

関節リウマチ 152 例における間質性肺疾患罹患状況の検討

研究分担者 田中良一 東京大学 大学院医学系研究科 内科学専攻アレルギーリウマチ学 助手
研究協力者 中込一之 東京大学医学部附属病院 アレルギーリウマチ内科 医員

研究要旨：関節リウマチ（RA）ではしばしば間質性肺病変（ILD）を合併し、またILDはRAの重要な予後決定因子となることが知られている。従って、RAに対する治療戦略を立てる上で、RAに合併するILD（RA-ILD）の罹患状況を知ることは非常に重要と考えられる。今回、我々は当科に通院中の文書で同意が得られたRA患者152例につき、ILDの頻度及び特徴をretrospectiveに検討した。胸部X線又は胸部CTが撮影されたRA患者145例のうち、ILD合併は19例（13.1%）に認められた。一方で、検討した152例において胸部CTでILDを合併していない症例が60例認められた。Retrospectiveな検討であるが、当院におけるRA患者でのILDの合併率は、過去の文献的報告とほぼ同様であることを今回確認することができた。

A. 背景、研究目的

間質性肺病変（ILD: interstitial lung diseases）は、画像上両側びまん性陰影を特徴とし、肺の間質をそ炎症の場とする疾患群である。原因として、

- 1) 粉塵、抗原の吸入
- 2) 薬剤□放射線
- 3) 膠原病などの全身疾患
- 4) 不明などが挙げられる。

その中で、発症原因不明のものを特発性間質性肺炎（IIPs: idiopathic interstitial pneumonias）と呼び、

- ① 特発性肺線維症（IPF: idiopathic pulmonary fibrosis）
- ② 非特異性間質性肺炎（NSIP: nonspecific interstitial pneumonia）
- ③ 急性間質性肺炎（AIP: acute interstitial pneumonia）
- ④ 特発性器質化肺炎（COP: cryptogenic organizing pneumonia）
- ⑤ 剥離性間質性肺炎（DIP: desquamative interstitial pneumonia）
- ⑥ リンパ球性間質性肺炎（LIP: lymphoid interstitial pneumonia）
- ⑦ 呼吸細気管支炎を伴う間質性肺疾患

（RB-ILD: respiratory-bronchiolitis-associated interstitial lung disease）に分類される。

その中でも特に頻度が高い病態がIPFであるが（対応する病理組織像はUIP: usual interstitial pneumonia）、治療法は限られ、その予後はあまり良くないことが知られている。

関節リウマチ（RA: rheumatoid arthritis）は代表的な自己免疫疾患の一つであり、しばしば関節を破壊することで生活の質（QOL: quality of life）を低下させる。またRAではしばしばILDを合併し、ILDは生命予後を規定する重要な因子となることが知られている。近年、RAの関節破壊に対する治療は、生物学的製剤の導入などにより、格段に進歩しているにもかかわらず、RAに合併するILD（RA-ILD）の治療はIIPs（IPF）に対する治療と同様、大きな進歩が見られていないのが実状である。

RA-ILDはIIPsとは、様々な点で異なる病態であることが示唆されている。RA-ILDでは気管支血管周囲結合織、小葉間隔壁や胸膜近傍などの広義間質に炎症や線維化が見られ、特にリンパ濾胞の過形成を伴うことが多い。病理学的にはRA-ILDはNSIP patternをとることが多いが、例

えば、NSIP pattern と UIP pattern など複数の病理所見が同一患者で混在することもしばしば経験される。一般に NSIP pattern の方が UIP pattern よりも、生命予後は良好と考えられており、RA-ILDの方が IPF よりも生命予後は良好とされている。ILD は、粉塵を含む何らかの吸入抗原が関与する可能性が高いと考えられているが、RA-ILD ではその他に免疫学的な機序も関与すると考えられる。一方で、RA-ILD 及び IIPs (IPF) どちらにおいても、発症に対する喫煙の関与が示唆され、共通の発症原因の存在も疑われる。このように、RA-ILD と IPF とは、共通点及び相違点があり、RA-ILD の研究は、RA だけではなく、ILD (IIPs) の病態の解明のきっかけとなる可能性がある。

