

200729025A

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 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 島 田 浩 太

平成 20 (2008) 年 4 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

関節リュマチにおける間質性肺病変発症に関わる遺伝子の探索	1
島田浩太	

### II. 分担研究報告書

1. 候補遺伝子リストの作成	12
中込 一之	
2. 間質性肺病変合併関節リュマチにおける TGF $\beta$ 関連遺伝子の SNP 解析	15
山田 亮	

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リウマチ科 医師

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発性を含めた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と検体・臨床情報収集

相模原病院、京大病院、道後温泉病院に加え、昨年度末には東大病院にても対象患者の研究参加について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。抄録原稿提出日現在、京大病院 340 検体、道後温泉病院 430 検体、相模原病院 1141 検体が収集されており、東大病院においても、検体採取が開始されている。検体収集と平行して、検体に付帯させる臨床情報の収集をさらに進めている。

(2) 候補遺伝子リストの作成

本研究では候補遺伝子アプローチを想定している。動物モデル・患者検体の検討でこれまでに特発性を含めたILDの病態に関連が示唆されている分子・このパスウェイ上での関連分子の遺伝子を対象とする。今年度はILD病態関連分子としてTGF(transforming growth factor) $\beta$ を取り上げ、候補パスウェイ遺伝子群は、KEGGおよびILD・TGF $\beta$ 関連文献における記載をもとに126関連遺伝子をリストアップした。また、リストアップされた関連分子の一部をパスウェイマップとした。

(3) 対象患者の選定作業とSNP解析

収集された検体のうち、ILD合併についての画像によるILD合併に関する臨床情報がすでに付帯されているものの中から、ILD合併群95例、非合併例77例を対象とした。これらについて、(2)でリストアップしたTGF $\beta$ 関連126遺伝子に存在するSNPsのうち1078SNPsでのアレル頻度差を検討し、単独SNPとして有意な頻度差を有するものは認められなかった。

### 分担研究者

杉井章二

東京都立府中病院リウマチ科医長

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

山田 亮

東京大学医科学研究所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

医学センター疾患ゲノム疫学解析分野教授

大村浩一郎

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学助教

寺尾知可史

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学大学院生

高杉 潔

医療法人千寿会道後温泉病院理事長

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

西門クリニック リウマチ科医師

松井利浩

(独) 国立病院機構相模原病院リウマチ科医長

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ハビリテーション科医師

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、タクロリムス、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、図1)。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：high-resolution）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発性を含めた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 2）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と SNP 解析を施行した。

### 1. DNA 検体収集体制の確立と検体・臨床情報収集

（島田（大村、寺尾、高杉、小澤、當間、松井、中山、池中、道下）杉井、中込）

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、京大病院、道後温泉病院に加え、昨年度末には東大病院にても対象患者の研究参加について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。京大病院 340 検体、道後温泉病院 430 検体、相模原病院 1141 検体、東大病院 25 検体、合計 1936 検体が収集されており、なお継続中である。検体収集と平行して、検体に付帯させる臨床情報(表 2, 3, 図 3, 4)の収集をさらに進めている。

## 2. 候補遺伝子リストの作成

（島田、中込）

本研究では候補遺伝子アプローチを想定している。動物モデル・患者検体の検討でこれまでに特発性を含めたILDの病態に関連が示唆されている分子・このパスウェイ上での関連分子の遺伝子を対象とする。今年度はILD病態関連分子としてTGF(transforming growth factor) $\beta$ を取り上げ、候補パスウェイ遺伝子群は、KEGG およびILD・TGF $\beta$  関連文献における記載をもとに126関連遺伝子をリストアップした(表4)。リストアップされた関連分子の一部をパスウェイマップの形で図5に示す。

## 3. 対象患者の選定作業と SNP 解析

（山田（松田、大村、寺尾））

収集された検体のうち、ILD 合併についての画像によるILD合併に関する臨床情報(表2)がすでに付帯されているものの中から、ILD合併群としてA,B,C合計95例を、非合併例としてHを77例を対象とした。これらについて、表4に掲げた遺伝子に存在するSNPsのうち1078SNPsについてタイピング・解析を行った。Trend検定の結果のp値上位100SNPsを表5に示す。

## D. 考察

表5に示したSNPsにおいて、アレル頻度差のp値は最も小さいSNPにおいても0.00017であ

り、1078SNPs についての解析に伴う多重検定の面を Bonferroni 補正にて考慮すると、単独の SNP で有意なアレル頻度差を有するものは認められなかった。今回解析に用いた検体は、RA の診断、ILD の有無以外の臨床情報が収集中であり、臨床情報を加味した ILD 合併群/非合併群各群の背景因子の検討が課題である。今回の解析で用いた検体数が有意なアレル頻度差を検出するのに十分でなかった可能性は考えられるが、単独 SNP のみでなく候補遺伝子群における分子間相互作用を考慮したパスウェイ解析についても検討している。

#### E. 結論

ILD 合併 RA 99 例と ILD 非合併 RA 77 例の 2 群間において、TGFβ 関連 126 遺伝子に存在する SNPs のうち 1078SNPs でのアレル頻度差を検討し、単独 SNP として有意な頻度差を有するものは認められなかった。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1.論文発表

