

厚生労働科学研究費補助金

免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業

関節リウマチにおける間質性肺病変発症に関わる遺伝子の探索

平成 18 年度 総括研究報告書

主任研究者 島 田 浩 太

平成 19 (2007) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書

関節リウマチにおける間質性肺病変発症に関わる遺伝子の探索 島田浩太	1
--------------------------------------	---

II. 分担研究報告書

1. 候補パスウェイ遺伝子群における疾患関連多型解析方法の検討 山田 亮	12
2. 関節リウマチにおけるメトトレキサート肺炎の高分解能 CT による評価方法の検討 松井利浩	15
3. 関節リウマチ 152 例における間質性肺疾患罹患状況の検討 田中良一	19

関節リウマチにおける間質性肺病変発症に関わる遺伝子の探索

主任研究者 島田浩太

独立行政法人 国立病院機構相模原病院 臨床研究センター リウマチ性疾患研究部 流動研究員

研究要旨：

近年の関節リウマチ（RA：rheumatoid arthritis）診療における種々の治療薬の格段の進歩にもかかわらず、RAにしばしば合併し生命予後に重大な影響を及ぼしうる間質性肺病変（ILD：interstitial lung diseases）の発症機序の解明や治療法の確立に関しては未だ不十分である。また、本邦 RA 患者では薬剤誘発性ILDの発症頻度が他国と比して著しく高いとの報告もあることから、RAに関連するILD発症機序の解析は極めて重要な研究課題である。対象である、ILD合併RA患者及び非合併RA患者より文書による同意を得たのち、末梢静脈血約7mlを採取、DNAを抽出する。ILDの合併の有無については原則、胸部高分解能（HR）CTに基づいて評価を行う。採取したゲノムDNA検体については、諸報告にてこれまでに特異性を含めたILDの病態に関連が示唆されている分子、およびこれにパスウェイ上で関連する分子の遺伝子を対象とした一塩基多型（SNP：single-nucleotide polymorphism）解析を行う。今年度は本課題遂行に必要な、下記検討を進めた。

(1)DNA 検体収集体制の確立：今年度は、相模原病院、東大病院、京大病院、道後温泉病院において、対象患者の研究参加について、また、京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター（以下、京大ゲノム医学センター）においては、DNA 検体受け入れについての倫理的側面が、各施設の倫理委員会にて審議に付され、同意患者からの末梢血検体採取および京大ゲノム医学センターでの検体保存・解析が承認された。平行して採血体制の整備が行われ、京大病院、道後温泉病院、相模原病院にて検体採取が開始され、計1432検体を収集した。

(2)対象患者の選定作業：各施設において、本課題の解析対象となるILD合併RA症例および非合併RA症例のリストアップを進めた。相模原病院では通院中のRA患者中、HRCT上明らかなILD合併を有するRA98例、HRCT上明らかにILD合併が認められない126例（対照群）が認められ、症例検討を進めている。東大病院においては152例のRA患者において画像の検討が行われ、19例のILD合併RA症例（画像の検討できた145例中13.1%）とILD非合併例60例が認められた。

(3)候補パスウェイ遺伝子群における疾患関連多型解析方法の検討：任意の数の遺伝子に認められた任意の数のSNPについて、定式化したハプロタイプロタギングSNPのリスト化アプリケーションを作成した。また、そのようにして得られたSNPリストについてジェノタイプング実験デザインを行うために必要な情報を公共データベースより抽出し、デザインアプリケーション用のフォーマットで出力するルーチンを作成した。また、小・中規模なパスウェイとそのSNPセットについて、総合的帰無仮説検定を実施するアプリケーションを作成した。

(4)薬剤性肺炎の画像評価方法の検討：臨床的メトトレキサート（MTX）肺炎13症例の検討を(1)用語の統一、(2)用語の解釈の統一、(3)読影スライスの統一、(4)共通ワークシートの使用、(5)複数の専門家による独立した読影、(6)討議による最終的な統一見解、の手順で評価し、MTX肺炎の高分解能CT所見として以下の特徴を得た。すなわち、びまん性または斑状、肺の中枢から末梢にかけての広がり、すりガラス影主体、上肺野優位、牽引性気管支拡張などの構造改変を伴うものは少ないこと、であった。

RA患者中、CTにて明らかなILD合併が認められるのは10%内外と少数であり、十分な検体数を収集するには多施設の協力が望ましい。本課題においては既に複数の施設の協力を得、臨床情報およびDNA検体の収集を開始、これまでにRA患者1463検体を収集しさらに継続中である。

分担研究者

杉井章二

(独) 国立病院機構相模原病院リハビリテーション科医師

田中良一

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻

アレルギーリウマチ学助手

山田 亮

京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター

疾患ゲノム疫学解析分野助教授

研究協力者

中込一之

東京大学医学部附属病院

アレルギーリウマチ内科医員

大村浩一郎

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学助手

松田文彦

京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター

医学センター疾患ゲノム疫学解析分野教授

高杉 潔

医療法人千寿会道後温泉病院理事長

高地雄太

(独) 理化学研究所遺伝子多型研究センター

関節リウマチ関連遺伝子研究チーム

當間重人

(独) 国立病院機構相模原病院臨床研究センター

リウマチ性疾患研究部長

小澤義典

(独) 国立病院機構相模原病院リウマチ科医長

松井利浩

(独) 国立病院機構相模原病院リウマチ科医師

中山久徳

(独) 国立病院機構相模原病院リウマチ科医師

池中達央

(独) 国立病院機構相模原病院リウマチ科医師

道下和也

(独) 国立病院機構相模原病院リウマチ科医師

A. 研究目的

近年の関節リウマチ (RA : rheumatoid arthritis) 治療は、種々の抗リウマチ薬や生物学的製剤の適切な投与により格段の進歩をみせており、特に関節破壊抑制効果に関しては極めて良好な結果が報告されている。しかしながら、RA にしばしば合併する間質性肺病変=ILD は生命予後に重大な影響を及ぼしうる状態であるにもかかわらず、その発症機序の解明や治療法の確立に関しては未だ不十分である。ILD は諸報告により RA の 5~40%と高率に合併することが知られている。RA 患者の死因においても、ILD は 11.2%を占め、感染性肺炎 10.5%とともにもっとも大きな死因の一つであるという報告もなされている(黒坂ら、2005)。また、メトトレキサート、他黒リムス、レフルノミドといった近年効果が期待されている抗リウマチ薬では既存のILDが薬剤性肺障害の危険因子であるとされている。さらに、実に本邦において処方可能な抗リウマチ薬のほとんどに副作用としてILDが記載されている(表1)。また、本邦では薬剤誘発性ILDの発症頻度が著しく高いと報告されている(工藤、2006)。以上から、RAに関連するILDの発症機序の解析はきわめて重要であり、本課題ではRAにおけるILDの発症に関わる遺伝的素因の探索を行うことを目的としている。

