

Table 2. The discriminative ability and the global model fit of three predictive models according to subphenotype of case patients.

Case phenotype	Model	AUC (95% CI)	AIC*	-2logL†
Overall	HLA	65.9 (63.9-67.9)	3474.44	3460.44
	SNP	58.8 (56.6-60.9)	3633.43	3603.43
	Integrative	68.4 (66.4-70.4)	3424.39	3382.39
RF & anti-CCP positive	HLA	68.3 (65.2-71.4)	1603.76	1589.76
	SNP	60.0 (56.7-63.3)	1703.06	1673.06
	Integrative	70.9 (67.8-73.9)	1591.90	1549.89

* Akaike's information criterion. † $2 \times$ maximum log likelihood.

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～

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 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 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授

研究要旨

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製するための基盤情報を提供する目的で以下の研究を実施した。病型・病態進行予測のアルゴリズムの精度をあげるためには、すでに報告されている、多人種の遺伝子型データが公開されている複数の関連を示す遺伝子座を対象に、メタアナリシスを行う必要がある。そこでこの解析に必要なデータを得るため、臨床情報の付加された検体を始め、すでに収集されている臨床情報の付加されていない検体も合わせて SNP の遺伝子型を決定し、重要なデータを得ることに成功した

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製することである。このアルゴリズムの精度をあげるために、すでに報告されている複数の関連を示す遺伝子座を対象に、メタアナリシスを行う必要がある。そこで本年度はこの解析に必要なデータを得るため、臨床情報の付加された検体を始め、検出力を上げるため、すでに収集されている臨床情報の付加されていない検体も合わせてSNPの遺伝子型を決定する。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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) ; 5×10^{-15}

CCR6 (rs3093023) ; 2×10^{-5}

CD40 (rs4810485) ; 5×10^{-5}

PADI4 (rs2240340) ; 1×10^{-4}

BLK (rs2736340) ; 3×10^{-4}

D. 考察

残念ながら 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。

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。本年度はその病態予測アルゴリズムの作製への重要な基盤情報を獲得したと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Meguro A, Inoko H, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Okada E, Yamakawa R, Yuasa T, Fujioka T, Ohno S, Bahram S, Mizuki N. Genetics of Behcet's disease inside and outside the MHC. *Ann Rheum Dis*. 2010 Apr;69(4):747-54.
2. 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.
3. M A Abdulla, I Ahmed, Assawamakin, J Bhak, S K. Brahmachari, G C. Calacal, A Chaurasia, C H Chen, J Chen, Y T Chen, J Chu, E M C. C L Paz, M C A. D Ungria, F C. Delfin, J Edo, S Fuchareon, H Ghang, T Gojobori, J Han, S F Ho, B Peng H, W Huang, H Inoko, P Jha, T A. Jinam, L Jin, J Jung, D Kangwanpong, J Kampuansai, G C. Kennedy, P Khurana, H L Kim, K Kim, S Kim, W Y Kim, K Kimm, R Kimura, T Koike, S Kulawonganunchai, V Kumar, P S Lai, J Y Lee, S Lee, E T. Liu, P P. Majumder, K K Mandapati, S Marzuki, W Mitchell, M Mukerji, K Naritomi, C Ngamphiw, N Niikawa, N Nishida, B Oh, S Oh, J Ohashi, A Oka, R Ong, C D. Padilla, P Palittapongarnpim, H B. Perdigon, M E Phipps, E Png, Y Sakaki, J M. Salvador, Y Sandraling, V Scaria, M Seielstad, M R Sidek, A Sinha, M Srikummool, H Sudoyo, S Sugano, H Suryadi, Y Suzuki, K A. Tabbada, A Tan, K Tokunaga, S Tongsimma, L P. Villamor, E Wang, Y Wang, H Wang, J Y Wu, H Xiao, S Xu, J Yang, Y Y Shugart, H S Yoo, W Yuan, G Zhao, B A Zilfalil, Indian Genome Variation Consortium Mapping Human Genetic Diversity in Asia *Science*. 2009 Dec 11;326(5959):1541-5.
4. 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 May;31(5):834-41.
5. 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 Aug 11;11:123.
6. Riveira-Munoz E, He SM, Escaramis 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* 2010 Nov 25. Online publication

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 6 座との包括的関連解析

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
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	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	
研究協力者	鈴木 康夫	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学	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	佐藤 慎二	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学	准教授
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	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	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一部検査二課	課長
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

研究要旨

目的：関節リウマチ (RA) 発症に関与する遺伝要因の 1/3 程度は *HLA* により説明できるとされているが、*HLA-DRB1* 以外の *HLA* との関連を調べた報告は少ない。そこで、本研究では RA と *HLA* との包括的関連解析を行った。

方法：収集した 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。

結果：*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。

結論：*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 *HLA* 5 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。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は多因子性の全身疾患であり、症例によっては関節破壊の進行が身体的障害をもたらす。RA の危険因子の約 60% が遺伝要因であり、一卵性双生児の一致率は約 12~15%、二卵性双生児では 3~4%、非双生児

の同胞では 2~4% である(1)。同胞の発症率と一般の発症率の比 λ_s は 5~10 である (2)。RA の遺伝要因の 1/3 は主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex, MHC, ヒトでは human leukocyte antigens: HLA) 領

域に存在し(3)、その中でも *HLA-DRB1* が最も感受性の遺伝子である。白人集団の主要なリスクアリルは *HLA-DRB1*04:01* であり、日本人集団で *DRB1*04:05* である。*DRB1* 遺伝子がコードしている HLA-DR 抗原 B 鎖の 70~74 番目のアミノ酸配列により定義される shared epitope (SE) は RA 感受性 (4,5) および関節破壊の重症度と関連している (6)。

MHC は古典的および非古典的 MHC に分けられる。ヒトの古典的 MHC には 3 種類のクラス I 抗原 (HLA-A, -B, -C) および 3 種類のクラス II 抗原 (HLA-DR, -DQ, DP) が存在する。クラス I 抗原は重鎖と β 2-ミクログロブリンから成り、高度に多型を示す領域は *HLA-A, -B, -C* 遺伝子座にコードされている重鎖に存在する。クラス II 抗原は α 鎖と β 鎖から成り、高度に多型を示す領域は *HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1* 遺伝子座にコードされる β 鎖に存在する。これらの遺伝子群を含む MHC 領域はヒトの場合、6 番染色体短腕上に存在し、テロメア側からクラス I 領域、クラス III 領域、クラス II 領域の順に並んでいる。6 種類の古典的 HLA はテロメア側から *HLA-A, -C, -B, -DRB1, -DQB1, -DPB1* の順番である。クラス III 領域には *TNF- α* や *NOTCH4* 等の HLA 以外の RA 感受性遺伝子が複数存在している。RA の遺伝要因の大きな部分は HLA であり、*DRB1* 以外の HLA も高度な多型を示すが、これまでの報告の多くは *DRB1* および SE と RA との関連である。