以上をふまえた上で、今回は RA 患者におけるILDの罹患状況を明らかにする目的で、以下の検討を行った。

B. 研究方法

東京大学附属病院アレルギーリウマチ内科に通院中の RA 患者のうち文書で同意の得られた152例に対して、胸部 X 線 (CXR)、胸腹部 CT 画像を retrospective に検索し、以下の分類を行った (表 1)。すなわち、CT 上、ILD 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 以上であるものを「あ」、2cm に満たないものを「い」、CT が施行されていないが、CXR にて明らかな ILD の所見が認められるものを「う」、ILD の所見が認められないものを「え」、CT 上 ILD の所見が見られないものを「お」とした。CT、CXR いずれも未施行であるものを「か」とした。

C. 研究結果

表 2 に分類結果を示す。152 例中、79 例 (52.0%) に CT が施行されていた。このうち 19 例に ILD を認めた。CT の撮影されていない 73 例中、66 例に CXR が施行されていたが、これらに ILD は認められなかった。CT または CXR が施行されていた 145 例中の ILD の頻度は 19 例 (13.1%) であっ

た。このうち、最大病変の短径が 2cm 以上であるものは 12 例 (145 例中 8.3%) であった。

D. 考察

RA におけるILDの頻度に関する報告については、その診断法により大きく異なり、5~40%以上と様々である。RA患者においては、CXRでの検討で11%の肺線維症合併 (Jurik AG et al. Scand J Rheumatol 11:217, 1994)、高分解能 (HR) CTにて約20%のILDの合併 (McDonagh et al. Br J Rheumatol 33:118, 1994) が報告されており、CT (一部HRCT) による本研究での罹患率とおおむね一致している。

ただし本研究の限界として、retrospective な検討であり、過去 11 年遡っての画像検索を行ったため、画像上 ILD が見られなかった症例でも現在までに発症している可能性があり、実際の罹患率はより高値でありうる点が挙げられる。

E. 結論

胸部 X 線又は胸部 CT が撮影された RA 患者 145 例のうち、ILD 合併は 19 例 (13.1%) に認められた。一方で、検討した 152 例において胸部 CT で ILD を合併していない症例が 60 例認められた。Retrospective な検討であるが、当院における RA 患者での ILD の合併率は、過去の文献的報告とほぼ同様であることを今回確認することができた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakaya M, Dohi M, Okunishi K, Nakagome K, Tanaka R, Imamura M, Baba S, Takeuchi N, Yamamoto K, Kaga K. Noninvasive system for evaluating allergen-induced nasal hypersensitivity in murine allergic rhinitis. Lab Invest. 2006;86(9):917-26.

2. Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Tanaka R, Miyazaki J, Yamamoto K. In vivo IL-10 gene delivery attenuates bleomycin induced pulmonary fibrosis by inhibiting the production and activation of TGF-beta in the lung. *Thorax*. 2006;61(10):886-94.
3. Shoda H, Nakazaki K, Izutsu K, Tanaka R, Komagata Y, Misaki Y, Yamamoto K. Epstein-Barr virus-associated mononucleosis caused by weekly low-dose methotrexate therapy in a rheumatoid arthritis patient. *Scand J Rheumatol*. 2006;35(2):152-3.
4. Nagatani K, Dohi M, To Y, Tanaka R, Okunishi K, Nakagome K, Sagawa K, Tanno Y, Komagata Y, Yamamoto K.

Splenic dendritic cells induced by oral antigen administration are important for the transfer of oral tolerance in an experimental model of asthma. *J Immunol*. 2006;176(3):1481-9.

2.学会発表

1. 田中良一 シンポジウム 3「関節リウマチと肺合併症」関節リウマチと肺合併症 まとめ 第21回臨床リウマチ学会 2006 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. 分類

