

201007002A

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 XXXXXXXXXX

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 猪子 英俊

平成23(2011)年 5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 -----	5
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 -----	15
研究分担者 井ノ上逸朗	
研究協力者 中岡博史	
2. リウマチ感受性遺伝子解析に関する研究 -----	23
研究分担者 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 6座との包括的関連解析に関する研究 -----	25
研究分担者 光永滋樹	
研究協力者 鈴木康夫、桑名正隆、佐藤慎二、本間康彦、柏瀬貢一、成田 暁	
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. 日本人集団におけるHLAと生化学検査値の関連 -----	39
研究分担者 光永滋樹、井ノ上逸朗	
研究協力者 本間康彦、椎名 豊、柏瀬貢一、成田 暁	
協力者 奥平裕子	
研究代表者 猪子英俊	
5. A*24:02をコードするHLA-A遺伝子座の近傍に存在する大規模な欠失領域の同定 とムチランス型関節リウマチとの関連の検討 -----	47
研究分担者 光永滋樹、井ノ上逸朗、岡 晃	
研究協力者 鈴木康夫、佐藤慎二、本間康彦、崔 泰林、細道一善	
協力者 奥平裕子、國井七絵	
研究代表者 猪子英俊	
6. リシーケンシングによる関節リウマチ感受性遺伝子における rare variant の探索 -----	61
研究協力者 國井七絵	
研究分担者 光永 滋樹、井ノ上逸朗	
研究協力者 鈴木 康夫、佐藤 慎二	
研究代表者 猪子 英俊	
7. 等温増幅法による多型解析法の開発に関する研究 -----	69
研究分担者 光永滋樹、木下健司、太田正穂	
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 -----	77
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	83
-----------------------	----

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
研究分担者	井ノ上逸朗 田中 正史 岡 晃 光永 滋樹 木下 健司 太田 正穂	国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝研究部門 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学 信州大学医学部法医学
研究協力者	鈴木 康夫 佐藤 慎二 本間 康彦 椎名 豊 桑名 正隆 柏瀬 貢一 成田 暁 中岡 博文 崔 泰林 細道 一善	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学 東海大学医学部内科学系リウマチ内科学 東海大学医学部内科学系循環器内科学・検診センター 東海大学医学部内科学系循環器内科学・検診センター 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 東京都赤十字血液センター検査一部 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝研究部門 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝研究部門

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	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授
研究分担者	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
研究分担者	田中 正史	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授
研究分担者	岡 晃	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	講師
研究分担者	光永 滋樹	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授
研究分担者	木下 健司	武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学	教授
研究分担者	太田 正穂	信州大学医学部法医学	准教授

研究要旨

本研究プロジェクトでは、診療情報と遺伝子多型の情報を解析することにより関節リウマチの発症の初期に病型・病態進行を予測するアルゴリズムの開発と、アルゴリズムに必要な遺伝子多型のタイピングシステムの開発を目指している。そのために、関節リウマチ感受性遺伝子領域の SNP 解析、HLA タイピング、アルゴリズム開発のためのメタアナリシスと易罹患性モデルの構築、等温増幅法による遺伝子多型解析法の開発を行い、以下の結果を得た。

収集した症例のうち RA 症例 622 例、RA の家族歴がなく抗 CCP 抗体陰性、rheumatoid factor (RF) 陰性の対象群 966 例で、HLA の 6 座のタイピングを行った。RA 症例は自己抗体（抗 CCP 抗体、RF）の有無あるいは病型により層別化した。関連の評価は Fisher's exact tests, Trend tests およびハプロタイプの推定により行った。*A*26:01* 以外の HLA アリルは自己抗体陰性の RA とは関連を示さなかった。*DRB1* 以外の 5 種類の HLA 遺伝子座でも、自己抗体陽性の RA との有意な関連が検出された。これらの関連の多くは *DRB1* との連鎖不平衡により説明可能であった。しかし、*DPB1*02:01* と *DPB1*04:01* は *DRB1* とのハプロタイプでは説明できないので、*DRB1* とは独立して RA 感受性あるいは抵抗性を付与すると考えられた。日本人集団で最も RA 感受性である *DRB1*04:05* と *DQB1*04:01* を含むハプロタイプのオッズ比 (OR) は、そのハプロタイプ上にある HLA-B および HLA-C のアリルに依存し、0.99~5.20 と多様であった。さらに、白人集団で最も有意な RA との関連を示し、日本人集団でも RA 感受性である *DRB1*04:01* よりも、それと同じハプロタイプ上にある *C*07:04* と *B*15:18* の方が高い OR と低い *p* 値を示した。以上より、HLA と関節リウマチの関連を包括的に理解するためには、HLA-*DRB1* だけでなくそれ以外の HLA5 座およびそれらのハプロタイプを解析することが必要であると考えられた。

網羅的文献検索とメタアナリシスを行い、関節リウマチ感受性に関して十分なエビデンスを有する遺伝的多型として、HLA-*DRB1* の 6 アレルと 14 SNPs (single nucleotide polymorphisms) を選抜した。症例 1,300 検体、対照 1,500 検体について、メタアナリシスにより選抜した遺伝的多型をジェノタイピングした。その結果にもとづき選抜した遺伝的多型による易罹患性予測モデルの妥当性は受動者動作特性 (ROC) 曲線で分析した。HLA-*DRB1* の 6 アレルと 14 SNPs を用いた場合の AUC は 68% と中程度であった。抗 CCP 抗体およびリウマトイド因子陽性の患者での AUC は 71% に上昇した一方、陰性患者での AUC は 59% へと低下したことから、病態予測への有用性が示唆された。

96 ウェル・プラスチックプレートの 1 ウェルに 16 種類のプローブ（プライマー）を固定し、ウェル中で等温増幅反応を行い、プローブ（プライマー）からの特異的伸張反応と biotin-dUTP の取り込みにより、等温増幅法による HLA-*DRB1* の low-resolution タイピングの系を確立した。報告されている関節リウマチ感受性遺伝子から 8 種類の遺伝子を選び、それぞれの SNP についても特異的等温増幅を行うことにより SNP タイピングが可能であり、ま

たサイバークリーン滴下により肉眼的に判定可能であることも示した。これらの方法は HLA と SNP を同一のプラットフォーム上でタイピング可能であり、特殊な機器を必要としないので、比較的広範囲の医療施設で使われ得ると考えられた。

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た。

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:

東海大学医学部付属病院リウマチ内科および慶應義塾大学病院リウマチ内科に来院した関節リウマチ患者、東海大学医学部付属病院検診センター受診者 (対照群)、から文書によるインフォームドコンセントを取得した上で、診療情報と血液検体を入手した。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、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。関節リウマチ患者症例622例 (ムチランス型17例、多関節進行型270例、少関節型135例、不明200例)、検診センター受診者2,013例 (関節リウマチの家族歴なし1,809例、家族歴あり192例、関節リウマチ本人12例) を収集した。この他に、関節リウマチ患者症例938例、対照群937例を収集済みであり、その一部を解析に用いた。

