

23. Raffoux C, Pointel JP, Drouin P, Streiff F, Debry G, Sauvanet JP. Type IIa hyperlipoproteinemia and the HLA system. *Tissue Antigens* 1978;11:55-8.
  24. Dufosse F, Ferraz ME, Goudemand J, Rouget JP, Dewailly P, Jaillard J. Type IIa hyperlipoproteinemia and HLA - A and B antigens: no association. *Tissue Antigens* 1984;23:246-9.
  25. Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM, Pramstaller PP, et al. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat Genet* 2009;41:47-55.
  26. Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, et al. Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat Genet* 2009;41:56-65.
  27. Teslovich TM, Musunuru K, Smith AV, Edmondson AC, Stylianou IM, Koseki M, et al. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids. *Nature* 2010;466:707-13.
  28. Kamatani Y, Matsuda K, Okada Y, Kubo M, Hosono N, Daigo Y, et al. Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat Genet* 2010;42:210-5.
  29. Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 2008;40:161-9.
  30. Forsblom CM, Sane T, Groop PH, Tötterman KJ, Kallio M, Saloranta C, et al. Risk factors for mortality in Type II (non-insulin-dependent) diabetes: evidence of a role for neuropathy and a protective effect of HLA-DR4. *Diabetologia* 1998;41:1253-62.
  31. Wang F, Liu H, Blanton WP, Belkina A, Lebrasseur NK, Denis GV. Brd2 disruption in mice causes severe obesity without Type 2 diabetes. *Biochem J*. 2009;425:71-83.
  32. Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M. The emerging genetics of type 2 diabetes. *Trends Mol Med* 2010;16:407-16.
  33. Solini A, Muscelli E, Stignani M, Melchiorri L, Santini E, Rossi C, et al. Soluble human leukocyte antigen-g expression and glucose tolerance in subjects with different degrees of adiposity. *J. Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3342-6.
  34. Chen XY, Yan WH, Lin A, Xu HH, Zhang JG, Wang XX. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 2008;72:335-41.
  35. Kolte AM, Steffensen R, Nielsen HS, Hviid TV, Christiansen OB. Study of the structure and impact of human leukocyte antigen (HLA)-G-A, HLA-G-B, and HLA-G-DRB1 haplotypes in families with recurrent miscarriage. *Hum Immunol* 2010;71:482-8.
- F. 研究発表
1. 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:なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

Table 1. Subject Characteristics and Comparison of Biochemical Values

	Female	Male	Total	<i>p</i>
value				
N	772	844	1616	
Age (years)	56.3 ± 10.1	57.9 ± 10.2	57.1 ± 10.2	
Height (cm)	155.8 ± 5.6	168.5 ± 6.0	162.4 ± 8.6	
Weight (kg)	53.0 ± 8.0	66.6 ± 9.6	60.1 ± 11.2	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.8 ± 3.1	23.4 ± 3.0	22.7 ± 3.1	
Blood Glucose (mg/dl)	97.1 ± 13.6* <sup>1</sup>	103.2 ± 15.9	100.3 ± 15.1	1.98E-16
HbA1c (%)	5.08 ± 0.47	5.12 ± 0.61	5.10 ± 0.55	0.184
Total Cholesterol (mg/dl)	210 ± 31.0	203 ± 30.3	207 ± 30.9	1.44E-07
LDL-Cholesterol (mg/dl)	125 ± 28.6	125 ± 28.7	125 ± 28.6	0.849
HDL-Cholesterol (mg/dl)	74.4 ± 18.3	62.1 ± 16.9	68.0 ± 18.6	6.6E-42
Triglyceride (mg/dl)	91.3 ± 49.9	124 ± 73.3	108 ± 65.3	2.54E-25
Uric Acid (mg/dl)	4.59 ± 1.00	5.98 ± 1.15	5.31 ± 1.28	4E-125
CRP (mg/dl)* <sup>2</sup>	0.125 ± 0.267	0.142 ± 0.335	0.134 ± 0.304	0.274

Student's t-tests were used for total cholesterol and LDL-cholesterol which showed equality of variance in the F-test, and Welch's t-tests were used for the other biochemical traits which showed unequal variance.