B. 研究方法

本課題はILD合併RA患者及び非合併RA患者を対象とする。RA患者については、他の膠原病の合併例は対象外とする。ただし、シェーグレン症候群の合併例は対象とする。ILDとしては、UIP(usual interstitial pneumonia)パターンおよびNSIP(non-specific interstitial pneumonia)パターンを対象とし、COP(cryptogenic organizing pneumonia, 以前のBOOP(bronchiolitis obliterans organizing pneumonia))パターンは本課題では除外する。また、これらとは別に薬剤性肺炎症例については、これらを対象とする。独立行政法人国立病院機構相模原

病院（以下、相模原病院）リウマチ科、東京大学医学部附属病院（以下、東大病院）アレルギーリウマチ内科、京都大学医学部附属病院（以下、京大病院）免疫・膠原病内科、医療法人千寿会道後温泉病院リウマチセンター（以下、道後温泉病院）に通院中の RA 患者より文書による同意を得たのち、末梢静脈血約 7ml を採取、DNA を抽出する。各症例についてはILDの合併の有無について原則、胸部高分解能（HR）CT に基づいた評価を行うほか、表 2 に示す臨床情報を収集する。採取したゲノム DNA 検体については、一塩基多型（SNP：single-nucleotide polymorphism）解析を行う。この際、本課題の規模から網羅的検索は適しにくく、動物モデルおよび患者検体での検討においてこれまでに特異性を含めたILDの病態に関連が示唆されている分子、およびこれにパスウェイ上で関連する分子の遺伝子を対象とする。候補パスウェイ遺伝子群は、WEB 上に公開されているパスウェイマップ（KEGG：Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）（図 1）およびILD関連文献における記載をもとにリストアップを行う。これら候補パスウェイ遺伝子群については個々の遺伝子に同定されている一塩基多型群に公表されているデータを利用して、ハプロタイプ-タギングを抽出し、ハプロタイプ-タギング SNP について総合的帰無仮説の棄却検定方法を定め、その SNP に対して得られたケース-コントロールジェノタイプデータにパーミュテーションテストの手法を適用して統計的有意差検定を行うことを想定している。

C. 研究結果

今年度は本課題遂行に必要な、DNA 検体収集体制の確立、対象患者の選定作業、疾患関連多型解析方法の検討、薬剤性肺炎に画像評価法の検討を進めた。

1. DNA 検体収集体制の確立

（島田、田中（中込）、山田（大村、高杉）

本課題は遺伝子を扱う臨床研究であり、特に倫理的側面には配慮を要する。今年度は、相模原病院、東大病院、京大病院、道後温泉病院において、対象患者の研究参加について、また、京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター（以下、京大ゲノム医学センター）においては、DNA 検体受け入れについての倫理的側面が、各施設の倫理委員会にて審議に付され、独立行政法人国立病院機構相模原病院リウマチ科、および京都大学医学部附属病院免疫・膠原病内科における文書による説明ののち文書による同意を得た患者からの末梢血検体採取および京大ゲノム医学センターでの検体保存・解析が承認された。平行して採血体制の整備が行われ、京大病院（18年8月8日）、道後温泉病院（同10月2日）、相模原病院（同12月4日）にて検体採取が開始された（括弧内は開始日）。原稿提出日現在、京大病院 343 検体、道後温泉病院 166 検体、相模原病院 954 検体、合計 1463 検体が収集されており、なお継続中である。東京大学医学部附属病院においては倫理委員会の承認が得られ、近日中に採血を開始する予定である（表 4）。

2. 対象患者の選定作業

（島田（當間、小澤、松井、中山、池中、道下）、杉井、田中（中込）、山田（大村、高杉）

各施設において、本課題の解析対象となるILD合併 RA 症例および非合併 RA 症例のリストアップを進めた（図 2）。今年度は相模原病院通院中の RA 患者中、HRCT 上明らかなILD合併を有する RA98 例、HRCT 上明らかにILD合併が認められない 126 例（対照群）が認められており、さらに症例検討を進めている。東大病院においては 152 例の RA 患者において画像の検討が行われ、19 例のILD合併 RA 症例（画像の検討できた 145 例中 13.1%）とILD非合併例 60 例が認められている。

また、アンケート法を用いた生活・職業歴の収集を開始した(図3)。

3. 候補パスウェイ遺伝子群における疾患関連多型解析方法の検討

(山田(高地、松田))

任意の数の遺伝子に認められた任意の数の SNP について、定式化したハプロタイプロタギング SNP のリスト化アプリケーションを作成した。また、そのようにして得られた SNP リストについてジェノタイピング実験デザインを行うために必要な情報を公共データベースより抽出し、デザインアプリケーション用のフォーマットで出力するルーチンを作成した。また、小・中規模なパスウェイとその SNP セットについて、総合的帰無仮説検定を実施するアプリケーションを作成した。

4. 薬剤性肺炎の画像評価方法の検討

(杉井(中込))

臨床的メトトレキサート(MTX)肺炎13症例の検討を(1)用語の統一、(2)用語の解釈の統一、(3)読影スライスの統一、(4)共通ワークシートの使用、(5)複数の専門家による独立した読影、(6)討議による最終的な統一見解、の手順で評価し、MTX肺炎の高分解能CT所見として以下の特徴を得た。すなわち、びまん性または斑状、肺の中核から末梢にかけての広がり、すりガラス影主体、上肺野優位、牽引性気管支拡張などの構造改変を伴うものは少ないこと、であった。

D. 考察

RA患者中、CTにて明らかなILD合併が認められるのは10%内外と少数であり、十分な検体数を収集するには多施設の協力が望ましいと考えられる。本課題においては既に複数の施設の協力を得、臨床情報およびDNA検体の収集を開始して