1. Matsui T, Kuga Y, Kaneko A, Nishino J, Eto Y, Chiba N, Yasuda M, Saisho K, Shimada K, Tohma S. Disease Activity Score 28 (DAS28) using C-reactive protein underestimates disease activity and overestimates EULAR response criteria compared with DAS28 using erythrocyte sedimentation rate in a large observational cohort of rheumatoid arthritis patients in Japan. *Ann Rheum Dis*. 2007 Sep;66(9):1221-6

2. Yang Xiang, Toshihiro Matsui, Kosuke Matsuo, Kota Shimada, Shigeto Tohma, Hiroshi Nakamura, Kayo Masuko, Kazuo

Yudoh, Kusuki Nishioka, and Tomohiro Kato. Comprehensive Investigation of Disease-Specific Short Peptides in Sera from Patients with Systemic Sclerosis (SSc): Complement C3f-des-arginine (DRC3f), Detected Dominantly in SSc, Enhances Proliferation of Vascular Endothelial Cells. *Arthritis Rheum* 56:2018-2030, 2007

3. Kanda H, Yokota K, Kohno C, Sawada T, Sato K, Yamaguchi M, Komagata Y, Shimada K, Yamamoto K, Mimura T. Effects of low-dose simvastatin on rheumatoid arthritis through reduction of Th1/Th2 and CD4/CD8 ratios. *Mod Rheum* 17:364-368, 2007

##### 2.学会発表

1. 島田浩太、松井利浩、川上美里、道下和也、池中達央、中山久徳、小澤義典、當間重人. リウマトイド髄膜炎として加療し得た、関節リウマチに伴う慢性髄膜炎の一例. ワークショップ、第 51 回日本リウマチ学会学術集会、平成 19 年 4 月 26 日、横浜

2. 萩原太、杉井章二、早川洋美、島田浩太、中山久徳、松井利浩、小澤義典、當間重人、森俊仁. 関節リウマチ(RA)における線維筋痛症 (FMS,Fibromyalgia)合併例の調査. ワークショップ、第 51 回日本リウマチ学会学術集会、平成 19 年 4 月 26 日、横浜

3. 中山久徳、萩原太、早川洋美、道下和也、池中達央、島田浩太、松井利浩、杉井章二、小澤義典、當間重人. 関節リウマチ患者における骨折予防薬剤介入前向き試験 36 ヶ月成績. ワークショップ、第 51 回日本リウマチ学会学術集会、平成 19 年 4 月 28 日、横浜

4. 萩原太、中山久徳、十字塚夫、早川洋美、池中

達央、島田浩太、松井利浩、杉井章二、小澤義典、  
當間重人. 関節リウマチ(RA)患者における骨粗鬆  
症とQOLの関連. ワークショップ、第51回日  
本リウマチ学会学術集会、平成19年4月28日、  
横浜

5. 中山久徳、萩原太、早川洋美、道下和也、池中  
達央、島田浩太、松井利浩、杉井章二、小澤義典、  
當間重人. 関節リウマチ患者に対する「ステロイ  
ド性骨粗鬆症の管理と治療のガイドライン」の適  
応の妥当性に関する検討. ワークショップ、第51  
回日本リウマチ学会学術集会、平成19年4月28  
日、横浜

6. 島田浩太、松井利浩、當間重人. DAS28 でみ  
た関節リウマチ疾患活動性の季節性推移(第3報)  
～関東地方での検討～. 一般演題、第72回日本

温泉気候物理医学会学術集会、平成19年5月18  
日、箱根

7. 島田浩太、松井利浩、岩田香奈子、道下和也、  
池中達央、中山久徳、小澤義典、當間重人. リウ  
マトイド髄膜炎として加療し得た関節リウマチ  
に伴う慢性髄膜炎の一例. 免疫アレルギー2、第  
61回国立病院総合医学会、2007年11月16-17日、  
名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

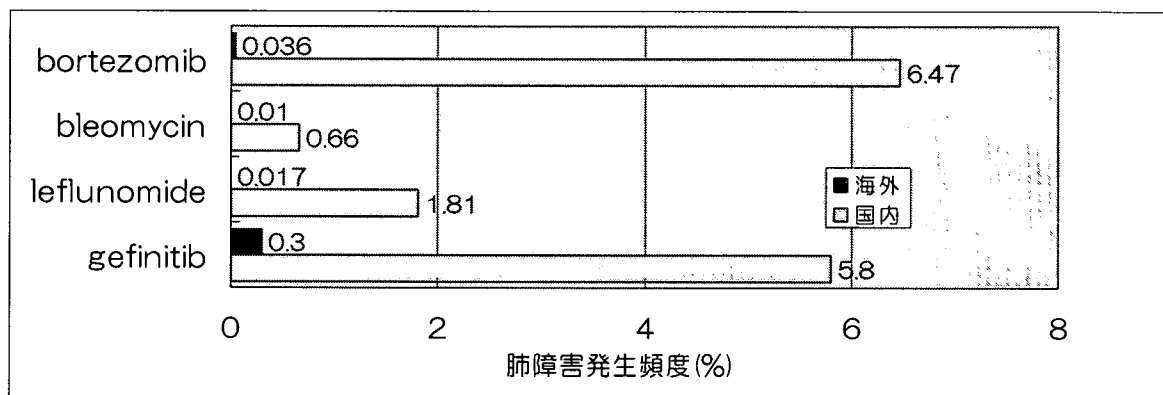
1. 特許取得       なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他         なし