リウマチ因子 (RF) や抗 cyclic citrullinated peptides (CCP) 抗体のような自己抗体が RA 診断のバイオマーカーとして使われている。特に抗 CCP 抗体は高い特異性と感受性を示すことが報告されている(7)。HLA はこのような自己抗体の産生にも関与している(8)。よって、本研究では、HLA 6 座のタイピングを行い、そのハプロタイプを推定し、それらの結果にもとづき HLA との包括的関連解析を行った。

B. 方法

症例：東海大学病院 (427 例) および慶應義塾大学病院 (195 例) の関節リウマチ患者合計 622 例を本研究の解析に用いた。対象群として東海大学病院の検診センター受診者で RA の家族歴のない 1,037 例を用いた。すべての症例で文書によるインフォームドコンセントを得た。家族歴の有無および本人が RA でない確認はインフォームドコンセント取得時に行った。

対象群 1,037 例で RF 陽性は 61 例 (5.9%)、抗 CCP 抗体陽性は 13 例 (1.3%) であった。

RF 陰性で抗 CCP 抗体陰性の 966 例を以下の解析には用いた。

東海大学病院の症例は関節破壊の程度およびその進行速度により 3 種類の病型に分けた (9)：ムチランス型 (MUD)、多関節進行型 (MES)、少関節型 (LES)。

本研究に用いた症例の詳細は Table 1 に示した。

HLA タイピング：末梢血から抽出キット GENOMIX (SRL) により染色体 DNA を抽出・精製した。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。対象群の HLA のアリル頻度は日本赤十字社の骨髄データセンターで報告されている頻度とよく一致していた (<http://www.bmdc.jrc.or.jp/stat.html>)。自己抗体の検出：抗 CCP は MESACUP-2 テスト CCP (MBL、名古屋)、およびカットオフ値 4.5 U/mL で測定した。RF は N-Assay TIA RF (ニッポーボーメディカル、東京) を用い、カットオフ値 20 U/mL を用いて判定した。統計学的解析：RA 患者および対象群を、特定の HLA アリル、または特定の HLA ハプロタイプ、または特定の遺伝子型をもつ群ともたない群に分け、Fisher's exact test により有意差を検定した。Bonferroni の補正は本研究で観察された HLA アリルの数を p 値に掛けることにより算出した：*HLA-A* は 23、*-B* は 33、*-C* は 21、*-DRB1* は 33、*-DQB1* は 14、*-DPB1* は 19 である。Cochran-Armitage test for trend は R ソフトウェアを用いて行った。HLA ハプロタイプは PHASE version 2.1 (10) により推定した。

C. 結果

自己抗体の有無で層別化した関節リウマチと HLA アリルとの関連：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 (Table 2)。これは白人集団で、抗 CCP 抗体陽性の RA 患者群だけが SE との関連を示すとの報告(11)と一致していた。*HLA-A*26:01* は抗 CCP 抗体陰性の患者群で、その頻度が有意に低下していた。しかし、抗 CCP 抗体陽性群では有意な関連は認められなかった。抗 CCP 抗体陰性の RA は *HLA-DR3* と有意に関連しているとの報告があるが(12)、日本人集団を対象とした本研究ではそのよう

な関連は検出されなかった。これは日本人集団における *HLA-DR3 (DRB1*03:01)* の頻度が低いことによる可能性もある：日本赤十字社の骨髄データセンターによると 0.13% であり、本研究でも検出されたのは RA 患者群で 1 例のみであった。また、日本人集団では *DRB1*09:01* が抗 CCP 抗体陰性の RA と関連しているとの報告があるが(13)、そのような関連も検出されなかった。

RF 陰性の患者群でも *A*26:01* を含め、*HLA* との有意な関連は認められなかった。さらに、自己抗体 (抗 CCP 抗体あるいは RF) 陰性の患者群では SE との関連も認められなかった。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。

HLA と抗 CCP 抗体陽性の RA との関連：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 (Table 2)。これらの *HLA-DRB1* アリルはこれまでに日本人集団で報告されているものとよく一致していた。韓国人集団では *DRB1*09:01* が抗 CCP 抗体陽性の RA と強い関連がある ($p = 3.76e-09$) との報告があるが、そのような関連は検出できなかった：RA でのアリル頻度は 17.0%、対象群では 15.4%、 $p = 0.260$, OR = 1.13, 95%CI=0.92 - 1.39。

PHASE を用いて推定した *HLA* の 6 座ハプロタイプ (*HLA-A*, *-C*, *-B*, *-DRB1*, *-DQB1*, *DPB1*) および 4 座ハプロタイプ (*HLA-C*, *-B*, *-DRB1*, *-DQB1*) をそれぞれ Table 3 と Table 4 に示した。ハプロタイプで、その頻度が 0.5% 以上のもので、RA 特異的なものはなかった。しかし、特定のハプロタイプの頻度の有意な増大あるいは減少が観察された。*HLA-DRB1* 以外の *HLA* アリルも RA との有意な関連を示したが (Table 2)、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 (Table 2)、*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。

*HLA-DRB1*04:01* は白人集団でもっとも強い RA 感受性アリルであり、日本人集団でも RA 感受性との関連を示す (Table 2)。一方、*C*07:04*, *B*15:18*, *DRB1*04:01*,

*DQB1*03:01* は同一のハプロタイプ上に存在するが (Table 4)、 p 値や OR を比較すると、*C*07:04* や *B*15:18* の方が *DRB1*04:01* よりも低い p 値、高い OR を示した。