PubMedおよびNHGRI GWAS catalogより網羅的文献検索とメタアナリシスを行うことで、関節リウマチ易罹患性予測モデルに採り込む遺伝的多型情報を収集する。症例1,300検体、対照1,500検体について、メタアナリシスにより選抜した遺伝的多型をジェノタイピングした。

予測モデルの妥当性は受動者動作特性曲線解析によるAUC値により評価した。

より正確な罹患性予測を実現するために必要な新規感受性遺伝子数を明らかにするため、シミュレーション実験を行った。AUC=0.80に到達するために必要な遺伝子数を求めた (抗CCP抗体を関節リウマチ診断マーカーとして用いた場合のAUCが0.8程度であることから、臨床的有用性が期待できるAUC値を0.8と設定した)。

新たな感受性遺伝子同定に向けて、ネットワーク解析によってリシーケンシング候補遺伝子を選定する。タンパク質間相互作用データベースHPRDに基づき分子ネットワークを構築し、構築したネットワーク上で既知の感受性遺伝子近傍に存在する遺伝子を候補として検索する手法を検討した。

② SNP、HLAの多型解析および関連分析: 本研究では患者1,288検体、健常者1,505検体を使用した。一方対象とする遺伝子座は文献的に抽出した37個のSNPを選択した。遺伝子型の決定はすべてTaqMan assay法により実施した

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した。統計解析はRソフトウェアを用いて、Fisher's Exact Testにより行った。

病型との関連解析は、Ochiの分類によりムチランス型、多関節進行型、少関節型に分けて行った。

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Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) を用い、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。

プラスチック基板上に固定したプローブでの塩基配列得的な増幅産物の捕捉と発色反応は以下のように行った。アミノ修飾オリゴDNA用

固定化基板キット（住友ベークライト）を用い、96 穴プレート 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。Low resolution でのタイピングの場合は、全 DRB1 アリルを増幅するプライマーを用いて LAMP 反応を行い、プローブの特異性で各 DRB1 アリルのタイピングを行った。

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：

PubMed および NHGRI GWAS catalog による網羅的文献検索およびメタアナリシスにより、*HLA-DRB1* の 6 アリルと 23 SNPs で関節リウマチ感受性との関連が認められた。

この中で、日本人一般集団においてアレル頻度が 5% を超えるもの（*HLA-DRB1* の 6 アリルおよび 15 SNPs）についてジェノタイピングを行った。

選択した遺伝子型多型の関節リウマチリとの関連を単変量および多変量ロジスティック回帰分析で評価した。

CCR6 ($P=4.1 \times 10^{-5}$; OR=1.25),

PADI4 ($P=1.5 \times 10^{-4}$; OR=1.23),

BLK ($P=3.2 \times 10^{-4}$; OR=1.24)

CD40 ($P=4.7 \times 10^{-4}$; OR=0.80)

の 4 SNPs では高度に有意な関連が認められた。

HLA-DRB1 だけを含むモデルと SNPs の情報を追加したモデルを比較したところ、*HLA-DRB1* だけを含むモデルの AUC = 65.9% に対し、*HLA-DRB1* と SNPs を含むモデルの AUC は 68.4% であり、AUC の有意な上昇が認められた ($P=2.8 \times 10^{-6}$)。

さらに、抗CCP抗体やリウマトイド因子の検査結果による関節リウマチ病型分類によって、遺伝的多型による予測モデルの識別能が異なるかどうかを検討した。リウマチ因子・抗CCP抗体陽性患者ではAUCは70.9%と増加したのに対し、陰性患者はAUCが58.8%と低値であった。

罹患性予測モデルの識別能 (AUC=71%) は sub-optimal な水準であったので、どの程度の遺伝的座位を同定すれば遺伝子スクリーニン

グとして有用な予測の正確度(AUC=0.80)に到達するかを検証した。

Common disease-common variant (CDCV) 仮説のもと、オッズ比が 1.2 でアレル頻度 0.3 を仮定したシミュレーション・シナリオでは、50 座位を同定することで、AUC=80%に到達する。オッズ比が 1.1 でアレル頻度 0.3 を仮定した場合、180 座位が必要となる。

CDCV 仮説に基づくゲノムワイド関連解析では捉えられない低頻度ながら効果の大きい変異が存在するという multiple rare variants (MRV) 仮説に基づき、オッズ比が 3.0 でアレル頻度 0.01 を仮定すると、20 座位が必要となる。オッズ比が 2.0 でアレル頻度 0.01 と仮定した場合は 50 座位を要するという結果が得られた。

効率よく候補遺伝子スクリーニングを行う方法として、タンパク質間相互作用ネットワーク上において、選定された既知の感受性遺伝子と近位に存在する遺伝子群をリシーケンシング候補遺伝子として検出する手法の検討を行った。

解析の結果、最高順位の遺伝子はマウスで関節リウマチ様の症状を示す家系から同定された原因遺伝子であった。また、上位にランクされた遺伝子群も興味深い機能を有しており、リシーケンシング候補遺伝子となりうるものであった。

② SNP、HLAの多型解析および関連分析：

実験を行った 37 個の SNP では増幅不良など実験的エラーの頻度は極めて少なく、エラーデータの頻度は平均 0.58% (最小:0.00%、最大 4.3%) であった。しかしながら、3 個の SNP は多型がないか、極めて低頻度のアリルで、メタアナリシスには耐えられないものであった。文献から抽出した SNP であり、恐らく人種差であると考えられる。また 4 個の SNP ではハーディー・ワインバーグ平衡から極端に偏りがあり、恐らく構造多型によるものか、プライマー・プローブそのものに問題があったのかもしれない。したがって、その他、30 個の SNP データが以降の解析へ供することとした。

これらの遺伝子型データを基に関連解析を行ったところ 5 個の遺伝子座において強い関連が示された。

これらの関連を示す P 値は以下の通りであった。

HLA-DRA (rs9268657) ; 5X10-15

CCR6 (rs3093023) ; 2X10-5

CD40 (rs4810485) ; 5X10-5

PADI4 (rs2240340) ; 1X10-4
BLK (rs2736340) ; 3X10-4

HLA との関連解析では、HLA 6 座の特定のアリルはその頻度が、関節リウマチ患者で増大あるいは減少していた。しかしこれを抗 CCP 抗体陽性群と陰性群に分けた場合、A*26:01 以外は、抗 CCP 抗体陽性の RA 群だけが HLA アリルとの有意な関連を示した。よって以下の HLA と RA との関連解析は、抗 CCP 抗体陽性の患者群 (RF 陰性は含む) だけを用いて行った。

