

profile の予測能を ROC 曲線および AUC 統計量で評価した。

### 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 Table 2 に示した。

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<sup>2</sup> 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=1.23×10<sup>-3</sup>~4.02×10<sup>-23</sup>)。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。

Table 2. Results of meta-analyses of associations between rheumatoid arthritis and single nucleotide polymorphisms.

Gene	Polymorphism	Number of study	Heterogeneity			Random effect			Fixed effect		
			Q	(P-value)	I <sup>2</sup>	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

#### 2) ゲノムワイド関連解析のメタアナリシスにおける研究間異質性が統計学的結論に及ぼす影響

全ての研究に共通する単一の効果を仮定する母数モデル (FEM) を用いた場合、遺伝的効果の異質性に応じて偽陽性率の増加が顕著であった (Figure 1 上段)。一

方、研究間で遺伝的効果の異質性を許容する変量モデル (REM) を用いた場合、偽陽性率の増加は比較的小さかった (Figure 1 下段)。また、異質性の検定 (Cochran's Q test; P<0.1) の検出力が 0.8 未満となるシミュレーション条件下であっても、FEM の利用した場合、偽陽性率

が増加することが分かった。このことから、検出が困難な程度の研究間の異質性に対しても、FEMは頑健ではないということが示唆され、REMを適用することが望ましいと考えられる。

さらに、症例・対照を計 5,000 から 20,000 検体を用いたゲノムワイド関連解析のメタアナリシスにおいて、異質性の増加に伴い、遺伝子 - 疾患の関連を同定する検出力が低下し (Figure2 上段)、ゲノムワイド有意水準を満たした場合にオッズ比が過大推定される「勝者の呪い」という現象が起こることを明らかにした

(Figure2 下段)。この現象は、統合されるトータルのサンプル数が少なく、リスクアレルの頻度が低く、オッズ比の真値が小さい場合に顕著であることが分かった。また、トータルのサンプル数が同一の場合、統合する研究の数を少なくし、各研究あたりのサンプル数を大きくした場合に、研究間異質性の及ぼす影響が大きく、検出力の低下および統合オッズ比推定値の過大評価の度合いが顕著となることを明らかにした (Nakaoka & Inoue 2009, J Hum Genet)。

Figure 1. The type I error rate in fixed effects model (FEM) and random effects model (REM) meta-analyses at the significance level of 0.05 for five scenarios as the function of  $\tau^2$ , disease allele frequency  $f_A = 0.1$  or 0.3. The top and bottom rows show the type I error rates when applying FEM and REM, respectively. The lines of the type I error rate under FEM for scenarios I, II and III are overlapping. The description of each simulation scenario is in Table 1.

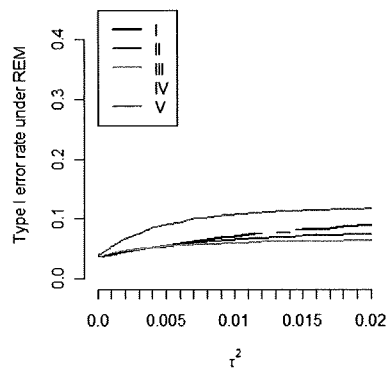
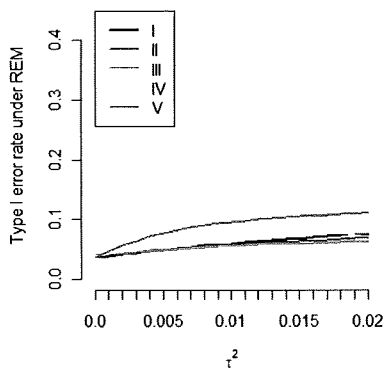
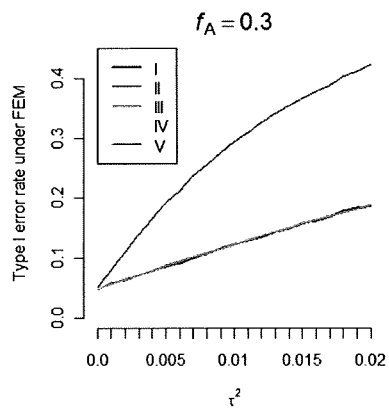
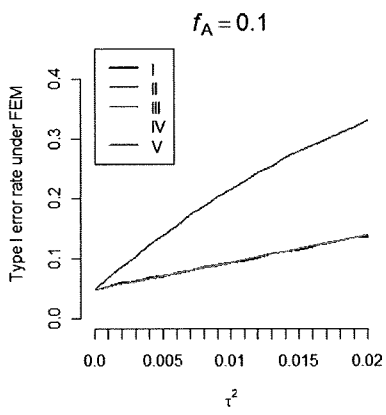
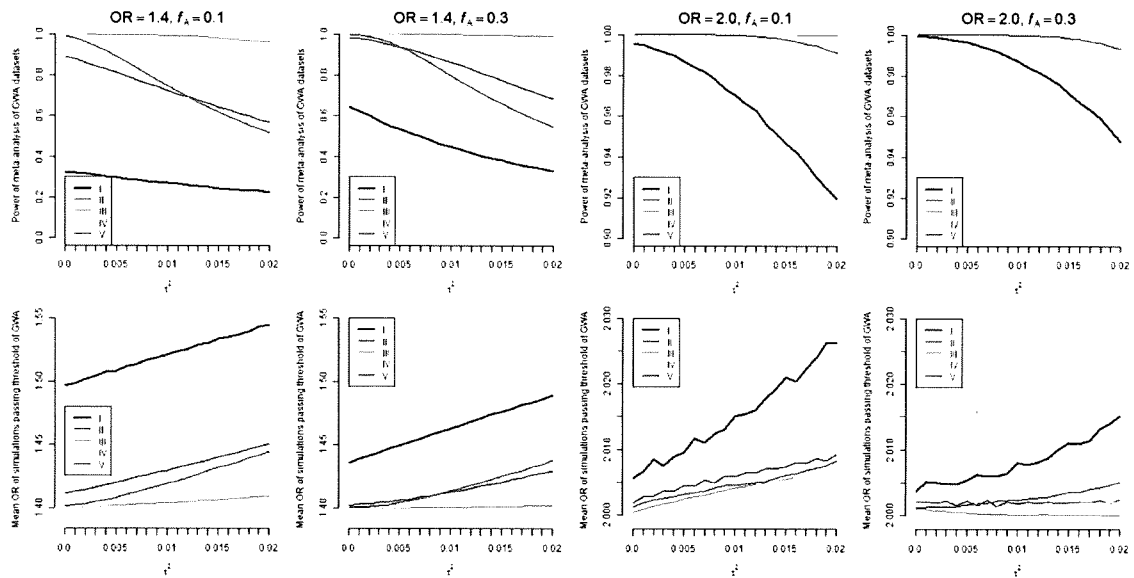