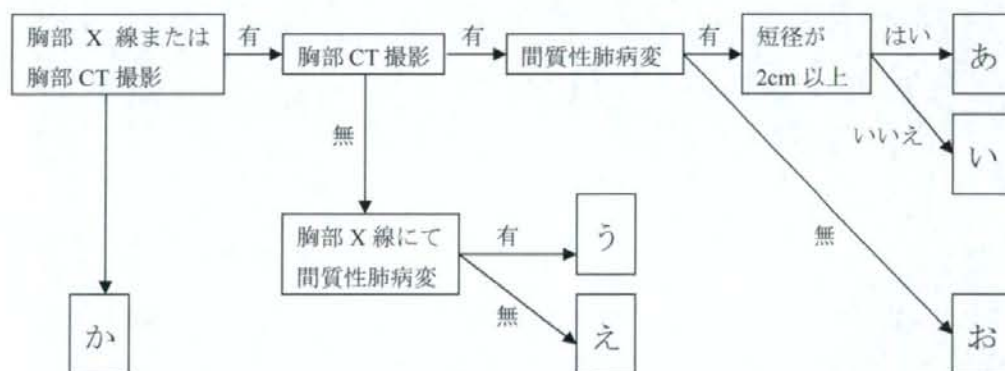


表2. ILD の罹患状況

分類	あ	い	う	え	お	か	計
症例数	12	7	0	66	60	7	152
(%)	7.9	4.6	0.0	43.4	39.5	4.6	100.0

候補パスウェイ遺伝子群における疾患関連多型解析方法の検討

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

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

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

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

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

A. 研究目的

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

研究戦略は候補遺伝子アプローチであるので、本年度は、候補遺伝子選択および、候補遺伝子上の解析対象多型選択のための論理策定とツール作成を行った。また、SNP データを登録するデー

タベースを構築し、連鎖不平衡マッピングのための基礎的な公開解析ツールの実装を行うとともに、公開解析ツールの不備を補うべくカスタマイズのデザインを策定し、実装する。

B. 研究方法と実装

(1) 候補遺伝子の選択

RA および RA 関連間質性肺炎について既知事項から、遺伝素因を持ち得る機能パスウェイ特定し、それを解析対象として定める。機能パスウェイには複数の遺伝子が所属し、また、複数の機能パスウェイに属する分子が存在することから、ひとつの機能パスウェイは、別の機能パスウェイと

ネットワーク状に連絡しうる。現在では、ある遺伝子を端緒にその機能的つながりをたどろうとすると、非常に巨大な分子-分子ネットワークを通じて、膨大な数の分子となんらかの関係を持つことが示される。本研究課題では、この分子-分子ネットワークをグラフとしてとらえ、グラフ理論を用いて、ある分子・もしくはある限局的な機能パスウェイから、任意の距離にある分子部分集合を、一定の規則で抽出し、それを、解析対象遺伝子リストとする手法を開発する。

(2) タイピング候補多型の選択

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

(3) SNP タイピングデータの複合検定

同一パスウェイ上の複数の遺伝子について、検定した複数の SNP は、同一の仮説に対する複数の検定であるとみなすことができる。本研究では、解析対象パスウェイに対して複数の多型をマーカーとして用いて、複数の検定を実施したものと

して、オムニバスパーミュテーションテスト手法により、総合的棄却域を定め、個別の SNP についてもマルチプルテスト補正後の P 値を与える手法を実装した。パーミュテーションテスト補正においては、SNP データ補正法として、常用されている Tippette 補正関数のほかに、一般的なマルチプルテスト関数としてよく用いられる Fisher 関数他、計 3 関数を用いるものとした。

C. 考察

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

(4) SNP データ解析ツールの整備

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

- ・ Pairwise LD
 - r^2 を中心に D' を併用
- ・ LD block
 - Solid Spine of LD を中心に Gabriel 法、Four gamete test 法を併用
- ・ Recombination rate 推定
 - Coalescent model based-RJMCMC
- ・ Haplotype 推定
 - PLEM
 - SNPHAP
 - Phase
 - EM for 2-individual pooled data
- ・ 関連検定
 - 単一 SNP・ハプロタイプ アレル頻度分割表検定
 - ・ Fisher の正確確率検定(大

規模データ対応)

- 一般線形回帰法・尤度解析(尤度比検定とスコア検定)
- Permutation 補正
 - ・ Tippete 関数
 - ・ Fisher 関数
 - ・ Liptak logit 関数
- FDR 補正
- ・ TagSNP 選別
 - r2-greedy 法
 - Optimum solution 法

D. 結論

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

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Gotoh N, Yamada R, Hiratani H, Renault V, Kuroiwa S, Monet M, et al. No association between complement factor H gene polymorphism and exudative age-related macular degeneration in Japanese. *Hum Genet.* 2006 Aug;120(1):139-43.

2. Okazaki Y, Suzuki A, Sawada T, Ohtake-Yamanaka M, Inoue T, Hasebe T, Yamada R, et al. Identification of citrullinated eukaryotic translation initiation factor 4G1 as novel autoantigen in rheumatoid arthritis.

