

200807022A

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事業)

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール
および遺伝子検査システムの開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 猪子 英俊

平成21(2009)年 4月

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事業)

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール
および遺伝子検査システムの開発

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 猪子 英俊

平成21(2009)年 4月

【目 次】

班員名簿

I. 総括研究報告

- 関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール
および遺伝子検査システムの開発に関する研究 1
研究代表者 猪子英俊

II. 分担研究報告

1. 関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測アルゴリズム
の開発に関する研究 9
分担研究者 井ノ上逸朗
研究協力者 中岡博史
研究協力者 田嶋 敦
研究協力者 成田 暁
2. リウマチ感受性遺伝子解析に関する研究 16
分担研究者 岡 晃
分担研究者 田中正史
研究代表者 猪子英俊
3. 関節リウマチとHLA-DRB1の関連分析に関する研究 20
分担研究者 光永滋樹
研究協力者 鈴木康夫、本間康彦
協力者 奥平裕子、吉川枝里、中川美弥子、伊藤とも美
研究代表者 猪子英俊
4. 等温増幅法による新規HLAタイピング法の開発に関する研究 28
分担研究者 光永滋樹、木下健司
研究協力者 太田正徳
協力者 奥平裕子、吉川枝里
研究代表者 猪子英俊

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 41

IV. 研究成果の刊行物・別刷 46

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツールおよび遺伝子検査システムの開発
に関する研究班

班員名簿

区分	氏名	所属
研究代表者	猪子 英俊	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
分担研究者	井ノ上逸朗	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
	田中 正史	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
	岡 晃	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
	光永 滋樹	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
	木下 健司	武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学
研究協力者	鈴木 康夫	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学
	本間 康彦	東海大学医学部内科学系循環器内科学・検診センター
	太田 正穂	信州大学医学部法医学
	田嶋 敦	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
	成田 暁	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
	中岡 博文	財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総括研究報告書

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール
および遺伝子検査システムの開発に関する研究

研究代表者 猪子 英俊 東海大学医学部 医学部長
東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授

分担研究者 井ノ上逸朗 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授
分担研究者 田中 正史 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授
分担研究者 岡 晃 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 講師
分担研究者 光永 滋樹 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授
分担研究者 木下 健司 武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学 教授

研究要旨

関節リウマチ (RA) の病型・病態進行予測ツール作成のために、RA 患者と健常人で解析を行う RA 感受性遺伝子領域として35領域を厳選し、平均解像度6.0kbにて合計 SNP 数1,144個を配置した。これらの領域は RA との遺伝学的な関連に加え、その発症などに極めて重要な遺伝子がこれら領域に網羅的に含まれており、今後の進展が十分に期待されると考えられる。

病型・病態進行予測ツールの精度を上げるために、既報の関節リウマチ (RA) 感受性遺伝子を対象に、研究間の異質性を考慮に入れた変量モデルを用いてメタ・アナリシスを行ったところ、*TNFAIP3-OLIG3*、*STAT4*、*TRAF1-C5*、*PADI4* で有意な関連が認められた。さらに、RA と関連する SNP を網羅的に検出するため、Bayesian logistic regression (BLR) を用いた複数 SNP 同時関連解析法の検討を行い、我々が持つ RA SNP dataset の再解析を行ったところ、*NOTCH4* および *BTNL2* の SNP を含むモデルが選択された。連鎖不平衡にある領域内の複数 SNP のうち、独立して疾患と関連している SNP を検出する手法として有効であることが確認された。このようにして検証された SNP を、今後予測ツール作成時に組み込んでいくとともに、必要な場合は解析対象1,144 SNPs に加えていく。

新規に収集した症例で、HLA・DRB1 と関節リウマチとの関連を分析した。日本人集団でよく知られているように、DRB1*0405 との強い関連が確認された： $P < 0.0001$, Odds ratio (OR) = 2.48, 95% 信頼区間 (95% CI): 1.59-3.87。一方、DRB1*0802 と DRB1*1302 では protective な関連が認められた。Shared Epitope に基づく分類でも、同様に S_{3P} 群で有意な関連が認められ、X 群では protective な関連が認められた。DRB1*0901 アリルは関節リウマチとの関連は認められなかったが、genotype としては DRB1*0405 + DRB1*0901 のヘテロだけが有意な相関を示した ($P = 0.0034$, OR = 3.00, 95% CI: 1.44-6.25)。日本人集団で DRB1*0901 は抗 CCP 抗体陰性の RA と関連しているとの報告もあり、今後症例数を増やし、診療情報も含め DRB1*0901 との関連の詳細な検討が必要であると考えられた。

等温増幅法の一つである Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) の反応条件を検討し、系の複雑さを減少させるために、外側のプライマーである F3 と B3 を用いない LAMP の系を作成した。この系を用いて、① HLA の genotyping を行う場合に問題となる ambiguity 解決の検討、② HLA のアリルタイピングの実行可能性、③ HLA・DRB1 の low resolution タイピング、④ プラスチック基板上で等温増幅反応と発色反応を行うことによる HLA・DRB1 の low resolution タイピングの肉眼による判定、について検討を行い、それらが可能であることを示した。

A. 研究目的

本研究は関節リウマチ (RA) 感受性遺伝子の多型と、病型および抗CCP抗体等の診療情報との関連解析に基づくアルゴリズム開発により発症初期に病態進行を予測し、それによる適切な投薬・治療での患者QOLの向上を目指すとともに、それらの診断に用いるための感受性遺伝子の SNP、HLAの迅速・簡便な検査法を開発することにより、“ベンチワークからベッドサイドへ”の医療の実現を目的としている。

B. 研究方法

本研究のために、① 診療情報および多型解析結果のデータベースの構築とそれに基づく予測アルゴリズムの開発、② SNP、HLAの多型解析および関連分析、③ 簡便・迅速・安価な多型検査システムの開発、に関しそれぞれサブグループを形成し実行している。