\*<sup>1</sup> Values with '±' are means ± s.d.

\*<sup>2</sup> Means and standard deviation were calculated by substituting <0.09 to 0.08

Table 2. Associations between HLA alleles and biochemical traits in the Mann-Whitney U test

	female			male			total		
	<i>p</i>	<i>p<sub>c</sub></i>	power	<i>p</i>	<i>p<sub>c</sub></i>	power	<i>p</i>	<i>p<sub>c</sub></i>	power
<b>Blood Glucose</b>									
A*26:02	0.2865	1	0.24	0.0036	0.0399	0.78	0.0079	0.0874	0.75
C*14:02	0.8608	1	0.10	0.0041	<b>0.0452</b>	<b>0.90</b>	0.0302	0.3318	0.82
DPB1*03:01	0.0041	0.0370	0.21	0.6299	1	0.20	0.0170	0.1526	0.37
<b>HbA1c</b>									
DPB1*03:01	6.65E-05	<b>5.98E-04</b>	<b>0.82</b>	0.7547	1	0.22	0.0048	0.0432	0.68
<b>Total Cholesterol</b>									
DRB1*14:03	0.0015	<b>0.0287</b>	<b>0.83</b>	0.3041	1	0.15	0.0028	0.0541	0.81
<b>LDL-Cholesterol</b>									
DPB1*02:01	0.0160	0.1440	0.80	0.8864	1	0.05	0.0742	0.6678	0.50
<b>Triglyceride</b>									
C*14:03	0.0019	0.0205	0.72	0.0504	0.5542	0.53	6.05E-4	<b>0.0067</b>	<b>0.85</b>

*p<sub>c</sub>*: calculated by multiplication of the allele number which used statistical analysis (allele frequency >1.0%) to *p* value. When *P<sub>c</sub>* is more than 1, *p<sub>c</sub>* is expressed as "1". Only the alleles which showed the smallest *p<sub>c</sub>* value on the haplotype with *p<sub>c</sub>* < 0.05 are shown. The *p<sub>c</sub>* values which are less than 0.05 with more than 0.8 of statistical power are shown in bold.

Table 3. Associations between HLA alleles and biochemical traits in Fisher's exact test

	female	male	Total
Total Cholesterol: $\geq 240$ vs $< 220$ (mg/dL)			
DRB1*14:03			
<i>p</i>	3.23E-4	0.5456	0.0011
<i>pc</i>	0.0061	1	0.0206
power	0.93	0.084	0.87
OR	4.32	1.32	2.77
95% CI	1.83-10.36	0.33-4.01	1.45-5.15
LDL-Cholesterol: $\geq 160$ vs $< 140$ (mg/dL)			
DPB1*02:01			
<i>P</i>	0.0043	1	0.0544
<i>pc</i>	0.0389	1	0.4897
power	0.84	0.045	0.51
OR	0.41	0.97	0.69
95% CI	0.19-0.79	0.58-1.56	0.46-1.00

*pc*: calculated by multiplication of the allele number which used statistical analysis (allele frequency  $> 1.0\%$ ) to *p* value. Only the alleles which showed the smallest *pc* value on the haplotype with *pc*  $< 0.05$  are shown.

