

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：ヒトゲノムテーラーメイド研究

関節リウマチ関連遺伝子の同定と
その機能解析、相互関連の研究

平成17～19年度 総合研究報告書

主任研究者 山本一彦

平成20年3月

目 次

I. 総合研究報告書

関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析、相互関連の研究 ----- 1

東京大学大学院医学系研究科内科学専攻 主任研究者 山本 一彦

関節リウマチの病態解析と生物学的製剤による

滑膜組織および骨軟骨組織に関する研究 ----- 7

東京女子医科大学東医療センター整形外科 井上 和彦

複合遺伝性疾患としての関節リウマチの遺伝因子解析の理論研究とその実践的活用 ----13

東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センター ゲノム機能解析分野

山田 亮

関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析、相互関連の研究 -----17

独立行政法人理化学研究所遺伝子多型研究センター 高地 雄太

Fcrl5 遺伝子欠損マウスの作成 -----23

東京大学医科学研究所ヒト疾患モデル研究センター細胞機能研究分野

岩倉 洋一郎

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----29

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----37

I. 総合研究報告

関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析、相互関連の研究

主任研究者 山本 一彦 東京大学大学院医学系研究科アレルギーリウマチ学

研究要旨 患者個人と社会に重大な影響を与えている関節リウマチの疾患感受性遺伝子をゲノムワイドの一塩基多型（SNP）関連解析で進めた結果、複数の遺伝子を同定した。これらの遺伝子の機能を詳細に分析することが、RAの病因の検索、新しい治療法の開発、オーダーメイド医療を推進するために重要と考えられる。そこで本研究では、個々の遺伝子の機能を解析することを中心に研究を進め、さらに患者情報との対比、遺伝子同士の相互作用などを検討するためのサンプル収集も推進した。

分担研究者

井上 和彦 東京女子医科大学東医療センター
教授

山田 亮 東京大学医科学研究所附属
ヒトゲノム解析センター ゲノム機能
解析分野 准教授

高地 雄太 理化学研究所横浜研究所
遺伝子多型研究センター 研究員

岩倉 洋一郎 東京大学医科学研究所ヒト疾患モ
デル研究センター細胞機能研究分野
教授、センター長

沢田 哲治 東京大学医学部附属病院
アレルギーリウマチ内科 助教

川畑 仁人 東京大学医学部附属病院
アレルギーリウマチ内科 助教

神田 浩子 東京大学医学部附属病院
アレルギーリウマチ内科 助教

藤尾 圭志 東京大学医学部附属病院
アレルギーリウマチ内科 助教

く示唆されている。遺伝的要因ではHLA-DRの解析が進んでいるが、これは全遺伝的要因の約1/3程度を説明するだけであり、それ以外の複数の遺伝的要因が関与していることが示唆されている。遺伝的要因は、疾患の発症と病態の進展に一義的に関与していることが推定されることから、遺伝的要因の解明がRAの病態や新しい治療法の開発につながると期待されている。しかし、種々の技術的な制約によりそれらを同定することは容易でなく、一般的に行われている候補遺伝子的なアプローチには限界がある。この点で、特定の遺伝子を想定せず、ゲノム上のすべての遺伝子についてその関与を検討する、いわゆる「仮説なしの全ゲノム解析」が1つの研究の方向と考えられるようになってきた。特にケース（患者集団）とコントロール（健常人集団）での多型頻度を比較する関連解析（genome wide association study）が今後の多因子疾患の解析に有望視されており、2007年には生命科学の最も著しいブレークスルーの分野の1つとされている（Science 318:1842, 2007）。

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）は原因不明の多発関節炎を主体とした全身性疾患であり、遺伝的影響が強

我々はこのような観点からゲノムワイドに一塩基多型（SNP）での関連解析を推進してい

る理化学研究所遺伝子多型研究センターと共同で、RA関連遺伝子としてPADI4, SLC22A4, RUNX1, FCRL3などを同定し報告した (Nature Genetics 34:395-402, 2003. Nature Genetics 35:341-348, 2003. Nature Genetics 37:478-485, 2005.)。しかし、これまでの研究はRAに関係する遺伝子の重要性を明らかにしただけであり、どうしてRAの病態と関係があるのか、複数の関連遺伝子間に相互作用があるのか、これらの遺伝子多型の組み合わせでRAの疾病としてタイプが異なるのか、治療薬に対する反応に違いがあるのか、などについては明らかでない。

そこで本研究では、それぞれの遺伝子の機能を詳細に探索し、その機能に関連する分子群とその遺伝子多型を明らかにすることを第1の目標とした。細胞への遺伝子移入や siRNA のよる機能抑制実験に加えて、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作成を進めた。さらに発症から経過が十分に把握できている症例のDNAサンプルを収集することを含めて、複数の関連遺伝子間の相互作用、HLA-DR 遺伝子型との関係を明らかにし、RA の疾患としてのタイプ分け、治療薬との反応など、ゲノム情報を今後の RA 診療に直結させるシステムを構築することを目標として研究を進めた。

B. 研究方法

1. 同定した RA 関連遺伝子機能解析

1) PADI4 遺伝子と RA の関係についての機能解析

PADI4 がシトルリン化する蛋白を同定する目的でcDNAライブラリーのスクリーニングなどを行い、数個の候補分子を同定した。またPADI4のノックアウトマウスの作成、B6へのバッククロスを進めた。さらに、ノックアウトマウスを用いてコラーゲン誘発関節炎モデルを作成し、その病変を解析した。また、このマウス

を用いて抗PADI4モノクローナル抗体を作成することを試みた。これを用いてPADI4を標的とした治療試薬として使用可能か否かを検討する予定である。さらに、PADI4の細胞内での役割を細胞生物学的手法を中心に研究した。

2) SLC22A4 と RA 炎症に関する機能解析

平成17年度に抗酸化物質であるエルゴチオネインがSLC22A4によりトランスポートされることがドイツのグループより報告された。エルゴチオネインは抗酸化作用により、細胞内のNF- κ Bを中心としたシグナル伝達に強く影響を与えることが予想された。そこで、SLC22A4を強発現する細胞株、siRNAにより発現抑制された細胞株を数種作成することに成功した。さらに細胞外に一定量のエルゴチオネインを添加することで、細胞の反応性と細胞内のエルゴチオネイン濃度の相関を検討した。標的細胞として単球を中心とした免疫担当細胞を用い、TNFなどの外部刺激によりIL-8などの遺伝子発現がどのように影響を受けるかを解析することで、SLC22A4の発現量と炎症、免疫応答の関係を明らかにすることを目標とした。