① 診療情報および多型解析結果のデータベースの構築とそれに基づく予測アルゴリズムの開発：

Genome Medical Research Coordinator (GMRC) により文書によるインフォームドコンセントを取得したうえで、東海大学医学部付属病院リウマチ内科に来院した関節リウマチ患者、および健康人コントロールとして同検診センター受診者、から診療情報と血液検体入手した。血液検体から常法によりDNAを抽出しDNA多型の解析に用いるとともに、血漿を用いて抗CCP抗体を測定した。診療情報および多型解析結果 (HLAおよびSNPタイピング結果) を入力しデータベースを構築した。

予測ツール開発の準備として、また予測アルゴリズムの精度をあげるために、既報のRA感受性遺伝子のメタ・アナリシスを行った。このとき、研究間の異質性が認められたので、それを考慮に入れた変量モデルを用いて解析を行った。解析対象は、文献的に抽出できた *NFAIP3-OLIG3* (rs6920220)、*STAT4* (rs7574865)、*TRAF1-C5* (rs10818488, rs37161847)、*PADI4* (rs2240340)、*TNFRSF1B* (rs1061622)についてそれぞれ4、15、9、

6、8および9件の研究である。さらに、RAと関連するSNPを網羅的に検出するため、Bayesian logistic regression (BLR) を用いた複数SNP同時関連解析法の検討を行った。解析には我々が持っているRA SNP dataset (Tamiya et al., 2005)を用いた。SNPあたりの遺伝子型欠測率が<10%、検体あたりの遺伝子型欠測率が<10%であるデータを利用した。遺伝子型の欠測について HapMap JPT の phase II data を reference panel としてデータの補完を行った。

② SNP、HLAの多型解析および関連分析：

我々が同定した感受性遺伝子領域をはじめ、多くの文献を精査することにより感受性遺伝子領域を厳選した。また選抜された領域において、SNPを選択する基準として、実験上のクオリティー確保ならびに効率化を図るため、日本人集団において MAF (Minor Allele Frequency) 0.1 以上の SNP、さらに pair-wise r^2 を算出し、 $r^2 > 0.8$ で規定される LD ブロックについては tagging して候補 SNP をリストアップした。

HLAのタイピングは蛍光ビーズを用いたSSO法 (Luminex 法) (LABType SSO, ベリタス) により行った。DRB1の shared epitope は、du Montcel ST et al. の報告に従い分類し、解析を行った。統計解析は Fisher's Exact Test により行い、Woolfの方法により95%信頼区間 (以下95% CI) を求めた (GraphPad InStat)。

③ 簡便・迅速・安価な多型検査システムの開発：

等温増幅反応は特殊な機器を使用しないので、簡便・迅速・安価で、また患者に近い場所での検査が可能になると考え、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) を用いた検査システムを検討した。LAMP反応は、SYBR Green I 存在下でABI社のPRISM7000またはPRISM7500を使用し、増幅した二本鎖DNAにSYBR Green Iがインターカレートして増大する蛍光強度をモニターすることにより増幅の有無を判定した。さらに、プローブを固定したプラスチック基板上でLAMPを行い、発色反応により陽性プロ

ブを検出する方法についても検討した。96 well プレート の各 well に5'末端をC6アミノ化したプローブをプラスチック基板上に固定化した。その後 biotin-dUTP 存在下、各 well 中で LAMP 反応を行った。プラスチック基板上のプローブから LAMP 反応により伸長した DNA、すなわち陽性プローブ、の検出はストレプトアビジン-AP (バイオ・ラッド) を反応させ、BCIP/NBT 溶液 (パーキンエルマー) により発色させた。

C. 研究結果

- ① 診療情報および多型解析結果のデータベースの構築とそれに基づく予測アルゴリズムの開発:

TNFAIP3-OLIG3, STAT4, TRAF1-C5, PADI4, TNFRSF1B についてメタ・アナリシスを行った。これらのうち *STAT4, TRAF1-C5, PADI4* では、研究間で遺伝的効果の異質性が認められたため、研究間の異質性を考慮に入れた変量モデルを用いて解析を行った。その結果、*TNFAIP3-OLIG3, STAT4, TRAF1-C5, PADI4* で有意な関連が認められた。本研究で着目している他の遺伝子についてもメタ・アナリシスを進めている。同時に、関節リウマチと関連する SNP を網羅的に検出するため、Bayesian logistic regression (BLR) を用いた複数 SNP 同時関連解析法の検討を行った。関節リウマチ SNP dataset (Tamiya et al. *Hum Mol Genet* 14: 2305-2321, 2005) の再解析を行ったところ、*NOTCH4* および *BTNL2* の SNP を含むモデルが選択された。連鎖不平衡にある領域内の複数 SNP のうち、独立して疾患と関連している SNP を検出する手法として有効であることが確認された。

- ② SNP、HLA の多型解析および関連分析:

SNP の選択は最終的に、対象領域合計 6,888kb、総 SNP 数 1,144 個、平均解像度 6.0kb (SD: 6.33) となった。また、これらの SNP の日本人集団における MAF は (HapMap project のデータより)、平均 0.283 (SD: 0.124)、最大 0.5、最小 0.1 であり、遺伝統計学的な解析に耐えうるものと考えられた。

DRB1 のアレルと RA との関連解析の結果、有意差があったものは DRB1*0405 ($P < 0.0001$, OR = 2.48, 95% CI: 1.59-3.87)、DRB1*0802 ($P = 0.0037$, OR = 0.15, 95% CI: 0.03-0.67)、DRB1*1302 ($P = 0.0082$, OR = 0.34, 95% CI: 0.15-0.76) の 3 アレルであり、DRB1*0802、DRB1*1302 は protective であった。

du Montcel らの shared epitope の分類により DRB1 アレルを分類し、関連分析を行ったところ、RA 発症との関連がみられたものは DRB1*0405 を含む S_{3P} のグループ ($P < 0.0001$, OR = 2.68, 95% CI: 1.71-4.21) であり、protective なものは DRB1*0802 を含む X のグループであった。一方、DRB1*1302 を含む S_1 のグループでは有意な関連は認められなかった ($P = 0.1668$)。