いる。また、MTX肺炎について比較的特徴的なCT所見を得られたことは、本課題における薬剤性肺炎の検討につながるものである。

E. 結論

各施設における検体採取が開始されつつあり、これまでにRA患者1463検体を得ており、さらに継続中である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsui T, Shimada K, Tohma S. Anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatic diseases other than rheumatoid arthritis. Clin Rheumatol. 2006 Jul;25(4):610-1.
2. Toshihiro Matsui, Kota Shimada, Naoko Ozawa, Hiromi Hayakawa, Futoshi Hagiwara, Hisanori Nakayama, Shoji Sugii, Yoshinori Ozawa, and Shigeto Tohma. Diagnostic Utility of Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies for Very Early Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol 33:2390-2397, 2006
3. Toshihiro Matsui, Kayoko Osumi, Naoko Ozawa, Kota Shimada, Shuji Sumitomo, Kenichi Shimane, Misato Kawakami, Hisanori Nakayama, Shoji Sugii, Yoshinori Ozawa, and Shigeto Tohma. CD64 on Neutrophils is a Sensitive and Specific Marker for Detection of Infection in Patients with Rheumatoid Arthritis. J Rheumatol 33:2416-2424, 2006

4. Kota Shimada, Toshihiro Matsui, Misato Kawakami, Hisanori Nakayama, Yoshinori Ozawa, Hiroyuki Mitomi and Shigeto Tohma. Methotrexate-related Lymphomatoid Granulomatosis: A Case Report of Spontaneous Regression of Large Tumors in Multiple Organs After Cessation of Methotrexate Therapy in Rheumatoid Arthritis. Scand J Rheumatol 36:64, 2007
- 2.学会発表
1. Kota Shimada, Futoshi Hagiwara, Hiromi Hayakawa, Shuji Sumitomo, Kenichi Shimane, Tatsuo Ikenaka, Takahiro Yamada, Misato Kawakami, Hisanori Nakayama, Toshihiro Matsui, Shoji Sugii, Yoshinori Ozawa, Shigeto Tohma. Optimal Cutoff Values of Serum KL-6 and Surfactant Protein D for Diagnosis of and Prediction of Acute Development of Interstitial Lung Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis. ACR 2006, Nov. 2006. Washington DC, USA.
 2. Toshihiro Matsui, Kota Shimada, Futoshi Hagiwara, Hisanori Nakayama, Shoji Sugii, Yoshinori Ozawa, Shigeto Tohma. Combination of Anti-CCP Antibody and Rheumatoid Factor is Useful for a Diagnosis of Very Early RA. ACR 2006, Nov. 2006. Washington DC, USA.
 3. Toshihiro Matsui, Atsushi Kaneko, Kota Shimada, Shigeto Tohma. DAS28-CRP Overestimates the Disease Activity of RA Compared with DAS28-ESR. ACR 2006, Nov. 2006. Washington DC, USA.
 4. Hisanori Nakayama, Futoshi Hagiwara, Kota Shimada, Shoji Sugii, Toshihiro Matsui, Yoshinori Ozawa, Shigeto Tohma. Three-Year Effects of Bisphosphonates on Treatment of Osteoporosis and on Reducing the Risk for Vertebral Fractures of Rheumatoid Arthritis Patients.(fracture intervention trial) ACR 2006, Nov. 2006. Washington DC, USA.
 5. 島田浩太、松井利浩、藤田英樹、川上美里、池中達央、山田高広、中山久徳、小澤義典、當間重人. リウマトイド因子陰性関節リウマチに生じた Rheumatoid Neutrophilic Dermatitis の一例, ポスターセッション, 第 50 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 18 年 4 月 24 日. 長崎
 6. 島田浩太、朝比奈昭彦、松井利浩、山澤美緒子、川上美里、池中達央、山田高広、中山久徳、小澤義典、當間重人. 皮疹・関節炎ともにインフリキシマブが著効した膿疱性乾癬・乾癬性関節炎の一例, ポスターセッション, 第 50 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 18 年 4 月 24 日. 長崎
 7. 島田浩太、松井利浩、當間重人. DAS(Disease Activity Score)28 でみた関節リウマチ(RA)活動性の季節性推移, ワークショップ, 第 50 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 18 年 4 月 26 日. 長崎
 8. 島田浩太、松井利浩、當間重人. 関節リウマチ (RA) 患者の入院頻度とその原因 (4029 例における検討), ワークショップ, 第 50 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 18 年 4 月 26 日. 長崎
 9. 當間重人、萩原太、早川洋美、住友秀次、島

- 根謙一、池中達央、山田高広、川上美里、島田浩太、中山久徳、松井利浩、杉井章二、小澤義典. 関節リウマチ患者の間質性肺病変合併診断における血清マーカー(KL-6, SP-D)の至適カットオフ値の検討. ワークショップ, 第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成18年4月26日. 長崎
10. 川上美里、島田浩太、松井利浩、中山久徳、小澤義典、當間重人. 関節リウマチに対するメトトレキサート療法中に発症し、同剤中止により自然軽快した lymphomatoid granulomatosis の一例, ポスターセッション, 第50回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成18年4月24日. 長崎
11. 松井利浩、島田浩太、當間重人. DAS28でみたRA活動性の季節性推移(第2報), 一般演題, 第71回日本温泉気候物理医学会総会, 平成18年5月26日, 札幌・定山溪. 抄録: 日本温泉気候物理医学会雑誌 70:30, 2006
12. 島田浩太、松井利浩、當間重人. 関節リウマチ患者の入院頻度とその原因—4026例における検討—, ポスターセッション, 第60回国立病院総合医学会, 平成18年9月23日, 京都
13. 當間重人、萩原太、早川洋美、池中達央、道下和也、島田浩太、中山久徳、松井利浩、杉井章二、小澤義典. 関節リウマチ患者の間質性肺病変合併診断における血清マーカーの至適カットオフ値は従来の値より低い. ポスターセッション, 第60回国立病院総合医学会, 平成18年9月22日, 京都
14. 當間重人、萩原太、早川洋美、池中達央、道下和也、島田浩太、中山久徳、松井利浩、杉井章二、小澤義典. 関節リウマチ患者において「KL-6高値」「SP-D高値」「肺間質性病変」は、間質性肺病変増悪の危険因子だ. ポスターセッション, 第60回国立病院総合医学会, 平成18年9月22日, 京都
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

表 1. 副作用としてILDが記載されている抗リウマチ薬(各添付文書による)