3) FCRL3 と自己免疫に関する解析

FCRL3の機能を明らかにするため、FCRL3のトランスジェニックマウスおよびノックアウトマウスを作成した。これらのマウスの免疫機能を詳細に調べた。またFCRL3に対するモノクローナル抗体により免疫応答の阻害が可能か、自己免疫疾患モデルが治療可能かを検討した。また、細胞へのシグナルを検討するため、細胞表面部分を機能の判明しているFc γ RIIB分子として、細胞内部分をFCRL3とするキメラ分子を作成し、細胞内へのシグナルの詳細を検討した。

2. 遺伝子相互作用の研究

2つ以上の遺伝子の組み合わせによる関連を検討した。具体的には既にゲノムワイドスク

リーニングのケース・コントロールで検出されている複数のSNPについて、それぞれの遺伝子型の複数の組み合わせで形成される遺伝子多型頻度をケース・コントロールで比較する作業を行い、疾患関連遺伝子として検出されうる多型の組み合わせを検討した。HLA-DRの遺伝子型についてもこれに加えて相互作用を解析した。

3. 臨床情報との関係の研究

新たなRA患者のDNAサンプルの収集の為に組織作りと倫理委員会への申請を行った。申請した研究計画に従い、RA発症より10年以上経過したRA患者群を対象に、リウマトイド因子、シトルリン化蛋白抗体(抗CCP抗体)、滑膜炎の指標であるMMP-3などの検査データ、X線検査による骨破壊の程度の評価、治療反応性などの臨床データとともにDNAサンプルの提供を受け、これらの層別化と遺伝子多型の比較を行う予定である。

倫理面への配慮

研究対象者には人権擁護上の配慮を行った上で、研究方法による不利益、危険性とそれらを排除する方法等について十分なインフォームドコンセントを行った。実験動物に対しては過度の苦痛を与えないなど、動物愛護上の十分な配慮を行った。なお、ヒトゲノム・遺伝子解析研究、免疫研究、並びに臨床研究に関する倫理指針等は徹底して遵守した。

C. 研究結果

1. 同定したRA関連遺伝子機能解析

現在、関節リウマチに最も特異性の高い自己抗体は抗シトルリン化蛋白抗体である。PADI4は蛋白のアルギニンをシトルリン化する酵素である。そこでライブラリーを用いたPADI4がシトルリン化する蛋白を同定を行った結果、

細胞外蛋白のI型コラーゲン、核内の転写因子であるeIF4G1など複数の蛋白を同定した。これらのリコンビナント蛋白を作成し、RA患者との反応を検討したところ、感度はそれぞれ50%程度であったが、特異度は90%以上であり、既に市販されているシトルリン化環状ペプチドと同等の特異度を示し、これらの蛋白が実際の免疫応答の標的になっていることが示された。すなわち、RAでは複数のシトルリン化された自己抗原が免疫応答の標的になっていることが明らかとなった。

PADI4のノックアウトマウスはほぼB6へのバッククロスが完成した。II型コラーゲンでの免疫を行ったが、現在のところ関節炎の頻度にコントロールと比較して差が見いだせていない。B6は関節炎を惹起しにくい系統であることから、より明らかな関節炎を惹起する方法を各種パラメータを変化させて検討する予定である。

SLC22A4に関しては、日本人の別の大規模コホートでのRAとの関連を追認した(論文投稿中)。しかし、機能研究については、siRNAを用いた研究を含めて、遺伝子導入細胞の不安定性によると思われる細胞内シグナルの結果のばらつきがあり、現在のところ明確な結論に到達できていない。しかし、SLC22A4は隣接するSLC22A5と共に炎症性腸疾患にも関連する遺伝子とされており、炎症との関係をより詳細に検討する必要があると思われる。

FCRL3については、細胞外を既にリガンドが分かっているFcγRIIBに置き換えたキメラ分子を作成し、細胞内ドメインのシグナル機能を検討した。その結果、FCRL3の細胞内ドメインは、B細胞受容体(BCR)とコライゲートした場合、主としてITIMとして働きBCRシグナルを抑制することで、Ca²⁺イオンの流入を抑制やアポトーシスを抑制していることが判明した(論文

投稿中)。FCRL3 がリンパ節のセントロサイトに強く発現していることを考えると、ここにおける自己反応性 B 細胞のネガティブな選択に重要な働きを担っている可能性が強い。

ヒト FCRL3 と相同の分子はマウスの Fcrl5 と考えられることから、この遺伝子のトランスジェニックマウスとノックアウトマウスを作成した。トランスジェニックマウスでは、T 細胞依存のおよび非依存の抗原に対する IgM の免疫応答が亢進していた。現在、ノックアウトマウスが完成し、B6 にバッククロスしている。

2. 遺伝子相互作用の研究

複数の遺伝子多型について試行をおこなったが、現存のプログラムとコンピュータでは解析時間が遅く、現実的でないことが判明、より良いシステムの開発が必要であることが判明した。

3. 臨床情報との関係の研究

DNA サンプルの充実、種々の患者の情報とともにリウマトイド因子、抗 CCP 抗体、HLA-DR のタイピングについて情報の充実を進めている。現在、RA のサンプルは 2000 以上となっている。

D. 考察

RA の遺伝要因の検索は世界的に進められており、候補遺伝子解析だけでなく全ゲノムを対象とした疾患遺伝子解析の必要性が提唱されている。これに関して、一遺伝子多型 (SNP) の解析を主体としたケース・コントロールの関連解析が注目され始め、ハプロタイプブロック解析などを加えながら、種々の疾患について世界的に解析が進められている。この患者集団と対照集団での頻度の差を解析する関連解析は、集団全体の組み換え情報が反映されるので、かなり狭い領域に責任領域を特定出来る可能性がある。この方法を用いて、我々は世界に先駆

けて RA 関連遺伝子を複数見だし報告している。

以上のようにケース・コントロール関連解析の有用性が最近 3 年ほどの間に世界的にも認識され、欧米でも政府プロジェクト、ベンチャーなどで盛んに行われるようになってきた。ただし、この方法は、ケースとコントロールの両集団が遺伝的に同質でないと偽陽性を生む可能性が高くなる。この点でわが国は比較的均一のゲノム構造であることが我々の試算でも明らかであり、欧米に比べて解析に有利であろうと考えられる。またこのように検出される疾患関連遺伝子には民族差があることも重要で、例えば PADI4 は日本、韓国では我々とは独立した研究組織による追試で確認されているが、英国では頻度差はあるが統計学的有意差を示すデータが得られていない。逆に米国から発表された RA 関連遺伝子 PTPN22 遺伝子多型は、日本人、中国人では多型そのものが存在しない。このような民族間の相互比較情報は重要である。そこで、米国、韓国、オランダなどの研究者とともに共同研究で短時間に情報交換するシステムを立ち上げつつある。