Fisher's exact test の解析では RA 感受性の HLA-DRB1 アリルは、DRB1*04:05, *04:01, *10:01 であり、RA 抵抗性の DRB1 アリルは、DRB1*13:02, *14:05, *08:02 であった。

HLA-DRB1 以外の HLA アリルも RA との有意な関連を示したが、その大部分は RA 感受性あるいは抵抗性の DRB1 アリルとハプロタイプを形成していた。しかし、DPB1*02:01 と DPB1*04:01 はそれぞれ RA 感受性と RA 抵抗性を付与するが、DRB1 とのハプロタイプでは説明できないので、DRB1 とは独立に感受性あるいは抵抗性を付与していると考えられた。

Cochran-Armitage test for trend による検定では、RA 感受性および RA 抵抗性のすべての HLA-DRB1 アリルが、有意な p 値を示した。よって RA 感受性アリルのホモ接合体はヘテロ接合体よりもより高いリスクを与え、RA 抵抗性アリルの場合はより低いリスクを与えることが分かった。

Ochi の分類、すなわち関節破壊の程度とその進行速度により、患者群を以下の 3 群に分けた：ムチランス型 (MUD)、多関節進行型 (MES)、少関節型 (LES)。Fisher's exact test により HLA アリルと MUD/MES あるいは LES との関連を調べたところ、顕著な差は認められなかった。SE との関連でも同様な結果であった。しかし、HLA-DPB1*02:01 はより関節破壊の程度が高い MUD/MES に対してのみ有意な関連を示した：MUD/MES, $p = 9.04e-04$, OR = 1.46, 95% CI = 1.16 – 1.83; LES, $p = 0.132$, OR = 1.29, 95% CI = 0.912 – 1.81。

抗 CCP 抗体陽性はより関節破壊の程度が高い MUD/MES と有意な関連を示した。すなわち、MUD/MES と LES の 2 群で抗 CCP 抗体の有無により Fisher's exact test を行った結果は $p = 0.00675$, OR = 2.14, 95% CI = 1.22 – 3.74 であった。

③ 簡便・迅速・安価な多型検査システムの開発:

日本人集団で 0.1% 以上のアリル頻度を示す DRB1 アリルは 30 種類を 15 群に分け、これらをタイピングするための 14 種類のプローブをデザインした。これに陽性コントロールと陰性コントロールのプローブを加えた計 16 種類のプローブを 96 ウェル・プレートの 1 つのウェル底面に固定し、DRB1 の全アリルを増幅できるプライマーを用いて、ウェル中で等温増幅反応を行った。サンプルの DRB1 アリルに特異的なプローブからの伸長反応により取り込んだ biotin-dUTP を、avidin-ALP により発色させて陽性プローブを同定した。

これにより日本人集団で観察される 30 種類の DRB1 アリルの low resolution でのタイピングが可能であった。また、肉眼でも容易に判定が可能であり、実用化可能であると考えられた。

報告されている関節リウマチ感受性遺伝子から代表例として 8 種類を選定し、それらの SNP を特異的に等温増幅する系を構築した。この系は等温増幅後にサイバークリーン I を滴下することにより、肉眼的に容易に判別が可能であった。

D. 考察

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

罹患性予測モデルの識別能は AUC で 0.68 であり、他の多因子疾患と比べると高い数値であるものの、臨床応用を考える上では sub-optimal な水準であった。しかし、抗 CCP 抗体・リウマトイド因子陽性患者に対しては AUC が 0.71 と高値を示した一方、陰性患者では 0.59 と低い数値であったことから、病態予測への可能性が期待される。

シミュレーション実験から、実用的な水準 (AUC=0.8) で遺伝的予測を可能とするためには、従来の CDCV 仮説のみに依存するのではなく、MRV 仮説に基づく低頻度ながら効果の大きな変異を同定するアプローチの必要性が示唆された。

既知の感受性遺伝子情報と分子ネットワーク情報を統合し、リシーケンス候補遺伝子を絞り込むアルゴリズムを検討した結果、興味深い遺伝子群が選定された。次世代シーケンサーを用い、多数検体についてスクリーニングを行うことで、疾患リスクと関連する稀少変異の同定につながると期待される。

② SNP、HLA の多型解析および関連解析:

7 個の SNP において、有用な遺伝子型データを獲得することができなかったが、その

他 30 個の SNP についてはクオリティーの高いデータを得ることができた。さらに強い関連を示す、SNP も検出されたことから、病型・病態進行予測のアルゴリズム作製に重要なデータを提供できることになると考えられる。

HLA クラス I 領域とクラス II 領域の間に存在するクラス III 領域にはいくつかの RA 感受性遺伝子や SNP が報告されている：*NFKB1L1*, *TNF*, *TNXB*, *NOTCH4*, *NCR3-AIF1*. *HLA-B*15:18* と *C*07:04* は、同一のハプロタイプを組む *DRB1*04:01* よりも低い *p* 値と高い OR を示した。この結果は *DRB1*04:01* ではなく *C*07:04* または *B*15:18* が RA 発症に第一義的に関与していることを示唆する。しかし、上述のようにクラス III 領域にはいくつかの RA 感受性遺伝子、SNP が存在しているので、それらと *C*07:04-B*15:18* が連鎖不平衡にあり、それが *p* 値や OR に寄与している可能性も考えられる。さらに、日本人集団でもっとも強い RA 感受性を示す *DRB1*04:05* を含むハプロタイプのいくつかは RA 感受性ではなく中立であった。すなわち強い連鎖不平衡にある *DRB1*04:05* と *DQB1*04:01* を含むハプロタイプの OR は、ハプロタイプに含まれる *HLA-B* や *HLA-C* に依存して、0.99~5.20 と幅広い値を示した。これらの結果は、RA 発症において、クラス II 領域だけでなくクラス I およびクラス III 領域の重要性を示し、RA 発症における *HLA* の寄与の包括的理解には、ハプロタイプを考慮すべきことを示唆する。また、*HLA* クラス I が、*DRB1* と協同してあるいは協同なしに、RA の発症に関与している可能性も示唆される。

③ 簡便・迅速・安価な多型検査システムの開発:

等温増幅とプラスチック基板上でのプローブからの伸張反応を組み合わせ、多型を検出する本法は、*HLA* と SNP を同一のプラットフォーム上でタイピング可能であり、特殊な機器を必要としないので、比較的広範囲の医療施設で使われ得ると考えられる。

