

200802011A

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 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 島 田 浩 太

平成 21 (2009) 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 ————— 1  
島田浩太

### II. 分担研究報告書

1. 間質性肺病変合併関節リウマチにおけるゲノムワイド SNP 解析 ————— 11  
大村浩一郎
2. 関節リウマチ臨床 1 亜型としての間質性肺炎発症リスクのゲノム ————— 16  
スキャン実施のための検定手法の検討と実施ツールの開発  
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

研究代表者 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。今年度は採取したゲノム DNA 検体から全ゲノムを対象にして一塩基多型（SNP：single-nucleotide polymorphism）解析を行った。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・臨床情報収集体制の確立：今年度も引き続き相模原病院、東大病院、京大病院、道後温泉病院から計 1985 検体を収集したが、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の収集をさらに進めている。

(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。収集された検体のうち、CT 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、我々が作成した「CT 所見に基づいた ILD 評価基準」に従って診断された ILD 合併群 136 例と非合併群 177 例を遺伝解析の対象とした。

(3) 関節リウマチ臨床 1 亜型としての間質性肺炎発症リスクのゲノムスキャン実施のための検定手法の検討と実施ツールの開発：RA 患者が ILD を合併するか否かには、遺伝子多型のほかに、複数の臨床因子が関与すると予想されている。これらはある程度の複雑さを持った多変量解析の枠組みで評価されるべきものである。疾患形質・臨床情報項目について非順序尺度・順序尺度・量的形質を、遺伝子多型について非順序尺度・順序尺度を想定し、それらを一元的に管理するデータベースフォーマットを作成した。同一のデータフォーマットから、同一作業ルーチンにて変数情報抽出し、10000 人 x 100 万遺伝子マーカーのオーダーでの繰り返し検定処理を行うルーチンを単変量解析用に構築することにより、多変量解析の枠組みでの大規模遺伝子マッピングを遂行するための、基礎的統計解析環境の開発に成功した。

(4) 間質性肺病変合併関節リウマチにおけるゲノムワイド SNP 解析：市販の全ゲノムジェノタイプングキットを用いてタイプングを行った。同キットでタイプングされる全 SNPs のうち、予め決められたカットオフ値を超える SNPs の遺伝情報を抽出した。得られた臨床情報と遺伝情報から RA 患者における ILD 合併群と非合併群の間で関連解析を行った。最も小さい Trend 検定の p 値は  $1 \times 10^{-5}$  以上であり、解析の対象となった 244759 SNPs についての多重検定にて単純な補正後の有意水準とされる  $1.2 \times 10^{-7}$  以下の p 値を示した SNP は認められなかった。

RA 患者中、CT にて明らかな ILD 合併が認められるのは 10% 程度であり、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 1985 検体を収集したが、今回の解析で用いた検体数が有意なアレリズム差を検出するのに十分ではない可能性があるため、今後はさらに 2000-3000 検体程度を収集して、解析を継続していくことにより、確定的な候補遺伝子を挙げられると予想される。また、これらとは別に薬剤誘発性 ILD 症例を対象とした遺伝解析によって感受性遺伝子を探索していくことも必要である。

### 研究分担者

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

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

大村浩一郎

京都大学大学院医学研究科臨床免疫学助教

### 研究協力者

杉井章二

東京都立府中病院リウマチ科医長  
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

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

高杉 潔

医療法人千寿会道後温泉病院理事長

小澤義典

西門クリニック リウマチ科医師

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

古川 宏

(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流動研究員

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

### 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の関節外病変としてしばしば合併する間質性肺病変 (ILD : interstitial lung diseases) は生命予後に重大な影響を及ぼしうる病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%とともに最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が記載されているだけでなく (表1)、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 (図1、工藤、*日内会誌*95:1058-62, 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。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。検体収集とともに臨床情報の収集を

行う(表 2)。ILD の合併の有無については胸部高分解能 (HR) CT に基づいて評価を行う (表 3, 図 2)。採取したゲノム DNA 検体については、一塩基多型 (SNP : single-nucleotide polymorphism) のタイピングを行う。昨年度までは、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した候補遺伝子アプローチによる解析をしてきた。昨年度までの研究で確定的な候補遺伝子が認められなかったため、今年度は採取したゲノム DNA 検体から全ゲノムを対象にして SNP 解析を行った。

### 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全ゲノムを対象にした SNP 解析を施行した。

(1) DNA 検体収集の継続と臨床情報収集 (島田、大村、寺尾、高杉、小澤、當間、古川、松井、中山、池中、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。今年度までに、京大病院 347 検体、道後温泉病院 472 検体、相模原病院 1118 検体、東大病院 48 検体、合計 1985 検体が収集されており (表 4)、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) の収集をさらに進めている。

(2) 対象患者の選定作業と SNP 解析 (山田、大村、寺尾、松田)

収集された検体のうち、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」 (表3) 合計136例と非合併例として「H」 (表3) 177例を遺伝解析の対象とした。これらについて、全ゲノム上の277420SNPsについてタイピング・解析を行った。タイピングのデータクオリティコントロールは、最近のゲノムワイドスタディの基準に照らして、十分に良いもの