HLA-DRB1 の genotype との関連分析では、DRB1*0405 + DRB1*0901 のヘテロ接合体が RA 発症と強い関連を示した ($P = 0.0034$, OR = 3.00, 95% CI: 1.44-6.25)。その他のもので有意差を示すものは無かった。

- ③ 簡便・迅速・安価な多型検査システムの開発:

HLA genotyping の ambiguity のモデルとして HLA-DRB1*0405 + DRB1*1501 のヘテロと HLA-DRB1*0410 + DRB1*1502 のヘテロの組み合わせを選んだとき、DRB1*0405、DRB1*1501、HLA-DRB1*0410、DRB1*1502 をそれぞれアレル特異的に増幅することが可能であった。

また、日本人集団で 0.1% 以上のアレル頻度を示す 32 種類の DRB1 アレルを 11 グループに分け、グループ特異的増幅を行うことにより、この方法で HLA-DRB1 の Low resolution での genotyping が可能であった。さらに、この Low resolution typing をプローブを固定したプラスチック基板上で行うことにより、肉眼的に陽性プローブを判定可能であった。

D. 考察

メタ・アナリシスで研究間に異質性が認められる場合、変量モデルを用いる

ことで、偽陽性を抑えることができると考えられる。変量モデルを適用した結果、*TNFAIP3-OLIG3*, *STAT4*, *TRAF1-C5*, *PADI4* で有意な関連が認められた。また、公開データベースのメタ・アナリシスから得られる知見を Bayesian logistic regression における事前分布として取り込むことで、サンプル数の不足が補完され、広く追認された SNP であれば確実にモデルに取り込み、偽陽性が疑われる SNP についてはモデルから除外するという評価法の構築が可能になるのではないかと考えられる。このような考えに基づき、新たな手法の開発を進めている。

今後の解析対象として選択した SNP には関節リウマチとの遺伝学的な関連に加え、さらにその発症などに極めて重要な遺伝子がこれら領域に網羅的に含まれており、今後の進展が十分に期待される。

HLA アリルを shared epitope により分類したとき、shared epitope は RA 感受性の HLA-DRB1 アリルをよく説明するが、アジア人集団においては一部当てはまらない面もあると考えられた。これは集団差によるものか RA の病型等の他の要因によるものか不明である。今後、症例数を増やすとともに、抗 CCP 抗体を含む診療情報を併せ、詳細な検討を行いたい。

反応条件を検討、変更するとともに、使用するプライマーの数を減らし複雑さを低減させた等温増幅法 LAMP により HLA の genotyping が可能であることを示した。本法は等温増幅 60 分、SYBR Green I による発色による可視化に 10 分、または BCIP/NBT によるプラスチック基板上 (96 well プレート) での発色に 30 分、で genotyping が可能である。基本的には恒温槽があればよいので特殊な機器も必要としないので、この方法を基に簡便・迅速・安価な検査システムの開発が可能であると考えられる。

E. 結論

関節リウマチの診療情報と関節リウマチ感受性遺伝子の多型情報 (HLA および SNP) を基に今後開発していく病型・病態進行を予測するツール (数理モデル) 開発体制が整った。さらに予測ツールを実用

化する上で必要な多型解析システムの HLA 部分については目処が立った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kulski JK, Shigenari A, Shiina T, Hosomichi K, Yawata M, Inoko H. HLA-A allele associations with viral MER9-LTR nucleotide sequences at two distinct loci within the MHC alpha block. *Immunogenetics*. in press
- 2) Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Association of the toll-like receptor gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*. 67, 725-7, 2008.
- 3) Akiyama M, Yatsu K, Ota M, Katsuyama Y, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Kumagai N, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Microsatellite analysis of the GLC1B locus on chromosome 2 points to NCK2 as a new candidate gene for normal tension glaucoma. *Br J Ophthalmol*. 92, 1293-6, 2008.
- 4) Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I, Inoko H. Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. *Hum Genet*. 123, 655-60, 2008.
- 5) Ohtsuka M, Inoko H, Kulski JK, Yoshimura S. Major histocompatibility complex (Mhc) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strain C57BL/6. *BMC Genomics*. 9, 178, 2008.
- 6) Sekigawa T, Tajima A, Hasegawa T,

- Hasegawa Y, Inoue H, Sano Y, Matsune S, Kurono Y, Inoue I. Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin intolerant asthma. *Clin Exp Allergy* in press.
- 7) Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J Hepatol* 50, 453-460, 2009.
 - 8) Bilguvar K, Yasuno K, Niemela M, Ruigrok YM, Fraunberg M, Duijn CM, Berg LH, Mane S, Mason C, Choi M, Gaaal E, Bayri Y, Kolb L, Arlier Z, Ravuri S, Ronkainen A, Tajima A, Laakso A, Hata A, Kasuya H, Koivisto T, Rinne J, Ohman J, Breteler MMB, Wijmenga C, State MW, Rinkel GJE, Hernesniemi J, Jaaskelainen JE, Palotie A, Inoue I, Lifton RP, Gunel M. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in Europe and Japanese populations. *Nat Genet* 40, 1472-1477, 2008.
 - 9) Nishida N, Koike A, Tajima A, Ogasawara Y, Ishibashi Y, Uehara Y, Inoue I, Tokunaga K. Evaluating the performance of Affymetrix SNP Array 6.0 platform with 400 Japanese individuals. *BMC Genomics* 9, 431, 2008.
 - 10) Kirschek B, Kasuya H, Tajima A, Akagawa H, Sasaki T, Yoneyama T, Ujiie H, Kubo O, Bonin M, Takakura K, Hori T, Inoue I. Network-based gene expression analysis of intracranial aneurysm tissue reveals role of antigen presenting cells. *Neuroscience* 154, 1398-1407, 2008.
 - 11) Uno Y, Suzuki Y, Wakaguri H, Sakamoto Y, Sano H, Osada N, Hashimoto K, Sugano S, Inoue I. Analysis of expressed sequence tags from liver in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): A systematic identification of drug-metabolizing enzyme genes. *FEBS Let* 582, 351-358, 2008.
 - 12) Sasahara A, Kasuya H, Kirschek B, Tajima A, Onda H, Sasaki T, Akagawa H, Hori T, Inoue I. Gene expression in a canine basilar artery vasospasm model: a genome-wide network-based analysis. *Neurosurg Rev* 31, 283-290, 2008.
 - 13) Bae JS, Cheong HS, Kim JO, Lee SO, Kim EM, Lee HW, Kim S, Kim JW, Cui T, Inoue I, Shin HD. Identification of SNP markers for common CNV regions and association analysis of risk of subarachnoid aneurismal hemorrhage in Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 593-596, 2008.
 - 14) Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tamura R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics* 9, 90, 2008.
 - 15) Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, Inoue I. Integration of hepatitis B virus DNA into the MPP (mixed lineage leukemia) 4 gene and rearrangements of *MLL4* in human hepatocellular carcinoma cells. *Hum Mutat* 29, 703-708, 2008.
 - 16) Okada H, Tajima A, Shichiri K, Tanaka A, Tanaka K, Inoue I. Genome-wide expression analyses of testes of non-obstructive azoospermia patients demonstrate a specific gene expression profile and implicate *ART3* in genetic susceptibility. *PLoS Genet* 4, e26, 2008.
 - 17) Nakaoka H, Gaillard C, Fujinaka K, Watanabe N, Ito M, Kawada K, Ibi T, Sasae Y, Sasaki Y. The use of link provider data to improve national genetic evaluation across weakly connected subpopulations. *J Anim Sci* 87, 62-71, 2009.
 - 18) Nakaoka H, Gaillard C, Ibi T, Sasae Y, Sasaki Y. Adjusting for heterogeneity of variance for carcass