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. 各種薬剤性肺障害の国内外比較



工藤翔二 日内会誌 95:1058-62, 2006 掲載データより作成



図 2. KEGG 上のパスウェイマップ (例として MAPK シグナルを掲げた。)

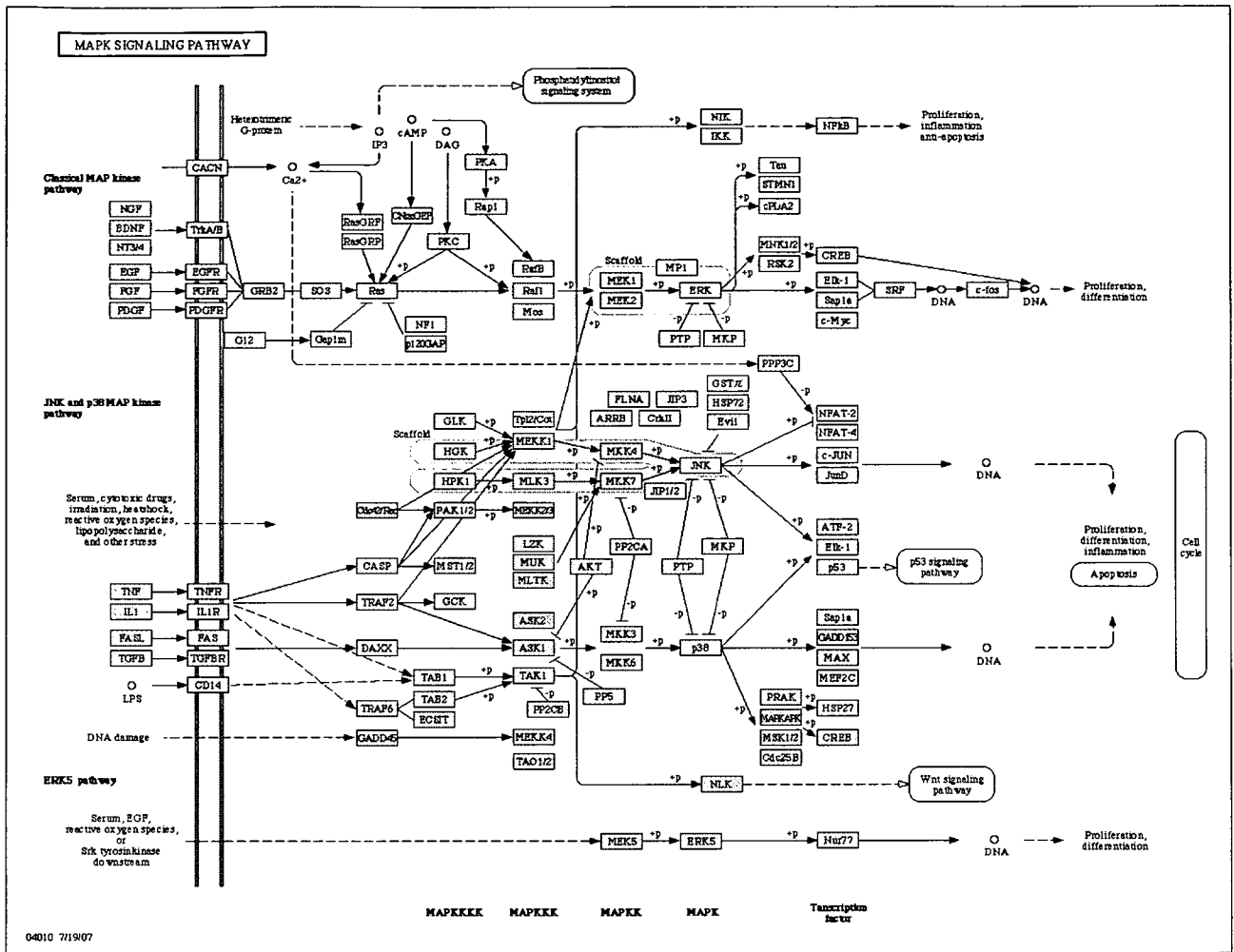


表 2. 収集する臨床情報

**【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3参照）
- ・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<sup>\*1</sup>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<sup>\*2</sup>。

「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<sup>\*2</sup>。

「C」：HRCT上、間質性肺病変の所見<sup>\*1</sup>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<sup>\*2</sup>。