D-ペニシラミン	金チオリンゴ酸ナトリウム
アクタリット	オーラノフィン
ブシラミン	ミゾリビン
サラゾスルファピリジン	インフリキシマブ
メトトレキサート	エタネルセプト
レフルノミド	タクロリムス*

*「間質性肺炎の悪化」

図 1. KEGG 上のパスウェイマップ (例として TGFβ を掲げた。)

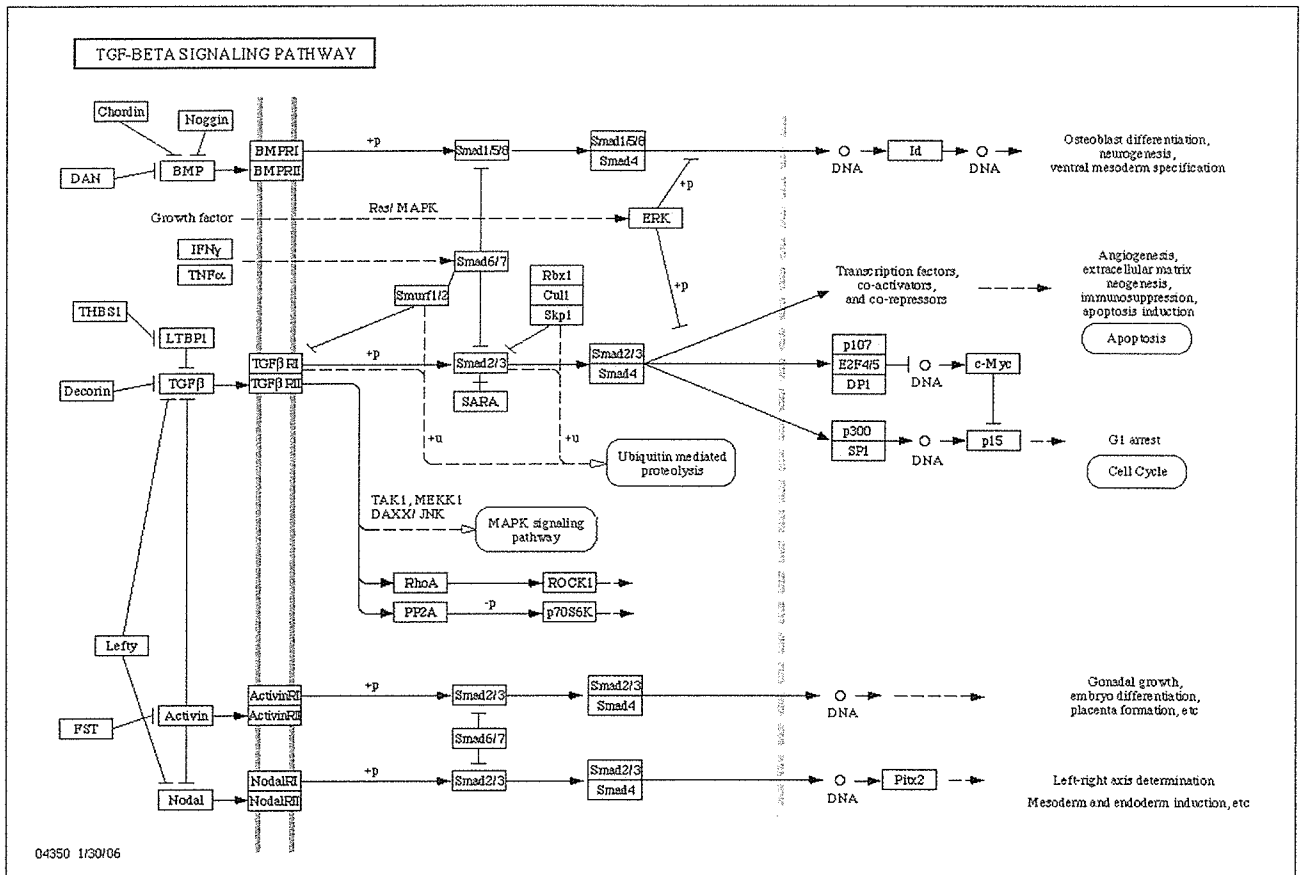


表 2. 収集する臨床情報

【1】基本情報

- ・生年月日
- ・性別
- ・RA発症年月
- ・RAのStage
- ・RAのClass

【2】生活歴

- ・喫煙の有無
- ・鳥飼育歴
- ・羽毛布団の使用歴
- ・無機・有機粉塵曝露歴
- ・乳癌等胸部放射線療法歴

【3】画像所見

- ・画像分類（「A」～「H」および「X」～「Z」のいずれか）（表 2 参照）
- ・撮像日：「A」～「H」について、根拠となる画像の撮像年月日。

【4】付帯情報

- ・薬剤性肺炎歴の有無
- ・間質性肺病変急性増悪歴の有無
- ・現存間質性肺病変についての他の診断の有無とその診断（ILD症例のみ）

表 3. 画像所見の分類

「A」：HRCT上、間質性肺病変の所見^{*1}が認められ、所見が最大となるスライスにおいてその病変の短径が2cm以上であるもの^{*2}。

「B」：HRCT未撮像であるもののうち、HRでない胸部CT上、間質性肺病変の所見が認められ、所見が最大となるスライスにおいてその病変の短径が2cm以上であるもの^{*2}。

「C」：HRCT上、間質性肺病変の所見^{*1}が認められるが、所見が最大となるスライスにおいてもその病変の短径が2cmに満たないもの^{*2}。

「D」：HRCT未撮像であるもののうち、HRでないCT上、間質性肺病変の所見が認められるが、所見が最大となるスライスにおいてもその病変の短径が2cmに満たないもの^{*2}。

「E」：HRCT、HRでないCTいずれも撮像されていず、胸部単純レントゲンにて明らかな間質性肺病変の所見が認められるもの。

「F」：HRCT、HRでないCTいずれも撮像されていず、胸部単純レントゲン上肺病変の所見が認められないもの。

「G」：HRCT未撮像であるもののうち、HRでないCT上、肺病変の所見が見られないもの。

「H」：HRCT上、肺病変の所見が見られないもの。

「X」：HRCT上評価・分類困難（含：気管支拡張症主とする症例、細気管支病変主とする症例、肺気腫を主とする症例、BOOP(COP)パターン症例）

「Y」：HRCT撮像なく、従来CT上評価・分類困難（同上）

「Z」：CT撮像なく、CXR上評価・分類困難（同上）

註

*1：すりガラス影、小葉間隔壁の肥厚、小葉内網状陰影、牽引性気管支拡張、structural distortion、蜂巢肺、末梢血管影の不規則な腫大、細気管支拡張像を伴う高度の肺野高吸収域、不正な小葉間隔壁肥厚像及び小葉内間質肥厚像、胸膜下線状影、浸潤影、のいずれかまたはいくつかからなり、総合的に間質性肺病変と考えられるもの。