traits affects single and multiple trait selections in genetic evaluation of Japanese Black cattle. *Anim Sci J* 79, 645-654, 2008.

2. 学会発表

58th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics
Philadelphia, Pennsylvania November 11-15, 2008

- 1) Exploration of genes related to X-linked mental retardation (XLMR) by in-house X-tiling array.

S. Honda¹, S. Hayashi¹, I. Imoto¹, I. Inoue², T. Yabe³, K. Tokunaga⁴, E. Nakagawa⁵, Y. Goto⁶, J. Inazawa¹.

¹Dept Mol Cytogenet, Med Res Inst, Tokyo med & dent Univ, Tokyo, Japan; ²Div Mol Life Sci, Sch Med, Tokai Univ, Isehara, Japan; ³Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Cent, Tokyo, Japan; ⁴Dept Hum Genet, Grad Sch Med, Univ Tokyo, Tokyo, Japan; ⁵Div Child Neurol Musashi Hosp, Natl Center Neurol & Psychiat, Tokyo, Japan; ⁶Dept Mental Retardation and Birth Defect Res, Natl Inst Neurosci, Natl Cent Neurol & Psychiat, Tokyo, Japan.

- 2) Allelic alterations in epithelial ovarian carcinomas uncovered by Affymetrix SNP Array 5.0.

Tajima¹, K. Yoshihara², I. Inoue², K. Tanaka².

¹Dep Molecular Life Sci, Tokai Univ Sch Medicine, Kanagawa, Japan; ²Dep Obstet & Gynecol, Niigata Univ Graduate Sch Med & Dent Sciences, Niigata, Japan.

- 3) A two-stage whole genome association study of intracranial aneurysm in a Japanese cohort. K. Yasuno¹, A. Tajima¹, T. Takahashi¹, A. Hata², I. Inoue¹.

¹Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan; ²Department of Public Health, School of Medicine, Chiba University Chiba Japan

- 4) Development of Genome Wide Association Database in Japanese Integrated Database Project.

Koike¹, N. Nishida², I. Inoue³, S. Tsuji⁴, K. Tokunaga².

¹Cent Res Lab, Hitachi, Ltd, Japan; ²Graduate School of Medicine, University of Tokyo; ³Tokai University School of Medicine; ⁴Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo.

- 5) Elucidation of etiologies in complex diseases under multivariate variance component-threshold model.

Narita¹, K. Yasuno¹, H. Nakaoka¹, A. Tajima¹, I. Inoue^{1,2}.

¹Dept Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, Japan; ²Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi Saitama Japan

- 6) 清水佐良子、光永滋樹、吉川枝里、岡晃、猪子英俊: Loop-mediated

Isothermal Amplification 法による ambiguity 解決の可能性. 第17回日本組織適合性学会大会 (大阪), 2008.

- 7) 光永滋樹、清水佐良子、奥平裕子、岡晃、猪子英俊: 等温増幅法を用いた HLA の新規 DNA タイピング法. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 BMB 2008 (神戸), 2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測アルゴリズムの開発

分担研究者	井ノ上逸朗	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授
研究協力者	中岡 博文	財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団	
研究協力者	田嶋 敦	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	講師
研究協力者	成田 暁	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	助教

研究要旨

本研究では、当研究グループが行ったマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド関連解析や他の研究者による解析で報告されている疾患感受性遺伝子の SNP 多型情報とリウマチの病型や抗 CCP 抗体等の診療情報との多変量解析に基づき、病型・病態進行予測アルゴリズムの開発を行う。予測アルゴリズムの精度を上げるためには、疾患との関連が広く追認されている SNP を用いることが重要であると考えた。そこで、近年のゲノムワイド関連解析や候補遺伝子アプローチから関節リウマチ感受性遺伝子として報告されている *TNFAIP3-OLIG3*, *STAT4*, *TRAF1-C5*, *PADI4*, *TNFRSF1B* についてメタ・アナリシスを行った。これらのうち *STAT4*, *TRAF1-C5*, *PADI4* では、研究間で遺伝的効果の異質性が認められたため、研究間の異質性を考慮に入れた変量モデルを用いて解析を行った。その結果、*TNFAIP3-OLIG3*, *STAT4*, *TRAF1-C5*, *PADI4* で有意な関連が認められた。本研究で着目している他の遺伝子についてもメタ・アナリシスを進めている。