「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<sup>\*2</sup>。

「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。

図3. 画像所見分類フローチャート

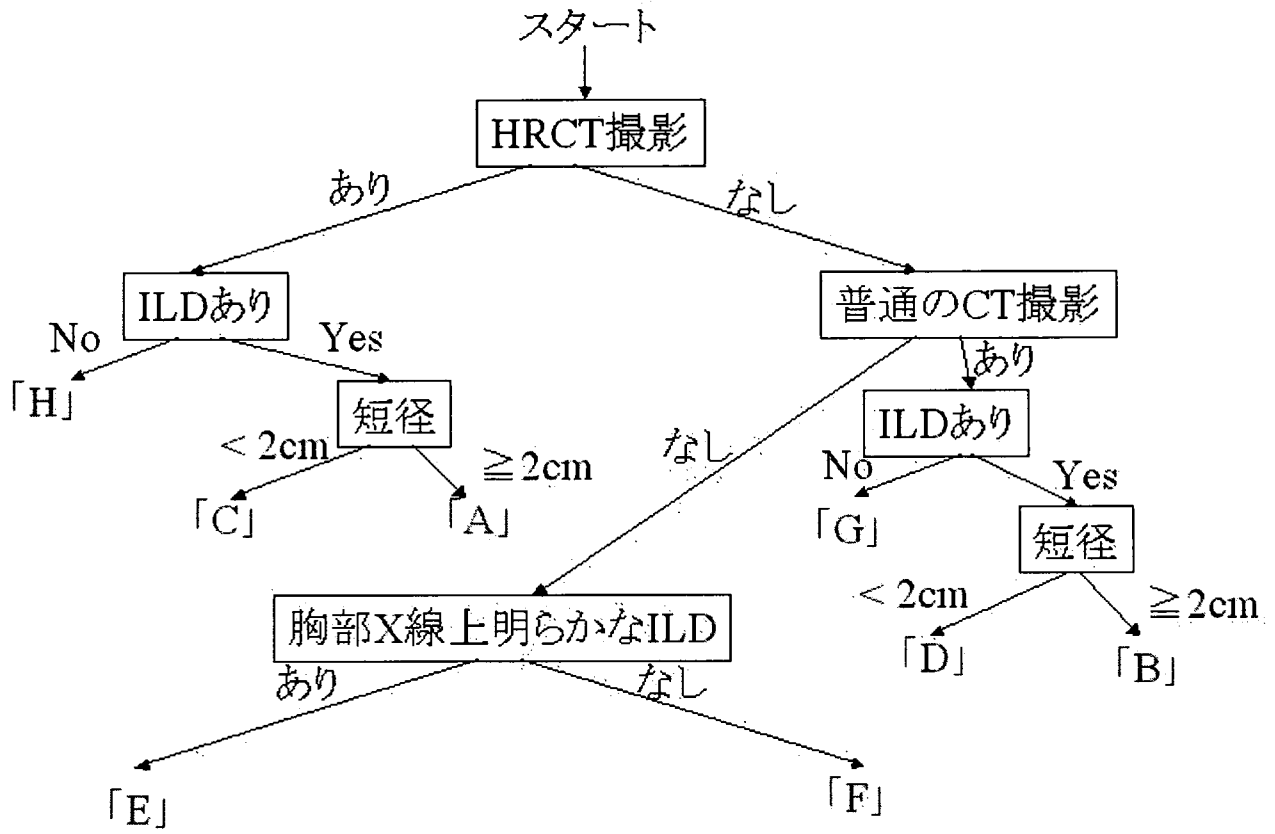


図4. 生活・職業歴収集用アンケート用紙

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。

〇〇病院〇〇科

表 4. TGFβ 関連遺伝子リスト

gene name	gene ID	gene name	gene ID	Gene name	gene ID	gene name	gene ID	gene name	gene ID	gene name	gene ID
ACVR1	90	CTGF	1490	IL1B	3553	MAP3K7	6885	PRKCI	5584	SMAD6	4091
ACVRL1	94	CTSD	1509	IL2RA	3559	MAPK1	5594	PRKCQ	5588	SMAD7	4092
AGT	183	CUL1	8454	IL2RB	3560	MAPK14	1432	PRKCZ	5590	SMAD7	4092
CCL2	6347	DAXX	1616	IL2RG	3561	MAPK8	5599	RBL1	5933	SMURF1	57154
CDC25A	993	DCN	1634	IL6	3569	MMP1	4312	RBX1	9978	SMURF2	64750
CDKN1A	1026	E2F4	1874	IL7	3574	MMP12	4321	RHOA	387	SP1	6667
CDKN2B	1030	E2F5	1875	INHBA	3624	MMP2	4313	RNF111	54778	TFDP1	7027
CLU	1191	EIF3S2	8668	ITGA1	5771	MMP9	4318	ROCK1	6093	TGFB1	7040
COL1A1	1277	FGF2	2247	ITGA2	3673	MYC	4609	RPS6KB1	6198	TGFBR1	7046
COL1A2	1278	FGF7	2252	ITGA3	3675	MYC	4609	RUNX1	861	TGFBR2	7048
COL3A1	1281	FKBP1A	2280	ITGA5	3678	PDGFA	5154	RUNX3	864	TGFBR3	7049
COL4A1	1282	FN1	2335	ITGAV	3685	PDGFB	5155	SERPINE1	5054	THBS1	7057
COL4A2	1284	FNTA	2339	ITGB1	3688	PLAU	5328	SFPTC	6440	TIMP1	7076
COL4A3	1285	FOS	2353	ITGB6	3694	PLG	5340	SFTPFB	6439	TIMP2	7077
COL4A4	1286	FOXA1	3169	JUN	3725	PPP2CA	5515	SFTPC	6440	TIMP3	7078
COL4A5	1287	FOXA2	3170	JUNB	3726	PRKCA	5578	SKI	6497	TIMP4	7079
COL4A6	1288	FOXH1	8928	JUND	3727	PRKCB1	5579	SKIL	6498	TITF1	7080
COL7A1	1294	IGF1	3479	LEFTY1	10637	PRKCD	5580	SKP1A	6500	TNF	7124
CREBBP	1387	IL10	3586	LEFTY2	7044	PRKCE	5590	SMAD2	4087	TNFRSF1A	7132
CSF2	1437	IL13	3596	LTBP1	4052	PRKCG	5582	SMAD3	4088	TNFRSF1B	7133
CSF2	1437	IL1A	3552	MAP3K1	4214	PRKCH	5583	SMAD4	4089	ZFYVE9	9372