*2：間質性肺病変の所見を主たる変化とする画像については、気腫性病変所見、気管支拡張所見、細気管支病変所見を伴っていても、「A」～「D」に分類することとする。

表 4. 各施設ゲノム検体収集状況

施設	収集開始日	収集済検体数
京大	2006年8月8日	343
道後	2006年10月2日	166
相模原	2006年12月4日	954
東大	開始準備中	-
計	-	1463

図2. 画像所見分類フローチャート

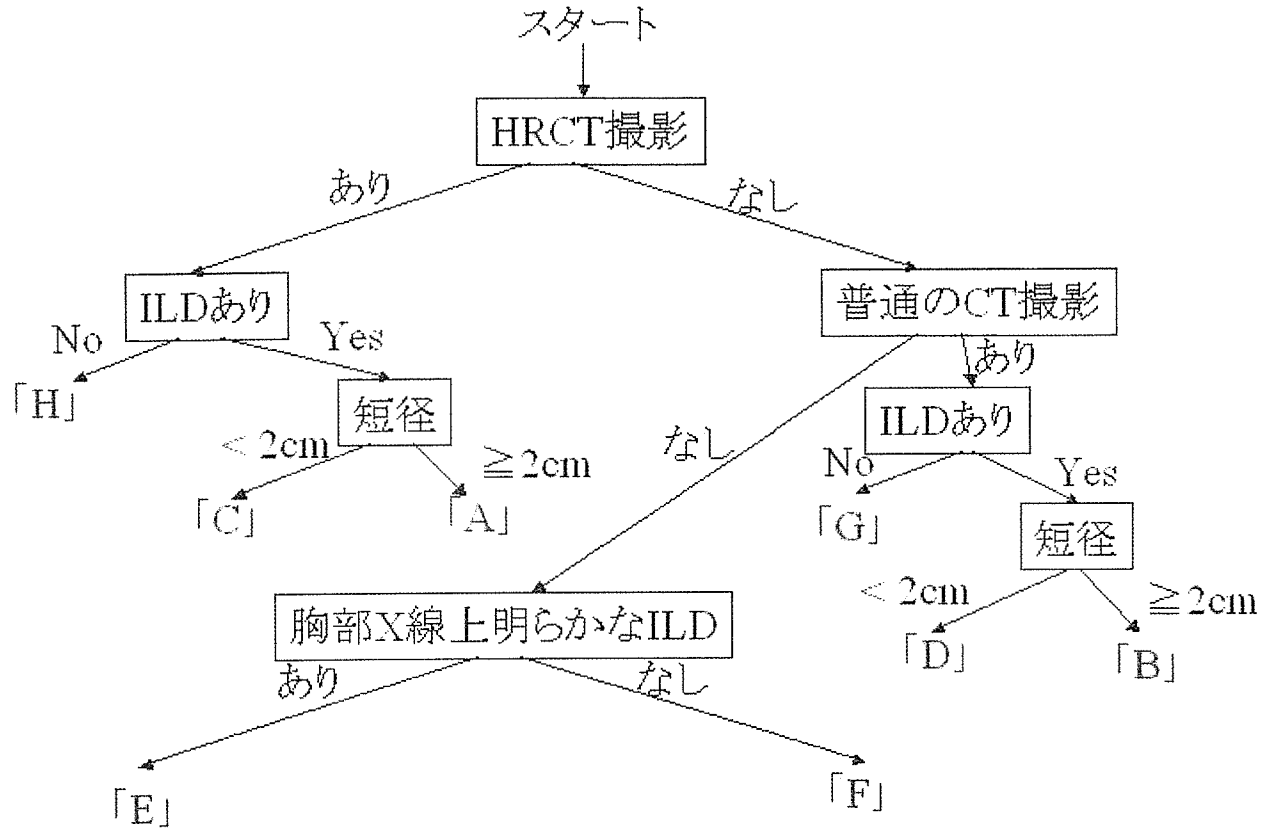


図3. 生活・職業歴収集用アンケート用紙

アンケートのお願い

大変お手数ではございますが、以下のアンケートにお答えいただきたく、よろしくお願いいたします。

1. たばこは吸いますか？（あてはまるもの1つを選んで○印をつけてください。）
 - A. 吸わない。
 - B. 以前は吸ったが今は吸わない。
 - C. 現在吸っている。

2. たばこを吸っている方・吸ったことのある方にお尋ねします。1日に吸う（吸った）本数と吸った年数をおしえてください。

1日_____本、_____年間

3. 鳥を飼っていますか？（あてはまるもの1つを選んで○印をつけてください。）
 - A. 飼ったことはない。
 - B. 以前は飼っていたが今は飼っていない。
 - C. 現在飼っている。

4. 羽毛布団をつかっていますか？（あてはまるもの1つを選んで○印をつけてください。）
 - A. つかったことはない。
 - B. 以前は使っていたが今は使っていない。
 - C. 現在使っている。
 - D. わからない。

5. 粉じん*の多い環境で働いていますか？（あてはまるもの1つを選んで○印をつけてください。）
（*「粉じん」とは、金属、岩石、木材などからなる、粉のように細かいちりのことです。）
 - A. いたことはない。
 - B. 以前は粉じんの多い環境で働いたことがあるが今はそうでない。
 - C. 現在粉じんの多い環境で働いている。

6. 乳癌など、胸部に放射線治療を受けたことがありますか？（あてはまるもの1つを選んで○印をつけてください。）
 - A. 受けたことはない。
 - B. 以前受けたことがあるが今は受けていない。
 - C. 現在受けている。
 - D. わからない。

ご協力ありがとうございました。

○○病院○○科

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担研究報告書

候補パスウェイ遺伝子群における疾患関連多型解析方法の検討

分担研究者 山田 亮 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 疾患ゲノム疫学解析分野 助教授
研究協力者 松田文彦 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 疾患ゲノム疫学解析分野 教授
研究協力者 高地雄太 (独) 理化学研究所遺伝子多型研究センター 関節リウマチ関連遺伝子研究チーム 研究員