HLA 遺伝子型と抗 CCP 抗体陽性 RA との関連：*HLA* 遺伝子型と抗 CCP 抗体陽性 RA との関連を Fisher's exact test により調べてみると、*DRB1* と *DQB1* のみが Bonferroni 補正後も有意な関連を示した。このとき Bonferroni 補正は本研究で観察された遺伝子型の数で行った：*HLA-A*, 67; *HLA-C*, 82; *HLA-B*, 179; *DRB1*, 123; *DQB1*, 62; *DPB1*, 47。RA と有意な関連を示した *DRB1* 遺伝子型は以下の通りである：*DRB1*04:05/04:05* ($p = 1.12e-06$, OR = 4.18, 95% CI = 2.24 - 8.06), *DRB1*04:05/09:01* ($p = 1.69e-05$, OR = 2.57, 95% CI = 1.69 - 4.06), *DRB1*04:01/04:05* ($p = 4.60e-05$, OR = 9.47, 95% CI = 2.62 - 51.6)。*DRB1*04:05* のホモ接合体はアリルモードでの *DRB1*04:05* の OR よりも高い値を示した：それぞれ、4.18 と 2.69。よって、RA 患者群と対象群を、AA (A アリルのホモ接合体), Aa (A アリルのヘテロ接合体), aa (A アリルをもたないもの) 遺伝子型に分け Cochran-Armitage test for trend により検定を行った (Table 5)。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。よってこれらの結果から、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。

Shared Epitope と抗 CCP 抗体陽性 RA との関連：*DRB1* アリルを SE により分類 (5) したとき、RA 感受性 SE は S2 ($p = 2.43e-04$, OR = 2.88, 95% CI = 1.59 - 5.33) と S3p ($p = 1.03e-19$, OR = 2.15, 95% CI = 1.82 - 2.54) であり、RA 抵抗性 SE は S1 ($p = 4.97e-08$, OR = 0.58, 95% CI = 0.48 - 0.71) と X ($p = 6.19e-05$, OR = 0.72, 95% CI = 0.61 - 0.85) であった。SE の遺伝子型も同様に感受性あるいは抵抗性を示した (データは示していない)。また、Cochran-Armitage test for trend でも以下のような p 値が得られ、*DRB1* アリルの場合と同様に "double dose effect" があることが分かった (S3p, $p = 1.37e-20$; S2, $p = 1.38e-04$; S1, $p = 3.88e-16$; X, $p = 5.91e-05$)。しかし、S3p に分類され白人集団では RA 感受性であるとされる *DRB1*01:01* を含め、S3p のいくつ

かの *DRB1* アリルは抗 CCP 抗体陽性 RA との関連を示さなかった (Table 6)。

病型と HLA、あるいは病型と抗 CCP 抗体との関連 : Ochi の分類 (9) に従い、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)。ムチランス型は 427 症例の中で 17 例であり、その中の 16 例が抗 CCP 抗体陽性であったが症例数が少ないので、以下の解析は多関節進行型と併せて一つの群として行った。本研究の症例でのムチランス型は 4.0% であり、~5% という以前の報告 (17) とよく一致していた。

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。RF の有無は関節破壊の程度との関連は示さなかった ($p = 0.0856$, OR = 1.69, 95% CI = 0.90 - 3.14)。

D. 考察

本研究で我々は自己抗体陰性の RA では *A*26:01* 以外のいかなる *HLA* アリルとも有意な関連がないことを示した (Table 2)。この結果は、DR 抗原 8 鎖の 70~74 番目のアミノ酸配列により規定される SE が自己抗体陰性の RA とは関連を示さないという報告 (11) と一致している。しかし、RA 感受性である S3p の SE をもつ一部の *HLA-DRB1* アリルは RA 感受性ではなかった (Table 6)。*DRB1*04:05* と **10:01* は RA 感受性であったが、*DRB1*01:01*, **04:10*, **14:06* は感受性でも抵抗性でもなく、中立であった。

RA 感受性 *HLA-DRB1* アリルのトランスジェニック・マウスを II 型コラーゲンで免役して誘導されるコラーゲン誘導関節炎 (collagen-induced arthritis, CIA) は RA の動物モデルとして使われてきた (20)。一方、II 型コラーゲンやそのイムノドミナント・ペプチドである CII (255 - 274) に対する T 細胞応答性

の昂進が RA 患者で観察されている (21)。また、HLA の X 線構造解析から、ペプチド結合部位には多型性を示す領域が関与し 5 つのポケットが存在すること、そして各ポケットにはペプチドの P1, P4, P6, P7, P9 と名付けられた位置のアミノ酸がそれぞれ結合することが明らかにされている (22)。さらに、SE に対応する *DRB1-Arg⁷¹* が、確かに II 型コラーゲンペプチド CII (259 - 273) の P4 に相当する *Glu²⁶⁶* と塩橋を形成し結合することが、*HLA-DR1(DRB1*01:01)* と CII (259 - 273) 複合体の三次元構造解析により明らかにされている (23)。これらの知見はこれまでの SE に関する膨大な研究とともに RA 発症における SE の重要性を示す。しかし、HLA に結合するペプチドは P4 だけで規定されるのではなく、P1, P6, P7, P9 にも規定される。よって日本人集団においては、*DRB1*01:01*, **04:10* および **14:06* が、P1, P6, P7, P9 を結合するポケットを形成するアミノ酸の多型のために、RA 感受性に関連したペプチドを結合できない可能性も十分に考えられる。*A*26:01* が抗 CCP 抗体陰性の RA において抵抗性であったが、これについては他の集団での再現が必要である。

我々は本研究で、*DPB1*02:01* は RA 感受性であり、*DPB1*04:01* は RA 抵抗性であることを示した (Table 2)。*DPB1*02:01* の一部は RA 感受性である *DRB1*10:01* とハプロタイプを形成しており、*DPB1*04:01* もその一部は RA 抵抗性である *DRB1*13:02* とハプロタイプを形成している (Table 3)。それでこれらの *DRB1* アリルの影響を除外するために、*DRB1*10:01* または *DRB1*13:02* を除外した集団で Fisher's exact test を行った。*DRB1*10:01* を除外したとき *DPB1*02:01* は $p = 0.000925$, OR = 1.36, 95% CI = 1.13 - 1.63 の結果を示し、Bonferroni の補正後も有意な関連を示した。同様に *DRB1*13:02* を除外したとき *DPB1*04:01* は $p = 5.99e-10$, OR = 0.16, 95% CI = 0.07 - 0.33 を示した。これらの結果は *DPB1* は *DRB1* とは独立して RA 感受性あるいは RA 抵抗性を付与することを示す。さらに、*DRB1*04:05* と *DPB1*02:01* の両方のアリルをもっている RA 患者では、*DRB1*04:05* あるいは *DPB1*02:01* 単独の場合よりも低い p 値と高い OR を示した : $p = 8.31e-21$, OR = 3.52, 95% CI = 2.67 - 4.64。この結果も *DPB1* は *DRB1* とは独立して RA 感受性あるいは RA 抵抗性を付与することを支持する。