PADI はペプチド中のアルギニンをシトルリンに変換する酵素である。一方我々の解析とは別に欧州の研究者が抗シトルリン化自己抗体が RA に非常に特異性が高いことを報告していた。これら 2 つの研究から、現在では蛋白のシトルリン化とそれに対する免疫応答が RA の原因または増悪と密接に結びついていることが世界的にも認識されている。この分子と RA との関連を詳細に検討することが、RA の病因・病態を解析する上で極めて重要になると考えられる。

第 1 染色体の 1q23 領域に FCRL3 遺伝子を同定、報告した (Nature Genetics 37:478-485, 2005)。この遺伝子産物は成熟 B 細胞、特にリンパ節

の胚中心のセントロサイトに強く発現している。プロモーターに存在する遺伝子多型が発現量と相関し、これが自己抗体産生と強く関係していることが判明した。さらにRAだけでなく、全身性エリテマトーデスや自己免疫性甲状腺炎など複数の自己免疫疾患と関連していることが明らかになっている。今後、ノックアウトマウスの解析を加えて、より詳細な機能を明らかにしている必要がある。

E. 結論

患者個人と社会に重大な影響を与えているRAの疾患感受性遺伝子として、ゲノムワイドの一塩基多型 (SNP) 関連解析で進めた複数の遺伝子について遺伝子の機能を詳細に分析した。RAの病因の検索、新しい治療法の開発、オーダーメイド医療を推進するために重要と考えられる。さらに患者情報との対比、遺伝子同士の相互作用などを検討するためのサンプル収集も進めた。しかし、複数の遺伝情報の組み合わせを総合する解析ではより実用的なアルゴリズムの開発が必要であると思われた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ Yamamoto K, Yamada R. Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis. *N.Engl.J.Med.* 357:1250-1251, 2007.

・ Fujio K, Okamura T, Okamoto A, Yamamoto K. T cell receptor gene therapy for autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 10:222-232, 2007.

・ Fujio K, Okamura T, Okamoto A, Yamamoto K. T cell receptor and anti-inflammatory gene modulated T cells as therapy for auto immune

diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 1110:222-32, 2007.

・ Shoda H, Fujio K, Yamamoto K. Rheumatoid Arthritis and Interleukin-32. *Cell Mol Life Sci.* 30:398-403, 2007.

・ Yamaguchi Y, Fujio K, Shoda H, Okamoto A, Tsuno NH, Takahashi K, Yamamoto K. Interleukin-17B and interleukin-17C are associated with TNF-alpha production and contribute to the exacerbation of inflammatory arthritis. *J Immunol.* 179, 7128-36, 2007.

・ Yamamoto K, Okamoto A, Fujio K. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune diseases. *Expert Opin Biol Ther.* 7:359-367, 2007.

・ Suzukawa M, Komiya A, Yoshimura-Uchiyama C, Kawakami A, Koketsu R, Nagase H, Iikura M, Yamada H, Ra C, Ohta K, Yamamoto K, Yamaguchi M. IgE- and FcεRI-mediated enhancement of surface CD69 expression in basophils: role of low-level stimulation. *Int Arch Allergy Immunol.* 143:56-59, 2007.

・ Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, Nishimoto N, Miyasaka N, Sumida T, Shima Y, Takada K, Matsumoto I, Saito K, Koike T. A multicenter phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol.* 17:191-197, 2007.

・ Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci.* 1108:323-339, 2007.

・ Takizawa Y, Kanda H, Sato K, Kawahata K, Yamaguchi A, Uozaki H, Shimizu J, Tsuji S, Masaki Yoshikata, Yamamoto K. Polymyositis associated with focal mesangial proliferative glomerulonephritis with depositions of immune complexes. *Clin Rheumatol.* 26: 792-796, 2007.

・ Okunishi K, Dohi M, Fujio K, Nakagome K,

Tabata Y, Okasora T, Seki M, Shibuya M, Imamura M, Harada H, Tanaka R, Yamamoto K. Hepatocyte growth factor significantly suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol.* 179:5504-5513, 2007.

• Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, Yamamoto K. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 341:94-100, 2006.

• Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae SC, Tokuhira S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman KM, Kang CP, Kang C, Otsubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, Yamamoto K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genet.* 37:478-485, 2005.

• Chang X, Yamada R, Suzuki A, Sawada T, Yoshino S, Tokuhira S, Yamamoto K. Localization of peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) and citrullinated protein in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 44: 40-50, 2005.

• Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem Biophys Res Commun.* 327: 192-200, 2005.

• Kawaida R, Yamada R, Kobayashi K, Tokuhira S, Suzuki A, Kochi Y, Chang X, Sekine A, Tsunoda T, Sawada T, Furukawa H, Nakamura Y, Yamamoto K.

CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 6:194-202, 2005.

• Yamada R, Yamamoto K. (Review) Recent findings on genes associated with inflammatory disease. *Mutation Res.* 573: 136- 151, 2005.

• Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R, Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet.* 50:264-266, 2005.

• Suzuki A, Yamada R, Ohtake-Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 333:418-426, 2005.

• Yamamoto K, Yamada R. Genome-wide single nucleotide polymorphism analyses of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 25:12-15, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

関節リウマチの病態解析と生物学的製剤による滑膜組織および骨軟骨組織に関する研究

分担研究者 井上 和彦 東京女子医科大学東医療センター 整形外科 教授

研究要旨 関節リウマチおよび変形性関節症の病態の遺伝子学的解明は未だ明確なものはない。しかしながら治療においては関節リウマチに抗 TNF- α 抗体などを用いた生物学的製剤による治療など近年めざましい発展を遂げている。こうした特定の分子を標的とした治療が関節疾患で有効であることは、病態の解明に対しても遺伝子学的アプローチにより解析できる可能性がある。我々は生物学的製剤使用中の関節リウマチの臨床評価と血清のサイトカイン濃度を調べ、IL-6 が有意に生物学的製剤により減少したことを確認した。さらに変形性関節症の病態解析のためメカニカルストレスに着目し軟骨細胞において DNA マイクロアレイによって生体内リズムを調節する遺伝子 CLOCK の発現抑制を認め変形性関節症においてタンパクレベルにおいてもその抑制を確認した。

現在、関節リウマチ(RA)に対して生物学的製剤における滑膜組織の変化および骨破壊抑制効果について明らかでない。インフリキシマブを使用中関節鏡下滑膜切除術および人工関節置換術時に採取した滑膜および骨軟骨組織を免疫組織学的に解析した。インフリキシマブ効果減弱例における滑膜組織は血管新生性に富み、TNF α はほぼ完全に抑制され、IL-6 の発現は増加していた。MMP-3 は滑膜表層に CD20 は滑膜間質に発現していた。骨髄組織においてインフリキシマブ使用により細胞成分に富む隔壁の肥厚がみられ、type I collagen, RANKL, OPG, OPN 陽性であり、特に CD68 の増加が認められた。以上よりインフリキシマブを使用の RA の滑膜では TNF α は抑制されるが効果減弱においては IL-6 の発現がみられ、骨髄変化では隔壁の肥厚を伴う骨髄幹細胞の組織球分化促進が考えられた。さらにインフリキシマブで治療した関節リウマチ 245 例において 21 例にインフリキシマブ投与中止した寛解となった(8.6%)うち 1 例の滑膜組織では IL-6 の発現は増加していなかった。寛解における骨破壊抑制効果はレントゲン上手指関節において改善傾向があったが骨組織においても骨梁の再生が認められた。