であった。複数の日本国内地域からのサンプルには、集団構造化が存在し、その影響への配慮が必要であることが知られているが、今回のわれわれのサンプルは、複数地域からのサンプルではあったが、ケース・コントロールの分布に地域間の偏りがありなかったことから、検定結果に重大な影響がないことが確認された。その上でTrend検定の結果のp値は最も小さいSNPにおいても $1 \times 10^{-5}$ 以上であった (図3)。

### D. 考察

上記のとおり、ゲノムワイドスタディにおけるアレル頻度差のTrend検定の結果のp値は最も小さいSNPにおいても $1 \times 10^{-5}$ 以上であり、解析の対象となった244759SNPsについての多重検定にて単純な補正後の有意水準とされる $1.2 \times 10^{-7}$ 以下のp値を示したSNPは認められなかった。今回解析に用いた検体では、性別・年齢・RAとILDの診断以外の生活歴臨床情報 (表 2【2】、図 4) は現在収集中であり、これらを加味した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はない可能性があるが、今後はさらに2000-3000検体程度を収集して、解析を継続していくことにより、確定的な候補遺伝子を挙げられると予想される。また、これらとは別に薬剤誘発性ILD症例を対象とした遺伝解析によって感受性遺伝子を探索していくことも必要である。

### E. 結論

ILD合併RA症例136例とILD非合併RA症例177例の2群間において、全ゲノムに存在する244759SNPsでのアレル頻度差を検討したが、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

### 学会発表

1. 松井利浩、小宮明子、島田浩太、西野仁樹、炎症反応高値関節リウマチ患者における感染症診断マーカーとしての末梢血好中球上 CD64 分子定量の有用性の検討、一般演題、第 82 回(中)日本感染症学会総会、平成 20 年 4 月 18 日、島根
2. 松井利浩、小宮明子、道下和也、池中達央、島田浩太、中山久徳、西野仁樹、當間重人、CRP 高値関節リウマチ患者における感染症マーカーとしての好中球上 CD64 分子定量の有用性の検討、ワークショップ、第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 21 日、札幌
3. 萩原太、杉井章二、池中達央、島田浩太、中山久徳、松井利浩、小澤義典、當間重人、Profile of Mood Status (POMS)による関節リウマチ患者の倦怠感の検討。ポスターセッション、第 62 回国立病院総合医学会、2008 年 11 月 21 日、東京
4. 中山久徳、池中達央、島田浩太、松井利浩、當間重人、リウマチ性疾患患者に対して便潜血検査は有用である。ポスターセッション、第 62 回国立病院総合医学会、2008 年 11 月 21 日、東京
5. 松井利浩、小宮明子、道下和也、池中達央、島田浩太、中山久徳、西野仁樹、當間重人、好中球上 CD64 分子定量は Tocilizumab 投与関節リウマチ患者においても感染症検出に有用である、ワークショップ、第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 21 日、札幌
6. 萩原太、杉井章二、池中達央、島田浩太、中山久徳、松井利浩、小澤義典、當間重人、Profile of Mood States (POMS)による関節リウマチ患者の倦怠感の検討、ポスター、第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 21 日、札幌
7. 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、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」適用の妥当性の検討(前向き検証)ポスター、第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 21 日、札幌
8. 松井利浩、池中達央、小宮明子、道下和也、島田浩太、中山久徳、西野仁樹、當間重人、Tocilizumab 治療中、人工股関節置換術、腎盂腎炎、化膿性膝関節炎+敗血症性ショックを経験した関節リウマチ患者における経時的な好中球上 CD64 分子測定の有用性、ポスター、第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 21 日、札幌
9. 當間重人、竹下康代、二見秀一、道下和也、池中達央、島田浩太、中山久徳、松井利浩、関節リウマチに合併する難治性下腿潰瘍に対する白血球除去療法の効果-CD34 陽性幹細胞数の変動に関する検討一、ポスター、第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 21 日、札幌
10. 萩原太、中山久徳、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) 患者におけるビスフォスフォネート製剤 (BP 剤) の腰背部痛に対する効果、ポスター、第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 21 日、札幌
11. 松井利浩、島田浩太、小宮明子、萩原太、道下和也、中山久徳、當間重人、イムノクロマト法による抗 CCP 抗体測定の有用性、ポスター、第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会、平成 20 年 4 月 21 日、札幌
12. 小宮明子、松井利浩、島田浩太、道下和也、池中達央、中山久徳、當間重人、全身性エリテマトーデス患者における好中球上 CD64 分子定量値の検討、ポスター、第 52 回(中)日