*DPB1*02:01* は抗 CCP 抗体陽性の RA に感受性であるだけでなく、より関節破壊が重篤な

RAとも関連していた。一方、*DPB1*02:01*は少関節型の若年性関節リウマチの早期発症との関連および*DR3*, *DR5*, *DR6*との相互作用が報告されている(24)。よって日本人集団において、*DRB1*04:05*と*DPB1*02:01*が協同して作用し、RAの発症や関節破壊の進行に関与している可能性が考えられる。

*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：*NFKB1* (25,27), *TNF* (28,29), *TNXB* (27,30), *NOTCH4* (27,31), *NCR3-AIF1* (32)。*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(Table 4)。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*との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。

E. 文献

1. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993;32:903-7.
2. Wandstrat A, Wakeland E. The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2001;2:802-809.
3. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000;43:30-37 (2000).
4. 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;30:1205-13.
5. du Montcel ST, Michou L, Petit-Teixeira E, Osorio J, Lemaire I, Lasbleiz S, et al. New classification of HLA-DRB1 alleles supports the shared epitope hypothesis of rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1063-8.
6. Gorman JD, Lum RF, Chen JJ, Suarez-Almazor ME, Thomson G, Criswell LA. Impact of shared epitope genotype and ethnicity on erosive disease: a metaanalysis of 3,240 rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 2004;50:400-12.
7. Schellekens GA, Visser H, de Jong BA, van den Hoogen FH, Hazes JM, Breedveld FC, et al. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis Rheum.* 2000;43:155-63.
8. van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Huizinga TW, Toes RE, de Vries RR. The HLA-DRB1 shared epitope alleles are primarily a risk factor for anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and are not an independent risk factor for development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54:1117-21.
9. Ochi T, Iwase R, Yonemasu K, Matsukawa M, Yoneda M, Yukioka M, et al. Natural course of joint destruction and fluctuation of serum C1q levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:37-43.
10. Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003;73:1162-9.
11. Kaltenhäuser S, Pierer M, Arnold S, Kamprad M, Baerwald C, Häntzschel H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide are associated with the DRB1 shared epitope and predict joint erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2007;46:100-4.
12. Kirsten N, Verpoort, Floris A. van Gaalen, Annette H. M. van der

- Helm-van Mil, et al. Association of HLA-DR3 With Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Antibody-Negative Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3058-62.
13. 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;25:219-24.
 14. Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA-DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum.* 2005;52:3433-8.
 15. Lee HS, Lee KW, Song GG, Kim HA, Kim SY, Bae SC. Increased susceptibility to rheumatoid arthritis in Koreans heterozygous for HLA-DRB1*0405 and *0901. *Arthritis Rheum.* 2004;50:3468-75.
 16. Benazet JF, Reviron D, Mercier P, Roux H, Roudier J. HLA-DRB1 alleles associated with rheumatoid arthritis in southern France. Absence of extraarticular disease despite expression of the shared epitope. *J Rheumatol.* 1995;22:607-10.
 17. Mody GM, Meyers OL. Resorptive arthroplasty in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1988;15:1075-7.
 18. Van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R949-58.
 19. Bukhari M, Thomson W, Naseem H, Bunn D, Silman A, Symmons D, et al. The performance of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in predicting the severity of radiologic damage in inflammatory polyarthritis: results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Rheum* 2007;56:2929-35.
 20. Qian Z, Latham KA, Whittington KB, Miller DC, Brand DD, Rosloniec EF. An autoantigen-specific, highly restricted T cell repertoire infiltrates the arthritic joints of mice in an HLA-DR1 humanized mouse model of autoimmune arthritis. *J Immunol.* 2010;185:110-8.
 21. Kim HY, Kim WU, Cho ML, Lee SK, Youn J, Kim SI, et al. Enhanced T cell proliferative response to type II collagen and synthetic peptide CII (255-274) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2085-93.
 22. Rosloniec EF, Ivey RA 3rd, Whittington KB, Kang AH, Park HW. Crystallographic structure of a rheumatoid arthritis MHC susceptibility allele, HLA-DR1 (DRB1*0101), complexed with the immunodominant determinant of human type II collagen. *J Immunol.* 2006;177:3884-92.
 23. Ploski R, McDowell TL, Symons JA, Flatø B, Duff GW, Thorsby E, et al. Interaction between HLA-DR and HLA-DP, and Between HLA and interleukin 1α in juvenile rheumatoid arthritis indicates heterogeneity of pathogenic mechanisms of the disease. *Hum Immunol.* 1995;42:343-7.
 24. Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, et al. A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70-kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics.* 2001;71(3):263-70.
 25. Lin CH, Cho CL, Tsai WC, Ou TT, Wu CC, Yen JH, et al. Inhibitors of κB-like gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2006;105:193-7.
 26. Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, et al. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet.* 2005;14:2305-21.
 27. Mu H, Chen JJ, Jiang Y, King MC, Thomson G, Criswell LA. Tumor necrosis factor α microsatellite polymorphism is associated with rheumatoid arthritis severity through an interaction with the HLA-DRB1 shared epitope. *Arthritis Rheum.* 1999;42:438-42.
 28. Matthey DL, Hassell AB, Dawes PT, Ollier WE, Hajeer A. Interaction

- between tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms and the HLA-DRB1 shared epitope in rheumatoid arthritis: influence on disease outcome. *Arthritis Rheum.* 1999;42:2698-704.
29. Yang HC, Liang YJ, Chung CM, Chen JW, Pan WH. Genome-wide gene-based association study. *BMC Proc.* 2009;3 Suppl 7:S135.
30. Ando K, Kanazawa S, Tetsuka T, Ohta S, Jiang X, Tada T et al. Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts. *Oncogene.* 2003;22:7796-803.
31. Yan Z, Ferucci ED, Geraghty DE, Yang Y, Lanier AP, Smith WP, Zhao LP, Hansen JA, Nelson JL. Resequencing of the human major histocompatibility complex in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls in Alaska Natives of Southeast Alaska. *Tissue Antigens.* 2007;70:487-94.
- 15) 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