A. 研究目的

関節疾患である関節リウマチおよび変形性関節症の病態の遺伝子学的解明を目的とし、現在関節リウマチにおいて生物学的製剤における抗サイトカイン療法でのどのような分子が臨床効果に関連し発現変化しているか、またそれ

がどのような遺伝子発現と関係しているか解明することである。

さらに RA の治療は近年寛解を目標とすることが叫ばれており、従来の抗リウマチ薬にない治療効果、特に骨関節破壊抑制さらには改善効果が臨床上認められている。RA は発症から 5 年

で75%が骨関節破壊がおこるとされており、これをいかに防止するかがRAの治療では重要である。欧米で広く用いられている臨床評価 Disease Activity Score (DAS) 28 をにより寛解の指標が獲得できる。こうした中で我が国では2003年7月よりRAに対してインフリキシマブの使用が開始された。インフリキシマブは、ヒトTNF α をマウスに免疫し、マウスが産生した抗ヒトTNF α 抗体のV領域の遺伝子とヒトIgG1 κ 鎖のC領域の遺伝子を連結し作成されたキメラ型抗TNF α モノクローナル抗体である。TNF α は単球やマクロファージから産生されTNF β は主にリンパから産生される。TNF α は細胞膜上のTNFレセプターであるp55とp75に結合しNF κ Bを介して炎症性サイトカインが産生される。インフリキシマブはこのTNF α と特異的に結合することにより、TNF α が標的細胞上のTNF α レセプターであるp55とp75に結合するのを阻害し、結果的にTNF α の生物学的作用を抑制する。こうした分子生物学的作用により临床上インフリキシマブ投与により2週間で97.5%の症例でc-reactive protein (CRP)が50%以下に減少する。現在、骨関節破壊抑制効果については現在のところ報告は少ない。当施設においてインフリキシマブを使用して治療した245例のうち寛解に至ってインフリキシマブを中止した症例は21例であり、このうち中止時にMMP-3陽性やRAPA高値の4症例はCRPの陽性となり再燃した。寛解に至らない症例についてもレントゲン上骨破壊抑制さらには改善まで認めている症例がある。こうした生物学的作用の骨破壊抑制効果の機序解明はRAの病態を治療の側から解明する一つの手段として期待できる。インフリキシマブの投与により骨および軟骨の修復について現在のところ詳細な研究報告はない。本研究はRAに対する

インフリキシマブによる骨軟骨修復機所を臨床的評価、画像評価、手術時標本による組織学的評価、分子生物学的手法を用いて統計学的に解明することを目的とする。

B. 研究方法

関節リウマチに対して生物学的作用を用いて治療した患者血清中のIL-1 β , IL-6, TNF- α 濃度を投与前と投与後に経時的にELISAを用いて測定する。関節滑膜細胞の初代培養において生物学的作用添加においてIL-1 β , IL-6, TNF- α 濃度を濃度依存的および経時的に測定する。関節軟骨細胞をgel form内での3次元培養しmagnetic forceを利用してメカニカルストレスをかけ、4日後の軟骨細胞のRNAを抽出し12000遺伝子をDNAマイクロアレイを用いて一度に発現変化を調べる。促進および抑制遺伝子を抽出し病態解明につながる遺伝子候補を挙げてリアルタイムPCR法にて確認する。候補遺伝子のうち一つが生物学的作用を用いて治療した関節リウマチのサイトカイン産生とどのような関連性があるか滑膜細胞および破骨前駆細胞、間葉系幹細胞を用いてどの細胞にDNAマイクロアレイで抽出した遺伝子が生物学的作用により影響を受けサイトカイン産生に関与するかRT-PCR,およびELISA法にて調べる。

また、RAにおいてインフリキシマブで治療した症例の臨床評価DAS28, CRP(dl/ml), 抗リウマチ因子(RAPA)、血清サイトカインIL-1 β , TNF- α , IL-6、を計測し両手単純レントゲン写真をvan der heijde Sharp score (van der Heijde. J Rheumatol 2000;27:261-3)にて比較検討を行う。インフリキシマブ投与中に施行した人工関節置換術においてインフォームドコンセントを得た上で滑膜、骨、軟骨を採取し組織学

的にサイトカイン発現、類骨増生、破骨細胞、骨芽細胞の増加の有無、軟骨損傷部の修復の有無を TNF- α 、IL-6、OPG、RANKL、CD20、MMP-3、type I collagen、CD68、TRAP の免疫染色および Alizarin-red 染色にて Ca 沈着を調べる。

C. 研究結果

関節リウマチに対して生物学的製剤を用いて治療した患者血清中の IL-1 β 、IL-6、TNF- α 濃度は IL-1 β 、TNF- α は有意な変化を認めなかったが、IL-6 は生物学的製剤投与前と比べて有意に減少を認めた。これは抗 TNF- α 抗体による治療により TNF- α の濃度は血清中では変化せず IL-6 のみ炎症反応改善に関与していたことを示している。この IL-6 の変化は CRP の炎症反応の有意な減少と相関を認めた。次に軟骨細胞の3次元培養でメカニカルストレスをかけて変化した遺伝子を DNA マイクロアレイを用いて調べたところ生体内リズムを司る CLOCK 遺伝子が発現抑制していることをつきとめた。CLOCK 自体の発現変化もリアルタイム PCR 法にて経時的にリズムをつくって発現していることを認めた。現在関節リウマチにおける IL-6 の発現と CLOCK 遺伝子の関連性を調べるために滑膜細胞および破骨前駆細胞、間葉系幹細胞を用いて RNA およびタンパクレベルで生物学的製剤における発現変化を解析中である。

さらに RA に対して生物学的製剤を用いて治療した患者血清中の IL-1 β 、IL-6、TNF- α 濃度は IL-1 β 、TNF- α は有意な変化を認めなかったが、IL-6 は生物学的製剤投与前と比べて有意に減少を認めた。これは抗 TNF- α 抗体による治療により TNF- α の濃度は血清中では変化せず IL-6 のみ炎症反応改善に関与していたことを示している。この IL-6 の変化は CRP の炎症反