同時に、関節リウマチと関連する SNP を網羅的に検出するため、Bayesian logistic regression (BLR) を用いた複数 SNP 同時関連解析法の検討を行った。関節リウマチ SNP dataset (Tamiya et al. *Hum Mol Genet* 14: 2305-2321, 2005) の再解析を行ったところ、*NOTCH4* および *BTNL2* の SNP を含むモデルが選択された。連鎖不平衡にある領域内の複数 SNP のうち、独立して疾患と関連している SNP を検出する手法として有効であることが確認された。

A. 研究目的

関節リウマチは慢性の全身性炎症性疾患であり、主たる病態は年余にわたって持続する慢性滑膜炎である。炎症の結果として関節は徐々に破壊され、運動機能障害を呈する。発症や病態の進展には複数の遺伝要因および環境要因が関与する、多因子疾患であるとされている。関節リウマチ感受性遺伝子の SNP 多型情報と病型および抗 CCP 抗体等の診療情報などから、発症初期に病態進行を予測することが可能となれば、適切な投薬と治療方針の決定に役立つと考えられる。

本研究では、多変量解析に基づく病型・病態進行予測アルゴリズムの開発を

目的としている。現在、SNP 多型情報と診療情報のデータベース構築へ向け、既知の関節リウマチ感受性領域の多型情報の収集を行っているが、予測アルゴリズムの精度を上げるためには、疾患との関連が広く追認されている SNP を用いることが重要であると考え、近年のゲノムワイド関連解析や候補遺伝子アプローチにおいて同定された関節リウマチ感受性遺伝子についてメタ・アナリシスを行った。

また、複数の遺伝子と環境の影響によって決定される多因子疾患の関連解析では、現在主流となっている単一座位検定を行うよりも、分析対象であるすべての SNP 遺伝子型を同時に評価し、疾患のリ

スクと最も関連のある一連の SNPs を同定することが望ましい。ところが、大規模な関連解析では SNP 数の増加に伴い考慮すべきモデル数が極めて多くなり、stepwise ロジスティック回帰のように変数選択に基づく方法の適用は不可能である。一方、Bayesian logistic regression (BLR) では、各 SNP の効果の大きさの事前分布として、ラプラス分布を設定したベイズ推定を行うことにより、疾患と実質的な関連が認められない SNP の推定値がゼロへと縮小(shrink)されるため、変数選択を行うことなく、複数 SNP を同時に評価することが可能となる。今回は、関節リウマチ SNP dataset (Tamiya et al., 2005)の再解析を通じて、BLR の有効性を評価した。

B. 研究方法

1) 関節リウマチ感受性遺伝子のメタ・アナリシス

SNP 多型情報のデータベース構築に向け、我々がこれまでにマイクロサテライトマーカーによるゲノムワイド関連解析によって見出した領域および既知の領域、計 35 領域のうち、*TNFAIP3-OLIG3*、*STAT4*、*TRAF1-C5*、*PADI4*、*TNFRSF1B* についてメタ・アナリシスを行った。

文献検索には PubMed を使い、2008 年 12 月までに公表された論文およびその参考文献についてスクリーニングを行った。選択条件として、血縁関係のない検体を用いた症例対照関連研究をメタ・アナリシスに用いた。感受性遺伝子同定のため多段階スクリーニングを用いている報告については、メタ・アナリシスに際して、各スクリーニングを一つの研究として扱った。

遺伝的効果の大きさはアレリック・テストにおけるオッズ比とした。遺伝的効果の大きさに関する研究間の異質性の評価として、Cochran's Q test (Cochran, 1954) および I^2 統計量 (Higgins and Thompson, 2002) を用いた。

統合効果の推定には、漸近分散法による母数モデルおよび DerSimonian-Laird の方法による変量モデルの両者を用い、結果を比較した。

2) BLR を用いた複数 SNP 同時関連解析法の検討

解析には関節リウマチ SNP dataset (Tamiya et al., 2005) を用いた。SNP あたりの遺伝子型欠測率が <10%、検体あたりの遺伝子型欠測率が <10% であるデータを利用した。遺伝子型の欠測について HapMap JPT の phase II data を reference panel としてデータの補完を行った (PLINK プログラム; Purcell et al., 2007)。その結果、症例 940 件、対照 738 件の 66SNP について全ての遺伝子型データが利用可能となった。

BLR には HyperLasso プログラム (Hoggart et al., 2008) を用いた。

C. 研究結果

1) 関節リウマチ感受性遺伝子のメタ・アナリシス

文献検索の結果、*NFAIP3-OLIG3* (rs6920220)、*STAT4* (rs7574865)、*TRAF1-C5* (rs10818488 および rs37161847)、*PADI4* (rs2240340)、*TNFRSF1B* (rs1061622) についてそれぞれ 4、15、9、6、8 および 9 件の研究を抽出できた。これらの研究をメタ・アナリシスによって統合した結果を図 1 および表 1 に示した。

図 1. *STAT4* 遺伝子 rs7574865 の T アレルと関節リウマチ感受性との関連に対するオッズ比 (正方形は個々の研究のオッズ比を、菱形はそれぞれ母数モデル(上段)および変量モデル(下段)でのオッズ比を表わしている)