F. 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* (in press)
- 2) Mitsunaga S, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Shiina Y, et al. Particular HLA alleles are associated with biochemical traits in the Japanese population. *Hum Immunol* 2011 (in press)

2. 学会発表

- 13) 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.
- 14) 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：関節リウマチの病型と HLA との関連解析。第 19 回日本組

Table 1. Case subjects used in this study

	Group 1 (n = 427)						Group 2 (n = 195)		Total (n = 622)		
	MUD+MES		LES		unknown						
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	overall
anti-CCP Ab											
(+)	41	209	18	83	0	4	27	106	86	402	488
(-)	6	31	9	23	0	1	12	21	27	76	103
unknown	0	0	0	2	0	0	7	22	7	24	31
RF											
(+)	39	189	18	76	0	4	26	110	83	379	462
(-)	5	28	7	16	0	0	20	39	32	83	115
unknown	3	23	2	16	0	1	0	0	5	40	45

Table 2. Rheumatoid arthritis susceptible and protective HLA alleles

HLA allele	anti-CCP positive (n = 488)			anti-CCP negative (n = 103)		
	P value	OR	95% CI	P value	OR	95% CI
<i>DRB1*04:01</i>	2.43e-04	2.88	1.59 – 5.33	0.294	1.80	0.61 – 5.30
<i>DRB1*04:05</i>	3.18e-24	2.69	2.21 – 3.27	0.284	1.24	0.84 – 1.85
<i>DRB1*13:02</i>	6.26e-11	0.26	0.16 – 0.42	0.216	0.65	0.35 – 1.21
<i>DRB1*14:05</i>	3.45e-05	0.19	0.06 – 0.49	0.498	1.32	0.50 – 2.99
<i>DRB1*08:02</i>	2.15e-04	0.37	0.19 – 0.66	0.698	0.75	0.32 – 1.75
<i>DRB1*10:01</i>	3.20e-05	6.83	2.41 – 7.39	0.456	1.88	0.22 – 16.2
<i>DQB1*04:01</i>	2.86e-23	2.65	2.18 – 3.23	0.331	1.23	0.82 – 1.83
<i>DQB1*06:04</i>	9.49e-11	0.26	0.16 – 0.42	0.162	0.61	0.31 – 1.17
<i>DPB1*02:01</i>	1.32e-04	1.41	1.18 – 1.68	0.248	1.22	0.88 – 1.71
<i>DPB1*04:01</i>	5.89e-04	0.47	0.28 – 0.74	0.868	1.04	0.50 – 1.99
<i>B*15:18</i>	4.82e-05	2.92	1.69 – 5.11	0.518	1.51	0.52 – 4.38
<i>B*37:01</i>	2.52e-04	4.87	1.91 – 13.9	0.212	2.70	0.56 – 13.1
<i>B*44:03</i>	2.35e-09	0.34	0.23 – 0.51	0.151	0.63	0.34 – 1.14
<i>B*54:01</i>	7.61e-04	1.61	1.21 – 2.13	0.246	1.35	0.81 – 2.26
<i>B*59:01</i>	2.52e-06	3.00	1.86 – 4.90	0.396	1.48	0.57 – 3.83
<i>C*01:02</i>	1.24e-05	1.54	1.27 – 1.88	0.018	1.54	1.09 – 2.18
<i>C*07:04</i>	1.75e-05	4.59	2.17 – 10.4	0.361	1.71	0.38 – 7.78
<i>C*14:03</i>	8.27e-09	0.36	0.24 – 0.53	0.070	0.56	0.30 – 1.05
<i>A*33:03</i>	1.15e-04	0.53	0.38 – 0.75	0.609	0.85	0.50 – 1.45
<i>A*26:01</i>	0.775	1.04	0.78 – 1.39	1.96e-03	0.28	0.09 – 0.69

Only HLA alleles which showed significant association with RA after Bonferroni correction are shown. *P* value shown here is without Bonferroni correction.

Table 3. Six-locus HLA haplotypes and their frequencies in case and control

HLA-A	HLA-C	HLA-B	DRB1	DQB1	DPB1	Freq (%)	
						Case	Control
24:02	12:02	52:01	15:02	06:01	09:01	4.7	6.2
24:02	01:02	54:01	04:05	04:01	05:01	2.6	0.8
24:02	07:02	07:02	01:01	05:01	04:02	2.6	2.6
33:03	14:03	44:03	13:02	06:04	04:01	1.4	3.4
24:02	12:02	52:01	15:02	06:01	02:01	1.3	0.4
24:02	12:02	52:01	15:02	06:01	05:01	1.1	0.7
26:01	03:04	40:02	09:01	03:03	05:01	1.1	0.5
02:06	01:02	59:01	04:05	04:01	04:02	0.9	0.2
24:02	01:02	59:01	04:05	04:01	04:02	0.9	0.7
24:02	01:02	59:01	04:05	04:01	05:01	0.8	0.2
02:06	01:02	54:01	04:05	04:01	05:01	0.7	0.3
01:01	06:02	37:01	10:01	05:01	02:01	0.6	0.3
02:01	01:02	54:01	04:05	04:01	05:01	0.6	0.3
02:10	08:01	40:06	04:05	04:01	05:01	0.6	0.2
11:01	04:01	15:01	04:06	03:02	02:01	0.6	0.8
11:01	07:02	39:01	08:03	06:01	02:01	0.6	0.2

Only the haplotypes with more than 0.6% of frequency in cases are shown.

Table 4. Four-locus HLA haplotypes, their frequencies and the association on the onset of rheumatoid arthritis