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) を基に構築する病型・病態進行を予測するツール (数理モデル)、および予測ツールを実用化していく上で必要な多型解析システムのプロトタイプが開発できた。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mitsunaga S, Okudaira Y, Kunii N, Cui T, Hosomichi K, Oka A, Suzuki Y, Homma Y, Sato S, Inoue I, Inoko H. Exact break point of a 50 kb deletion 8 kb centromeric of the HLA-A locus with HLA-A*24:02: the same deletion observed in other A*24 alleles and A*23:01 allele. *Immunogenetics*. 2011 Apr 26. [Epub ahead of print]
- 2) Mitsunaga S, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Shiina Y, Inoue I, Inoko H. Particular human leukocyte antigen alleles are associated with biochemical traits in the Japanese population. *Hum Immunol*. 2011 Apr 8. [Epub ahead of print]
- 3) Ando A, Shigenari A, Ota M, Sada M, Kawata H, Azuma F, Kojima-Shibata C, Nakajoh M, Suzuki K, Uenishi H, Kulski JK, Inoko H. SLA-DRB1 and -DQB1 genotyping by the PCR-SSOP-Luminex method. *Tissue Antigens*. 2011 Apr 21. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01669.x. [Epub ahead of print]
- 4) Shiina T, Kono A, Westphal N, Suzuki S, Hosomichi K, Kita YF, Roos C, Inoko H, Walter L. Comparative genome analysis of the major histocompatibility complex (MHC) class I B/C segments in primates elucidated by genomic sequencing in common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Immunogenetics*. 2011 Apr 20. [Epub ahead of print]
- 5) Ohtsuka M, Miura H, Nakaoka H, Kimura M, Sato M, Inoko H. Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into in vitro fertilized eggs. *Transgenic Res*. 2011 Mar 25. [Epub ahead of print]
- 6) Sato M, Kawagoe T, Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Ishihara M, Namba K, Kitaichi N, Morimoto S, Kaburaki T, Ando Y, Takenaka S, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. 6. Toll-like receptor 2 (TLR2) gene polymorphisms are not associated with sarcoidosis in the Japanese population. *Mol Vis*. 2011 Mar 15;17:731-6.
- 7) Ohta Y, Shiina T, Lohr RL, Hosomichi K, Pollin TI, Heist EJ, Suzuki S, Inoko H, Flajnik MF. Primordial linkage of $\beta 2$ -microglobulin to the MHC. *J*

- Immunol. 2011;186:3563-71.
- 8) Chiba T, Matsuzaka Y, Warita T, Sugoh T, Miyashita K, Tajima A, Nakamura M, Inoko H, Sato T, Kimura M. NFKBIL1 Confers Resistance to Experimental Autoimmune Arthritis Through the Regulation of Dendritic Cell Functions. *Scand J Immunol.* 2011;73:478-85.
 - 9) Murase M, Nishida T, Onizuka M, Inamoto Y, Sugimoto K, Imahashi N, Murata M, Miyamura K, Kodera Y, Inoko H, Naoe T. Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 haplotype correlates with relapse and survival after allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Dec 20. [Epub ahead of print]
 - 10) Sada T, Ota M, Katsuyama Y, Meguro A, Nomura E, Uemoto R, Nishide T, Okada E, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Association analysis of Toll-like receptor 7 gene polymorphisms and Behçet's disease in Japanese patients. *Hum Immunol.* 2011;72:269-72.
 - 11) Riveira-Munoz E, He SM, Escaramís G, Stuart PE, Hüffmeier U, Lee C, Kirby B, Oka A, Giardina E, Liao W, Bergboer J, Kainu K, de Cid R, Munkhbat B, Zeeuwen PL, Armour JA, Poon A, Mabuchi T, Ozawa A, Zawirska A, Burden AD, Barker JN, Capon F, Traupe H, Sun LD, Cui Y, Yin XY, Chen G, Lim HW, Nair RP, Voorhees JJ, Tejasvi T, Pujol R, Munkhtuvshin N, Fischer J, Kere J, Schalkwijk J, Bowcock A, Kwok PY, Novelli G, Inoko H, Ryan AW, Trembath RC, Reis A, Zhang XJ, Elder JT, Estivill X. Meta-Analysis Confirms the LCE3C_LCE3B Deletion as a Risk Factor for Psoriasis in Several Ethnic Groups and Finds Interaction with HLA-Cw6. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1105-9.
 - 12) Onizuka M, Kunii N, Toyosaki M, Machida S, Ohgiya D, Ogawa Y, Kawada H, Inoko H, Ando K. Cytochrome P450 genetic polymorphisms influence the serum concentration of calcineurin inhibitors in allogeneic hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Nov 22. [Epub ahead of print]
 - 13) Suzuki M, Meguro A, Ota M, Nomura E, Kato T, Nomura N, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Genotyping HLA-DRB1 and HLA-DQB1 alleles in Japanese patients with normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 2010 Sep 15;16:1874-9.
 - 14) Shiina T, Tanaka K, Katsuyama Y, Otabe K, Sakamoto K, Kurata M, Nomura M, Yamanaka H, Nakagawa H, Inoko H, Ota M. Mitochondrial DNA diversity among three subpopulations of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) originating from the Indochinese region. *Exp Anim.* 2010;59(5):567-78.
 - 15) Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H. Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism. *Mol Biosyst.* 2011;7:91-100.
 - 16) Ohtsuka M, Ogiwara S, Miura H, Mizutani A, Warita T, Sato M, Imai K, Hozumi K, Sato T, Tanaka M, Kimura M, Inoko H. Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e198.
 - 17) Kurata R, Nakaoka H, Tajima A, Hosomichi K, Shiina T, Meguro A, Mizuki N, Ohono S, Inoue I, Inoko H. TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's disease independently of HLA-B*51 and -A*26. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;401:533-7.
 - 18) Michikawa Y, Suga T, Ishikawa A, Hayashi H, Oka A, Inoko H, Iwakawa M, Imai T. Genome wide screen identifies microsatellite markers associated with acute adverse effects following radiotherapy in cancer patients. *BMC Med Genet.* 2010;11:123.
 - 19) Mizuki N, Meguro A, Ota M, Ohno S, Shiota T, Kawagoe T, Ito N, Kera J, Okada E, Yatsu K, Song YW, Lee EB, Kitaichi N, Namba K, Horie Y, Takeno M, Sugita S, Mochizuki M, Bahram S, Ishigatsubo Y, Inoko H. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010;42:703-6.
 - 20) Ikewaki N, Yamao H, Kulski JK, Inoko H. Flow cytometric identification of CD93 expression on naive T lymphocytes (CD4+)CD45RA (+) cells in human neonatal umbilical cord blood. *J Clin Immunol.* 2010;30:723-33.
 - 21) Nakaoka, H., Takahashi, T., Akiyama, K., Cui, T., Tajima, A., Kirschek, B.,