Figure 2. Simulations for the powers in random effects model (REM) meta-analyses of detecting a gene-disease association at the significance level of  $5.7 \times 10^{-7}$  (the top row) and the mean OR of the simulations passing the threshold (the bottom row) as the function of  $\tau^2$ , disease allele frequency  $f_A = 0.1$  or  $0.3$ , the overall OR = 1.4 or 2.0. When the overall OR = 2.0, the lines of the powers for scenarios II, III and IV are overlapping. The description of each simulation scenario is in Table 1.

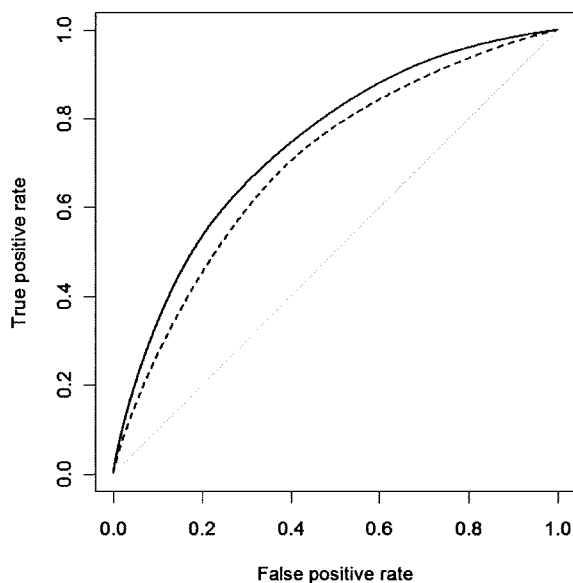


### 3) メタアナリシスに基づく関節リウマチ易罹患性予測モデルの構築とその臨床的妥当性

関節リウマチをモデル疾患とし、メタアナリシスに基づき、易罹患性予測モデルを構築する統計手法の開発を行った。関節リウマチの遺伝的関連解析に関するメタアナリシスの情報を網羅的に収集し、精度が高く、一般化可能性の高い疾患-遺伝子の関連を抽出し、抽出したオッズ比の推定値およびアレル頻度の情報から、ベイズの定理を用いて、疾患のリスクに

関する genomic profile を構築するという手法である。変量効果モデルのメタアナリシスで有意水準  $P < 0.0001$  を満たした 11SNPs および HLA-DRB1 の情報による評価モデルを構築した。構築した Genomic profile に基づく遺伝的予測の正確度を、ROC 曲線およびその AUC 値によって評価したところ、上記遺伝的マーカーのみを用いた場合、AUC は 0.70 であり、性別の効果を加えると 0.74 であった (Figure3)。

Figure 3. ROC curve for a model containing all the 11 SNPs, HLA-DRB1 and gender (black solid line, AUC=0.74), for the 11 SNPs and HLA-DRB1 (black dashed line, AUC=0.70) and for a random discrimination (gray solid line, AUC=0.50).