研究要旨: 関節リウマチ患者における間質性肺炎発症に関わる遺伝子多型をパスウェイ単位で解析する。パスウェイ単位で解析するにあたっては、マルチプルテストिंगの評価が不可欠である。

機能パスウェイを構成する複数遺伝子について、疾患との関連を探索することは、疾患関連遺伝子標的を設定する一方法として認知されている。しかしながら、複数遺伝子に存在する複数遺伝子多型について総合的に形質関連を検出する手法は確立されていない。本課題では、個々の遺伝子に同定されている一塩基多型(SNP)群に公表されているデータを利用して、ハプロタイプ-タギングを抽出し、ハプロタイプ-タギング SNP について総合的帰無仮説の棄却検定方法を定め、その SNP に対して得られたケース-コントロールジェノタイプデータにパーミュテーションテストの手法を適用して統計的有意差検定を行うことを想定している。分担研究者はその解析戦略に準じた解析アプリケーションを作成する。

任意の数の遺伝子に認められた任意の数の SNP について、定式化したハプロタイプ-タギング SNP のリスト化アプリケーションを作成した。また、そのようにして得られた SNP リストについてジェノタイプ実験デザインを行うために必要な情報を公共データベースより抽出し、デザインアプリケーション用のフォーマットで出力するルーチンを作成した。また、小・中規模なパスウェイとその SNP セットについて、総合的帰無仮説検定を実施するアプリケーションを作成した。

現時点で作成を終えたアプリケーションは、個別の SNP についてのケース・コントロール関連検定をマルチプルテストिंगの文脈で解釈し、総合的帰無仮説検定を行うものであるが、これに引き続き、ハプロタイプ単位での関連検定についてのマルチプルテストिंग、遺伝子-遺伝子相互作用を加味したマルチプルテストिंगを組み込むことが必要になるものと思われる。

A. 研究目的

関節リウマチの1合併症である間質性肺炎の併発およびその進行に関与する遺伝因子の探索を、1塩基多型(SNP)を用いて実施するために必要な遺伝統計学的・バイオインフォマティクスの解析ツールの開発および、実装を行い、解析支援を行うとともに、実際に遺伝子多型データを産出・保管し、開発ツールを適用し、データの解釈を行う。

研究戦略は候補遺伝子アプローチであるので、本年度は、候補遺伝子選択および、候補遺伝子上の解析対象多型選択のための論理策定とツール作成を行った。また、SNP データを登録するデータベースを構築し、連鎖不平衡マッピングのための基礎的な公開解析ツールの実装を行うとともに

に、公開解析ツールの不備を補うべくカスタマイズのデザインを策定し、実装する。

B. 研究方法と実装

(1) 候補遺伝子の選択

RA および RA 関連間質性肺炎について既知事項から、遺伝素因を持ち得る機能パスウェイ特定し、それを解析対象として定める。機能パスウェイには複数の遺伝子が所属し、また、複数の機能パスウェイに属する分子が存在することから、ひとつの機能パスウェイは、別の機能パスウェイとネットワーク状に連絡しうる。現在では、ある遺伝子を端緒にその機能的つながりをたどろうとすると、非常に巨大な分子-分子ネットワークを通じて、膨大な数の分子となんらかの関係を持つ

ことが示される。本研究課題では、この分子間分子ネットワークをグラフとしてとらえ、グラフ理論を用いて、ある分子・もしくはある限局的な機能パスウェイから、任意の距離にある分子部分集合を、一定の規則で抽出し、それを、解析対象遺伝子リストとする手法を開発する。

(2) タイピング候補多型の選択

解析候補遺伝子について、公共 SNP データベース dbSNP(NCBI)から SNP リストを抽出し、その SNP について HapMap プロジェクトにおける日本人データを用いて、各遺伝子のハプロタイプを標準的なハプロタイプ推定アプリケーション fastPhase によって推定し、推定ハプロタイプのうち、一定頻度以上のものを識別する haplotype-tagging SNP のセットを minimal haplotype tagging 法によって確定した。さらに、実際に SNP ジェノタイピングアッセイを組むためには、一定の数の SNP をパネル化することが必要となることが多く、パネル化にあたっては、SNP タイピングアッセイプロトコルごとに実験デザインの可否条件が異なることから、その条件を加味して、最終的にデザイン可能であり、かつ、一定識別条件を持ち、かつ、ちょうど規定数の SNP リストを作成することが求められる。本研究では、識別ハプロタイプ頻度をパラメタ化し、それを増減することにより、この実用上のリスト作成過程を半自動化し、複数のアッセイプロトコルに対応することを実現した。

(3) SNP タイピングデータの複合検定

同一パスウェイ上の複数の遺伝子について、検定した複数の SNP は、同一の仮説に対する複数の検定であるとみなすことができる。本研究では、解析対象パスウェイに対して複数の多型をマーカーとして用いて、複数の検定を実施したものとして、オムニバスパーミュテーションテスト手法により、総合的棄却域を定め、個別の SNP についてもマルチプルテスト補正後の P 値を与える手法を実装した。パーミュテーションテスト補

正においては、SNP データ補正法として、常用されている Tippette 補正関数のほかに、一般的なマルチプルテスト関数としてよく用いられる Fisher 関数他、計 3 関数を用いるものとした。

C. 考察

今年度の成果により、一般的に、特定パスウェイ、もしくは特定分子を指定することにより、任意の大きさの遺伝子リストを定型的に作成することが可能となり、また、任意の数の最適解析 SNP リストの作成が可能となった。また、そのようにして対象とされた SNP について算出されたジェノタイプデータを包括的に検定する基盤の整理も終了した。

(4) SNP データ解析ツールの整備

本研究スタイルに合わせてカスタマイズした手法の開発・実装のほか、一般的な解析手法の実行環境も併せて整備した。整備手法は以下の通り。基本解析ツールリスト

- ・ Pairwise LD
 - r^2 を中心に D' を併用
- ・ LD block
 - Solid Spine of LD を中心に Gabriel 法、Four gamete test 法を併用
- ・ Recombination rate 推定
 - Coalescent model based-RJMCMC
- ・ Haplotype 推定
 - PLEM
 - SNP HAP
 - Phase
 - EM for 2-individual pooled data
- ・ 関連検定
 - 単一 SNP・ハプロタイプ アレル頻度分割表検定
 - ・ Fisher の正確確率検定(大規模データ対応)
 - 一般線形回帰法・尤度解析(尤度比検定とスコア検定)
 - Permutation 補正

- ・ Tippete 関数
- ・ Fisher 関数
- ・ Liptak logit 関数
- FDR 補正
- ・ TagSNP 選別
 - r2-greedy 法
 - Optinum solution 法

D. 結論

パスウェイベースの SNP 関連解析の基盤整理が終了した。実際の遺伝子リスト・SNP リストを作成し、タイピングアッセイの実施と検定に向けて、最適な標本確保とアッセイプロトコルの決定を待ち、解析を遂行していくこととする。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Gotoh N, Yamada R, Hiratani H, Renault V, Kuroiwa S, Monet M, et al. No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese. *Hum Genet.* 2006 Aug;120(1):139-43.
2. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, et al. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis.