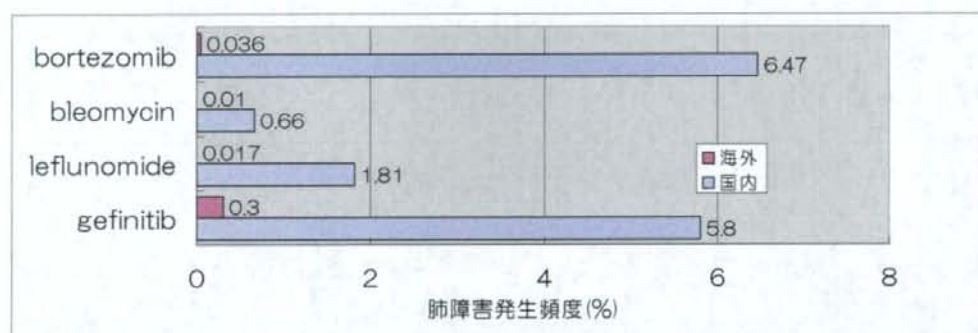
- 本リウマチ学会総会・学術集会，平成 20 年 4 月 21 日，札幌
13. 中山久徳、道下和也、池中達央、島田浩太、松井利浩、當間重人，リウマチ性疾患患者に対する便潜血検査の有用性の検討，ポスター，第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会，平成 20 年 4 月 21 日，札幌
  14. 萩原太、中山久徳、道下和也、島田浩太、松井利浩、杉井章二、小澤義典、當間重人，関節リウマチ患者におけるビスフォスフォネート剤の関節痛への影響，ポスター，第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会，平成 20 年 4 月 21 日，札幌
  15. 小宮明子、松井利浩、島田浩太、道下和也、池中達央、中山久徳、當間重人，関節リウマチ患者における感染症マーカーとしての単球上 CD64 分子定量の検討，ポスター，第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会，平成 20 年 4 月 21 日，札幌
  16. 寺尾知可史、大村浩一郎、山田亮、島田浩太、高杉潔、吉藤元、野島崇樹、白井崇、藤井隆夫、松田文彦、三森経世，日本人 RA 患者を用いた TRAF1/C5 遺伝子の多型と疾患感受性の検討，ポスター，第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会，平成 20 年 4 月 21 日，札幌
  17. 小宮明子、松井利浩、島田浩太、道下和也、池中達央、中山久徳、當間重人，成人発症ステイル病(AOSD)における好中球上 CD64 分子定量値の検討，ポスター，第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会，平成 20 年 4 月 21 日，札幌
  18. 萩原太、杉井章二、池中達央、島田浩太、中山久徳、松井利浩、小澤義典、當間重人，Profile of Mood States(POMS)による関節リウマチ患者のうつ気分の検討，ポスター，第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会，平成 20 年 4 月 21 日，札幌
  19. T. Matsui, A. Komiya, K. Michishita, T. Ikenaka, K. Shimada, H. Nakayama, J. Nishino, S. Tohma . CLINICAL UTILITY OF NEUTROPHIL CD64 EXPRESSION TO DISTINGUISH RA FLARE FROM INFECTION IN RA PATIENTS WITH A HIGH TITER OF INFLAMMATORY MARKER. Annual European congress of rheumatology 2008 2008.6.12 Paris, France,
- 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

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<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。

表4. 各施設ゲノム検体収集状況

施設	収集済検体数
京大病院	347
道後温泉病院	472
相模原病院	1118
東大病院	48
計	1985

図2. 画像所見分類フローチャート

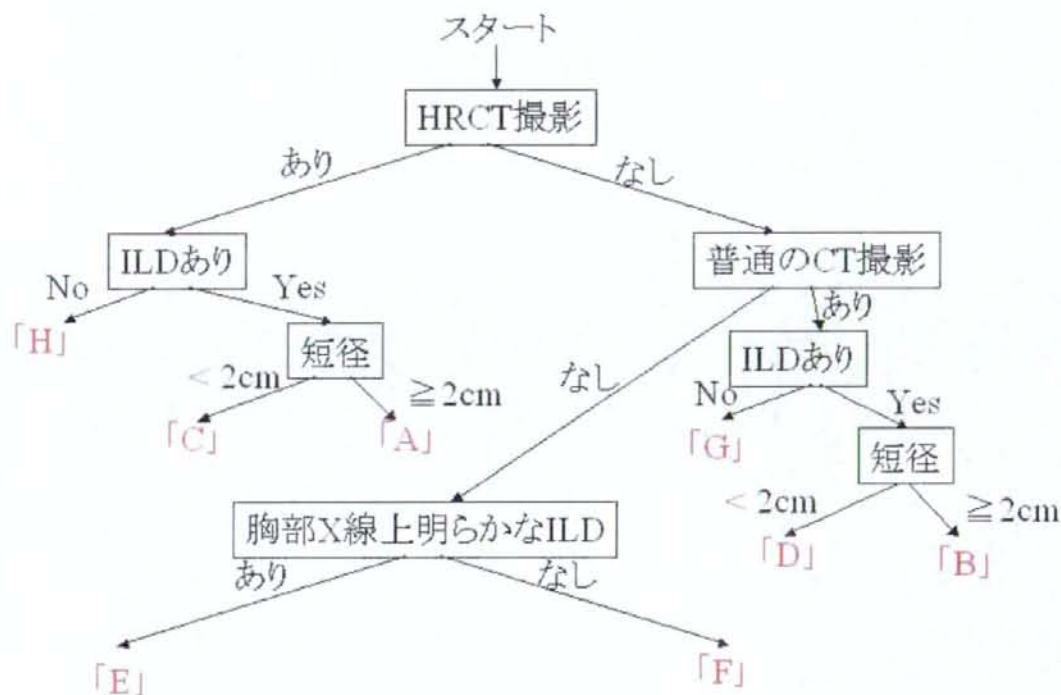


図 3. SNPs のアレル頻度差の p 値(Trend 検定)