#### 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。

疾患遺伝子研究において同定された疾患 - 遺伝子の関連について、研究間で遺伝的効果が異なる可能性は十分にあり得ると考えられている。例えば、同定された遺伝子多型マーカーと真の機能的遺伝子多型との連鎖不平衡の度合いが研究対象となる集団間で異なる場合、同定された遺伝子マーカーの効果は集団間で異質となるだろう。また、gene-gene あるいは gene-environment 間の交互作用、集団の構造化、表現型の誤分類、タイピングエラーなどのバイアスも遺伝的効果の異質性の一因となりうる。我々は、シミュレーション実験を用いて、異質性の増加に伴い、疾患 - 遺伝子の関連を特定する検出力が低下し、ゲノムワイド有意水準を満たした場合にオッズ比が過大推定される「勝者の呪い」という現象が起こることを明らかにした。このことは、複数の

ゲノム全域関連解析の結果を統合するメタアナリシスを行う際に、研究間の異質性の存在を考慮し、十分に検出力の高い研究デザインを設計する必要性を示唆するものである。

関節リウマチをモデル疾患とし、メタアナリシスに基づき、易罹患性予測モデルを構築する統計手法の開発を行った。本法では、Test 集団を用いることなく、メタアナリシスから得られる先験的な情報に基づいて、疾患易罹患性予測モデルを構築することが可能である。また、性別、喫煙などの情報や環境と遺伝子の相互作用なども、モデルに取り込むことができる。構築したモデルの予測能は、遺伝的多型情報のみを用いた場合、AUC が 0.70 であり、性別の効果を加えると 0.74 であった (Figure3)。これは、関節リウマチの診断に、抗シトルリン化ペプチド抗体を用いた場合の AUC 値が 0.8 程度であることを考慮すると、遺伝情報だけで比較的精度の高い予測が可能であることを示唆している。

## E. 結論

本研究では、遺伝的関連解析のメタアナリシスの情報から得られる先験的な知見を、網羅的に抽出、統合することで、関節リウマチの易罹患性予測モデルを構築する手法を提案した。今後、構築した Genomic profile の臨床的妥当性を関節リウマチ症例・対照の実データを用いて評価したいと考えている。さらに、関節リウマチの病態は患者ごとに多様であり、少関節型、多関節進行型、ムチランス型などの病型(sub-phenotype)が存在する

ことが知られている。これら病型と構築した genomic profile との間に相関が認められれば、発症初期に病態進行を予測し、それによる適切な投薬と治療方針の決定に有用な情報を提供し、患者 QOL の向上に寄与できるのではないかと考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Kee ALS, Kriscsek B, Auburger G, Simon M, Krex D, Arlier Z, Nayak N, Ruigrok Y, Niemela M, Tajima A, Frauberg M, Tamas D, Wirjatijasa F, Hata A, Jordi B, Oszvald A, Kasuya H, Gulam Z, Schoch B, Pankaj S, Stuer C, Roelof R, Beck J, Sola T, Ricciardi F, Aromaa A, Illig T, Schreiber S, Duijin CM, Berg LH, Claire P, Carole P, Roder C, Ozturk A, Gaal E, Jeremy W, Berg D, Geisen C, Christoph F, Paul S, Alex F, State MW, Wichmann HE, Breteler MMB, Wijmenga C, Mane S, Juan JE, Sandalcioglu IE, Meyer B, Raabe A, Daniel R, Jaaskelainen A, Hemesniemi J, Rinkel GJE, Zewnbutsu H, Inoue I, Palotie A, Cambien F, Nakamura Y, Lifton RP, Guenel M. Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 5 risk loci. Nat Genet online-published.

Yoshihara K, Tajima A, Yahata T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Kotera K, Masuzaki H, Tashiro H, Katabuchi H, Inoue I, Tanaka K. Gene expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent databases. *PLoS One* 5, e9615, 2010.

Imaizumi T, Tanaka H, Tajima A, Tsuruga K, Oki E, Sashinami H, Matsumiya T, Yoshida H, Inoue I, Ito E. Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) is induced by IFN-gamma in human mesangial cells in culture: possible involvement of RIG-I in the inflammation in lupus nephritis. *Lupus* in press.

Yoshihara K, Tajima A, Komata D, Yamamoto T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Inoue I, Tanaka K. Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates ZEB2 in tumor progression and prognosis. *Cancer Sci* 100, 1421-1428, 2009.

Nakaoka H, Inoue I. Meta-analysis of genetic association studies: methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse. *J Hum Genet* 54, 615-623, 2009.

Brookes AJ, Lehvaslaiho H, Muilu J, Shigemoto Y, Oroguchi T, Tomiki T, Mukaiyama A, Konagaya A, Kojima T, Inoue I, Kuroda M, Mizushima H, Thorisson GA, Dash D, Rajeevan H, Darlison MW, Woon M, Fredman D, Smith AV, Senger M, Naito K, Sugawara H. The phenotype and genotype experiment object model (PaGE-OM): a robust data structure for information related to DNA variation. *Hum Mutat* 30, 968-977, 2009

Ruigrok YM, Rinkel GJ, Wijmenga C, Kasuya H, Tajima A, Takahashi T, Hata A, Inoue I, Krischek B. Association analysis of genes involved in the maintenance of the integrity of the extracellular matrix with intracranial aneurysms in a Japanese cohort. *Cerebrovasc Dis* 28, 131-134, 2009.

h) Koike A, Nishida N, Inoue I, Tsuji S, Tokunaga K. Genome-wide association database developed in the Japanese Integrated Database Project. *J Hum Genet* 54, 543-546, 2009.

Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Inoue I, Maki K. Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor genes in a Japanese population. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 136, 536-541, 2009.

10. Kang E-H, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Tomoyasu Y, Watanabe M,

Yamaguchi M, Park S-B, Maki K, Inoue I. Association of the growth hormone receptor gene polymorphisms with mandibular height in a Korean population. *Arch Oral Biol* 54, 556-562, 2009.

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* 39, 972-981, 2009.