- Kasuya, H., Hata, A., and Inoue, I. (2010). Differential effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: site distribution. *Stroke* 8, 1593-1598.
- 22) Nakaoka, H., and Inoue, I. (2010). The Winner's Curse. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- 23) Kurata, R., Nakaoka, H., Tajima, A., Hosomichi, K., Shiina, T., Meguro, A., Mizuki, N., Ohono, S., Inoue, I., and Inoko, H. (2010). TRIM39 and RNF39 are associated with Behcet's disease independently of HLA-B *51 and -A *26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 533-537.
- 24) Cui, T.L., Nakaoka, H., Akiyama, K., Kamura, H., Hosomichi, K., Bae, J., Cheong, H., Shin, H., Yada, T., and Inoue, I. (2010). Positional effects of polymorphisms in probe-target sequences on genoplot images of oligonucleotide microarrays. *Genet. Mol. Res.* 1, 524-531.
- 25) Akiyama, K., Narita, A., Nakaoka, H., Cui, T., Takahashi, T., Yasuno, K., Tajima, A., Kirschke, B., Yamamoto, K., Kasuya, H. et al. (2010). Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J. Hum. Genet.* 10, 656-661.
- 26) 中岡博史、井ノ上逸朗：ゲノム情報を含む医学情報処理の将来。(2011) *医学の歩み*. 236, 667-674.
- 27) 中岡博史、井ノ上逸朗：ゲノムインフォマティクス--システム医学に向けて-- (2010) *日本臨床* 68 卷 増刊号 8, 93-99.
- 28) 光永滋樹、猪子英俊：Genome 情報と薬剤応答。(2011) *International Review of Thrombosis*. 6,
- チの病型と HLA との関連解析。第 19 回日本組織適合性学会大会（東京）2010.
- 3) 國井七絵、光永滋樹、細道一善、奥平裕子、鈴木康夫、本間康彦、井ノ上逸朗、猪子英俊：関節リウマチ感受性遺伝子における希少多型・変異の探索。BMB2010（神戸）2010.
- 4) Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue : The winner's curse in meta-analysis of genome-wide association studies., ASHG 60th Annual Meeting, Washington, D.C., Nov. 2010.
- 5) Hiromi Miura, Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue : Genotype-phenotype relationships of susceptibility loci from genome-wide association studies in intracranial aneurysm., ASHG 60th Annual Meeting, Washington, D.C., Nov. 2010.
- 6) Tailin Cui, Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Atsushi Tajima and Ituro Inoue : Screening for microdeletions on the Y chromosome using array CGH in 72 Japanese patients with non-obstructive azoospermia., ASHG 60th Annual Meeting, Washington, D.C., Nov. 2010.
- 7) Koichi Akiyama, Akira Narita, Hirofumi Nakaoka, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue : Genome-wide association study with gender adjustment to search for genetic variants responsible for intracranial aneurysms in Japanese population., ASHG 60th Annual Meeting, Washington, D.C., Nov. 2010.
- 8) 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 斎藤 卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊 : TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's Disease independently of HLA-B*51 and -A*26., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, Dec. 2010.
- 9) 中岡 博史, 崔 泰林, 田嶋 敦, 光永 滋樹, 井ノ上 逸朗 : A systematic approach to constructing genomic risk prediction model of common disease and assessing its clinical validity: A case study of rheumatoid arthritis., 第

2. 学会発表

- 1) 奥平裕子、光永滋樹、崔 泰林、河田寿子、細道一善、山口香織、岡 晃、井ノ上逸朗、猪子英俊：A*24:02 を有する HLA-A 遺伝子近傍の欠失領域の解析。第 19 回日本組織適合性学会大会（東京）2010.
- 2) 國井七絵、光永滋樹、奥平裕子、成田暁、鈴木康夫、本間康彦、桑名正隆、柏瀬貢一、井ノ上逸朗、猪子英俊：関節リウマ

33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, Dec. 2010.

- 10) 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 齋藤卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊 : ベーチェット病の新規感受性遺伝子 TRIM39, 日本人類遺伝学会第 55 回大会, Oct. 2010.
- 11) 崔 泰林, 中岡 博史, 秋山 康一, 田嶋敦, 井ノ上 逸朗 : アレイ CGH による非閉塞性無精子症 Y 染色体構造異常の網羅的な検出, 日本人類遺伝学会第 55 回大会, Oct. 2010.
- 12) 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 齋藤卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊 : HLA 領域に位置する新規ベーチェット病感受性遺伝子, 第 19 回日本組織適合性学会大会, Sep. 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

Ⅱ. 分担研究報告

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測アルゴリズムの開発

研究分担者

井ノ上 逸朗 国立遺伝学研究所 教授

中岡 博史 国立遺伝学研究所 研究員

研究要旨

本研究では、関節リウマチをモデル疾患として、DNA 多型情報と抗 CCP 抗体等の診療情報を利用した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。

網羅的文献検索とメタアナリシスを行い、関節リウマチ感受性に関して十分なエビデンスを有する遺伝的多型として、*HLA-DRB1* の 6 アレルと 14 SNPs (single nucleotide polymorphisms) を選抜した。選抜した遺伝的多型による易罹患性予測モデルの妥当性は受動者動作特性 (ROC) 曲線で分析した。*HLA-DRB1* の 6 アレルと 14 SNPs を用いた場合の AUC は 68% と中程度であった。抗 CCP 抗体およびリウマトイド因子陽性の患者での AUC は 71% に上昇した一方、陰性患者での AUC は 59% へと低下したことから、病態予測への有用性が示唆された。

Missing heritability という言葉で表されるように、未だ同定されていない関節リウマチ感受性遺伝子が多数存在するものと考えられる。既知の感受性遺伝子の情報とタンパク質間相互作用データベース情報を統合し、ネットワーク解析を行うことで、リシーケンシングのターゲット遺伝子を選定した。解析の結果、最上位の遺伝子はマウスで関節リウマチ様の症状を示す家系から同定された原因遺伝子であった。また、上位にランクされた遺伝子群も興味深い機能を有しており、リシーケンシング候補遺伝子として興味深いものである。新たな感受性遺伝子同定による病態解明が期待できる成果が得られた。

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 DNA 多型情報と抗 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。

近年、大規模な GWAS が行われ、感受性遺伝子同定の報告が飛躍的に増加している。これら新たな知見を取り込み、多数の感受性遺伝子座を同時に考慮する genomic profile を用いることで、疾患の易罹患性予測モデルを構築できる可能性がある。

そこで、本研究では、網羅的文献検索とメタアナリシスにより関節リウマチ感受性との関連について十分なエビデンスが認められる遺伝的多型を選抜し、易罹患性予測モデルを構築し、その妥当性を関節リウマチ症例 1,300 検体、

対照 1,500 検体を用いて検証する。

また、新たな感受性遺伝子同定に向けて、メタアナリシスで選択された既知の感受性遺伝子の知見に基づき、リシーケンシングの候補遺伝子を絞り込むためのネットワーク解析を行う。

B. 研究方法

PubMed および NHGRI GWAS catalog より網羅的文献検索とメタアナリシスを行うことで、関節リウマチ易罹患性予測モデルに採り込む遺伝的多型情報を収集する。