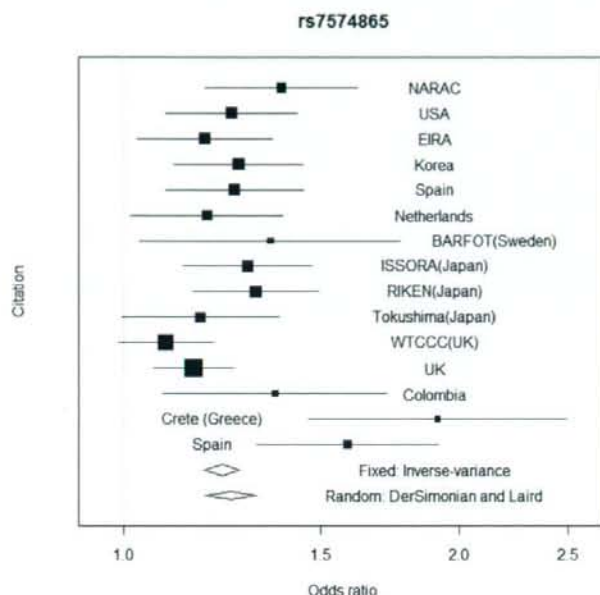


表 1. 関節リウマチ感受性遺伝子におけるメタ・アナリシスの結果

Gene	Polymorphism	Number of study	Heterogeneity			Random effect			Fixed effect		
			Q	(P-value)	I ²	OR	(95% CI)	P-value	OR	(95% CI)	P-value
<i>TNFAIP3-OLIG3</i>	rs6920220	4	1	0.828	0	1.25	(1.20-1.31)	4.02E-23	1.25	(1.20-1.31)	4.02E-23
<i>STAT4</i>	rs7574865	15	32	4.51E-3	55.8	1.27	(1.20-1.34)	2.22E-16	1.24	(1.19-1.28)	3.47E-31
<i>TRAF1-C5</i>	rs10818488	9	42	1.62E-06	80.8	1.21	(1.08-1.35)	7.57E-04	1.14	(1.09-1.19)	2.66E-09
<i>TRAF1-C5</i>	rs37161847	6	35	1.23E-06	85.9	1.19	(1.06-1.35)	4.39E-03	1.13	(1.09-1.18)	6.22E-09
<i>PADI4</i>	rs2240340	8	17	0.018	58.4	1.18	(1.07-1.30)	1.23E-03	1.17	(1.10-1.24)	2.28E-07
<i>TNFRSF1B</i>	rs1061622	9	11	0.178	30.0	0.98	(0.86-1.11)	0.736	0.96	(0.88-1.05)	0.389

Cochran's Q test により、*STAT4*、*TRAF1-C5*、*PADI4* では、研究間で遺伝的効果の異質性が認められた ($P < 0.05$)。また、これらの遺伝子における I^2 統計量はいずれも 50% を上回っており、研究間の異質性の度合いは極めて大きいことが分かった。

そこで、研究間の異質性を考慮に入れた変量モデルを用いて解析を行った。そ

の結果、*TNFAIP3-OLIG3*、*STAT4*、*TRAF1-C5*、*PADI4* で有意な関連が認められた ($P = 1.23 \times 10^{-3} \sim 4.02 \times 10^{-23}$)。遺伝的効果の大きさを表すオッズ比は、1.18 ~ 1.27 であり、いずれも moderate な効果だった。

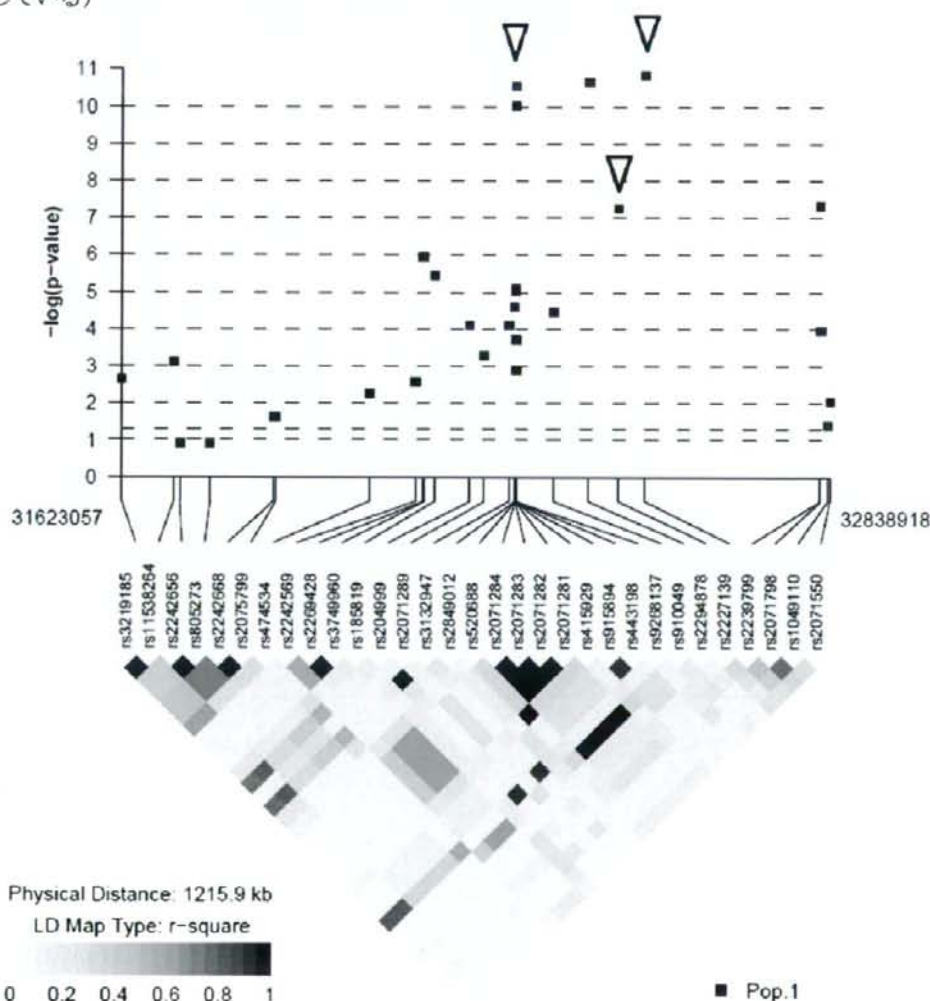
2) BLR を用いた複数 SNP 同時関連解析法の検討

関節リウマチ SNP dataset (Tamiya et al., 2005)の再解析を行った。6番染色体上の33SNPについての単一座位解析およびBLRによる解析の結果を図2に示す。単一座位解析では領域内の多くのSNPがボンフェローニの補正に基づく有意水準 ($\alpha=0.05/66$)を下回るP-valueを示している。一方、BLRを適用した場合、逆三角で示した3SNP(rs2071282、rs2294878、rs2227139)を含むモデルが選択された。rs2071282はNOTCH4のexon4、

rs2294878はBTNL2のintron2、rs2227139はHLA-DRAとHLA-DRB5の遺伝子間領域に位置する多型である。これら3SNPは疾患と実質的な関連を持ち、SNP間の連鎖不平衡の弱いものであった($r^2=0.04\sim 0.07$)。また、P-valueが低くても、これら3SNPと連鎖不平衡にあるSNPはモデルから除外されていることが分かった。つまり、領域内の複数SNPのうち、独立して疾患と関連しているSNPを検出することができた。