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.

#### 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を35個厳選し、平均解像度6.0kbにて合計SNP数1,144個配置した。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んでいる。現時点で収集を終えた詳細な臨床情報を有する患者380個体ならびに健常者570個体を対象としてイルミナ社のBeads ExpressによりこれらのSNPの遺伝子型を決定した。さらに関節リウマチの病型分類に基づき、その各病型ならびに領域別に疾患との関連を調査した。その結果、5領域において病型との有意な関連を見出した。HLA classII 領域では少関節型、*CD244*遺伝子領域ではムチランス型、*MRPL48*遺伝子領域では少関節型、*PRKCH*遺伝子領域ではリウマトイドファクター・ネガティブならびに*FTO*遺伝子領域ではムチランス型との関連がそれぞれ認められた。

**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、すべてとは言いきれないが、発症に対して比較的效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が高いと予測される SNP をさらに厳選した。最終的に関節リウマチの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 1,152 個配置した。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んでいる。

続いて現時点で収集を終えた詳細な臨床情報を有する患者 380 個体ならびに健常者 570 個体を対象としてイルミナ社の Beads Express によりこれらの SNP の遺伝子型を決定した。

### C. 研究結果

結果が得られない個体が多い SNP は解析対象から除外することとしこの基準を 5% 以上とした。その結果、163 SNP (14.1%) がこれに該当した。続いて、多型が認められなかった SNP ならびにハーディーワインバグ平衡から偏りのある SNP を検出したところ、それぞれ 15 SNP (1.3%)、30 SNP (2.6%) となった。最終的に今後の解析に使用可能な SNP は 944 SNP (81.9%) となった。一方、全検体中、極端に実験成績が悪い検体は一つも認められなかった。得られたデータを基に、まずは病型を層別化しない状態で関連解析を行った結果 (mode :log-additive)、HLA 領域における rs17191234 で  $P=8.4 \times 10^{-9}$ 、MRPL48 遺伝子領域における rs7935825 で  $P=9.3 \times 10^{-4}$ 、PRKCH 遺伝子領域における rs12887002 で  $P=9.3 \times 10^{-4}$  という関連が示された。

続いて、病型を層別化して関連解析を行った。その分類は二種類で一つは少関節炎型、多関節炎型、もしくはムチランス型、もう一つはリウマトイドファクター

(RF) 陽性もしくは陰性とした。その結果、少関節炎型でのみ関連のある SNP が検出された領域は HLA-Class II 領域における rs9277386 で  $P=1.2 \times 10^{-4}$ 、OR=2.88 (mode :recessive)、ならびに MRPL48 遺伝子領域における rs3817514 で  $P=2.0 \times 10^{-4}$ 、OR=2.56 (mode :recessive)、ムチランス型では CD244 遺伝子領域における rs3573389 で  $P=1.2 \times 10^{-3}$ 、OR=7.66 (mode :recessive)、ならびに FTO 遺伝子領域における rs2665272 で  $P=5.4 \times 10^{-3}$ 、OR=3.50 (mode :log-additive)、さらに RF 陽性では PRKCH 遺伝子領域における rs11627926 で  $P=1.2 \times 10^{-4}$ 、OR=0.38 (mode :dominant) であった。

### D. 考察

現在までに収集を終えた検体のほぼすべてを対象に、遺伝子型タイピングを終えた。まず、この実験のクオリティーを評価したところ、最終的なコールレートは 81.9% であった。本研究の各プライマー・プローブセットはすべてカスタムデザインであることを考慮するとこれは平均的な値であり、大きな問題はなかった。

現時点での収集検体数は目標値には届いていないが、得られたデータにて関連解析を実施した。特に臨床情報別に集団を層別化して解析した結果では 5 領域において、関連を示唆する SNP が検出された。この 5 領域での関連は層別化したときのみ観察される関連であり非常に興味深い。