応の有意な減少と相関を認めた。インフリキシマブ効果減弱例における滑膜組織は血管新生に富み、TNF α はほぼ完全に抑制され、IL-6 の発現は増加していた。MMP-3 は滑膜表層に CD20 は滑膜間質に発現していた。骨髄組織においてインフリキシマブ使用により細胞成分に富む隔壁の肥厚がみられ、type I collagen、RANKL、OPG、OPN 陽性であり、特に CD68 の増加が認められた。以上よりインフリキシマブを使用の RA の滑膜では TNF α は抑制されるが効果減弱においては IL-6 の発現がみられ、骨髄変化では隔壁の肥厚を伴う骨髄幹細胞のマクロファージ分化促進が考えられた。さらにインフリキシマブで治療した関節リウマチ 245 例において 21 例にインフリキシマブ投与中止した寛解となった(8.6%)うち 1 例の滑膜組織では IL-6 の発現は増加していなかった。

D. 考察

関節リウマチに対して画期的な治療薬である抗サイトカイン療法の生物学的製剤により IL-6 が減少し炎症反応が抑制されることを見出した。しかしながら、どのようなメカニズムでこの IL-6 と CRP の減少が結びついているかを解明することが今後の課題である。さらに変形性関節症にてメカニカルストレスとの関連性から CLOCK 遺伝子抑制を病態解明の鍵となる遺伝子として見出しこの発現が軟骨細胞において生体内リズムをつくり発現変化をしていることを見出した。この CLOCK 遺伝子がいかにして滑膜細胞、破骨前駆細胞、および間葉系幹細胞において IL-6 と連動するか調べ、どの細胞が生物学的製剤により反応しているかを見つけることが重要である。

RA の治療においてインフリキシマブにより効果減弱症例では滑膜組織から IL-6 の増加がみ

られた。このことは IL-6 を抑制する治療の併用が有効であることを示唆している。また、B リンパ球マーカーで CD20 の増加は効果減弱症例における HACA の増加や RAPA の増加など抗原抗体反応の活性化を意味しており免疫陽性薬の併用などの有効性も考えられた。骨髄組織における細胞成分に富む隔壁の肥厚は CD68 の発現細胞増加があり、骨髄幹細胞から組織球系細胞への分化促進が考えられた。TRAP 陽性細胞は少なく破骨細胞の増加は認めなかった。Type I collagen はよく染まっており Alizarin-red 染色にて Ca 沈着を認めた。以上よりインフリキシマブにおいて骨組織の代謝促進がみられ組織球の増加を特徴としていることは、RA の病態の場が関節だけでなく骨髄にもあり組織球増加により免疫反応促進とも考えられる。

E. 結論

関節疾患である関節リウマチおよび変形性関節症の病態の遺伝子学的解明の鍵となる遺伝子として CLOCK 遺伝子を発見した。これはメカニカルストレスにより軟骨細胞で発現抑制を受けるが、これにより軟骨代謝に変化をきたして関節破壊へと進む可能性がある。今後、生物学的製剤により IL-6 が減少することが CLOCK 遺伝子にも影響している可能性があり将来さらなる研究を必要とする。

またインフリキシマブを使用の RA の滑膜では T 効果減弱例においては NF α は抑制されるが IL-6 の発現がみられ、B リンパ球増加を伴っていた。骨髄変化では隔壁の肥厚を伴う骨髄幹細胞の組織球分化促進が認められた。

F. 健康危惧情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Histological changes in bone marrow after treatment of infliximab for rheumatoid arthritis.

Kanbe K, Inoue K, Inoue Y, Suzuki Y.

Clin Rheumatol. 2007 Nov 27.

Efficacy of arthroscopic synovectomy for the effect attenuation cases of infliximab in rheumatoid arthritis. Kanbe K, Inoue K. Clin Rheumatol. 25:877-881, 2006.

Kanbe K, Inoue K, Xiang C, Chen Q. Identification of clock as a mechano-sensitive gene by large-scale DNA microarray analysis: down-regulation in osteoarthritic cartilage. Modern Rheumatology. 16:131-6, 2006.

関節リウマチに対するインフリキシマブによる寛解導入療法.

神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝. 日本リウマチ・関節外科学会誌 26:393-401, 2007.

関節リウマチの骨・関節破壊:骨関節破壊と QOL
神戸克明、井上和彦. Clinical; Calcium 17:10-15.

関節リウマチの骨・関節破壊:骨関節破壊修復
神戸克明. Clinical; Calcium 17:105-109.

2. 学会発表

関節リウマチに対する生物学的製剤と手術治療.

神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝

日本リウマチ学会 2007. 4. 26-29. パシフィコ横浜

関節リウマチに対するインフリキシマブによる治療成績

神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、高山篤、早田浩一朗

日本リウマチ学会 2007. 4. 26-29. パシフィコ横浜

関節リウマチに対するインフリキシマブ使用における手術治療の意義

神戸克明、井上和彦、千葉純司、井上靖雄、鈴木祐孝

日本リウマチ・関節外科学会2007.11.9-10.品川プリンス

K. Kanbe, K. Inoue, J. Chiba, Y. Inoue.

RISK FACTORS OF INFECTION AFTER ORTHOPAEDIC SURGERY WITH INFLIXIMAB FOR RHEUMATOID ARTHRITIS.

EULAR, Barcelona, Spain, 13-16, June 2007.

K. Inoue, K. Kanbe, J. Chiba, Y. Inoue.

EFFICACY OF ARTHROSCOPIC SYNOVECTOMY FOR THE EFFECT ATTENUATION CASES OF INFLIXIMAB IN RHEUMATOID ARTHRITIS.

EULAR, Barcelona, Spain, 13-16, June 2007.

Katsuaki Kanbe, Kazuhiko Inoue

Ho-YAG laser treatment in shoulder arthroscopic synovectomy of rheumatoid arthritis.

14th European Rheumatoid Arthritis Surgical Society (ERASS) meeting, Pffikon/Zurich, Switzerland, on May 25-26, 2006.

Katsuaki Kanbe, Kazuhiko Inoue, Masayuki Nakagawa, Taisuke Yoneya, Akinori Hattori.

Analysis of cytokine production of synovium in rheumatoid arthritis by Ho-YAG laser

the 16th ISLSM, Tokyo, Japan on September 10, 2005.

Kanbe K, Inoue K,

The Efficacy and Safety of Infliximab for Rheumatoid Arthritis.