図5. TGFβ 関連分子のパスウェイマップ

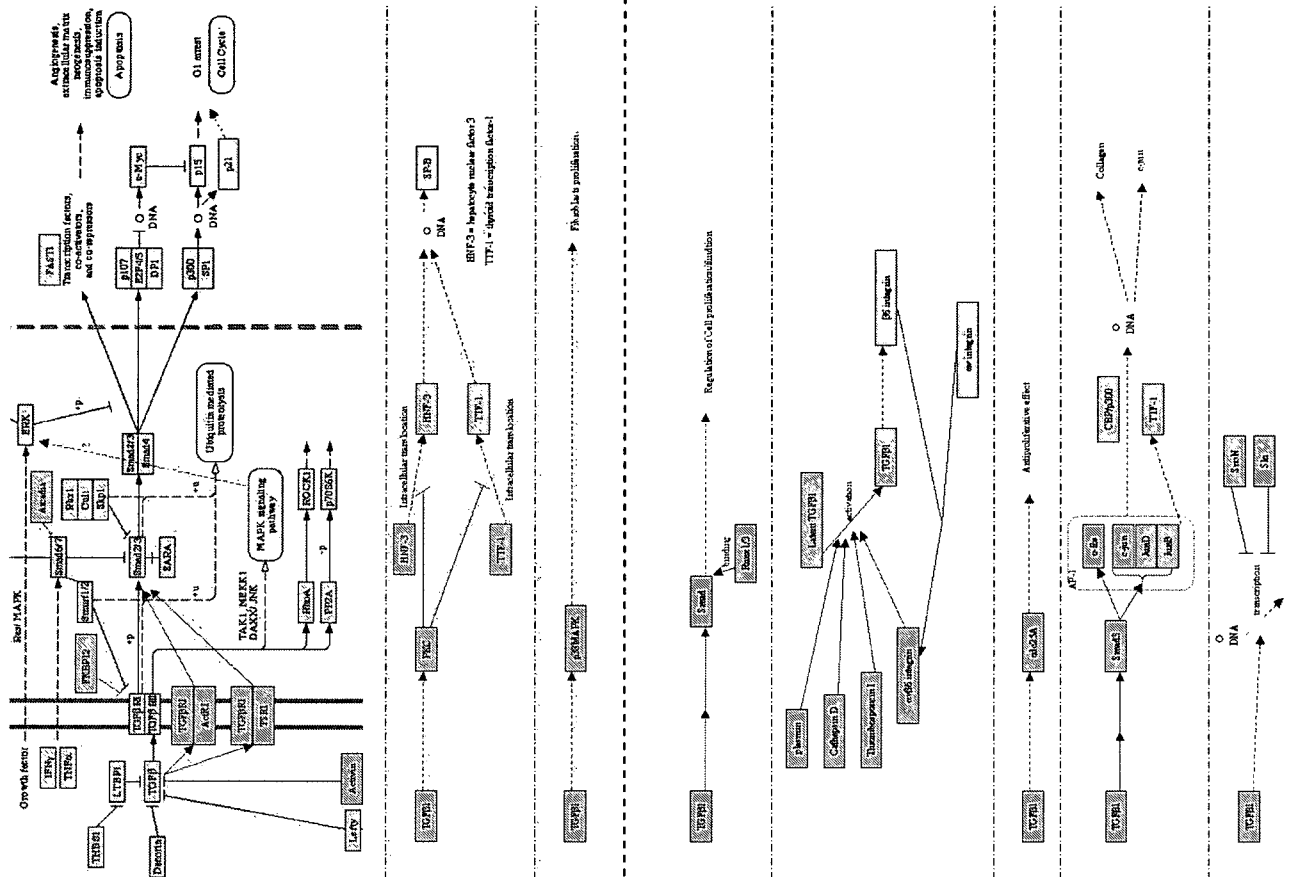


表 5. TGF  $\beta$  関連遺伝子内の SNP における群間アレル頻度差上位 100SNP (rsID は省略)