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

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

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	
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
協力者	崔 泰林	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	
協力者	細道一善	国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝学部門	助教
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
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	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

関節リウマチの発症には遺伝的要因が関与しており、60%程度は遺伝的要因で説明できるとされている。ムチランス型は関節リウマチ (RA) の中では最も重篤な関節破壊を伴う病型であるので、遺伝子の構造異常を疑い、comparative genomic hybridization (CGH) アレイによる解析を行ったところ、HLA-A 遺伝子座近傍に約 50 kb の欠失が検出された。解析の結果、この欠失は健常人の HLA-A24 に関連した欠失として 1990 年代に複数のグループから報告されているものであった。当初、ムチランス型 RA 患者 11 例中 10 例が A\*24:02 をもっていたので、この欠失が RA 患者と健常人で同じものであるか否かを検討した。RA 患者 2 名と健常人 2 名で、break point を含む 3.7 kb の領域を long-range PCR で増幅し塩基配列を比較したところ、すべて同一の塩基配列であった。Long-range PCR で増幅した 3.7 kb の増幅産物には LINE や SINE のような反復配列が多く含まれていた。また、欠失領域をもたない A\*02:01 や A\*32:01 では、この増幅産物とよく似た配列が約 50 kb 離れて存在していた(テロメア側を TH 領域、セントロメア側を CH 領域とした)。欠失は A\*24:02 以外の、A\*24:04, A\*24:07, A\*24:08, A\*24:20, A\*23:01 でも検出された。これらのことから、この欠失は A\*24 および A\*23 の ancestral haplotype が A\*2 から分岐したあとに、50 kb 離れた反復配列間で生じた相同組換えにより生じたと考えられた。さらに、欠失領域をもたない haplotype の TH および CH 領域を 3.7 kb の増幅産物の塩基配列と比較することにより、相同組換えは 50 kb 離れて存在する反復配列 MLT1F1 の AAGCAGCCCTGCAGGAAGGTCCA 内で生じた可能性が高いと考えられた。

A. 研究目的

一卵性双生児の関節リウマチ (RA) 発症の一致率は 12~15%、二卵性双生児の一致率は 3~4%、双生児ではない同胞の一致率は 2~4%である (1)。また、同胞の発症率と一般の発症率の比  $\lambda_s$  は 5~10 である (2)。よって RA 発症における遺伝的要因は比較的大きいと考えられる。ムチランス型は関節破壊の進行が速く、

その程度も激しいので、関節リウマチの中で最も重篤な病型である (3)。そのためゲノムの構造異常を疑い comparative genomic hybridization (CGH) array による解析を行ったところ、HLA-A 遺伝子座近傍に 50 kb の欠失が検出された。その後の解析により、ムチランス型症例 12 例のうち 11 例が A\*24:02 をも

っていた。そのためこの欠失は A\*24:02 に関連した欠失であり、ムチランス型発症には関与しない可能性も考えられた。

A\*24:02 あるいは血清学的な A24 または A23 抗原をもつ末梢白血球や B-cell line では大規模な欠失があることが 1990 年代に報告されている (4-7)。しかしこれまでのところその break point や近傍の塩基配列は報告されていない。よって、HLA-A 遺伝子座近傍の欠失がムチランス型と健常人で同じであるか否か、また A\*24 やその関連したアリルの形成過程でいつ頃欠失が生じたのかを明らかにすることを目的とした。そのため A\*24 に関連した欠失近傍の DNA 配列を long-range PCR により増幅し、その塩基配列を解析するとともに、ムチランス型関節リウマチ患者と健常人で比較した。決定した塩基配列をもとにした duplex long-range PCR により、A\*24 およびその関連アリルで欠失が存在するか否かについても検討した。

## B. 方法

東海大学病院に通院中のムチランス型関節リウマチ患者 12 名 (Table 1)、および同病院検診センター来訪者から文書によるインフォームドコンセントを得た後、本研究の症例とした。A\*23:01 の染色体 DNA は UCLA International Cell Exchange で配布されたものを東京都赤十字血液センター検査一部の柏瀬貢一博士より恵与された。本研究にあたっては東海大学医学部の倫理審査委員会の承認を受けた。

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。構造異常の解析には Human Genome CGH microarray kit (244 K), Hybridization Oven G2545A, DNA Microarray Scanner G2565BA (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用いた。