2. 学会発表

1. Yamada, R. et al. Inference of polyphyletic SNP-ratio by zero-distance limit of fraction of SNP pairs in complete linkage disequilibrium. New Orleans, LA, USA, 2006
2. Yamada, R. Location-oriented extraction and visual presentation of association strength for case-control SNP genotype data in a candidate region. Poster presentation at Genetic Analysis Workshop 15, Tampa, FL, 2006
3. Yamada, R. et al. Multiple marker LD index of SNPs and the method to plot their pertinent components. Tampa, FL, USA, 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

関節リウマチにおけるメトトレキサート肺炎の高分解能 CT による評価方法の検討

分担研究者 杉井章二 独立行政法人 国立病院機構相模原病院 リハビリテーション科 医師

研究協力者 中込一之 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科 医員

研究要旨：関節リウマチの治療薬として用いられるメトトレキサート（以下、MTX）は、ときに、MTX肺炎と呼ばれる間質性肺病変を惹起する。一方、間質性肺病変の診断においては高分解能 CT が不可欠な検査となっている。本研究では、統一された読影方法を用いて MTX 肺炎 13 症例の画像所見の特徴を検討した。その結果、MTX 肺炎の画像所見としてびまん性または斑状に、肺の中樞から末梢にかけて分布し、上肺野優位が多いすりガラス影が主体で構造改変を伴うものは少ない画像所見の特徴が得られた。画像診断では、読影者によって使用する異なる用語・解釈が客観的な記述を困難とする。本研究では統一した読影方法によって MTX 肺炎の客観的な画像所見が得られた。この方法は、画像を対象とする研究一般に有用と考えられた。

A. 研究目的

現在、間質性肺炎の診断において CT、特に高分解能 CT（以下、HRCT）は不可欠な検査となっている。診療や研究において CT 上の間質性肺炎所見を比較・分類などの分析を行う際には、統一された読影方法によってのみ客観的な評価が可能となる。今回は、関節リウマチに対して用いられる薬剤の一つであるメトトレキサート（以下、MTX）が引き起こした MTX 肺炎の読影において統一読影方法を試みた。

B. 研究方法

複数の施設から MTX 肺炎の症例の臨床情報と CT を得た（全 14 症例）。

(1)所見の用語の統一：びまん性肺疾患の CT 所見でよく使用される用語を用いた。「すりガラス影」、「浸潤影」、「小葉間隔壁の肥厚」、「結節陰影」、「牽引性気管支拡張」、「structural distortion」、「蜂窩肺」、「嚢胞状陰影」、「肺気腫」、「気管支壁肥厚」、「気管支拡張」、「細気管支病変」、の全 12 個の用語での記述を行った。

(2)病変の広がりや強さの記述：(1)の所見は、1.大動脈弓レベル、2.気管支分岐部レベル、3.中間

気管支幹レベル、4.下肺静脈レベル、5.横隔膜直上レベル、の 5 つのスライスで評価された。一スライスにおける各所見の病変範囲は、「すりガラス影」と「浸潤影」に関しては、病変部の面積を 5 つのグレード（0：病変なし、1：<25%、2：25～50%、3：50～75%、4：>75%）に分けて評価した。面積など定量が困難である「小葉間隔壁の肥厚」や「結節陰影」などその他の所見については、一、十、十十、と主観的に病変の強さと広がりを記述した。

(3)読影者：読影は、びまん性肺疾患に詳しい放射線科医、呼吸器の専門医、リウマチ性疾患に合併する間質性肺炎の診療にあたっているリウマチ科医によって構成された。読影者は読影前に使用する CT 所見用語の見解を確認しあい、記述する統一のワークシートを作成した（図 1）。読影は読影者ごとに独立になされ、(1)(2)の所見・広がりを共通のワークシートに記入した。後日、読影者は一同に会し、討議の上、画像所見・診断の統一見解を得た。

C. 研究結果

14 症例の検討で 13 症例が MTX 肺炎と診断された。これらより MTX 肺炎の画像所見として以下の特徴を得た(図 2・3)。分布上の特徴は、「びまん性または斑状」で肺の「中枢から末梢にかけての広がり」を認める点であった(図 2)。画像所見としては「すりガラス影が主体」であり、「上肺野優位が多い」。「牽引性気管支拡張などの構造改変を伴うものは少ない」が特徴的であった(図 3)。

D. 考察

今回、MTX 肺炎の比較的特徴的な画像所見を得ることができた。間質性肺炎の画像所見では、読影者によって使用する用語が違ったり、所見の取り方や解釈が異なったりするため、客観性の高い記述が困難となる。今回、(1)用語の統一、(2)用語の解釈の統一、(3)読影スライスの統一、(4)共通ワークシートの使用、(5)複数の専門家による独立した読影、(6)討議による最終的な統一見解、により MTX 肺炎において、独善性を極力排した、より客観性の高い画像所見が得られたものと思われた。この方法は、画像を対象にした研究すべてに有用な方法であると思われる。

なお、今回得られた MTX 肺炎の画像の特徴からは「ニューモシスティス肺炎を画像だけで鑑別・除外することは困難」と考えられた。

E. 結論

MTX 肺炎の画像診断・解析に、統一的な画像読影方法を取り入れることで、比較的特徴的な MTX 肺炎所見を得ることができた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1.学会発表