図2. 関節リウマチ SNP dataset の再解析の結果 (6番染色体)

(■は単一座位解析での各SNPの対数化P-valueを、▽はBLRで選択されたSNPを示している)



D. 考察

近年のゲノムワイド関連解析や候補遺伝子アプローチにより関節リウマチとの関連が示唆されている遺伝子についてメタ・アナリシスを行った。これらのうち *STAT4*, *TRAF1-C5*, *PADI4* では、研究間で遺伝的効果の異質性が認められた。そこで、研究間の異質性を考慮に入れた変量モデルを用いて解析を行った。母数モデルと変量モデルの結果を比較すると、研究間の異質性を考慮に入れた変量モデルにおいて 95%信頼区間が広くなり、P-value が大きくなっていった。研究間に異質性が認められる場合、変量モデルを用いることで、偽陽性を抑えることができると考えられる。変量モデルを適用した結果、*TNFAIP3-OLIG3*, *STAT4*, *TRAF1-C5*, *PADI4* で有意な関連が認められた。本研究で着目している他の遺伝子についてもメタ・アナリシスを進めていく。

BLR を適用することで、連鎖不平衡にある領域内の複数 SNP のうち、独立して疾患と関連している SNP を検出することができた。この特性は HLA 領域のように連鎖不平衡が高い領域の SNP 解析にきわめて有用であると考えられる。

しかし、実データのみを用いた解析では、サンプル数の不足により、弱い効果しか示さない SNP の検出力が不十分となることが懸念される。そこで、公開データベースのメタ解析から得られる知見を BLR における事前分布として取り込むことで、サンプル数の不足が補完され、広く追認された SNP であれば確実にモデルに取り込み、偽陽性が疑われる SNP についてはモデルから除外するという評価法の構築が可能になるのではないかと考え、新たな手法の開発を進めている。

E. 結論

メタ・アナリシスを行った結果、関節リウマチと *TNFAIP3-OLIG3*, *STAT4*, *TRAF1-C5*, *PADI4* の関連が追認できた。本研究で着目している他の遺伝子についてもメタ・アナリシスを進めていく。今後、これら関節リウマチ感受性遺伝子の

SNP 多型情報と臨床情報などから、病型・病態進行を予測する数理モデルの開発に取り組んでいく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sekigawa T, Tajima A, Hasegawa T, Hasegawa Y, Inoue H, Sano Y, Matsune S, Kurono Y, Inoue I. Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin intolerant asthma. Clin Exp Allergy in press.
- 2) Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. J Hepatol 50, 453-460, 2009.
- 3) Bilguvar K, Yasuno K, Niemela M, Ruigrok YM, Fraunberg M, Duijn CM, Berg LH, Mane S, Mason C, Choi M, Gaaal E, Bayri Y, Kolb L, Arlier Z, Ravuri S, Ronkainen A, Tajima A, Laakso A, Hata A, Kasuya H, Koivisto T, Rinne J, Ohman J, Breteler MMB, Wijmenga C, State MW, Rinkel GJE, Hernesniemi J, Jaaskelainen JE, Palotie A, Inoue I, Lifton RP, Gunel M. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in Europe and Japanese populations. Nat Genet 40, 1472-1477, 2008.
- 4) Nishida N, Koike A, Tajima A, Ogasawara Y, Ishibashi Y, Uehara Y, Inoue I, Tokunaga K. Evaluating the performance of Affymetrix SNP Array 6.0 platform with 400 Japanese individuals. BMC Genomics 9, 431, 2008.
- 5) Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I, Inoko H. Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. Hum Genet 123, 655-660, 2008.
- 6) Krischek B, Kasuya H, Tajima A,

- Akagawa H, Sasaki T, Yoneyama T, Ujii H, Kubo O, Bonin M, Takakura K, Hori T, Inoue I. Network-based gene expression analysis of intracranial aneurysm tissue reveals role of antigen presenting cells. *Neuroscience* 154, 1398-1407, 2008.
- 7) Uno Y, Suzuki Y, Wakaguri H, Sakamoto Y, Sano H, Osada N, Hashimoto K, Sugano S, Inoue I. Analysis of expressed sequence tags from liver in cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): A systematic identification of drug-metabolizing enzyme genes. *FEBS Lett* 582, 351-358, 2008.
- 8) Sasahara A, Kasuya H, Kriscsek B, Tajima A, Onda H, Sasaki T, Akagawa H, Hori T, Inoue I. Gene expression in a canine basilar artery vasospasm model: a genome-wide network-based analysis. *Neurosurg Rev* 31, 283-290, 2008.
- 9) Bae JS, Cheong HS, Kim JO, Lee SO, Kim EM, Lee HW, Kim S, Kim JW, Cui T, Inoue I, Shin HD. Identification of SNP markers for common CNV regions and association analysis of risk of subarachnoid aneurysmal hemorrhage in Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 373, 593-596, 2008.
- 10) Osada N, Hashimoto K, Kameoka Y, Hirata M, Tamura R, Uno Y, Inoue I, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Terao K, Kusuda J, Takahashi I. Large-scale analysis of *Macaca fascicularis* transcripts and inference of genetic divergence between *M. fascicularis* and *M. mulatta*. *BMC Genomics* 9, 90, 2008.
- 11) Saigo K, Yoshida K, Ikeda R, Sakamoto Y, Murakami Y, Urashima T, Asano T, Kenmochi T, Inoue I. Integration of hepatitis B virus DNA into the MPP (mixed lineage leukemia) 4 gene and rearrangements of *MLL4* in human hepatocellular carcinoma cells. *Hum Mutat* 29, 703-708, 2008.
- 12) Okada H, Tajima A, Shichiri K, Tanaka A, Tanaka K, Inoue I. Genome-wide expression analyses of testes of non-obstructive azoospermia patients demonstrate a specific gene expression profile and implicate *ART3* in genetic susceptibility. *PLoS Genet* 4, e26, 2008.
- 13) Nakaoka H, Gaillard C, Fujinaka K, Watanabe N, Ito M, Kawada K, Ibi T, Sasae Y, Sasaki Y. The use of link provider data to improve national genetic evaluation across weakly connected subpopulations. *J Anim Sci* 87, 62-71, 2009.
- 14) Nakaoka H, Gaillard C, Ibi T, Sasae Y, Sasaki Y. Adjusting for heterogeneity of variance for carcass traits affects single and multiple trait selections in genetic evaluation of Japanese Black cattle. *Anim Sci J* 79, 645-654, 2008.
2. 学会発表
58th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics
Philadelphia, Pennsylvania November 11-15, 2008
- 1) Exploration of genes related to X-linked mental retardation (XLMR) by in-house X-tiling array.
S. Honda¹, S. Hayashi¹, I. Imoto¹, I. Inoue², T. Yabe³, K. Tokunaga⁴, E. Nakagawa⁵, Y. Goto⁶, J. Inazawa¹.
¹Dept Mol Cytogenet, Med Res Inst, Tokyo med & dent Univ, Tokyo, Japan; ²Div Mol Life Sci, Sch Med, Tokai Univ, Isehara, Japan; ³Tokyo Metropolitan Red Cross Blood Cent, Tokyo, Japan; ⁴Dept Hum Genet, Grad Sch Med, Univ Tokyo, Tokyo, Japan; ⁵Div Child Neurol Musashi Hosp, Natl Center Neurol & Psychiat, Tokyo, Japan; ⁶Dept Mental Retardation and Birth Defect Res, Natl Inst Neurosci, Natl Cent Neurol & Psychiat, Tokyo, Japan.
- 2) Allelic alterations in epithelial ovarian carcinomas uncovered by Affymetrix SNP Array 5.0.
Tajima¹, K. Yoshihara², I. Inoue², K. Tanaka².
¹Dep Molecular Life Sci, Tokai Univ Sch