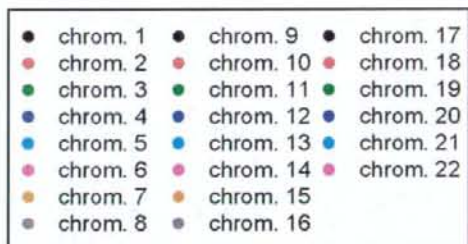
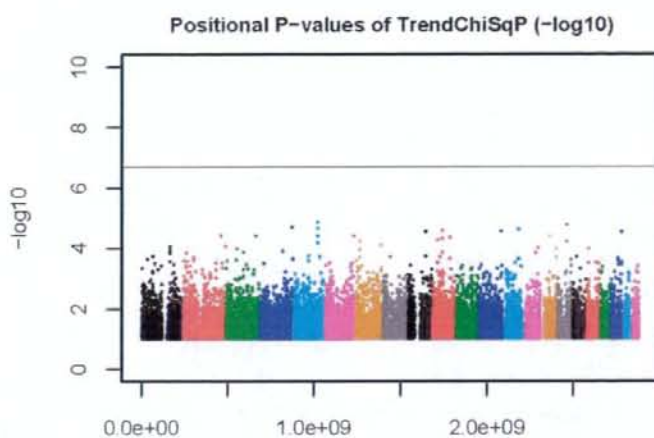


図4. 生活・職業歴収集用アンケート用紙

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、よろしくお願ひいたします。

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

### 間質性肺病変合併関節リウマチにおけるゲノムワイド SNP 解析

研究分担者 大村浩一郎 京都大学大学院医学研究科臨床免疫学助教  
研究協力者 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

**研究要旨：**相模原病院、東大病院、京大病院、道後温泉病院から収集した 1985 検体から、「CT 所見に基づいた ILD 評価基準」に従って診断された ILD 合併群 136 例と非合併群 177 例を遺伝解析の対象とした。市販の全ゲノムジェノタイプングキットを用いて SNP(single-nucleotide polymorphism)タイピングを行った。同キットでタイピングされる全 SNPs のうち、予め決められたカットオフ値を超える SNPs の遺伝情報を抽出した。得られた臨床情報と遺伝情報から RA 患者における ILD 合併群と非合併群の間で関連解析を行った。最も小さい Trend 検定の p 値は  $1 \times 10^{-5}$  以上であり、解析の対象となった 244759SNPs についての多重検定にて単純な補正後の有意水準とされる  $1.2 \times 10^{-7}$  以下の p 値を示した SNP は認められなかった。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はない可能性があるため、今後はさらに 2000-3000 検体を収集して、解析を継続していくことにより、確定的な候補遺伝子を挙げられると予想される。

#### A. 研究目的

近年、関節リウマチ (RA: rheumatoid arthritis) の治療は、抗リウマチ薬や生物学的製剤に格段の進歩がみられており、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: interstitial lung disease) は生命予後に重大な影響を及ぼしうる病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。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た。

#### B. 研究方法

今年度は、ILD 合併 RA 136 例と ILD 非合併 RA 177 例の 2 群間において (表 1)、全ゲノム上の 277420SNPs についてタイピングを行ない、アレル頻度差を検討した。

SNP 解析については、市販の全ゲノムジェノタイプ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全 SNPs のうち、予め決めら

れたカットオフ値 (Call rate > 90%, Minor allele frequency > 0.5%) を超える SNPs の遺伝情報を抽出した。得られた臨床情報と遺伝情報から RA 患者における ILD 合併群と非合併群の間で各 SNPs の関連解析を行った。

#### C. 研究結果

タイピングのデータクオリティコントロールは、最近のゲノムワイドスタディの基準に照らして、十分に良いものであった。予め決められたカットオフ値を満たす SNPs は 277420SNPs 中 244759SNPs であり、これについて解析した。複数の日本国内地域からのサンプルには、集団構造化が存在し、その影響への配慮が必要であることが知られているが、今回のわれわれのサンプルは、複数地域からのサンプルではあったが、ケース・コントロールの分布に地域間の偏りがありなかったことから (図 1)、検定結果に重大な影響がないことが確認された。

アレル頻度差の p 値は最も小さい SNP においても、 $1 \times 10^{-5}$  以上であり (表 2)、244759SNPs についての多重検定にて単純な補正後の有意水準とされ