### E. 結論

本研究の目標は多型情報に基づく病態予測にある。すでにこれまでの結果において、5 領域で病型との関連を示す SNP を検出することに成功した。今後、検体数増加に伴い、より確度の高いデータとすると共に、新たに病型との関連を示す領域を見出すことが期待される。最終的にはこれらのデータを利用して診療情報のデータベース構築と病態予測アルゴリズムの作成への重要な基盤情報となると考えられる。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kohno T, Kunitoh H, Shimada Y, Shiraishi K, Ishii Y, Goto K, Ohe Y, Nishiwaki Y, Kuchiba A, Yamamoto S, Hirose H, Oka A, Yanagitani N, Saito R, Inoko H, Yokota J. Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. *Carcinogenesis* 2010 31(5):834-841
  - 2) HUGO Pan-Asian SNP Consortium, Abdulla MA, Ahmed I, Assawamakin A, Bhak J, Brahmachari SK, Calacal GC, Chaurasia A, Chen CH, Chen J, Chen YT, Chu J, Cutiongco-de la Paz EM, De Ungria MC, Delfin FC, Edo J, Fuchareon S, Ghang H, Gojobori T, Han J, Ho SF, Hoh BP, Huang W, Inoko H, Jha P, Jinam TA, Jin L, Jung J, Kangwanpong D, Kampuansai J, Kennedy GC, Khurana P, Kim HL, Kim K, Kim S, Kim WY, Kimm K, Kimura R, Koike T, Kulawonganuchai S, Kumar V, Lai PS, Lee JY, Lee S, Liu ET, Majumder PP, Mandapati KK, Marzuki S, Mitchell W, Mukerji M, Naritomi K, Ngamphiw C, Niikawa N, Nishida N, Oh B, Oh S, Ohashi J, Oka A, Ong R, Padilla CD, Palittapongarnpim P, Perdigon HB, Phipps ME, Png E, Sakaki Y, Salvador JM, Sandraling Y, Scaria V, Seielstad M, Sidek MR, Sinha A, Srikumool M, Sudoyo H, Sugano S, Suryadi H, Suzuki Y, Tabbada KA, Tan A, Tokunaga K, Tongsimas S, Villamor LP, Wang E, Wang Y, Wang H, Wu JY, Xiao H, Xu S, Yang JO, Shugart YY, Yoo HS, Yuan W, Zhao G, Zilfalil BA; Indian Genome Variation Consortium. Mapping human genetic diversity in Asia. *Science*. 2009 Dec 11;326(5959):1541-5.
  - 3) Nakabayashi K, Komaki G, Tajima A, Ando T, Ishikawa M, Nomoto J, Hata K, Oka A, Inoko H, Sasazuki T; Japanese Genetic Research Group for Eating Disorders (JGRED), Shirasawa S. Identification of novel candidate loci for anorexia nervosa at 1q41 and 11q22 in Japanese by a genome-wide association analysis with microsatellite markers. *J Hum Genet*. 2009 Sep;54(9):531-7.
  - 4) Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection. *J Infect Dis*. 2009 Jun 1;199(11):1707-15.
- 2.学会発表  
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
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

関節リウマチと HLA-DRB1 の関連分析

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
協力者	奥平 裕子	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	
協力者	國井 七絵	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	
協力者	吉川 枝里	財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団	
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	教授
協力者	中川美弥子	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学	
協力者	伊藤とも美	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学	
研究協力者	本間 康彦	東海大学医学部内科学系検診センター	教授
研究協力者	桑名 正隆	慶應義塾大学医学部リウマチ内科学	准教授
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
研究協力者	柏瀬 貢一	東京都赤十字血液センター検査三課	課長
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 (RA) 患者 435 症例のうち、HLA-DRB1: 432 例、その他の HLA-A, -B, -C, -DQB1, -DPB1 は 429 例で HLA タイピングを行った。健常者コントロールのなかで関節リウマチの家族歴のない 1,809 例中、DRB1: 1,458 例、他の HLA 遺伝子座は 946 例でタイピングを行った。これらの HLA タイピング結果をもとに Fisher's exact test 解析を行った。

RA 感受性であったアリルは DRB1\*04:05, DRB1\*04:01, DRB1\*10:01, DPB1\*02:01、RA 抵抗性であったものは DRB1\*13:02, DRB1\*08:02, DPB1\*09:01 であった。DRB1 以外の HLA 遺伝子座 で有意な関連が検出されたが、Haploview による LD ブロック および D' 等の解析により、これらは DRB1 アリルとの連鎖不平衡によるものと考えられた。一方、DPB1 で検出された RA 感受性アリルおよび抵抗性アリル は、DRB1 との連鎖不平衡では説明ができないので、独立して RA 感受性および抵抗性を付与している可能性が示唆された。遺伝子型でも RA 感受性の遺伝子型が検出された。RA をムチランス型、多関節進行型、少関節型の病型に分けたとき、特定の DRB1 アリルあるいは遺伝子型で病型との有意な関連が検出された。

A. 研究目的

関節リウマチは多因子疾患であり、その

発症には遺伝要因が関与していることは双生児の研究(1) 等により明らかとなっている。

遺伝要因の中でも HLA の関与が大きく、その 1/3 は HLA による (2)とされている。これまでに日本人集団を含め、関節リウマチと HLA の関連が多数報告されてきた。しかし、HLA-DRB1 以外の HLA 遺伝子座、あるいは病型との関連を調べたものは少ない。よって本研究では HLA-DRB1 以外の HLA 遺伝子座との関連、および病型との関連を明らかにすることを目的とした。

## B. 方法

文書によるインフォームドコンセントを得た後、関節リウマチ患者群と健常者群(検診センター受診者)から末梢血を取得した。DNA は抽出キット GENOMIX (SRL) により抽出・精製した。新たに収集した関節リウマチ (RA) 患者 435 症例のうち、HLA-DRB1: 432 例、その他の HLA-A, -B, -C, -DQB1, -DPB1 は 429 例で HLA タイピングを行った。健常者コントロールのなかで関節リウマチの家族歴のない 1,809 例中、DRB1: 1,458 例、他の HLA 遺伝子座は 946 例でタイピングを行った。関節リウマチの家族歴の有無は、インフォームドコンセント取得時に聴取した。HLA のタイピングには蛍光ビーズを用いた SSO 法 (Luminex 法) (LABType SSO, ワンラムダ、または WAKFlow HLA タイピング試薬, 湧永製薬) を用いた。これらの HLA タイピング結果をもとに R ソフトウェアを用いて、Fisher's Exact Test により統計解析を行った。DRB1 の shared epitope (3) は、du Montcel ST et al. の報告 (4) に従い分類し、解析を行った。