症例 1,300 検体、対照 1,500 検体について、メタアナリシスにより選抜した遺伝的多型をジェノタイピングした。

予測モデルの妥当性は受動者動作特性曲線解析による AUC 値により評価した。

より正確な罹患性予測を実現するために必要な新規感受性遺伝子数を明らかにするため、シミュレーション実験を行った。AUC=0.80 に到達するために必要な遺伝子数を求めた(抗 CCP 抗体を関節リウマチ診断マーカーとして

用いた場合のAUCが0.8程度であることから、臨床的有用性が期待できるAUC値を0.8と設定した。

新たな感受性遺伝子同定に向けて、ネットワーク解析によってリシーケンシング候補遺伝子を選定する。タンパク質間相互作用データベース HPRD に基づき分子ネットワークを構築し、構築したネットワーク上で既知の感受性遺伝子近傍に存在する遺伝子を候補として検索する手法を検討した。

C. 研究結果

PubMed および NHGRI GWAS catalog による網羅的文献検索およびメタアナリシスにより、以下の遺伝的多型について関節リウマチ感受性との関連が認められた。

HLA-DRB1 の 6 アレル [DRB1*01:01, DRB1*09:01, DRB1*10:01, DRB1*04:04, DRB1*04:01, DRB1*04:05]、23 SNPs [rs7574865 (*STAT4*); rs3087243 (*CTLA4*); rs7528684 (*FCRL3*); rs3761847 (*TRAF1*); rs2812378 (*CCL21*); rs4810485 (*CD40*); rs42041 (*CDK6*); rs2240340 (*PADI4*); rs2476601 (*PTPN22*); rs2073838 (*SLC22A4*); rs2004640 (*IRF5*); rs6920220 (*TNFAIP3*); rs10499194 (*TNFAIP3*); rs3093024 (*CCR6*); rs874040 (*RBPJ*); rs11676922 (*AFF3*); rs13017599 (*REL*); rs6859219 (*ANKRD55*); rs934734 (*SPRED2*); rs2736340 (*BLK*); rs26232 (*C5orf30*); rs13315591 (*PXK*); rs706778 (*IL2RA*)] および微小欠失 [rs333 (*CCR5*)]。

上記の遺伝的多型のうち、日本人一般集団においてアレル頻度が5%を超えるもの (*HLA-DRB1* の 6 アレルおよび 15 SNPs) についてジェノタイプピングを行った。rs2004640 (*IRF5*) はハーディー・ワインバーグ平衡からの有意な逸脱が認められたため解析から除外した。

選択した遺伝子型多型の関節リウマチリとの関連を単変量および多変量ロジスティック回帰分析で評価した結果を Table 1 に示す。

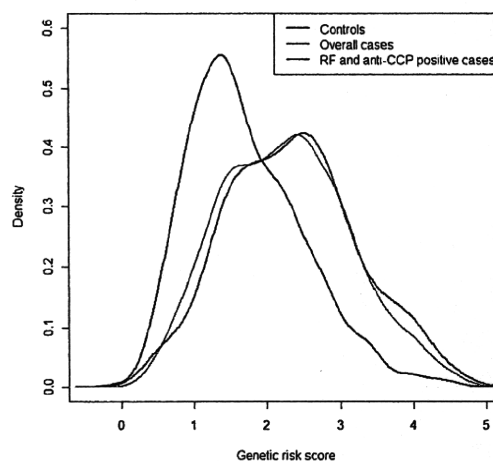
CCR6 ($P=4.1 \times 10^{-5}$; OR=1.25), *PADI4* ($P=1.5 \times 10^{-4}$; OR=1.23), *BLK* ($P=3.2 \times 10^{-4}$; OR=1.24) と *CD40* ($P=4.7 \times 10^{-4}$; OR=0.80) の 4 SNPs では高度に有意な関連が認められた。また、*C5orf30*, *SLC22A4*, *AFF3*, *FCRL3* では $P < 0.05$ 水準で有意差が確認でき、*SPRED2* と *STAT4* は関節リウマチのリスクとの関連傾向が見られた ($P < 0.1$)。関連が認められなかった 5 SNPs のうち、4 SNPs ではメタアナリ

シスと効果の方向が同じであった。

予測モデルの妥当性評価の結果を Table 2 に示す。*HLA-DRB1* だけを含むモデルと SNPs の情報を追加したモデルを比較したところ、*HLA-DRB1* だけを含むモデルの AUC = 65.9% に対し、*HLA-DRB1* と SNPs を含むモデルの AUC は 68.4% であり、AUC の有意な上昇が認められた ($P=2.8 \times 10^{-6}$)。

さらに、抗 CCP 抗体やリウマトイド因子の検査結果による関節リウマチ病型分類によって、遺伝的多型による予測モデルの識別能が異なるかどうかを検討した。リウマチ因子・抗 CCP 抗体陽性患者では AUC は 70.9% と増加したのに対し、陰性患者は AUC が 58.8% と低値であった。

Figure 1. Distribution of risk scores by phenotypic status for the integrative model, where six *HLA-DRB1* alleles and 14 SNPs were included. The curves were generated with a Gaussian kernel density smoother.



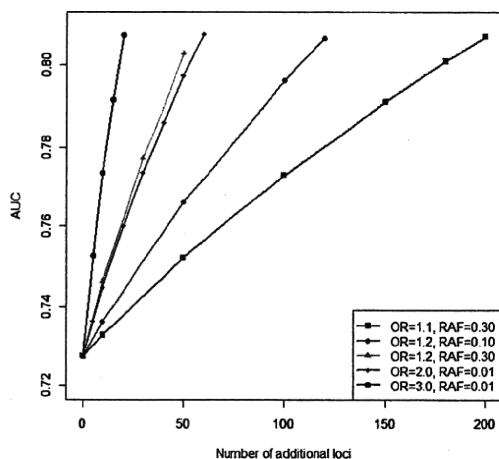
罹患性予測モデルの識別能 (AUC=71%) は sub-optimal な水準であった。これは、関節リウマチの遺伝的寄与の大部分が未だ同定されていないためであると考えられる。そこで、シミュレーション実験を用いて、どの程度の遺伝的座位を同定すれば遺伝子スクリーニングとして有用な予測の正確度 (AUC=0.80) に到達するかを検証した (Figure 2)。

Common disease-common variant (CDCV) 仮説のもと、オッズ比が 1.2 でアレル頻度 0.3 を仮定したシミュレーション・シナリオでは、50 座位を同定することで、AUC=80% に到達する。最新の関節リウマチのゲノムワイド関連解析で同定された SNPs のオッズ比が 1.2 を下回っていることから、より現実的なシナリオと

して、オッズ比が 1.1 でアレル頻度 0.3 を仮定した場合、180 座位が必要となる。

CDCV 仮説に基づくゲノムワイド関連解析では捉えられない低頻度ながら効果の大きい変異が存在するという multiple rare variants (MRV) 仮説に基づき、オッズ比が 3.0 でアレル頻度 0.01 を仮定すると、20 座位が必要となる。オッズ比が 2.0 でアレル頻度 0.01 と仮定した場合は 50 座位を要するという結果が得られた。

Figure 2. Simulation study addressing how many additional loci should be mapped for the establishment of excellent genetic risk prediction.