る  $1.2 \times 10^{-7}$  以下の p 値を示した SNP は認められなかった。

#### D. 考察

表 3 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  $1 \times 10^{-5}$  以上であり、解析の対象となった 244759 SNPs についての多重検定にて単純な補正後の有意水準とされる  $1.2 \times 10^{-7}$  以下の p 値を示した SNP は認められなかった。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はない可能性があるが、今後はさらに 2000-3000 検体を収集して、解析を継続していくことにより、確定的な候補遺伝子を挙げられると予想される。

#### E. 結論

ILD 合併 RA 症例 136 例と ILD 非合併 RA 症例 177 例の 2 群間において、全ゲノムに存在する 244759 SNPs でのアレル頻度差を検討したが、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

なし

##### 2. 学会発表

1. Murakami K, Fujii T, Takeda N, Terao C, Kobayashi S, Yoshifuji H, Nojima T, Omura K, Usui T, Mimori T Correlation between anti-CCP antibody and disease activity in patients with early rheumatoid arthritis, ワークショップ, 第 13 回アジア太平洋リウマチ会議, 2008 年 9 月 24 日, 横浜
2. Murakami K, Fujii T, Takeda N, Terao C, Kobayashi S, Yoshifuji H, Nojima T, Omura K, Usui T, Mimori T Correlation

between anti-CCP antibody and disease activity in patients with early rheumatoid arthritis, ポスター, 第 72 回アメリカリウマチ学会, 2008 年 10 月 25 日, サンフランシスコ

3. 湯川尚一郎, 大村浩一郎, 小林志緒, 吉藤元, 野島崇樹, 白井崇, 藤井隆夫, 三森経世 関節リウマチに対する白血球除去療法による末梢血制御性 T 細胞の変化, ポスター, 第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 20 年 4 月 21 日, 札幌
4. 井村嘉孝, 中嶋蘭, 村上孝作, 湯川尚一郎, 吉藤元, 野島崇樹, 大村浩一郎, 白井崇, 藤井隆夫, 三森経世 tRNA 関連抗原を認識する新規自己抗体-抗 Wa 抗体-, シンポジウム, 第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 20 年 4 月 21 日, 札幌
5. 村上孝作, 武田菜穂, 寺尾知可史, 藤井隆夫, 小林志緒, 吉藤元, 野島崇樹, 大村浩一郎, 白井崇, 三森経世 早期関節リウマチにおける抗 CCP 抗体価と疾患活動性との相関, ワークショップ, 第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 20 年 4 月 21 日, 札幌
6. 中嶋蘭, 横山倫子, 藤井隆夫, 井村嘉孝, 湯川尚一郎, 吉藤元, 野島崇樹, 大村浩一郎, 白井崇, 三森経世 ステロイド抵抗性ループス腎炎に対するタクロリムスの有効性に関する検討, ポスター, 第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 20 年 4 月 21 日, 札幌
7. 寺尾知可史, 大村浩一郎, 山田亮, 島田浩太, 高杉潔, 吉藤元, 野島崇樹, 白井崇, 藤井隆夫, 松田文彦, 三森経世 日本人 RA 患者を用いた TRAF1/C5 遺伝子の多型と疾患感受性の検討, ポスター, 第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集会, 平成 20 年 4 月 21 日, 札幌
8. 武田菜穂, 野島崇樹, 井村嘉孝, 湯川尚一郎, 吉藤元, 大村浩一郎, 白井崇, 藤井隆夫, 三森経世 SLE 患者の結核診断における

QuantiFERON TB-2Gの有用性, ワークショップ,  
第 52 回(中)日本リウマチ学会総会・学術集  
会, 平成 20 年 4 月 21 日. 札幌

9. 中嶋 蘭, 井村 嘉孝, 湯川 尚一郎, 吉藤 元,  
野島 崇樹, 川端 大介, 大村 浩一郎, 臼井  
崇, 藤井 隆夫, 三森 経世 間質性肺炎を合  
併した筋症状のない皮膚筋炎における抗  
CADM-140 抗体の臨床的意義, ポスター, 第  
36 回日本臨床免疫学会総会, 平成 20 年 10 月  
17 日. 東京

10. Yoshinaga Ito, Takashi Usui, Shio Kobayashi,  
Mikiko Iguchi, Hiromu Ito, Hiroyuki Yoshitomi,  
Takashi Nakamura, Motomu Hashimoto, Noriko  
Sakaguchi, Shimon Sakaguchi, Hajime Yoshifuji,  
Takaki Nojima, Koichiro Ohmura, Takao Fujii,  
and Tsuneyo Mimori, Gamma delta T cells are  
the predominant IL-17-producing cells in  
affected joints of collagen-induced arthritis, ワー  
クショップ, 第 38 回日本免疫学会学術集会,