## C. 結果

RA 感受性であったのは DRB1\*04:05 (P : <2.2e-16, OR: 2.53 95% confidence interval: 2.09-3.06), DRB1\*04:01 (P: 5.77e-05, OR: 3.00, 95% CI: 1.71-5.22), DRB1\*10:01 (P : 8.78e-05, OR: 6.83, 95%

CI: 2.36-22.2) であった。抵抗性であったものは DRB1\*13:02 (P: 3.51e-8, OR: 0.365, 95% CI: 0.236-0.546), DRB1\*08:02 (P: 0.000177, OR: 0.337, 95% CI: 0.162-0.633), DRB1\*14:05 (P: 0.0216, OR: 0.465, 95% CI: 0.213-0.914) であった (表 1)。他の HLA 遺伝子座でも RA 感受性、および抵抗性アリルが検出された。しかし、Haploview による LD ブロック、D' の解析および Fisher's Exact Test により有意な連鎖が検出されたので、これらは DRB1 アリルとの連鎖不平衡によるものと考えられた (図 1A, B)。一方、DPB1 で検出された RA 感受性アリル DPB1\*02:01 (P: 0.00599, OR: 1.30, 95% CI: 1.08-1.57)、および抵抗性アリル DPB1\*09:01 (P: 0.0172, OR: 0.690, 95% CI: 0.501-0.940) は、DRB1 との連鎖不平衡では説明ができないので、独立して RA 感受性および抵抗性を付与している可能性が示唆された (表 1-3)。

関節リウマチの病型を、ムチランス型、多関節進行型、少関節型に分け (5)、HLA との関連を解析した。健常者を対象としたとき、DRB1\*04:05 はすべての病型に対し感受性であった。一方、DRB1\*04:01 は多関節進行型とは有意に関連していたが (P: 0.00227, OR: 3.08, 95% CI: 1.43-6.24)、少関節型とは関連していなかった (P: 0.281, OR: 1.90, 95% CI: 0.482-5.46)。逆に DRB1\*10:01 は、少関節型と関連していたが (P: 0.0164, OR: 7.38, 95% CI 1.18-34.9)、多関節進行型とは関連していなかった (P: 0.0730, OR: 3.912, 95% CI: 0.630-18.4)。ムチランス型は 12 例中 11 例が A\*24:02 をもっており、関連が認められた (P: 0.0190, OR: 2.72, 95% CI: 1.18 - 6.26) (表 2)。HLA-B\*15:18 も同様に多関節進行型と有意に関連し (P: 0.00009, OR: 3.24, 95% CI: 1.81-5.78)、少関節型とは関連していなかった (P: 0.185, OR: 2.04, 95% CI:

0.76-5.45)。また、B\*51:01 は多関節進行型に抵抗性の傾向にあったが (P: 0.0234, OR: 0.68, 95% CI: 0.48-0.96)、少関節型に対してはそのような傾向にはなかった (P: 0.708, OR: 1.09, 95% CI: 0.67-1.75)。

HLA 遺伝子型と関節リウマチとの関連を調べたところ、DRB1\*04:05, 09:01 (P: 7.51e-07, OR: 2.95, 95% CI: 1.90-4.55), DRB1\*04:01, 04:05 (P: 1.13e-06, OR: 15.0, 95% CI: 4.10-82.5), DRB1\*04:05, 04:05 (P: 7.10e-05, OR: 3.50, 95% CI: 1.83-6.70)で強い関連がみられた (表4)。RA 感受性アレルのホモの方がヘテロよりもオッズ比が高くなるという報告もあるが (6)、そのような傾向はみられなかった (表1, 表4)。RA 抵抗性アレルのホモあるいはヘテロでは、症例数が少ないこともあり、有意な関連は検出できなかった。また、RA 感受性アレルと抵抗性アレルのヘテロでも有意な関連はみられなかった。DRB1\*09:01 はアレルの解析では感受性ではなかったが (P: 0.135, OR: 1.17, 95% CI: 0.954-1.43)、ホモでは RA 感受性の傾向にあった (表4)。アレルでの解析では最も強い RA 感受性を示した DRB1\*04:05 のホモよりも DRB1\*04:01, 04:05 のヘテロの方が高い OR を示していることは興味深く、今後さらに症例数を増やして検証する必要があると考えられた。

HLA 遺伝子型と病型との関連では、DRB1\*04:01, 04:05 のヘテロ、DRB1\*04:05, 09:01 のヘテロおよび DRB1\*04:05 のホモが多関節進行型との強い関連を示した (P: 1.20e-06, OR: 17.2, 95% CI: 4.51-96.8, P: 2.57e-06, OR: 3.09, 95% CI: 1.91-4.93, および、P: 0.000159, OR: 3.66, 95% CI: 1.80-7.31) (表4)。これらの HLA 遺伝子型のなかで DRB1\*04:05, 09:01 は少関節型との関連は示さなかった (P: 0.104, OR: 1.98, 95% CI: 0.738-4.53)。RA 感受性ではない

DRB1\*09:01 のヘテロが多関節進行型との関連を示したことは興味深い、これについてもさらに症例数を増やして検証する必要がある。なお、DRB1\*09:01 が抗 CCP 抗体陰性の関節リウマチと関連しているとの報告 (7) があるが、我々の症例では関連は認められなかった (データは示していない)。