1st East Asian group of Rheumatology meeting (EAGOR), Tokyo, 2005. 5.28

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

複合遺伝性疾患としての関節リウマチの遺伝因子解析の理論研究とその実践的活用

分担研究者 山田 亮

東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センター ゲノム機能解析分野 准教授

研究要旨 関節リウマチには有力な疾患感受性遺伝子とそのリスク多型が報告されている。本研究において、ゲノムワイドアソシエーションの手法を用いて、それら複数の疾患感受性遺伝子の複合効果の解析手法を研究し、関節リウマチの病理を遺伝学の立場から解明するために用いる遺伝統計解析手法の特性についての検討をするとともに、実用的な解析環境の構築を行った。

A. 研究目的

関節リウマチの発症リスク多型はその相対危険度がたかだか 1.5 程度のものが複数あり、それらのいくつかは、レプリケーションスタディによって確かめられてきている。これらのリスク多型のリスクの強さは民族差があることも判明してきた。本研究では、ゲノムワイドアソシエーション解析を遂行するために必要な統計解析手法の特性評価とツールの実装を目的とした。なお、研究期間中にも、ゲノムワイドアソシエーションスタディの標準的手法については新たな知見が加わり、また、スタディに使用する遺伝子多型も多様化したため、その変化に合わせて、中心として対象とする手法を適宜変更した。

B. 研究方法

初年度・第2年度・最終年度、それぞれ、シミュレーションデータを作成し、段階的に解析手法の特性の解明とその実用的運用上の課題の整理を行い、ツールとして実装した。

（倫理面への配慮）

解析ツールの開発にあたり、個人識別情報の漏洩に配慮し、匿名化後データのみを用いた解析環境を想定した開発を行った。

C. 研究結果

初年度は以下を実施した。
連鎖不平衡マッピングの基盤整備として、SNPを用いた連鎖不平衡マッピングを行うための基礎的な手法を大規模データに適用するための解析環境整備を以下のように行った。

- ・ 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
- 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
- ・ TagSNP 選別
- r^2 -greedy 法
- Optimum solution 法

また、MDR 法を WINDOWS 環境に導入し、典型的なエピスタシスの検出をする場合の、基本的動作の評価を行った。また、10-50 ローカスにつき、1000人から2000人規模でのシミュレーションデータを作成し、処理速度についての検討を行った。同時にエピスタシスの評価のための、シミュレーションなジェノタイプデータを作成するためのツールの構築を行った。

第2年度は以下を実施した。

HapMap プロジェクトより利用可能な非常に大規模なデータについて、SNP およびその連鎖不平衡状態を検討するために、昨年度までに構築した、各種ツール（以下にリスト）を、大規模データに適用可能なように改変した。

その上で、SNP の生起消滅および、SNP ペアの連鎖不平衡状態をモデル化した。SNP ペアの連鎖不平衡状態の推移について、変異・組み換え・ドリフトによって定義するとともに、その推移を SNP ペア間の遺伝的距離の関数として表現した。HapMap プロジェクトの膨大なデータから得られる多数の SNP ペアについて、連鎖不平衡状態をモデルに適用することによって、HapMap プロジェクトに用いられている SNP アレルの起源が同一であるか、複数の変異に由来するとみなすべきかを推論した。その結果、連鎖不平衡解析上、無視しえない比率で、複数変異事象に由来する SNP が存在することが予想された。

最終年度は、以下を実施した。

2 x 3 分割表関連検定にあたっては、遺伝モード（優性、劣性、アディティブ）に関する自由度 1 の検定と、モデルフリーの自由度 2 の検定との相互関係を漸近近似検定と正確確率検定の両方について、その統計量特性について検討した。それにより、遺伝モードに依存しない関連検定を SNP ごとにただひとつ選択する可能性が示唆された。

メタアナリシスに関しては、民族横断的なデータ統合においては、相対危険度の異質性を考慮した手法の採用が主流となるが、多型構造が特に多様な領域のマーカーにおけるデータを統合する場合には、従前の相対危険度異質性の考慮のみでは不十分である可能性を示唆する予備的データを得た。

CNP データにおけるケース・コントロール関連検定においては、SNP における、アディティブモデルのトレンド検定を拡張した形式の検定手法が有用であることが示唆されたが、その検定手法と、既発表の CNP 関連検定手法との特性比較を行い、解析モデルとして、トレンド検定（拡張型）の有用性を示唆する予備的データを得た。

SNP・CNP とともに、これらを用いた連鎖不平衡マッピングにおいては、連鎖不平衡を利用することから、これを数理的に取り扱う手法の開発も有用である。本研究課題では、関節リウマチ関連遺

伝子連鎖不平衡マッピングのための解析手法の開発の一環として、連鎖不平衡状態の幾何学的取り扱いに関して検討した。

これらの検討結果を踏まえた解析手法は、データ解析用ツールとして実装し、広く一般にも利用できるよう、研究室の情報公開用サーバにて、Java Applet として公開するとともに、配布可能な形式（Java Application）としても公開した。

D. 考察

SNP および CNP を用いた疾患遺伝子解析はますます盛んである。その解析手法には、従来の統計検定手法を遺伝疫学・多型マッピングに適した形式に修正して使用することが望ましい。本研究では、その修正に関して、体系的に検討を加え、適切な修正を加えた上で、一般に公開し、広く、遺伝疫学研究者の便宜を図っていると考えられる。

E. 結論

疾患関連遺伝子マッピングのためのケース・コントロール関連検定手法を体系的に検討し、ツールの開発・公開に到った。

F. 健康危機情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yamamoto, K. & Yamada, R. Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 357:1250-1251, 2007.
- Yamada, R. & Yamamoto, K. Mechanisms of disease: genetics of rheumatoid arthritis--ethnic differences in disease-associated genes. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 3: 644-50, 2007.
- Suzuki, A. Yamada, R. & Yamamoto, K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1108:323-39, 2007.
- Yamada R, Matsuda F. A novel method to express SNP-based genetic heterogeneity, Ψ , and its use to measure linkage disequilibrium for multiple SNPs, D_g , and to estimate absolute maximum of haplotype frequency. *Genetic Epidemiology.* 31:709-726, 2007.

- 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.* 120:139-43, 2006.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun.* 341:94-100, 2006.
- Yamada R, Yamamoto K, Holmdahl RE. Gene-based large scale LD-mapping of rheumatoid arthritis-associated genes. *The Hereditary Basis of Rheumatic Diseases.* 2006.
- Ohtsubo S, Iida A, Nitta K, Tanaka T, Yamada R, Ohnishi Y, Maeda S, Tsunoda T, Takei T, Obara W, Akiyama F, Ito K, Honda K, Uchida K, Tsuchiya K, Yumura W, Ujiie T, Nagane Y, Miyano S, Suzuki Y, Narita I, Gejyo F, Fujioka T, Nihei H, and Nakamura Y. Association of a single-nucleotide polymorphism in the immunoglobulin μ -binding protein 2 gene with immunoglobulin A nephropathy. *J. Hum. Genet.* 50:30-35, 2005.
- Nakayama M, Horiguchi A, S. Kubota K, Takazawa T, Ohsaka M, Kawaida R, Ono M, Kasuya A, Furukawa H, Yamada R, and Yamamoto K. Comparison of enzymatic properties between hPADI2 and hPADI4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327:192-200, 2005.
- Chang X, Yamada R, and Yamamoto K. Inhibition of antithrombin by hyaluronic acid may be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 7:R268--R273, 2005.
- Yamada R, and Yamamoto K. Recent findings on genes associated with inflammatory disease/Muta. *Res. Fund. Mol. Mech. Mutagen.* 573:136-151, 2005
- Yamada R. Peptidylarginine deiminase type 4, anticitrullinated peptide antibodies, and rheumatoid arthritis/*Autoimmun. Rev.* 4:201-206, 2005.
- Suzuki A, Yamada R, Yamanaka M, Okazaki Y, Sawada T, and Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333:41-426, 2005.
- Mori M, Yamada R, Kobayasi K, Kawaida R, and

Yamamoto K. Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J. Hum. Genet.* 50:264-266, 2005.

- Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley J. B, Shirasawa S, Sawada T, Bae S, Tokuhiko S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman K, M. Kang C, P. Kang C, Ostubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, and Yamamoto K. A functional variant in FCRL3, encoding Fc receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nat. Genet.* 37: 478-485, 2005.

- Suzuki A, Yamada R, Yamanaka M, Okazaki Y, Sasada T, and Yamamoto K. Anti-citrullinated collagen type I antibody is a target of autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333:418-426, 2005.

- Takizawa Y, Sawada T, Suzuki A, Yamada R, Inoue T, and Yamamoto K. Peptidylarginine deiminase 4 (PADI4) identified as a conformation-dependent autoantigen in rheumatoid arthritis/*Scand J Rheumatol* 34:212-215, 2005.

- Kawaida R, Yamada R, Kobayasi K, Tokuhiko S, Suzuki A, Kochi Y, Chang X, Sekine A, Tsunoda T, Sawada T, Furukawa H, Nakamura Y, and Yamamoto K. CUL1, a component of E3 ubiquitin ligase, alters lymphocyte signal transduction with possible effect on rheumatoid arthritis. *Gen. Immun.* 6:194-202, 2005.

2. 学会発表

<海外>

- Ryo Yamada SNP-pair Tetrahedron: Geometric Presentation of Haplotype Space of Pairwise SNPs International Genetic Epidemiology Meeting (2007) York, Great Britain

- 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

- 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

・ Yamada, R. et al. Multiple marker LD index of SNPs and the method to plot their pertinent components. Tampa, FL, USA, 2006

・ The quantification of the allelic variations of gene expression by real-time TaqMan PCR/The American Society of Human Genetics 55th Annual Meeting (ASHG 2005)/ Salt Lake City/USA/2005 Oct./ KobayasiK., SuzukiA., KochiY., YamadaR., and YamamotoK.

・ Genome-wide map of gene-based and block-based haplotypes and tag SNPs and comparison of power for association study/13th Takeda Science Foundation Symp. on Bioscience on Genome Analysis and Medicine/Tokyo/Dec.2004/TsunodaT. LathropG. M. SekineA. YamadaR. TakahashiA. OhnishiY. TanakaT. and NakamuraY.

<国内>

・ 岡田随象・ 山本一彦・ 山田亮 集団構造化補正、Genomic Control 法のフィッシャー正確確率検定への応用 日本人類遺伝学会(2007) 東京

・ 廣澤 桂 山田 亮 松田文彦 一塩基多型(SNP)を用いた有意検定における、観測ジェノタイプ情報の組み込みに関する検討 日本人類遺伝学会(2007) 東京

・ 免疫スクリーニング法による関節リウマチ関連遺伝子 peptidylarginine deiminase type four (PADI4) の基質同定/第 28 回日本分子生物学会年会/福岡/2005 年 12 月/山中美弥子, 鈴木亜香里, 菅野栄美, 岡崎優子, 沢田哲治, 山田亮, 山本一彦

・ シトルリン化フィブリノーゲンにおける関節リウマチの自己抗原部位の同定/第 35 回免疫学会総会・学術集会/横浜/2005 年 12 月/菅野栄美, 山田亮, 山中美弥子, 瀧澤泰伸, 沢田哲治, 山本一彦

・ 自己免疫疾患感受性 SNP の人種差の検討/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/森美賀子, 山田亮, 小林香子, 川井田礼美, 山本一彦

・ 関節リウマチとの関連が報告された SNPs についての日本人での追認関連解析/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/小林香子, 高地雄太, 山田亮, 森美賀子, 川井田礼美, 山本一彦

・ 関節リウマチ感受性遺伝子 FCRL3 の同定/第 49

回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/高地雄太, 山田亮, 山本一彦

・ ユビキチンリガーゼの構成成分 CUL1 は血球のシグナル伝達系を介して RA の罹患率へ影響を与える可能性を持つ/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/川井田礼美, 山田亮, 小林香子, 高地雄太, 沢田(哲治), 山本一彦

・ SNP による大規模 LD マッピング/第 49 回日本リウマチ学会総会・学術集会/横浜/2005 年 4 月/川口喬久, 川上弘人, 山田亮, 関根章博, 中村祐輔, 山本一彦, 角田達彦

3. 成果公開

研究室ウェブサーバにて、ツール公開 (平成 19 年度より)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

関節リウマチ関連遺伝子の同定とその機能解析，相互関連の研究

分担研究者 高地 雄太 独立行政法人理化学研究所遺伝子多型研究センター 研究員

研究要旨 関節リウマチ (RA) は、他の多くの自己免疫疾患と同様に、遺伝因子と環境因子が複雑に関与して発症する多因子疾患である。我々は、ホールゲノムに分布する一塩基多型 (SNPs) を用いた患者対照関連解析により、RA、全身性エリテマトーデス、自己免疫性甲状腺炎の疾患感受性に関連する FCRL3 (Fc receptor-like 3) 遺伝子の SNP 同定を行った。FCRL3 遺伝子多型は、遺伝子プロモーター領域に存在し、疾患感受性アレルでは転写因子 NF κ B との強い結合を介して B 細胞における FCRL3 の高発現をもたらす。FCRL3 は細胞内に、リンパ球受容体に特徴的な活性化モチーフ (ITAM) および抑制型モチーフ (ITIM) を持つ。B 細胞株を用いた解析では、FCRL3 は、B 細胞レセプター (BCR) によってもたらされる細胞内シグナルを抑制することが明らかになった。一方、FCRL3 遺伝子多型以外にも、複数の RA 感受性遺伝子の存在が考えられており、我々は、すでに他の自己免疫疾患との関連が報告されている、IRF5 遺伝子、STAT4 遺伝子、ZFAT 遺伝子の多型に注目し、日本人 RA 検体を用いた関連解析を行うことにより、これらの遺伝子多型が RA 感受性遺伝子であることを明らかにした。さらに、RA 感受性多型の相互関連を解析することにより、HLA-DRB1 多型と、FCRL3 多型および IRF5 多型の相互関連を明らかにした。これらのことから、RA の亜病態の背景に、異なった遺伝因子の組み合わせが存在することが示唆された。