本研究の PCR に用いたプライマーを Table 2 に、HLA-A 遺伝子領域におけるその位置を Fig. 1A に示した。Long-range PCR は以下のものを含む 25  $\mu$ L の反応系で行った: 320 nM PCR primers (Adel\_F2, Adel\_R2, Table 2), 32 ng の染色体 DNA, 0.5 U の KOD FX polymerase (Toyobo), 0.4mM の各 dNTP, KOD FX 用 PCR buffer (Toyobo)。Long-range PCR の反応条件は KOD FX polymerase の使用説明書に従い、タッチダウン PCR の系を用いた。この Long-range PCR により、A\*24 に関連した欠失

の近傍領域が増幅され、その大きさは 3,677 bp であった。欠失を含まないアリルの特異的増幅のための PCR プライマーは欠失領域に設定した。その塩基配列は Table 2 に示した。Long-range PCR の条件は欠失特異的条件と同じものを用いた。これにより 5,044 bp の増幅産物が得られた。通常は、欠失検出用プライマーと欠失が無いアリル特異的プライマーを混合し、duplex long-range PCR として行った。

系統樹の作成には ClustalW program (8) (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用い、dot plot 作成は UGENE (<http://ugene.unipro.ru/>) を用い、minimum repeat length, 50 bp; repeat identity, 100% で行った。

## C. 結果

CGH アレイを用いた解析では、プローブ A\_16\_P01449725 (nucleotide positions 29842827 - 29842885 on chromosome 6 of GRCh37 reference assembly NC\_000006.11) と A\_14\_P126040 (nucleotide positions 29913915 - 29913965) が陽性のシグナルを示し、その間の 5 個のプローブは陰性であった。すなわち、プローブ A\_16\_P01449727 (nucleotide positions 29854870 - 29854929) と A\_16\_P37563581 (nucleotide positions 29902255 - 29902314) の二つのプローブとその間のプローブはすべて陰性であった (Fig. 1A)。このことより、少なくともプローブ A\_16\_P01449727 と A\_16\_P37563581 の間の 47,445 bp が欠失しており、欠失の一端は HLA-A 遺伝子座から 8 kb テロメア側に存在することが分かった。一方、ムチランス型関節リウマチ患者は 12 例中 11 例が A\*24:02 をもっていた (Table 1)。また、1990 年代に血清学的に HLA-A\*24 あるいは A\*23 とタイピングされた症例では HLA-A 遺伝子座近傍に大規模な欠失が報告されており (4-6)、DNA レベルで A\*24:02 とタイピングされた症例でも大規模な欠失が報告されていた (7)。よって CGH アレイでムチランス型関節リウマチ患者に検出された欠失は、RA 患者特異的なものではなく、非 RA の健常人にも存在する可能性が考えられた。

HLA-A 遺伝子座近傍の欠失がムチランス型 RA 患者と健常人で同じであるか否かを明確にするために、まず break point の正確な同定を目指した。Adel\_F2 と Adel\_R2 のプライマーペア (Table 2) を用いると、欠失の近隣領域

を特異的に増幅できることが分かった (Fig. 1B)。この増幅産物の塩基配列をムチランス型 RA 患者 2 例、健常人 2 例で解析したところ、3,677 bp の長さで、すべて同一の塩基配列を有していた (accession number: AB603755)。制限酵素による切断でも塩基配列から予想される大きさのバンドを示した (Fig. 1B)。また、増幅産物を RepeatMasker (9) で解析したところ、極めて反復配列に富んでいることが分かった (Table 3)。

この HLA-A 遺伝子座近傍の欠失を多数の症例で調べるために、duplex long-range PCR の系を開発した。すなわち、欠失領域の近接領域を増幅する Adel\_F2 と Adel\_R2 プライマーペアと、欠失領域内に位置する A+F1 と A+R1 プライマーペアを混合して用いることにより、欠失あり/なしを電気泳動のバンドの明瞭な違いにより検出することができた (Fig. 2)。調べた範囲では A\*24:02 をもつムチランス型 RA 患者と健常人は、予想されたように約 3.7 kb のバンドが検出された。