Gene name	Gene id	p-value	Gene name	Gene id	p-value	Gene name	Gene id	p-value	Gene name	Gene id	p-value
COL4A2	1284	0.00017066	COL4A2	1284	0.029274847	LTBP1	4052	0.063072446	MAP3K1	4214	0.088002437
COL4A2	1284	0.000592209	TGFBR3	7049	0.029275883	PRKCA	5578	0.063186114	CUL1	8454	0.088468283
COL4A2	1284	0.000874378	PRKCH	5583	0.029332103	COL4A2	1284	0.0639923	PRKCD	5580	0.089289216
COL4A2	1284	0.004338535	ACVRL1	94	0.030106488	PRKCA	5578	0.065401412	COL4A4	1286	0.09003183
COL4A2	1284	0.005656482	TGFBR2	7048	0.031988414	FOS	2353	0.067187054	RUNX1	861	0.091297702
COL4A2	1284	0.006308989	RUNX1	861	0.032326089	SMAD3	4088	0.070010376	FN1	2335	0.091812751
SMAD3	4088	0.006389928	MAP3K1	4214	0.032758232	LTBP1	4052	0.070297179	FN1	2335	0.091812751
LTBP1	4052	0.006485369	PRKCA	5578	0.034030829	PRKCQ	5588	0.070306549	FN1	2335	0.091812751
PLG	5340	0.007071578	PDGFB	5155	0.035048596	COL4A4	1286	0.070649918	TGFBR3	7049	0.092059279
SMAD3	4088	0.007977793	RUNX1	861	0.037361864	PRKCA	5578	0.076306764	THBS1	7057	0.09392947
PLG	5340	0.010404245	COL4A3	1285	0.037654838	SMAD6	4091	0.076723426	COL4A1	1282	0.094571289
COL4A1	1282	0.010700594	PRKCA	5578	0.038907447	PRKCH	5583	0.077915485	MAPK1	5594	0.09509707
SMAD3	4088	0.011131196	RUNX1	861	0.046180234	CUL1	8454	0.078753535	COL4A3	1285	0.096455967
COL4A2	1284	0.011166609	SMAD3	4088	0.046978721	COL4A1	1282	0.078810357	ITGA3	3675	0.097439057
SMAD6	4091	0.014277897	SMAD2	4087	0.047697365	TITF1	7080	0.079177327	TIMP3	7078	0.100956516
MMP12	4321	0.015097845	COL4A1	1282	0.048593106	COL3A1	1281	0.079825446	ROCK1	6093	0.105712166
PRKCB1	5579	0.016069806	RUNX1	861	0.049034015	PRKCA	5578	0.079837056	ROCK1	6093	0.105712166
PRKCH	5583	0.020005694	SMAD7	4092	0.050775646	COL4A3	1285	0.079837056	TIMP2	7077	0.106370646
IL2RB	3560	0.022383289	SMAD7	4092	0.050775646	COL4A3	1285	0.079837056	IL2RB	3560	0.107711605
PLG	5340	0.022563962	PRKCA	5578	0.052408093	COL4A4	1286	0.080315385	LTBP1	4052	0.10856098
TNFRSF1B	7133	0.022851785	SMAD2	4087	0.053161146	SMAD3	4088	0.084315047	ITGB1	3688	0.109868635
SMAD2	4087	0.023170057	COL4A1	1282	0.053859484	FGF7	2252	0.084873266	COL4A1	1282	0.113419285
CREBBP	1387	0.025583127	MAP3K1	4214	0.056477509	COL4A4	1286	0.085038941	TIMP3	7078	0.113675728
PRKCA	5578	0.028515016	COL4A3	1285	0.059808735	TGFBR3	7049	0.086936519	SMAD6	4091	0.115252864



## 候補遺伝子リストの作成

分担研究者 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：

本研究では候補遺伝子アプローチを想定している。動物モデル・患者検体の検討でこれまでに特発性を含めたILDの病態に関連が示唆されている分子・このパスウェイ上での関連分子の遺伝子を対象とする。今年度はILD病態関連分子としてTGF(transforming growth factor) $\beta$ を取り上げ、候補パスウェイ遺伝子群は、KEGGおよびILD・TGF $\beta$ 関連文献における記載をもとに126関連遺伝子をリストアップした。また、リストアップされた関連分子の一部をパスウェイマップとした。

### A. 背景、研究目的

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において候補遺伝子アプローチの対象とする候補遺伝子リストを作成する。

### B. 研究方法

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）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。今年度はILD病態関連分子としてTGF(tissue growth factor) $\beta$ を取り上げた。

### C. 研究結果

TGF $\beta$ に関連する分子の遺伝子として126遺伝子をリストアップした（表1）。リストアップされた関連分子の一部をパスウェイマップの形で図1に示す。

### E. 結論

TGF $\beta$ 関連126遺伝子がリストアップされた。関節リウマチにおける間質性肺病変関連遺伝子として、合併例と皮合併例の群間比較を行う解析対象とする一塩基多型を選択するために本リストを活用した。

### F. 健康危険情報 なし

### G. 研究発表

#### 1.論文発表

1. 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.* 2007;179(8):5504-13.
2. **Nakagome K**, Dohi M, Okunishi K, Tanaka R, Kouro T, Kano MR, Miyazono K, Miyazaki J, Takatsu K, Yamamoto K. IL-5-induced hypereosinophilia suppresses the antigen-induced immune response via a TGF $\beta$ -dependent mechanism. *J Immunol.* 2007; 179(1): 284-94.
3. Nakaya M, Dohi M, Okunishi K, **Nakagome K**, Tanaka R, Imamura M, Yamamoto K, Kaga K. Prolonged allergen challenge in murine nasal allergic rhinitis: nasal airway remodeling and adaptation of nasal airway

responsiveness. Laryngoscope 2007; 117(5):  
881-5.