HLA-C*	HLA-B*	DRB1*	DQB1*	Freq (%)		p-value	OR	95% CI
				Case	Control			
12:02	52:01	15:02	06:01	8.4	9.0	0.628	0.93	0.70–1.23
01:02	54:01	04:05	04:01	7.2	3.9	1.95e-04	1.91	1.35–2.71
07:02	07:02	01:01	05:01	4.6	5.3	0.423	0.86	0.59–1.24
01:02	59:01	04:05	04:01	4.3	1.4	4.86e-06	3.06	1.85–5.16
01:02	46:01	08:03	06:01	2.4	2.8	0.542	0.84	0.49–1.40
03:04	40:02	09:01	03:03	2.4	1.6	0.142	1.53	0.84–2.74
08:01	40:06	09:01	03:03	2.4	2.3	0.896	1.04	0.59–1.76
07:04	15:18	04:01	03:01	2.0	0.4	5.38e-05	5.03	2.11–13.3
14:03	44:03	13:02	06:04	1.9	7.2	2.16e-10	0.25	0.15–0.42
01:02	55:02	04:05	04:01	1.7	0.7	0.010	2.62	1.19–5.88
06:02	37:01	10:01	05:01	1.6	0.0	7.51e-05	6.42	2.24–22.5
03:04	40:01	04:05	04:01	1.5	0.0	6.00e-04	5.01	1.83–15.8
04:01	15:01	04:06	03:02	1.5	1.9	0.654	0.822	0.42–1.55
14:02	51:01	04:05	04:01	1.5	1.2	0.490	1.30	0.63–2.61
03:04	40:02	04:05	04:01	1.3	0.0	1.51e-03	5.20	1.73–18.7
08:01	48:01	09:01	03:03	1.2	0.4	0.017	2.99	1.12–8.47
03:03	35:01	15:01	06:02	1.0	0.8	0.526	1.32	0.53–3.16
03:03	35:01	04:05	04:01	1.0	1.0	1.00	0.99	0.41–2.23

Only the haplotypes with more than 1.0% of frequency in cases are shown.

Table 5. The Cochran-Armitage test for trend on the genotypes of HLA alleles*

	Chi-squared value	p-value
<i>DRB1*04:01</i>	14.4	1.47e-04
<i>DRB1*04:05</i>	108	2.08e-25
<i>DRB1*13:02</i>	36.0	1.95e-09
<i>DRB1*14:05</i>	14.9	1.14e-04
<i>DQB1*04:01</i>	103	4.21e-24
<i>DQB1*06:04</i>	35.4	2.66e-09
<i>DPB1*02:01</i>	14.3	1.58e-04
<i>DPB1*04:01</i>	11.2	8.03e-04
<i>B*15:18</i>	17.7	2.54e-05
<i>B*44:03</i>	32.4	1.28e-08
<i>B*54:01</i>	11.8	5.85e-04
<i>B*59:01</i>	24.3	8.12e-07
<i>C*01:02</i>	19.6	9.77e-06
<i>C*14:03</i>	30.8	2.89e-08
<i>A*33:03</i>	14.8	1.17e-04

* *DRB1*08:02*, *DRB1*10:01*, *B*37:01* and *C*07:04* were omitted because there was no homozygote of these alleles.

Table 6. The association between DRB1 alleles with SE-S3p and anti-CCP Ab positive rheumatoid arthritis

HLA-DRB1 allele	Case (%) (n = 976)	Control (%) (n = 1,932)	P value	OR	95% CI
0101	62	126	0.811	0.96	0.68 – 1.32
0405	285	257	3.18e-24	2.69	2.21 – 3.27
0410	18	43	0.584	0.83	0.45 – 1.47
1406	13	39	0.236	0.66	0.32 – 1.26
1001	17	5	3.20e-05	6.83	2.41 – 23.7

**DRB1*04:04* and **14:02* were omitted due to small number of cases or controls in this study: *DRB1*04:04*, 5 cases and 1 control; *DRB1*14:02*, 1 case and 1 control.

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

日本人集団における HLA と生化学検査値の関連

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
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	
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	椎名 豊	東海大学医学部内科学系検診センター	教授
研究分担者	井ノ上逸朗	国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝学部門	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	
研究協力者	柏瀬 貢一	東京都赤十字血液センター検査一部	課長
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

研究要旨

本研究プロジェクト「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」では対照群として検診センター受診者の検体を、文書によるインフォームドコンセントを取得後収集した。この検体をもちいて HLA と生化学検査値との関連を調べた。特定の HLA アリルをもつか否かで 2 群に分け Mann-Whitney U test を行ったところ、女性集団で *DPB1*03:01* が HbA1c ($p = 6.65E-05$) と、*DRB1*14:03* ($p = 0.0015$) が総コレステロールと有意に関連しており、男性集団では *C*14:02* ($p = 0.0041$) が総コレステロールと有意に関連していた。基準値内の集団と異常値の集団に分け、Fisher's exact test で HLA との関連を調べたところ、女性の *DRB1*14:03* は総コレステロール高値と関連しており ($p = 3.23E-4$, OR = 4.32, 95% CI = 1.83-10.36), 女性の *DPB1*02:01* は LDL コレステロール高値に対し抵抗性であった ($p = 0.0043$, OR = 0.41, 95% CI = 0.19-0.79)。これらの関連は検出力 0.8 以上で、ボンフェローニの補正後も有意差を示した。

A. 研究目的

ヒト白血球抗原 (HLA) は自己および病原体等の非自己由来ペプチドを T 細胞に対し提示することにより、免疫応答において中心的役割を果たしている。自己ペプチドに反応性の T 細胞は厳密に制御されているが、その制御が一部破綻したとき自己免疫疾患発症へつながる。例えば関節リウマチ (RA) や全身性エリテマトデース (SLE) では自己反応性の T 細胞の出現が報告されている (1,2)。

HLA と自己免疫疾患との関連については極めて多数の報告があるが (3)、自己免疫疾患においてはしばしば血中の炎症性サイトカインレベルの増大が観察される (4)。例えば関節リウマチでは血漿中の TNF- α レベルが増大しており (5)、抗 TNF- α 抗体や抗 IL-6 抗体等による治療によりそのレベルは低下する (6, 7)。一方、近年、肥満による慢性炎症が様々な疾患に

(8-10)。齧歯類の肥満モデルでは脂肪組織の TNF- α が過剰発現しているが、TNF- α はインスリン抵抗性のメディエーターであり (11)、TNF- α 欠損マウスは肥満によるインスリン抵抗性になりにくい (12)。肥満では IL-6 レベルも増大しているが、IL-6 はインスリン抵抗性を促進する (13, 14)。HDL コレステロールも炎症に関与しており (15)、2 型糖尿病では血漿中の HDL コレステロールレベルの低下と炎症性サイトカインレベルの増大が観察される (16)。さらに、SLE や RA の患者では TNF- α , IL-1, IL-6 レベルが増大し HDL コレステロールは減少している。LDL コレステロールとトリグリセリド (中性脂肪) の増大も観察される (17-19)。

以上のようなこれまでの報告にもとづき、我々は HLA と生化学検査値との関連を調べた。すなわち HLA の 6 遺伝子座 (*HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQB1* and *-DPB1*) と 7 種類の生化学

検査値（空腹時血糖、HbA1c、総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪、尿酸）との関連を調べた。