より高い正確度で遺伝的予測を行うためには、新たな感受性遺伝子同定が必要である。これまでにゲノム研究で得られた知見を最大限に利用し、効率よく候補遺伝子スクリーニングを行う方法が求められる。

そこで、タンパク質間相互作用ネットワーク上において、選定された既知の感受性遺伝子と近位に存在する遺伝子群をリシーケンシング候補遺伝子として検出する手法の検討を行った。

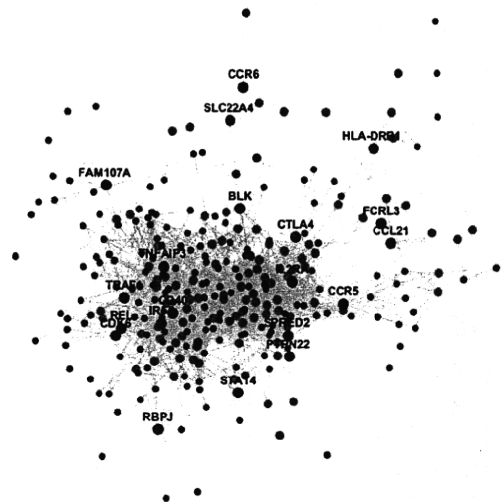


Figure 3. Result of network analysis. The known genes that are associated with rheumatoid arthritis are shown in black vertex. The genes that are ranked in the top 100 are highlighted in red. The genes ranked in the top 300 are colored in blue.

Figure 3 に示すように、関節リウマチ感受性遺伝子は高度に結合したネットワークを構成することがわかる。

解析の結果、最高順位の遺伝子はマウスで関節リウマチ様の症状を示す家系から同定された原因遺伝子であった。また、上位にランクされた遺伝子群も興味深い機能を有しており、リシーケンシング候補遺伝子となりうるものであった。

D. 考察

網羅的文献検索とメタアナリシスより選抜した遺伝的多型の多くで関連が追認できたことから、関節リウマチの遺伝的背景は人種を越えてオーバーラップしているものと考えられる。

罹患性予測モデルの識別能は AUC で 0.68 であり、他の多因子疾患と比べると高い数値であるものの、臨床応用を考える上では sub-optimal な水準であった。しかし、抗 CCP 抗体・リウマトイド因子陽性患者に対しては AUC が 0.71 と高値を示した一方、陰性患者では 0.59 と低い数値であったことから、病態予測への可能性が期待される。

抗 CCP 抗体の関節リウマチ診断検査 (AUC = 0.8) と同程度の水準で遺伝的予測を可能とするために必要な新規感受性遺伝子数をシミュレーション実験で示した。従来の CDCV 仮説のみに依存するのではなく、MRV 仮説に基づく低頻度ながら効果の大きな変異を同定するアプローチの必要性を示唆する結果であっ

た。

既知の感受性遺伝子情報と分子ネットワーク情報を統合し、リシーケンス候補遺伝子を絞り込むアルゴリズムを検討した結果、興味深い遺伝子群が選定された。次世代シーケンサーを用い、多数検体についてスクリーニングを行うことで、疾患リスクと関連する稀少変異の同定につながると期待される。

E. 結論

関節リウマチ感受性遺伝子を用いた易罹患性予測モデルは抗 CCP 抗体・リウマトイド因子陽性の患者に対して高い精度を示した。遺伝子型情報だけではなく、性別や喫煙習慣といった臨床情報をモデルに採り込むことも重要になるだろう。特に喫煙習慣は血清学的検査陽性の患者に強く関連することが知られており、遺伝子型情報と組み合わせることで、高精度の罹患性予測が可能となるだろう。

一方、新規感受性遺伝子同定に向けたアプローチも継続する必要がある。次世代シーケンサーの登場により多因子疾患の感受性稀少変異同定が期待される。そのためには、疾患感受性稀少変異が集積している可能性の高い遺伝子群を効率よく選定するアルゴリズム開発が重要となるだろう。本研究で行ったネットワーク解析で上位にランクされた遺伝子をリシーケニングし、疾患感受性稀少変異を同定することで、遺伝的寄与の大部分が未だ同定されていない関節リウマチにおいて、感受性遺伝子についての新たな知見が得られると期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Ohtsuka, M., Miura, H., Nakaoka, H., Kimura, M., Sato, M., and Inoko, H. (2011). Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into in vitro fertilized eggs. *Transgenic Res. in press*
- ② Nakaoka, H., Takahashi, T., Akiyama, K., Cui, T., Tajima, A., Krischek, B., Kasuya, H., Hata, A., and Inoue, I. (2010). Differential effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: site distribution. *Stroke* 8, 1593-1598.
- ③ Nakaoka, H., and Inoue, I. (2010). The

Winner's Curse. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.

- ④ Kurata, R., Nakaoka, H., Tajima, A., Hosomichi, K., Shiina, T., Meguro, A., Mizuki, N., Ohono, S., Inoue, I., and Inoko, H. (2010). TRIM39 and RNF39 are associated with Behcet's disease independently of HLA-B *51 and -A *26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 533-537.
- ⑤ Cui, T.L., Nakaoka, H., Akiyama, K., Kamura, H., Hosomichi, K., Bae, J., Cheong, H., Shin, H., Yada, T., and Inoue, I. (2010). Positional effects of polymorphisms in probe-target sequences on genoplot images of oligonucleotide microarrays. *Genet. Mol. Res.* 1, 524-531.
- ⑥ Akiyama, K., Narita, A., Nakaoka, H., Cui, T., Takahashi, T., Yasuno, K., Tajima, A., Krischek, B., Yamamoto, K., Kasuya, H. et al. (2010). Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J. Hum. Genet.* 10, 656-661.
- ⑦ 中岡博史、井ノ上逸朗：ゲノム情報を含む医学情報処理の将来。(2011) *医学の歩み*. 236, 667-674.
- ⑧ 中岡博史、井ノ上逸朗：ゲノムインフォマティクス--システム医学に向けて-- (2010) *日本臨床* 68 巻 増刊号 8, 93-99.

2. 学会発表

- ① Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue : The winner's curse in meta-analysis of genome-wide association studies., *ASHG 60th Annual Meeting*, Washington, D.C., Nov. 2010.
- ② Hiromi Miura, Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue : Genotype-phenotype relationships of susceptibility loci from genome-wide association studies in intracranial aneurysm., *ASHG 60th Annual Meeting*, Washington, D.C., Nov. 2010.
- ③ Tailin Cui, Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Atsushi Tajima and Ituro Inoue : Screening for microdeletions on the Y chromosome using array CGH in 72 Japanese patients with

non-obstructive azoospermia., *ASHG 60th Annual Meeting*, Washington, D.C., Nov. 2010.