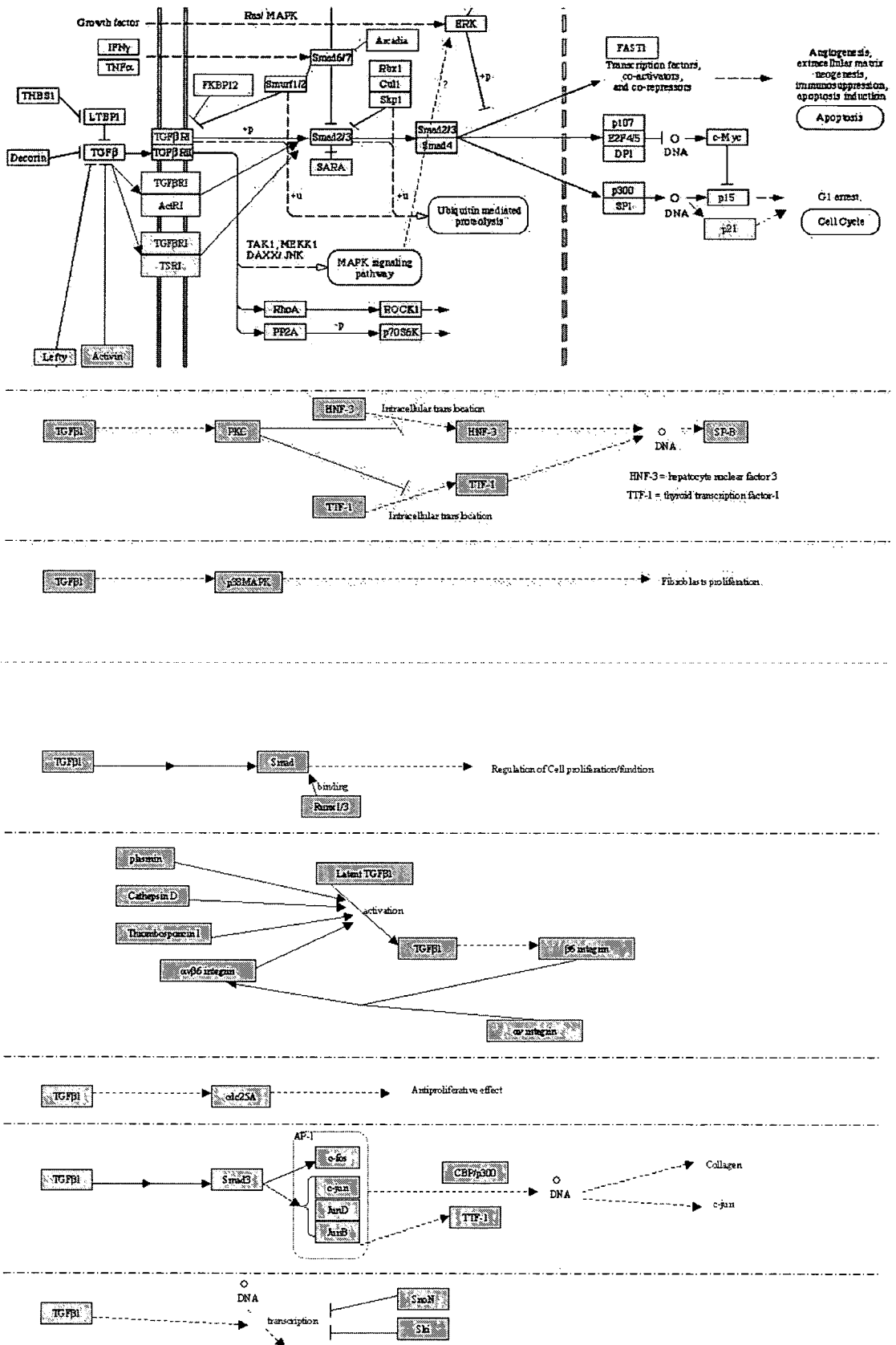
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