平成 20 年 12 月 2 日. 京都

11. 寺尾知可史, 山田亮, RoubilaMeziani, 高橋  
めい子, 大村浩一郎, 小久保美紀, 吉住明子,  
水谷美香, MarkLathrop, IngaMelchers, 松田  
文彦日本人, 白人のリウマチ検体を用いたゲ  
ノムワイド相関解析, ポスター, 「テーラーメ  
イド医療を目指したゲノム情報活用基盤技  
術」第 4 回公開シンポジウム, 平成 20 年 8  
月 1 日. 東京

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 |

表 1. 患者背景

	ILD 群	非ILD 群
患者数	136	177
男性/女性	47/89	25/152
年齢	67.8±9.7	64.8±12.1
罹患年数	14.8±11.5	18.1±12.9
Stage	2.84±1.15	2.88±1.06
Class	1.96±0.85	2.02±0.76

図 1. 多施設から採集された検体に集団構造化はなかった(Eigen plot)

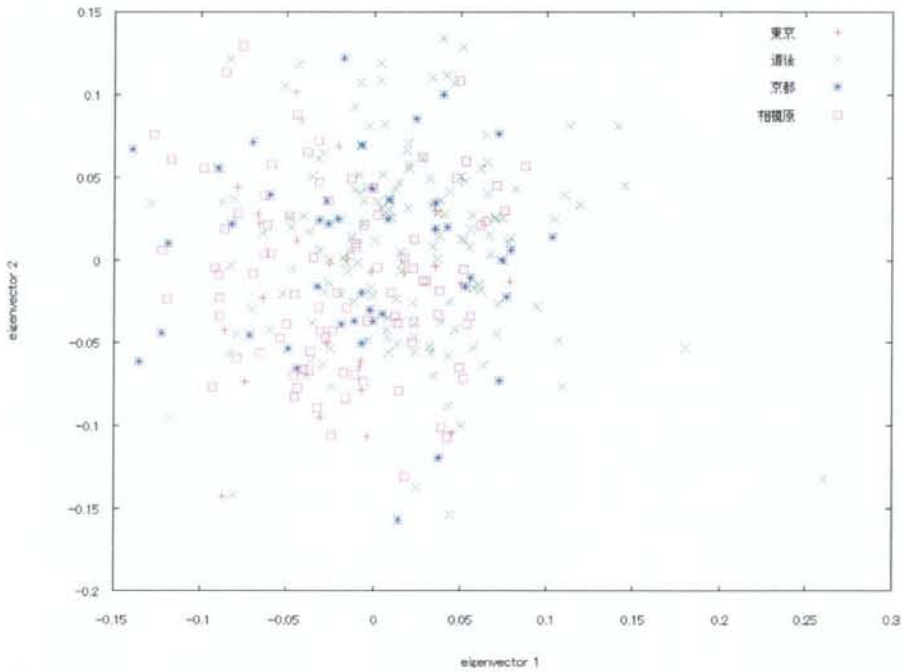




表 2. 全ゲノム上の SNP における群間アレル比較 (上位 100SNP, rsID は省略)

Gene name	Gene ID	P value	Gene name	Gene ID	P value	Gene name	Gene ID	P value	Gene name	Gene ID	P value
NRG2	9542	1.40E-05	NRG2	9542	3.92E-05	LOC116123	116123	1.16E-04	ZHX3	23051	2.19E-04
NRG2	9542	1.40E-05	NRG2	9542	3.92E-05	LOC116123	116123	1.16E-04	FLJ12716	60684	2.22E-04
NRG2	9542	1.40E-05	NRG2	9542	3.92E-05	LOC645841	645841	1.24E-04	FLJ12716	60684	2.22E-04
NRG2	9542	1.40E-05	LOC339858	339858	3.93E-05	NFKBIZ	64332	1.35E-04	GPC5	2262	2.29E-04
NRG2	9542	1.40E-05	LIPC	3990	4.06E-05	LOC116123	116123	1.37E-04	ZNF31	7579	2.29E-04
NRG2	9542	1.40E-05	ARHGAP19	84986	4.42E-05	PCDH15	65217	1.37E-04	ENPP6	133121	2.39E-04
CNGB1	1258	1.74E-05	PCDH15	65217	4.77E-05	LOC645241	645241	1.42E-04	RTN4	57142	2.43E-04
LOC391719	391719	2.05E-05	ARMC4	55130	5.31E-05	TMEM63C	57156	1.43E-04	BM039	55839	2.43E-04
NRG2	9542	2.26E-05	LOC646588	646588	5.98E-05	LOC116123	116123	1.49E-04	CADPS	8618	2.48E-04
NRG2	9542	2.26E-05	LOC646588	646588	5.98E-05	LOC391807	391807	1.79E-04	CADPS	8618	2.48E-04
NRG2	9542	2.26E-05	CNGB1	1258	6.11E-05	PDE4B	5142	1.82E-04	CADPS	8618	2.48E-04
NRG2	9542	2.26E-05	NRG2	9542	6.75E-05	GPR51	9568	1.83E-04	LOC645911	645911	2.58E-04
NRG2	9542	2.26E-05	NRG2	9542	6.75E-05	PDE4B	5142	1.84E-04	SH3YL1	26751	2.59E-04
NRG2	9542	2.26E-05	NRG2	9542	6.75E-05	ANK1	286	1.92E-04	GRM7	2917	2.62E-04
GPC5	2262	2.43E-05	NRG2	9542	6.75E-05	ANK1	286	1.92E-04	GRM7	2917	2.62E-04
PCDH15	65217	2.61E-05	NRG2	9542	6.75E-05	ANK1	286	1.92E-04	GRM7	2917	2.62E-04
PCDH15	65217	2.65E-05	NRG2	9542	6.75E-05	ANK1	286	1.92E-04	LOC391807	391807	2.62E-04
SCARB1	949	2.77E-05	LR8	28959	7.76E-05	LOC400954	400954	1.94E-04	OSR1	130497	2.63E-04
GPR51	9568	2.81E-05	TMEM16G	50636	8.41E-05	LOC400954	400954	1.94E-04	TOP1	7150	2.64E-04
CDH4	1002	3.04E-05	LOC116123	116123	8.79E-05	GLRA1	2741	1.94E-04	LOC646688	646688	2.69E-04
LOC646249	646249	3.81E-05	RIN3	79890	9.82E-05	LOC642480	642480	1.96E-04	ARMC4	55130	2.82E-04
C6orf118	168090	3.90E-05	MAG11	9223	1.03E-04	LOC645364	645364	1.97E-04	CDH4	1002	2.89E-04
NRG2	9542	3.92E-05	ANKRD12	23253	1.04E-04	C7orf9	64111	1.97E-04	MBD2	8932	3.02E-04
NRG2	9542	3.92E-05	LOC644279	644279	1.07E-04	LOC644279	644279	2.03E-04	EPHA4	2043	3.04E-04
NRG2	9542	3.92E-05	C7orf9	64111	1.11E-04	ARHGAP19	84986	2.15E-04	LOC645573	645573	3.04E-04