なし

- ④ Koichi Akiyama, Akira Narita, Hirofumi Nakaoka, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue : Genome-wide association study with gender adjustment to search for genetic variants responsible for intracranial aneurysms in Japanese population., *ASHG 60th Annual Meeting*, Washington, D.C., Nov. 2010.
- ⑤ 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 斎藤 卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊 : TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's Disease independently of HLA-B*51 and -A*26., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, Dec. 2010.
- ⑥ 中岡 博史, 崔 泰林, 田嶋 敦, 光永 滋樹, 井ノ上 逸朗 : A systematic approach to constructing genomic risk prediction model of common disease and assessing its clinical validity: A case study of rheumatoid arthritis., 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, Dec. 2010.
- ⑦ 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 斎藤 卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊 : ベーチェット病の新規感受性遺伝子 TRIM39, 日本人類遺伝学会第 55 回大会, Oct. 2010.
- ⑧ 崔 泰林, 中岡 博史, 秋山 康一, 田嶋 敦, 井ノ上 逸朗 : アレイ CGH による非閉塞性無精子症 Y 染色体構造異常の網羅的な検出, 日本人類遺伝学会第 55 回大会, Oct. 2010.
- ⑨ 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 斎藤 卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊 : HLA 領域に位置する新規ベーチェット病感受性遺伝子, 第 19 回日本組織適合性学会大会, Sep. 2010.

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

Table 1. Association analysis of rheumatoid arthritis with selected genetic markers.

Gene	Locus	SNP	Cases				Controls				Univariate*		Multivariate*		Previous report†
			A1/A2		Cases		1/1		2/2		OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	P	
			1/1	2/2	1/1	2/2	1/1	2/2							
HLA-DRB1	6p21.3	*01:01	+/-	7	160	1,119	1	157	1,331	1.29 (1.03-1.61)	0.025	1.93 (1.51-2.47)	1.7×10 ⁻⁷	1.60 (1.39-1.84)	
		*09:01	+/-	55	330	901	24	387	1,078	1.20 (1.04-1.39)	0.012	1.73 (1.47-2.03)	2.7×10 ⁻¹¹	1.67 (1.44-1.94)	
		*10:01	+/-	0	27	1,259	0	11	1,478	2.88 (1.42-5.83)	3.3×10 ⁻³	3.60 (1.72-7.55)	7.0×10 ⁻⁴	2.35 (1.90-2.91)	
		*04:01	+/-	1	53	1,232	0	34	1,455	1.89 (1.23-2.90)	3.9×10 ⁻³	2.74 (1.72-7.55)	2.4×10 ⁻⁵	3.30 (3.01-3.61)	
		*04:04	+/-	0	9	1,277	0	7	1,482	1.49 (0.55-4.02)	0.43	2.92 (0.98-8.68)	0.054	1.85 (1.54-2.22)	
		*04:05	+/-	76	540	670	34	349	1,106	2.31 (2.01-2.66)	1.3×10 ⁻³¹	2.80 (2.40-3.27)	2.7×10 ⁻³⁸	3.84 (3.30-4.46)	
SNPs with strong evidences of association ($P < 2.5 \times 10^{-3}$)															
CCR6	6q27	rs3093024	A/G	342	638	301	313	747	430	1.25 (1.12-1.39)	4.1×10 ⁻⁵	1.28 (1.14-1.43)	3.3×10 ⁻⁵	1.19 (1.15-1.24)	
PADI4	1p36.13	rs2240340	T/C	250	645	389	235	712	547	1.23 (1.11-1.37)	1.5×10 ⁻⁴	1.25 (1.11-1.41)	1.9×10 ⁻⁴	1.31 (1.22-1.41)	
BLK	8p23.1	rs2736340	C/T	93	534	639	165	648	672	1.24 (1.10-1.39)	3.2×10 ⁻⁴	1.24 (1.09-1.40)	9.7×10 ⁻⁴	1.19 (1.13-1.27)	
CD40	20q13.12	rs4810485	T/G	157	550	569	246	675	569	0.80 (0.72-0.89)	4.7×10 ⁻⁴	0.81 (0.72-0.91)	4.7×10 ⁻⁴	0.87 (0.83-0.90)	
SNPs with nominally significant association signals ($P < 0.05$)															
C5orf30	5q21.1	rs26232	T/C	78	503	699	116	621	757	0.86 (0.77-0.98)	0.018	0.86 (0.75-0.98)	0.021	0.90 (0.87-0.94)	
SLC22A4	5q31.1	rs2073838	A/G	169	553	559	151	647	692	1.14 (1.02-1.27)	0.022	1.17 (1.04-1.32)	9.9×10 ⁻³	1.11 (1.05-1.18)	
AFF3	2q11.2	rs11676922	T/A	357	627	293	371	742	378	1.11 (1.00-1.24)	0.043	1.11 (0.99-1.24)	0.081	1.14 (1.10-1.18)	
FCRL3	1q23.1	rs7528684	G/A	236	619	429	253	682	557	1.11 (1.00-1.23)	0.047	1.08 (0.97-1.22)	0.17	1.16 (1.09-1.24)	
SNPs showing the same direction of effect															
SPRED2	2p14	rs934734	G/A	45	392	843	30	446	1,017	1.14 (0.99-1.31)	0.064	1.17 (1.01-1.36)	0.041	1.13 (1.09-1.17)	
STAT4	2q32.3	rs7574865	T/G	176	567	537	169	669	655	1.10 (0.98-1.23)	0.093	1.10 (0.97-1.24)	0.13	1.23 (1.19-1.27)	
CTLA4	2q33.2	rs3087243	A/G	89	457	734	96	592	798	0.92 (0.82-1.04)	0.18	0.96 (0.84-1.10)	0.56	0.89 (0.85-0.95)	

TRAF1	9q33.2	rs3761847	A/G	290	659	334	310	780	398	1.05 (0.95-1.17)	0.35	1.03 (0.92-1.16)	0.57	1.13 (1.09-1.17)
IL2RA	10p15.1	rs706778	T/C	414	621	246	458	738	299	1.05 (0.95-1.17)	0.36	1.05 (0.93-1.17)	0.43	1.12 (1.09-1.16)
TNFAIP3	6q23.3	rs10499194	T/C	8	171	1,103	6	174	1,315	1.18 (0.96-1.46)	0.11	1.17 (0.94-1.47)	0.16	0.82 (0.77-0.87)

SNPs showing the opposite direction of effect or

* Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were estimated by logistic regression analyses using univariate analysis for each allele and multivariate logistic regression analyses for each allele and then using multivariate analysis including all the alleles. † ORs and 95% CIs were calculated by meta-analyses of published studies.