表 1. TGFβ 関連遺伝子リスト

gene name	gene ID	gene name	gene ID	Gene name	gene ID	gene name	gene ID	gene name	gene ID	gene name	gene ID
ACVR1	90	CTGF	1490	IL1B	3553	MAP3K7	6885	PRKCI	5584	SMAD6	4091
ACVRL1	94	CTSD	1509	IL2RA	3559	MAPK1	5594	PRKCQ	5588	SMAD7	4092
AGT	183	CUL1	8454	IL2RB	3560	MAPK14	1432	PRKCZ	5590	SMAD7	4092
CCL2	6347	DAXX	1616	IL2RG	3561	MAPK8	5599	RBL1	5933	SMURF1	57154
CDC25A	993	DCN	1634	IL6	3569	MMP1	4312	RBX1	9978	SMURF2	64750
CDKN1A	1026	E2F4	1874	IL7	3574	MMP12	4321	RHOA	387	SP1	6667
CDKN2B	1030	E2F5	1875	INHBA	3624	MMP2	4313	RNF111	54778	TFDP1	7027
CLU	1191	EIF3S2	8668	ITGA1	5771	MMP9	4318	ROCK1	6093	TGFB1	7040
COL1A1	1277	FGF2	2247	ITGA2	3673	MYC	4609	RPS6KB1	6198	TGFBR1	7046
COL1A2	1278	FGF7	2252	ITGA3	3675	MYC	4609	RUNX1	861	TGFBR2	7048
COL3A1	1281	FKBP1A	2280	ITGA5	3678	PDGFA	5154	RUNX3	864	TGFBR3	7049
COL4A1	1282	FN1	2335	ITGAV	3685	PDGFB	5155	SERPINE1	5054	THBS1	7057
COL4A2	1284	FNTA	2339	ITGB1	3688	PLAU	5328	SFPTC	6440	TIMP1	7076
COL4A3	1285	FOS	2353	ITGB6	3694	PLG	5340	SFTPB	6439	TIMP2	7077
COL4A4	1286	FOXA1	3169	JUN	3725	PPP2CA	5515	SFTPC	6440	TIMP3	7078
COL4A5	1287	FOXA2	3170	JUNB	3726	PRKCA	5578	SKI	6497	TIMP4	7079
COL4A6	1288	FOXH1	8928	JUND	3727	PRKCB1	5579	SKIL	6498	TITF1	7080
COL7A1	1294	IGF1	3479	LEFTY1	10637	PRKCD	5580	SKP1A	6500	TNF	7124
CREBBP	1387	IL10	3586	LEFTY2	7044	PRKCE	5590	SMAD2	4087	TNFRSF1A	7132
CSF2	1437	IL13	3596	LTBP1	4052	PRKCG	5582	SMAD3	4088	TNFRSF1B	7133
CSF2	1437	IL1A	3552	MAP3K1	4214	PRKCH	5583	SMAD4	4089	ZFYVE9	9372

図 5. TGFβ 関連分子のパスウェイマップ



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

間質性肺病変合併関節リウマチにおける TGF $\beta$  関連遺伝子の SNP 解析

分担研究者

山田 亮 東京大学医科学研究所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

大村浩一郎 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学助教

寺尾知可史 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学大学院生

研究要旨：

相模原病院、京大病院、道後温泉病院、東大病院より収集された検体のうち、ILD 合併についての画像による ILD 合併に関する臨床情報がすでに付帯されているものの中から、ILD 合併群 95 例、非合併例 77 例を対象とした。これらについて、中込分担研究者がリストアップした TGF $\beta$  関連 126 遺伝子に存在する SNPs のうち 1078SNPs でのアレル頻度差を検討した。単独 SNP として有意な頻度差を有するものは認められなかった。

A. 背景、研究目的

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において候補遺伝子アプローチの対象とする候補遺伝子リストを作成する。

B. 研究方法

収集された検体のうち、ILD 合併についての画像による ILD 合併に関する臨床情報がすでに付帯されているものの中から、ILD 合併群として A,B,C 合計 95 例を、非合併例として H を 77 例を対象とした。これらについて、表 4 に掲げた遺伝子に存在する SNPs のうち 1078SNPs についてタイピング・解析を行った。SNP 解析については、市販の全ゲノムジェノタイピングキットを活用することとした。同キットでタイピングされる SNPs のうち、予めリストアップした 126 候補遺伝子について、転写開始点の 1kb 上流から転写終止点の 1kb 下流までに含まれるものについて、タイピングデータを抽出した。各 SNP について、Call rate > 90%、Minor allele frequency > 0.5% をカットオフ値とした。

C. 研究結果

患者背景を表 1 に示す。ILD 合併群で男性が多く、高年齢であった。RA 罹患年数、Stage、Class については、有意差はみられなかった。

アッセイは平均 call rate : 99.66% であり、高い成功率であった。リストアップした 1078SNPs 中、814SNPs について、解析した。群間アレル頻度差について Trend 検定を行った結果の p 値上位 100SNPs を表 2 に示した。

D. 考察

表 2 に示した SNPs において、アレル頻度差の p 値は最も小さい SNP においても 0.00017 であり、1078SNPs についての解析に伴う多重検定の面を Bonferroni 補正にて考慮すると、単独の SNP で有意なアレル頻度差を有するものは認められなかった。今回解析に用いた検体は、RA の診断、ILD の有無以外の臨床情報が収集中であり、臨床情報を加味した ILD 合併群/非合併群各群の背景因子の検討が課題である。今回の解析で用いた検体数