A. 研究目的

ホールゲノムに分布する一塩基多型 (SNPs) を用いた関連解析により、関節リウマチ(RA)の疾患感受性に関連する遺伝子の探索および同定を行う。また、その遺伝子機能を解析することにより、病態への関わりを明らかにする。さらに、RA以外の自己免疫疾患感受性との関連が報告されている遺伝子多型に注目し、RA感受性との関連を解析する。疾患と関連する遺伝子多型同士の相互関連についても検討を行う。

B. 研究方法

1) ホールゲノム関連解析

RA 患者群 (830 人) および対照群 (658 人) の DNA 検体を用いて、インベーター法による SNP のジェノタイピングを行い、各 SNP のアレル頻度を比較することにより、疾患感受性に関連する遺伝子多型の同定を行った。

2) FCRL3 の機能解析

FCRL3 キメラタンパク (細胞外ドメイン; マウス Fcgr2b, 膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン; FCRL3 由来) の発現コンストラクトを作製し、

B 細胞株である ST486 細胞を用いて、安定発現株の作製を行った。FCRL3 キメラタンパク安定発現株を用いて、*in vitro* の実験系 (細胞内 Ca²⁺イオン流入アッセイ、アポトーシス誘導アッセイ、細胞内チロシン残基のリン酸化アッセイ) において、BCR シグナルに対する影響を評価した。また、FCRL3 細胞内のチロシンモチーフ (ITAM, ITIM) に対応するリン酸化ペプチドを合成し、これらのモチーフに結合する分子の同定を行った。

3) 候補遺伝子アプローチによる関連解析

RA 患者 1943 人、および対照群 1598 人の末梢血由来の DNA を用いて、TaqMan 法による SNP のジェノタイピングを行った。IRF5 遺伝子、STAT4 遺伝子、ZFAT 遺伝子の各多型を用いた患者対照関連解析を行い、疾患感受性との関連の検討を行った。

4) 遺伝子相互関連の解析

各 RA 感受性遺伝子のジェノタイプ別に患者群を層別化し、相互関連の対象となる遺伝子多型のアレル頻度、ジェノタイプ頻度の比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(厚生労働・文部科学・経済産業3省合同指針)に基づき研究計画を策定し、理化学研究所倫理委員会の審査を経た上で、研究を行った。DNA検体および臨床情報は、連結可能匿名化を行い、研究者とは独立した個人情報管理者による対応表の管理を行った。

C. 研究結果

1) ホールゲノム解析によるRA関連遺伝子の同定
全ゲノム領域に分布するSNPsを用いた患者対照関連解析により、1番染色体21-23領域に存在するSNPsに、疾患感受性との強い関連が認められた。この領域(16Mbp)に存在する742SNPsを用いて、詳細な関連解析を行った。これらの多型についてRA患者830人および対照群658人のジェノタイプングを行い、患者・対照群でアレル頻度の比較をしたところ、FCRL3(Fc receptor-like 3)遺伝子のプロモーター領域のSNP(-169C→T)がRA感受性と強い関連を示すことが明らかにされた(オッズ比1.37, P=0.000035)。

この多型(-169C→T)の疾患へ関わりを解析するため、周辺配列を用いて、ルシフェラーゼアッセイおよびゲルシフトアッセイを行ったところ、この多型は転写因子NF κ Bの結合を介して、遺伝子発現量を制御していることが明らかになった。すなわち、RA患者群で頻度の高い-169Cアレルの配列に、NF κ Bが強く結合し、その結果、FCRL3遺伝子の発現が増強されることが示された。実際に、健康人のBリンパ球のRNAを用いた解析では、-169C/C、-169C/T、-169T/Tというジェノタイプの順で、FCRL3の発現量が高かった。したがって、-169Cアレルを持つ個人において、FCRL3遺伝子の発現量が増加し、結果として疾患感受性を高めていることが考えられた。

FCRL3多型の病態への影響を調べるため、RA患者血清における自己抗体を解析した(東京大学医学部アレルギーリウマチ内科との共同研究。分担研究者: 沢田哲治)。その結果、RA感受性ジェノタイプを持つ患者群において、リウマトイド因子や、近年その疾患特異性が注目されている抗環状シトルリン化ペプチド抗体といった、RA関連自己抗体の産生が増強していた。これらの抗体は、

疾患の重症度との関連が報告されていることから、FCRL3多型は、疾患の予後予測因子になりうることが示唆された。

FCRL3多型と他の自己免疫疾患との関連を検討したところ、FCRL3多型は、全身性エリテマトーデスや自己免疫性甲状腺炎といった他の自己免疫疾患においても、発症に関連していることが明らかになった(国立国際医療センター研究所との共同研究)。したがって、FCRL3多型は、自己免疫疾患共通の遺伝因子である可能性が考えられた。

2) FCRL3の機能解析

安定発現株上のFCRL3キメラタンパクと、B細胞レセプター(BCR)を共架橋すると、BCR単独架橋をした場合に誘導される、Ca²⁺イオンの流入、細胞内タンパクのチロシン残基のリン酸化、アポトーシスは、それぞれ抑制された。FCRL3キメラタンパクの細胞内チロシン残基(Tyr650, Tyr662, Tyr692, Tyr722)をすべてフェニルアラニンに置換すると、これらのBCRシグナルの抑制機能は消失した。したがって、BCRシグナルの抑制には、これらのチロシン残基が必須であることが考えられた。

FCRL3細胞内チロシン残基の周辺配列は、既知のITAM, ITIMといったモチーフとの相関性が高い。これらのモチーフに結合する分子の同定を行うため、これらの配列に対応するチロシンリン酸化ペプチドを合成した。これらのペプチドを用いて、ST486細胞ライセートから、結合タンパクの共沈降を行った。その結果、Tyr650/Tyr662で構成されるITAMモチーフペプチドに、チロシンキナーゼSykが結合し、Tyr662, Tyr692のITIMモチーフにSHIP, SHP-1, SHP-2といった脱リン酸化酵素が結合することが明らかになった。FCRL3総体では、BCRシグナルに対して、抑制的に機能することから、これらのITIMおよびそれに結合する脱リン酸化酵素の働きが優位になることによって、FCRL3による抑制作用が働くことが考えられた。

3) 他の自己免疫疾患と共通のRA感受性遺伝子

患者・対照関連解析の結果、他の自己免疫疾患との関連が報告されているZFAT, IRF5, STAT4のいずれの多型においても、RA感受性との関連を認めた(次ページ表)。