2. 学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

候補遺伝子リストの作成

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

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異性を含めた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) β を取り上げ、候補パスウェイ遺伝子群は、KEGGおよびILD・TGF β 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。

G. 研究発表

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) β を取り上げた。

C. 研究結果

TGF β 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 β 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

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.

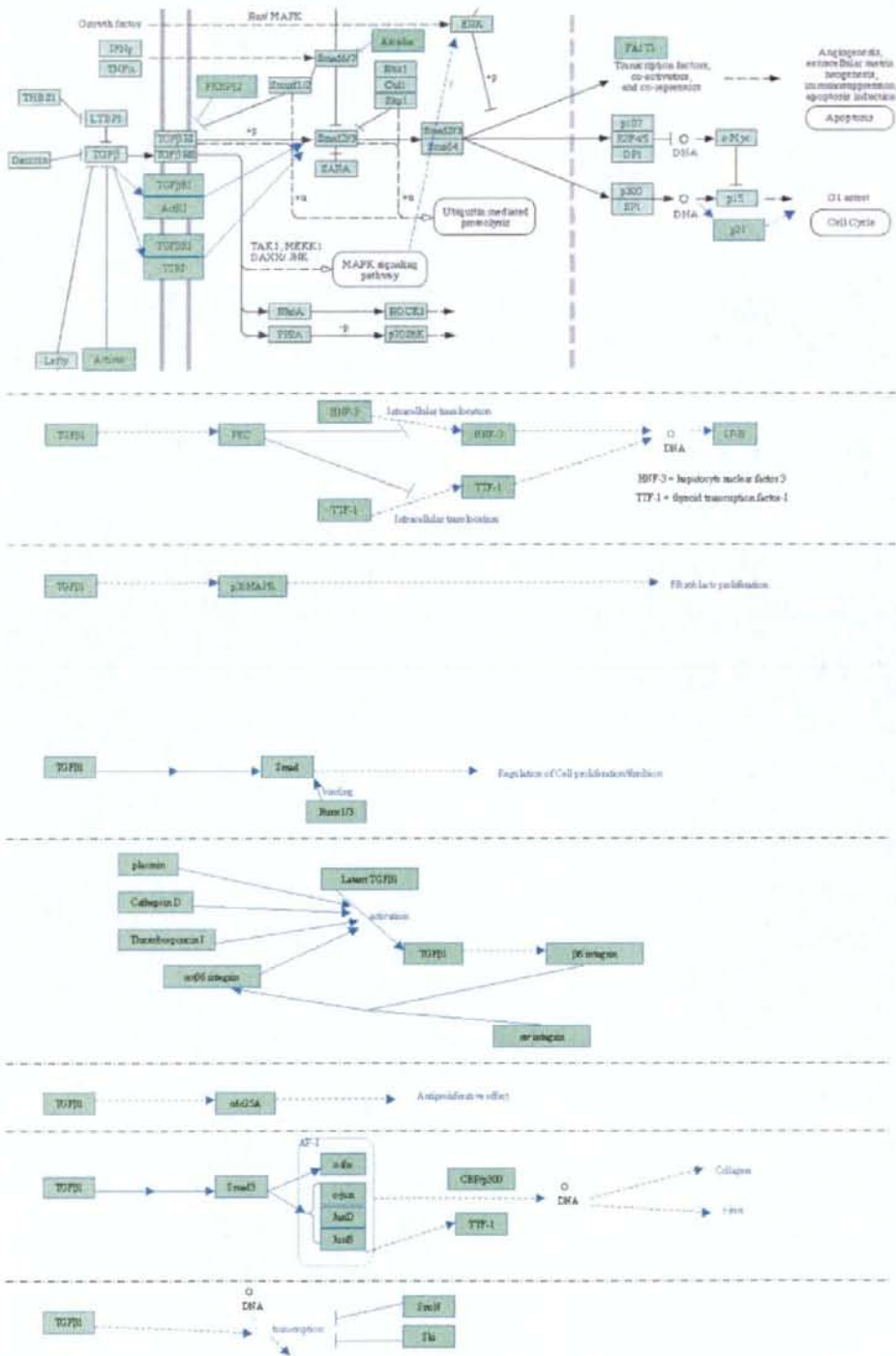
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表 1. 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	PRKCO	5588	SMAD7	4092
AGT	183	CUL1	8454	IL2RB	3560	MAPK14	1432	PRKCC	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	FNI	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	SFPTC	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 1. TGFβ 関連分子のパスウェイマップ



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

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

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 β 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 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

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、TGF β 関連 126 遺伝子に存在する SNPs のうち 1078 SNPs 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

3. 論文発表

1. Yamamoto, K. & Yamada, R. Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 357, 1250-1251 (2007).
2. 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).