- Medicine, Kanagawa, Japan; ²Dep Obstet & Gynecol, Niigata Univ Graduate Sch Med & Dent Sciences, Niigata Japan
- 3) A two-stage whole genome association study of intracranial aneurysm in a Japanese cohort. K. Yasuno¹, A. Tajima¹, T. Takahashi¹, A. Hata², I. Inoue¹.
¹Department of Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Kanagawa, Japan; ²Department of Public Health, School of Medicine, Chiba University Chiba Japan
- 4) Development of Genome Wide Association Database in Japanese Integrated Database Project. Koike¹, N. Nishida², I. Inoue³, S. Tsuji⁴, K. Tokunaga².
¹Cent Res Lab, Hitachi, Ltd, Japan; ²Graduate School of Medicine, University of Tokyo; ³Tokai University School of Medicine; ⁴Department of Neurology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo.
- 5) Elucidation of etiologies in complex diseases under multivariate variance component-threshold model. Narita¹, K. Yasuno¹, H. Nakaoka¹, A. Tajima¹, I. Inoue^{1,2}.
¹Dept Molecular Life Science, Tokai University School of Medicine, Isehara, Kanagawa, Japan; ²Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama, Japan.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチをモデルとした病型・病態予測進行ツール
および遺伝子検査システムの開発
～リウマチ感受性遺伝子解析～

分担研究者 岡 晃 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 講師
分担研究者 田中 正史 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授
研究代表者 猪子 英俊 東海大学医学部 医学部長
東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授

研究要旨

関節リウマチの感受性遺伝子領域、ならびにSNPの選抜を終え、本研究課題の基盤となる情報源獲得への準備が完了した。すなわち、感受性遺伝子領域を35個厳選し、平均解像度6.0kbにて合計SNP数1,144個配置することができた。これらの領域は関節リウマチとの遺伝学的な関連に加え、その発症などに極めて重要な遺伝子がこれら領域に網羅的に含まれており、今後の進展が十分に期待されるものである。

A. 研究目的

本課題の最終目標は、HLA遺伝子をはじめとして、我々がゲノムワイドの関連分析で同定、さらに他機関にて同定された関節リウマチ感受性遺伝子のSNP多型情報とリウマチの病型や各種診療情報に基づき、病型・病態進行予測のアルゴリズムを作成することである。

この目標達成のために、詳細な臨床情報を伴うリウマチ患者検体、ならびに健常者検体を用いて、既知のリウマチ感受性領域の多型情報を収集し、SNP多型情報および診療情報の統合データベースを構築するためのデータを獲得することが、本研究の目的である。

B. 研究方法

現在までに、主にSNPを多型マーカーとした候補遺伝子アプローチおよび全ゲノム関連解析により、多くの関節リウマチ感受性遺伝子が見出されている。さらに我々は、全ゲノムに配置したマイクロサテライトを使用するという独自の手法により、複数の感受性遺伝子を同定している(*Hum Mol Genetics* 14: 2305-21,2005.)。したがって、すべてとは言いが切れないが、発症に対

して比較的効果の高い感受性遺伝子は網羅的に同定されていると考えられる。そこで、これらの複数の感受性遺伝子を対象に、詳細な臨床情報を有する検体を用いて遺伝子型タイピングを行うことにより、病型・病態進行予測に基づくリウマチの進行予防を目指すデータベース構築への重要な情報源とすることを目指すこととした。そこでまず、我々が同定した感受性遺伝子領域をはじめ、多くの文献を精査することにより感受性遺伝子領域を厳選した。また選抜された領域において、SNPを選択する基準として、実験上のクオリティー確保ならびに効率化を図るため、日本人集団においてMAF(Minor Allele Frequency) 0.1 以上のSNP、さらにpair-wise r^2 を算出し、 $r^2 > 0.8$ で規定されるLDブロックについてはtaggingして候補SNPをリストアップした。一方、実際の遺伝子型タイピングにはillumina社のBeadsExpressによるgoldengate-Assayを用いる。そこで基本的に各プライマー・プローブセットはカスタムデザインとなるため、コンバージョンレートの高いと予測されるSNPをさらに厳選した。