関節リウマチ臨床1亜型としての間質性肺炎発症リスクのゲノムスキャン実施のための  
検定手法の検討と実施ツールの開発

研究分担者 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

研究要旨：本研究課題は、今年度より、機能パスウェイに着目した、標的遺伝子中心アプローチから、ゲノムワイドアソシエーションスタディ（GWAS）の枠組みに変更して解析することになった。GWASへの移行に伴い、2値型GWAS解析用の解析ルーチンでの解析環境へ、データを移行し、その解析を実施し、結果を主任研究者とともに検討した。

それに加えて、当分担研究においては、関節リウマチ関連間質性肺炎関連遺伝子を大規模にスクリーニングするために重要となる課題について、その解析手法の課題を定式化し、実装するための予備的検討を行った。

関節リウマチ関連間質性肺炎の解析において、一般的なGWASとの違いをあげると以下のようになる。（1）複数遺伝子の総合作用を検出する必要性が高いと予想される。これは、本研究課題が当初、パスウェイを基礎とする複数遺伝子を標的とした時点から、考慮されていた点である。（2）臨床情報を組み込む必要がある。この2点につき、臨床データ・形質定義に関する、総括研究者・分担研究者の担当部分と協議を進めつつ、組み込み因子のデータ型を定義し、それに準じた、データ格納フォーマットのデザインを行った。また、それらを、単一遺伝子マーカーで解析する場合の解析ルーチンを実装した。その上で、複数遺伝子・複数臨床項目を組み合わせてGWAS規模の多マーカー解析を実施するにあたっての、実行上の問題点を、机上にて、列挙し、その克服方向について情報収集を行った。

#### A. 研究目的

関節リウマチ（RA）の合併症としてのILDの遺伝的リスク探索においては、その第一段階として、RA合併ILD形質と遺伝子マーカーとの間の関連検定を実施することである。しかしながら、実際にRA発病者がILDを合併するか否かには、遺伝子多型のほかに、複数の臨床因子が関与すると予想されている。これらを考慮するにあたっては、臨床項目のデータ型が非常に多様性に富むため、ある程度の複雑さを持った多変量解析の枠組みで評価されるべきものである。一般的に医学生物学分野での多変量解析の手法開発は大きな成果を納めているが、それを、大規模遺伝子マッピングに応用することは、

2つの点で実行上の問題を生じる。第1点目は、遺伝子マーカー数に比例した検定数の増大による、解析作業コストの増大である、第2点目は、遺伝子マーカー群自体が相互に依存的な関係（連鎖不平衡）にあるために、多変量項目数とその相互依存関係の高次化である。この2点は、大規模遺伝子多型マッピング手法として、依然、未解決な課題であるので、本分担研究では、そのデータ解析構造の定式化を試み、実用的な解析手法について考察する。