3. Suzuki, A., Yamada, R. & Yamamoto, K. Citrullination by peptidylarginine deiminase in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1108, 323-39 (2007).
4. Ryo Yamada, F. Matsuda. 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).

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	p 値
N	95	77	
男性/女性	31/64	14/63	-0.03
年齢	68.1±8.05	62.4±10.8	--0.0001
罹患年数	14.7±12.5	18.1±13.0	--0.087
Stage	2.389±1.511	2.636±1.307	---0.364
Class	1.758±1.049	1.831±1.031	---0.796

* χ^2 検定, **t 検定, ***U 検定表2. TGF β 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			Gene			Gene			Gene		
Gene name	id	p-value	name	id	p-value	name	id	p-value	name	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	0.070306764	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	0.109808635
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

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

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、一般的に疾患型遺伝因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 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、国内の遺伝統計学研究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、臨床上、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難形を確保するとともに、GWA S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、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GWA Sアプローチへと変化があった。基本的なGWA S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

GWA S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

4. 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*.
3. 学会発表
- 1) Yamada R., Hirosawa 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

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 1×10^{-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 1.2×10^{-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RA136例とILD非合併RA177例の2群間において(表1)、全ゲノム上の277420SNPsについてタイプングを行ない、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。同キットでタイプングされる全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

タイプ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、 1×10^{-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 1.2×10^{-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 1×10^{-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 1.2×10^{-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 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

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 4) 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
- 5) 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

- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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

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

- 12) 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, 白井 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
- 13) 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

- 14) 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)。

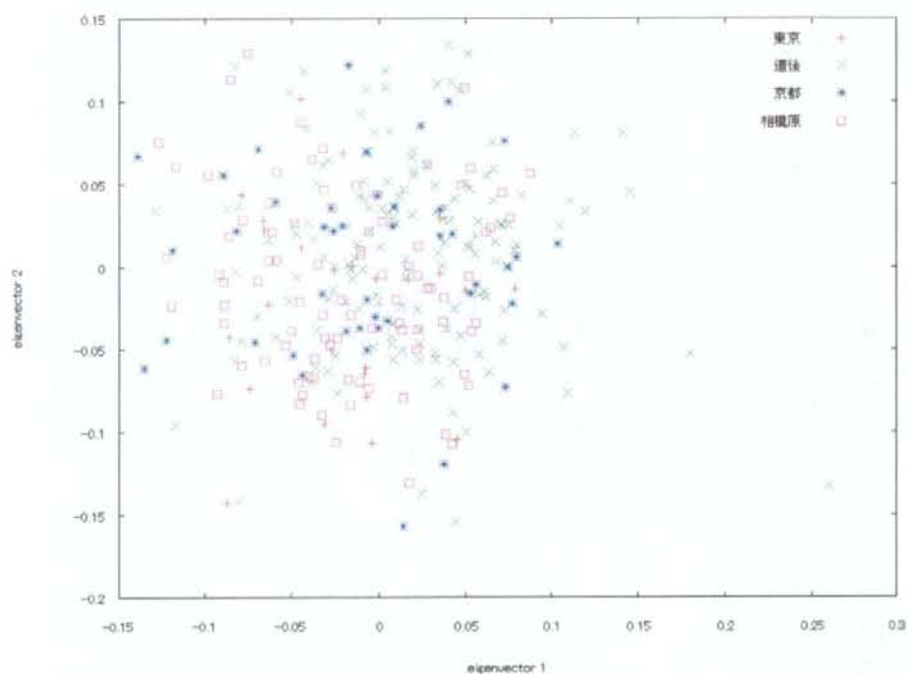


表 2. 全ゲノム上の SNP における群間アレル比較 (上位 100SNP, rsID は省略)

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	LRR	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	MAG1	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