A\*24:02 以外の他の A\*24 アリルおよび A\*23:01 をこの duplex long-range PCR で調べたところ、すべての症例で欠失が検出された (Fig. 3)。逆に、A\*24 および A\*23 以外では欠失は検出されなかった (Fig. 3)。HLA-A 遺伝子座のエクソン 2 およびエクソン 3 を用いて neighbor-joining (NJ) 法 (10) で系統樹を描くことにより、この欠失は A\*24 が A\*02 から分岐した後に生じたと考えられた。また、A\*23 もこの欠失が生じた後、A\*24 から分岐したと考えられた (Fig. 4)。

Break point を同定するために、long-range PCR の増幅産物の塩基配列を GenBank に登録されている 12 の欠失がない genomic clone の HLA-A から HLA-G までの配列と比較した。比較した配列と HLA-A のアリルは以下の通り: NT\_113891.2 (A\*01:01), NT\_167244.1 (A\*01:01), AC\_000138.1 (A\*02:01), NT\_167245.1 (A\*02:01), NW\_001838980.1 (A\*02:01), NC\_000006.11 (A\*03:01), NT\_007592.15 (A\*03:01), NT\_167248.1 (A\*26:01), AC\_000049.1 (A\*29:02), NT\_167246.1 (A\*29:02), NW\_923073.1 (A\*29:02), NT\_167249.1 (A\*32:01)。HLA-A 遺伝子座のテロメア側に二つの相同性が高い配列が、約 51 kb 離れて存在することが分かった。セントロメア側の相同な配列を CH (centromeric homologous sequence) 領域、テロメア側を TH (telomeric homologous sequence) と名付けた。CH 領域は HLA-A 遺

伝子座から 1.3 kb, TH 領域は HLA-A 遺伝子座から 56.1 kb, HLA-G 遺伝子座から 51.6 kb 離れていた (Fig. 1A)。

Dot plot よりこれらの領域と long-range PCR の増幅産物の塩基配列との比較を行った。TH 領域では HLA-A\*03:01 (NC\_000006.11) のものが、CH 領域では HLA-A\*32:01 (NT\_167249.1) のものが最も高い相同性を示した。それらの dot plot を、RepeatMasker で同定した反復配列とともに、Figure 5 に示した。long-range PCR の増幅産物の塩基配列はテロメア側が HLA-A\*03:01 (NC\_000006.11) の TH 領域と高い相同性を示し、セントロメア側は HLA-A\*32:01 (NT\_167249.1) の CH 領域と高い相同性を示した。さらに、TH 領域で相同性が高い領域の 3' 末端側にある MLT1F1 反復配列、CH 領域で相同性が高い領域の 5' 末端側にある MLT1F1 反復配列の 23 塩基 AAGCAGCCCTGCAGGAAGGTCCA が HLA-A\*03:01 (NC\_000006.11) の TH 領域と HLA-A\*32:01 (NT\_167249.1) の CH 領域とで共通していた。これらの結果は、A\*03- と A\*32- (ancestral) haplotypes の TH 領域内 MLT1F1 と CH 領域内中 MLT1F1 で共通した 23 塩基 AAGCAGCCCTGCAGGAAGGTCCA 内で組換えがおこり、50 kb の欠失が生じたことを示唆する。

#### D. 考察

血清学的な A24 あるいは A\*24:02 を有する HLA-A 遺伝子座近傍の大規模欠失は 1990 年代にいくつかのグループから報告されていたが (4-7)、その break point は今日まで同定されていなかった。我々は break point を挟む領域を long-range PCR で増幅し、その正確な位置を決定した。A\*24:02 のホモ接合体から得られた Break point を挟む領域の long-range PCR 産物は 3.7 kb の大きさであったが、反復配列を多く含んでいた。この増幅産物と相同性が高い配列が、欠失をもたない HLA-A ハプロタイプでは、約 50 kb 離れて 2 カ所に存在していた。これらを TH (テロメア側) と CH (セントロメア側) 領域と名付けたが、欠失は TH 領域と CH 領域間での相同組換えにより生じたと考えられる。さらに A\*24:02 以外の A\*24 アリルである、A\*24:04, A\*24:07, A\*24:08, and A\*24:20 および A\*23:01 にも欠失が存在していた。よって、これらのアリルは TH 領域と CH 領域での相同組換えの後に生じたと思われる。