1. 杉井章二. Rheumatoid Arthritis(RA) associated with complete AV block and severe mitral regurgitation(MR). 第 50 回日本リウマチ学会 学術集会. 2006 年 4 月 24 日、長崎
2. 杉井章二. 関節リウマチの治療薬と呼吸器関連副作用・MTX の効果と呼吸器関連副作用. イブニングシンポジウム. 第 46 回日本呼吸器学会学術集会. 2006 年 6 月 2 日、東京

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

図 1. 読影に用いた用紙

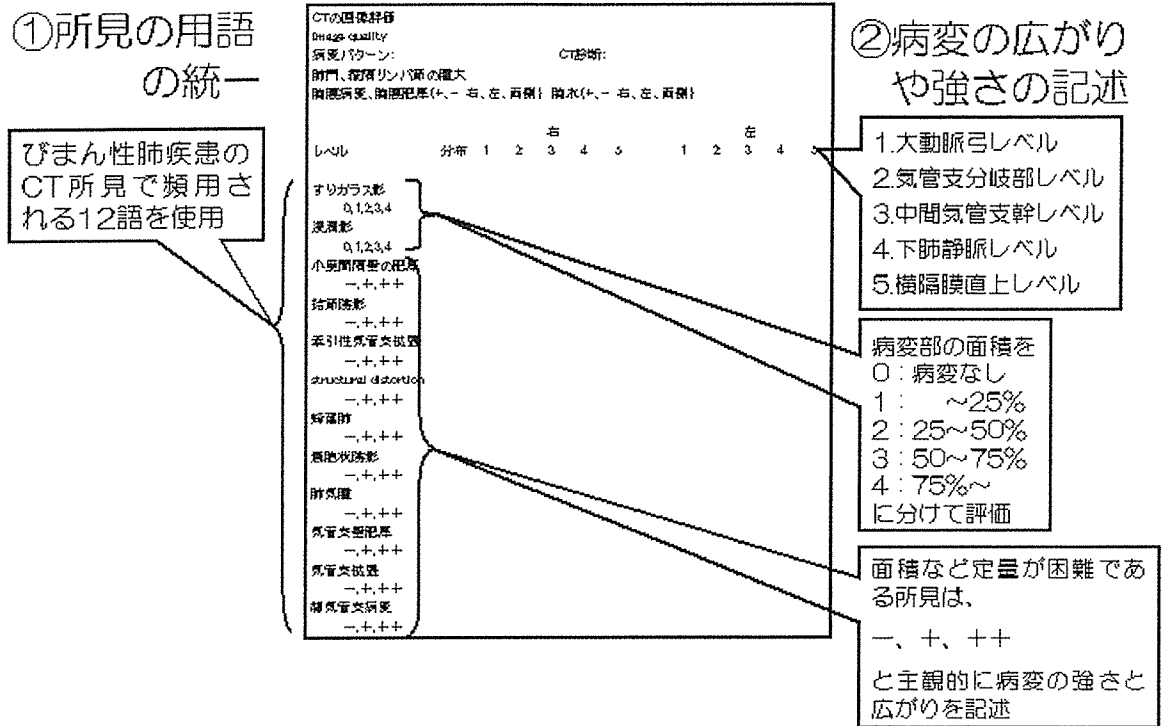
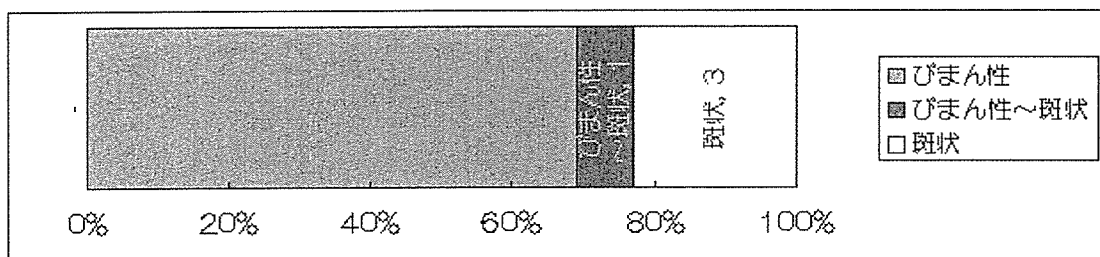


図 2. MTX 肺炎 13 症例の病変分布

びまん性が多い



肺の中樞から末梢にかけて広く分布

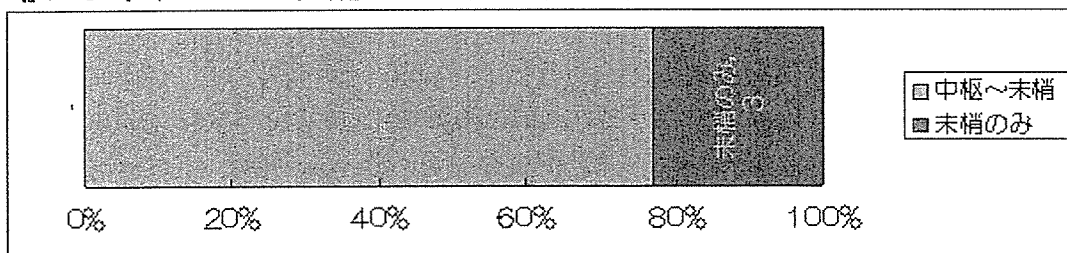
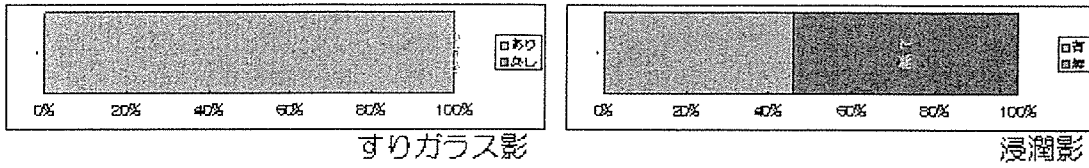
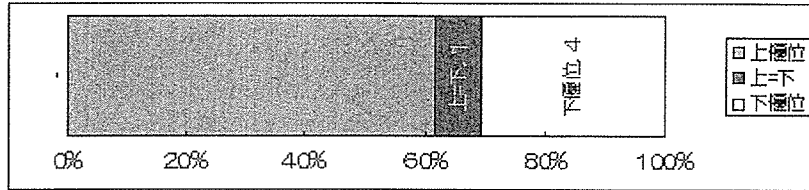


図 3. MTX 肺炎 13 症例の画像所見

すりガラス影が主体



上肺野優位が多い



牽引性気管支拡張等の構造改変を伴うものは少ない