B. 方法

文書によるインフォームドコンセントを得た1,616名の東海大学病院付属検診センター受診者を対象とした。本研究については、東海大学医学部の倫理審査委員会の承認を得て行った。

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。HLA-DRB1は1,616例、他の遺伝子座は1,047例でタイピングを行った。HLA タイピング結果は日本赤十字社骨髄データセンターで報告されている日本人集団における頻度とよく一致していた (<http://www.bmdc.jrc.or.jp/stat.html>)。以下の統計学的解析には1%以上の頻度をもつアレルだけを対象とした。統計解析に用いたアレル数と観察されたアレル数は以下の通りである(解析/観察)：HLA-A, 11/23; HLA-B, 19/40; HLA-C, 11/19, HLA-DRB1, 19/31; HLA-DQB1, 11/14; HLA-DPB1, 9/17。

Statcel 2 software (OMS, Saitama, Japan)を用いた検定では総コレステロール以外は正規分布では無かったので、解析はRソフトウェアを用いて Mann-Whitney U tests および Fisher's exact tests で行った。Mann-Whitney U tests では特定の HLA アレルをもつ群とまたない群に分けて行った。Fisher's exact tests は基準値内と異常値に分けて行った。用いた基準値と異常値は以下の通りである：空腹時血糖、110 mg/dl (基準値)、 ≥ 126 mg/dl (異常値)；HbA1c、 $< 5.6\%$ 、 $\geq 6.0\%$ ；総コレステロール、 < 220 mg/dl、 ≥ 240 mg/dl；HDL コレステロール、 ≥ 40 mg/dl、 < 40 mg/dl；LDL コレステロール、 < 140 mg/dl、 ≥ 160 mg/dl；中性脂肪、 < 150 mg/dl、 ≥ 200 mg/dl；尿酸(女性)、 < 6.0 mg/dl、 ≥ 7.0 mg/dl；尿酸(男性)、 < 7.0 mg/dl、 ≥ 8.0 mg/dl。PcはP値に解析に用いた HLA のアレル数、すなわち遺伝子座ごとの頻度1%以上の HLA アレル数を掛けて計算した。検出力はG*Power (20)を用いて計算した。HLA ハプロタイプは PHASE version 2 (21)を用いて推定した。

C. 結果

解析に用いた症例の背景因子を Table 1 に

まとめた。いくつかの生化学検査値には男女差があったので、以下の解析は全体での解析とともに男女別での解析も行った。なお、いくつかの生化学検査値に男女差があることは、70万人の日本人集団での解析でも報告されている(22)。

Mann-Whitney U test での結果を Table 2 に示した。女性の DPB1*03:01 は HbA1c および血糖値と有意に関連していた：それぞれ $p_c = 5.98E-04$, $p_c = 0.0370$ 。同様に DRB1*14:03 は総コレステロール($p_c = 0.0287$)、C*14:03 は中性脂肪($p_c = 0.0205$)と有意に関連していた。LDL コレステロールは総コレステロールの主要な構成成分であるが、DRB1*14:03 とは関連の傾向はあったが有意ではなかった($p = 0.0160$)。男性の検体では A*26:02 ($p_c = 0.0399$) と C*14:02 ($p_c = 0.0452$)空腹時血糖と有意な関連を示したが、女性でみられた有意な関連は検出できなかった。全検体を用いて解析した場合、C*14:03 が中性脂肪と($p_c = 0.0067$)、DPB1*03:01 が HbA1c と ($p_c = 0.0432$)有意に関連していた。これら以外にも有意な関連を示したものがあつたが、PHASE によるハプロタイプの推定から、それらは連鎖不平衡によるものと考えられた。

Fisher's exact tests は基準値内の群と異常値を示した群に分けて行い、その結果を Table 3 に示した。女性検体では、DRB1*14:03 ($p_c = 0.0061$, OR: 4.32, 95% CI = 1.83-10.36) が総コレステロールと、DPB1*02:01 ($p_c = 0.0389$, OR = 0.41, 95% CI = 0.19-0.79)が LDL コレステロールと有意な関連を示した。男性検体では有意な関連を示すものは無かった。DRB1*14:03は Mann-Whitney U test と Fisher's exact test の両方で総コレステロールと有意な関連を示した。

HDL コレステロールと尿酸は Mann-Whitney U test および Fisher's exact test のどちらの方法でも有意な関連を示すものは無かった。CRP は炎症性マーカーのひとつであるが、BMI および生化学検査値のいずれとも有意な関連は示さなかった。CRP 測定値の <0.09 を0.08として効果量を計算すると0.08であったので、これは効果量が小さいためであると考えられた。

D. 考察

総コレステロールは LDL コレステロール、HDL コレステロール、TG-rich リポタンパクコレステロールから成り、その主要成分は LDL

コレステロールである。Mann-Whitney U test と Fisher's exact test の両方で *DRB1*14:03* は総コレステロールと有意な関連を示した。しかし、LDL コレステロールとは有意な関連は検出できなかった：それぞれ、 $pc=0.738$ 、 $pc=0.238$ 。これは効果量が小さいためであると考えられる。Fisher's exact test による検定では *DPB1*02:01* が LDL コレステロール高値に対し抵抗性を示した。また、Mann-Whitney U test では *HLA-C*14:03* が中性脂肪と有意に関連していた。

近年、脂質異常症がゲノムワイド関連解析 (genome-wide association studies, GWAS) により解析されているが、HLA との関連の報告はほとんど無い (24-28)。我々は *DRB1*14:03* と総コレステロール ($pc=0.0287$)、*C*14:03* ($pc=0.0205$) と中性脂肪との有意な関連を検出したが、それらのアリル頻度がそれぞれ、1.8%、8.6%と低いために GWAS で検出されていない可能性がある。本研究では *DPB1*02:01* が LDL コレステロール高値に対し抵抗性であることを検出したが、HLA 領域では *B3GALT4* の下流にある *rs2254287* の SNP が GWAS により報告されている (29)。SNP の *rs2254287* が *DPB1*02:01* と連鎖不平衡にあるか否かは今後の検討課題である。

女性集団では *DPB1*03:01* と HbA1c および血糖値、男性集団では *A*26:02* および *C*14:02* と血糖値が有意な関連を示した。しかし、PHASE によるハプロタイプの推定ではこれらのアリルが同一ハプロタイプ上には存在していなかった。白人集団では DR4 が 2 型糖尿病と関連しているが (30)、本研究では DR4 と HbA1c あるいは血糖値との関連は検出されなかった。