Shared Epitope (SE) の解析結果を表5に示した。DRB1\*04:05 を含む S3P、DRB1\*04:01 を含む S2 (日本人集団でみられる DRB1 アレルでは、S2 は DRB1\*04:01 のみを含む) が感受性であり、DRB1\*13:02 を含む S1 と DRB1\*08:02 や DRB1\*09:01 を含む X が抵抗性であった。関節リウマチ感受性および抵抗性アレルを含まない S3D は中立であった。病型との関連では、S1 は多関節進行型に対し、強い抵抗性を付与するが、少関節型に対する効果はそれよりも弱い傾向であった (表5)。Shared epitope 遺伝子型として解析した場合も、S1 のホモは多関節進行型に対し抵抗性であり、S3D/X のヘテロは多関節進行型でのみ感受性であった (表6)。

#### D. 考察

関節リウマチと HLA アレルとの関連を解析し、感受性および抵抗性のアレルを検出した。良く研究されている HLA-DRB1 以外の HLA 遺伝子座でも有意な関連が検出されたが、連鎖不平衡の解析から DRB1 が第一義的で、他の遺伝子座での有意な関連は DRB1 との連鎖不平衡によるものと考えられた。しかし DPB1 で検出された感受性、抵抗性アレルは DRB1 との連鎖不平衡では説明できないので、独立にそれらを付与している可能性があると考えられる。

HLA 遺伝子型との関連では、DRB1\*04:01, 04:05 のヘテロが DRB1\*04:05 のホモよりも高いオッズ比を示した。白人では DR1 と DR4 のヘテロが関節リウマチ感

受性を増大させるとの報告 (8) があるが、我々の症例では検出できなかった。DR1 と DR4 のヘテロは Shared Epitope では S3P/S3P であるので、これは我々の症例では DRB1\*04:05 (S3P) のホモでもアリル・モードで解析したときの DRB1\*04:05 のオッズ比と同程度で合ったことと同様である。

関節リウマチの病型との関連解析でも、病型に特徴的な感受性アリル、あるいは HLA 遺伝子型が検出された。最重症のムチランス型で DRB1 ではなく、HLA-A\*24:02 との関連が検出されたことは興味深い。HLA-A\*24:02 は日本人集団で最も高いアリル頻度をもつ HLA-A のアリルであるので、A\*24:02 それ自体ではなく、近傍の遺伝子が関与している可能性も考えられる。今後、A\*24:02 遺伝子近傍での特徴的な変異・欠失等の探索が必要である。

多関節進行型は DRB1\*04:05, 09:01 のヘテロあるいは Shared Epitope S3P/X と強く関連していた。A\*24:02 とムチランス型との関連、および別のグループが解析している SNP との関連を組み合わせれば、関節リウマチ発症初期に病型・病態進行を予測することも可能になるのではないかと考えられる。しかし、HLA 遺伝子型との関連は症例数が少ないので、今後症例数を増やして解析する必要があると考えられる。

#### E. 文献

1. Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2, 802, 2001
2. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, et al. Common variants at CD40 and other genotype confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 40, 1216, 2008
3. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1987 Nov;30(11):1205-13.
4. du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, Pierlot C, Quillet P, Bardin T, Prum B, Cornelis F, Clerget-Darpoux F. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum.* 2005 Apr;52(4):1063-8.
5. Ochi T, Iwase R, Yonemasu K, Matsukawa M, Yoneda M, Yukioka M, Ono K. Natural course of joint destruction and fluctuation of serum C1q levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31, 37, 1988.
6. Gibert M, Balandraud N, Touinssi M, Mercier P, Roudier J, Revirion D. Functional categorization of HLA-DRB1 alleles in rheumatoid arthritis: the protective effect. *Hum Immunol.* 64, 930, 2003.
7. Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kobashigawa T, Tokunaga K, Tsuchiya N, Kamatani N, Kotake S. Differential association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. *Clin Exp Rheumatol.* 2007 Mar-Apr;25(2):219-24.
8. Suarez-Almazor ME, Tao S, Moustarah F, Russell AS, Maksymowych W.

HLA-DR1, DR4, and DRB1 disease related subtypes in rheumatoid arthritis. Association with susceptibility but not severity in a city wide community based study. J Rheumatol. 22, 2027, 1995.

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

奥平裕子、光永滋樹、山口香織、吉川枝里、岡 晃、猪子英俊：プラスチック基板上での等温増幅反応による HLA タイピング。第 18 回日本組織適合性学会大会（名古屋）， 2009.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし



表 1 関節リウマチ感受性および抵抗性の HLA アリル

表 1-1 HLA-DRB1

Allele	P value	OR	95% CI
04:05	<2.2e-16	2.53	2.09-3.06
04:01	5.77e-05	3.00	1.71-5.22
10:01	8.78e-05	6.83	2.36-22.2
13:02	3.51e-8	0.365	0.236-0.546
08:02	0.000141	0.332	0.160-0.622
14:05	0.0168	0.456	0.209-0.892