#### B. 研究方法

本全体課題における、解析主対象形質（ILD）のデータ型を確認し、また、それを定義するに

あたって用いている、臨床情報のデータ様態を確認する。また、関連遺伝子解析に有用と思われるその他の臨床情報につき、臨床医学研究分担者と協議の上、選択する。その上で、それらのデータ型の特徴を確認する。この事前ヒアリングをもとに、RA合併ILDのみならず、一般的に疾患亜型遺伝子統計検定を実行する上で必要な、解析の枠組みのモデルを構築し、モデルデータにおける、単変量統計量の挙動を検討し、多変量解析へと展開するための基礎的情報を蓄積する。

### C. 研究結果

疾患形質および、臨床情報項目につき、非順序尺度、順序尺度、量的形質を、遺伝子多型につき、非順序尺度、順序尺度を想定し、それらを、一元的に管理するデータベースフォーマットを作成した。同一のデータフォーマットから、同一作業ルーチンにて変数情報抽出し、10000人x100万遺伝子マーカーのオーダーでの繰り返し検定処理を行うルーチンを単変量解析用に構築した。多変量解析への展開は、データ型ごとにマニュアルコーディングを必要とする段階であるが、ロジスティック回帰分析の枠組みでの単遺伝子マーカー解析ツールを実装した。

RA合併ILDの発病リスク遺伝子解析にあたっては、組み合わせ爆発を回避しながら、複数遺伝子の相互作用を実行することが不可欠であるが、この問題は、RA合併ILDの解析のみならず、あらゆる疾患関連遺伝子解析について解決が期待されている課題であるため、この課題手法に関する世界の情勢につき、文献調査および学会聴講を行い、情報収集に努めた。画期的かつ、即時の応用が可能なアプローチがいまだに存在していないことが確認され、自主開発を含めた検討の妥当性を再確認した。本課題については、国内の遺伝統計学コミュニティと密接なコンタクトをとる体制を築き、年7回の情報交換を行い、課題の分解と整理に努

めた。

他方、多様な非遺伝因子の組み込みもRA合併ILDの解析には重要であることが主任・分担研究者より示唆された。特に、臨床で、重要な課題として、RAには合併するものの、その他の特異的要因の同定されないILDと、RA治療薬誘発性ILDの存在などが指摘され、ILDをタイプわけしつつ、それに関与する臨床項目の組み込みを将来的に行う可能性が提示された。これを受け、単遺伝子マーカーにおいて、この枠組みにて解析するための雛形を確保するとともに、GWAS規模への展開にあたっての留意事項の整理に努めた。複数遺伝子の解析と同様に、国内外での情報収集のほかに、同課題につき、研究コミュニティにて積極的に討議・検討を加えた。

### D. 考察

本年度は、標的遺伝子アプローチからGWASアプローチへと変化があった。基本的なGWAS解析をするための、データの管理体制に移ることに成功した。

今後のより詳細な解析に備え、RA合併ILDに限らない、遺伝統計学全般の解決課題である、複数遺伝子効果と多彩は臨床因子の組み込みに関して、RA合併ILD遺伝子探索に即した形で、解析手法上の課題定義を進めることに成功した。

### D. 結論

GWASの基礎的な解析を終了し、近未来的に実施することが望ましい、より詳細な解析を遂行するための解析手法上の研究を進めた。

### E. 健康危険情報 なし

### F. 研究発表

論文発表

1. Gotoh N, Yamada R, Matsuda F, Yoshimura N, Iida T. 2008. Manganese Superoxide Dismutase Gene (SOD2) Polymorphism and

- Exudative Age-related Macular Degeneration in the Japanese Population. *Am J Ophthalmol* 146(1):146.
2. Nakayama-Hamada M, Suzuki A, Furukawa H, Yamada R, Yamamoto K. 2008. Citrullinated fibrinogen inhibits thrombin-catalyzed fibrin polymerization. *J Biochem* 144(3):393-8.
  3. Okada Y, Mori M, Yamada R, Suzuki A, Kobayashi K, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. 2008. SLC22A4 Polymorphism and Rheumatoid Arthritis Susceptibility: A Replication Study in a Japanese Population and a Metaanalysis. *J Rheumatol* 35(9):1273-8.
  4. Shimane K, Kochi Y, Yamada R, Okada Y, Suzuki A, Miyatake A, Kubo M, Nakamura Y, Yamamoto K. 2008. A single nucleotide polymorphism in the IRF5 promoter region is associated with susceptibility to rheumatoid arthritis in the Japanese patients. *Ann Rheum Dis*.
  5. Suzuki A, Yamada R, Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, Kamatani Y, Mori M, Shimane K, Hirabayashi Y and others. 2008. Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Nat Genet* 40(10):1224-9.
  6. Yamada R. 2008. Primer: SNP-associated studies and what they can teach us. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4(4):210-7.
  7. Yamada R, Okada Y. 2008. An optimal dose-effect mode trend test for SNP genotype tables. *Genet Epidemiol*.
2. 学会発表
1. Yamada R., Hirose K. and Okada Y. An Optimal Dose-effect Mode Trend Test for SNP Genotype Tables. Human Genome Variation Meeting 2008 (HGV2008) Toronto, Canada
3. 成果公開
- 研究室ウェブサーバにて、公開アプリケーションの拡充
- 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