Bromodomain-containing protein 2 (BRD2) は核における転写制御因子であると推定されており、発生途中において発現する遺伝子群のひとつでもある。*BRD2* 遺伝子座は HLA クラス II 領域の *HLA-DMA* と *HLA-DMO* の間に位置し、*DPB1* 遺伝子座の 91 kb 上流に位置する。興味深いことに、マウスで *Brd2* 遺伝子を破壊すると、重度な肥満となるが 2 型糖尿病は発症しない (31)。この報告では、*in vitro* でインスリン抵抗性を誘導する TNF- α のシグナル伝達系に *Brd2* が関与しており、*in vivo* では *Brd2* の低下は炎症性シグナル伝達の低下をもたらすことが示されている。本研究では、*DPB1*03:01* が HbA1c と関連していることを Mann-Whitney U test により示した。日本人集団でこれまでに報告され

ている *BRD2* 遺伝子座の SNP の minor allele 頻度は極めて低いが、*DRB2* の発現低下をもたらす SNP と *DPB1*03:01* が連鎖不平衡にあることも考えられる。今後、リシーケンシング等により、*DPB1*03:01* をもつハプロタイプの塩基配列解析が必要である。

これまでに多数の GWAS が行われてきたが (32)、*HLA* と 2 型糖尿病の関連を報告したものはほとんどない。*HLA* と同じ 6 番染色体短腕上に存在する遺伝子では、*CDKAL1* と 2 型糖尿病との関連が報告され、replication study も行われている。しかし *CDKAL1* は *HLA-A* の上流 9 Mb に存在するので、特定の *HLA* アリルと連鎖不平衡にある可能性は低いと考えられる。また、*DPB1*03:01*、*A*26:02*、*C*14:02* の本研究におけるアリル頻度はそれぞれ 4.4%、1.8%、7.4%と低いために GWAS では検出されていないと考えられる。

可溶性 *HLA-G* (s*HLA-G*) 抗原はインスリン抵抗性と関連し、2 型糖尿病患者では健常人よりも s*HLA-G* がより多く検出されるとの報告がなされている (33)。また *HLA-G* 遺伝子のエクソン 8 にある 14 bp の挿入/欠失の多型は s*HLA-G* の発現と血漿中の s*HLA-G* レベルと関連しており、14 bp 挿入のホモ接合では、14 bp の欠失のホモ接合あるいはそれらのヘテロ接合よりも著しく s*HLA-G* レベルが低下している (34)。さらに、s*HLA-G* の 14 bp 欠失は *HLA-A*02*、*-A*03*、*-A*24* と連鎖不平衡にある (35)。これらを併せると、*HLA-A*02*、*-A*03*、*-A*24* は血糖高値と関連することになるが、本研究ではそのような関連は検出できなかった。

本研究で解析した生化学検査項目は健康と疾患の中間形質である。よって他の多数の因子も疾患発症には関与している。本研究の Mann-Whitney U test で検出した *HLA* との有意な関連は必ずしも Fisher's exact test では検出できなかった。これは、基準値内高値の症例が異常値に移行するには *HLA* だけではなく、他の遺伝要因や環境要因の関与が必要であるためと考えられる。本研究には 1,000 以上の症例を用い、*HLA* と生化学検査値との関連を示したが、その検証にはより多くの症例を用いた解析が必要である。

E. 文献

1. Zanelli E, Breedveld FC, de Vries RR. HLA association with autoimmune disease: a failure to protect?

- Rheumatology (Oxford) 2000; 39:1060-66.
2. Talken BL, Schäfermeyer KR, Bailey CW, Lee DR, Hoffman RW. T cell epitope mapping of the Smith antigen reveals that highly conserved Smith antigen motifs are the dominant target of T cell immunity in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001; 167:562-8.
 3. Shiina T, Hosomichi K, Inoko H, Kulski JK. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. *J Hum Genet* 2009; 54:15-39.
 4. Joseph A, Brasington R, Kahl L, Ranganathan P, Cheng TP, Atkinson J. Immunologic rheumatic disorders. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:S204-S215.
 5. Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344:907-16.
 6. Breedveld FC, van der Lubbe PA. Monoclonal antibody therapy of inflammatory rheumatic diseases. *Br Med Bull* 1995; 51:493-502.
 7. Maini RN, Elliott MJ, Brennan FM, Williams RO, Chu CQ, Paleolog E, et al. Monoclonal anti-TNF-alpha antibody as a probe of pathogenesis and therapy of rheumatoid disease. *Immunol Rev* 1995; 144:195-223.
 8. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005; 115:1111-9.
 9. Semenkovich CF. Insulin resistance and atherosclerosis. *J Clin Invest* 2006; 116:1813-22.
 10. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008; 454:428-35.
 11. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87-91.
 12. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 1997; 389:610-4.
 13. Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res* 2001; 9:414-7.
 14. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, et al. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2084-9.
 15. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Fogelman AM. HDL as a biomarker, potential therapeutic target, and therapy. *Diabetes* 2009; 58:2711-7.
 16. Haas MJ, Mooradian AD. Regulation of high-density lipoprotein by inflammatory cytokines: establishing links between immune dysfunction and cardiovascular disease. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26:90-9.
 17. Park YB, Choi HK, Kim MY, Lee WK, Song J, Kim DK, et al. Effects of antirheumatic therapy on serum lipid levels in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *Am J Med* 2002; 113:188-93.
 18. Svenungsson E, Fei GZ, Jensen-Urstad K, de Faire U, Hamsten A., Frostegard J. TNF-alpha: a link between hypertriglyceridaemia and inflammation in SLE patients with cardiovascular disease. *Lupus* 2003; 12:454-61.
 19. Escárcega RO, García-Carrasco M, Fuentes-Alexandro S, Jara LJ, Rojas-Rodriguez J, Escobar-Linares LE, et al. Insulin resistance, chronic inflammatory state and the link with systemic lupus erythematosus-related coronary disease. *Autoimmun Rev* 2006; 6:48-53.
 20. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007; 39:175-91.
 21. Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003; 73:1162-9.
 22. Donadon V, Antonini Canterin A, De Paoli P, Borean M, Villalta D, Zanata G, et al. Familial hypercholesterolemia and HLA antigens. *Clin Cardiol* 1986; 9:161-4.