表 1-4 HLA-B

Allele	P value	OR	95% CI
59:01	3.59e-05	2.89	1.72-4.91
15:18	0.000103	3.08	1.71-5.64
37:01	0.000901	4.83	1.71-15.6
54:01	0.00137	1.62	1.20-2.18
55:02	0.00139	2.10	1.31-3.35
15:11	0.0185	2.38	1.09-5.19
44:03	3.50e-06	0.432	0.287-0.635
67:01	0.0305	0.324	0.0820-0.932

表 1-2 HLA-DQB1

Allele	P value	OR	95% CI
04:01	<2.2e-16	2.51	2.03-3.10
06:04	2.62e-06	0.388	0.243-0.598
03:02	0.0105	0.658	0.469-0.912
05:03	0.0135	0.534	0.303-0.898

表 1-5 HLA-C

Allele	P value	OR	95% CI
01:02	4.11e-06	1.62	1.31-1.99
07:04	0.000134	4.08	1.85-9.47
06:02	0.00895	3.22	1.27-8.56
14:03	2.55e-06	0.426	0.283-0.626
07:02	0.00642	0.707	0.543-0.912

表 1-3 HLA-DPB1

Allele	P value	OR	95% CI
02:01	0.00599	1.30	1.08-1.57
09:01	0.0172	0.690	0.501-0.940

表 1-6 HLA-A

Allele	P value	OR	95% CI
02:06	0.0368	1.36	1.02-1.82
33:03	0.00209	0.595	0.416-0.836

表 2 ムチランス型の HLA : A\*24:02 との関連

No.	HLA-A		HLA-DRB1	
	Allele 1	Allele 2	Allele 1	Allele 2
M1	<b>A*24:02</b>		DRB1*0405	DRB1*1502
M2	<b>A*24:02</b>	A*26:02	DRB1*0405	DRB1*0901
M3	<b>A*24:02</b>		DRB1*0405	DRB1*1502
M4	<b>A*24:02</b>		DRB1*0901	DRB1*1501
M5	<b>A*24:02</b>	A*02:01/07	DRB1*0901	DRB1*1502
M6	<b>A*24:02</b>	A*11:01	DRB1*0405	DRB1*0901
M7	<b>A*24:02</b>		DRB1*0405	DRB1*1502
M8	<b>A*24:02</b>	A*11:01	DRB1*0405	DRB1*0901
M9	<b>A*24:02</b>	A*33:03	DRB1*0901	DRB1*1502
M10	<b>A*240:2</b>	A*31:01	DRB1*0101	DRB1*1401
M11	<b>A*24:02</b>	A*02:06	DRB1*0405	DRB1*0407
M12	A*02:01	A*26:03	DRB1*0901	DRB1*1201

A\*2402 を太字で示した。

表3 関節リウマチ病型とHLA：健常人コントロールとの比較

DRB1 allele (24)		全体 (n = 574)	少関節型 (190)	多関節進行型 (356)	ムチランス型
DRB1*04:05	P value	<2.2e-16	1.24e-06	1.08e-12	0.0233
	OR	2.60	2.47	2.70	2.92
	95% CI	2.08-3.25	1.71-3.51	2.06-3.51	1.02-7.486
DRB1*04:01		0.00511	0.281	0.00227	
		2.53	1.900	3.08	
		1.28-4.81	0.482-5.46	1.43-6.24	
DRB1*10:01		0.00906	0.0164	0.0730	
		4.86	7.38	3.912	
		1.29-18.3	1.18-34.9	0.630-18.4	
DRB1*13:02		2.20e-07	0.00052	0.000102	
		0.307	0.230	0.341	
		0.171-0.513	0.0614-0.607	0.166-0.630	
DRB1*08:02		0.000409	0.0637	0.00780	
		0.276	0.278	0.297	
		0.0986-0.627	0.0330-1.05	0.0790-0.792	
DRB1*140:5		0.0411	0.321	0.134	
		0.420	0.422	0.452	
		0.148-0.969	0.0498-1.61	0.119-1.22	

表4 病型とHLA遺伝子型：健常人コントロールとの比較

HLA 遺伝子型	全体	少関節型	多関節進行型	ムチランス型
<b>DRB1*04:01, 04:05</b>				
P value	1.13e-06	0.0352	1.20e-06	1
OR	15.0	9.96	17.2	0
95% CI	4.10-82.5	0.823-88.0	4.51-96.8	0-311
<b>DRB1*04:05, 09:01</b>				
	7.51e-07	0.104	2.57e-06	0.00948
	2.95	1.98	3.09	8.63
	1.90-4.54	0.738-4.53	1.91-4.93	1.46-35.9
<b>DRB1*09:01, 09:01</b>				
	0.0437	0.104	0.0138	1
	1.96	1.98	2.34	0
	0.98-3.80	0.738-4.53	1.12-4.65	0-19.4
<b>DRB1*04:05, 14:01</b>				
	0.0548	1	0.0385	1
	2.48	0	2.84	0
	0.860-6.82	0-4.87	1.01-7.48	0-45.1
<b>DRB1*04:05, 04:05</b>				
	7.10e-05	0.0247	0.000159	1
	3.50	3.47	3.66	0
	1.83-6.70	1.00-9.67	1.80-7.31	0-25.2
<b>DRB1*04:05, 15:02</b>				
	0.0207	0.531	0.113	0.0478
	1.90	1.42	1.66	6.72
	1.06-3.32	0.362-4.03	0.843-3.10	0.695-33.0