Dot plot による塩基配列の比較から、A\*24:02 のホモ接合体から得られた Break point を挟む領域の long-range PCR 産物は、その テロメア 側 が HLA-A\*03:01 (NC\_000006.11) の TH 領域と最も高い相同性を示し、セントロメア側は HLA-A\*32:01 (NT\_167249.1) の CH 領域と最も高い相同性を示した。さらに、この二つの領域の反復配列 MLT1F1 に存在する 23 bp の塩基配列 AAGCAGCCCTGCAGGAAGGTCCA が共通していた。これらのことから、相同組換えは A\*03:01 の TH 領域と A\*32:01 に存在する 23 bp の配列内で生じたと推定される (Fig. 6)。最も多型性を示すエクソン2とエクソン3を用いて系統樹を描いた場合、A\*02 が A\*24:02 に最も近いが (Fig. 4)、CH 領域に近いエクソン2だけを用いて系統樹を描くと A\*02 よりも A\*32:01 がより A\*24:02 に近い。このことも上述の、A\*24 を有する HLA-A 遺伝子座近傍の欠失は、A\*03:01 の TH 領域と A\*32:01 に存在する 23 bp の配列内での相同組換えにより生じた、という仮説を支持する。

A\*24:02 のエクソン 3 の塩基配列は A\*32:01 よりも A\*02:01 に近い。よって、ancestral A\*24 ハプロタイプと A\*02 ハプロタイプのイントロン2からエクソン3の間で第二の相同組換えが生じたと考えられる。あるいは、A\*32:01 と A\*02:01 ハプロタイプで double-crossover (11, 12) が生じたというモデルも考えられる。これらの検証には関連した HLA ハプロタイプのゲノムの塩基配列解析が必要である。

#### E. 文献

1. Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, Ollier WE (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 32:903-7
2. Wandstrat A, Wakeland E (2001) The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes. *Nat Immunol* 2: 802-809
3. Ochi T, Iwase R, Yonemasu K, Matsukawa M, Yoneda M, Yukioka M, Ono K (1988) Natural course of joint destruction and fluctuation of serum C1q levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:37-43
4. el Kahloun A, Vernet C, Jouanolle AM, Boretto J, Mauvieux V, Le Gall JY, David V, Pontarotti P (1992) A continuous restriction map from HLA-E to HLA-F. Structural comparison between different HLA-A haplotypes. *Immunogenetics* 35:183-9
5. Geraghty DE, Koller BH, Hansen JA, Orr HT (1992) The HLA class I gene family includes at least six genes and twelve pseudogenes and gene fragments. *J Immunol* 149:1934-46
6. Venditti CP, Chorney MJ (1992) Class I gene contraction within the HLA-A subregion of the human MHC. *Genomics* 14:1003-9.
7. Watanabe Y, Tokunaga K, Geraghty DE, Tadokoro K, Juji T (1997) Large-scale comparative mapping of the MHC class I region of predominant haplotypes in Japanese. *Immunogenetics* 46:135-41
8. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80
9. Smit AFA, Hubley R, Green P (RepeatMasker at <http://repeatmasker.org>)
10. Saitou N, Nei M (1986) The number of nucleotides required to determine the branching order of three species, with special reference to the human-chimpanzee-gorilla divergence. *J Mol Evol* 24:189-204



## F. 研究発表

### 1. 論文発表

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. 学会発表

- 16) 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.
- 17) 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 回日本組織適合性学会大会（東京）2010.
- 18) 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

Table 1. *HLA* alleles in arthritis mutilans

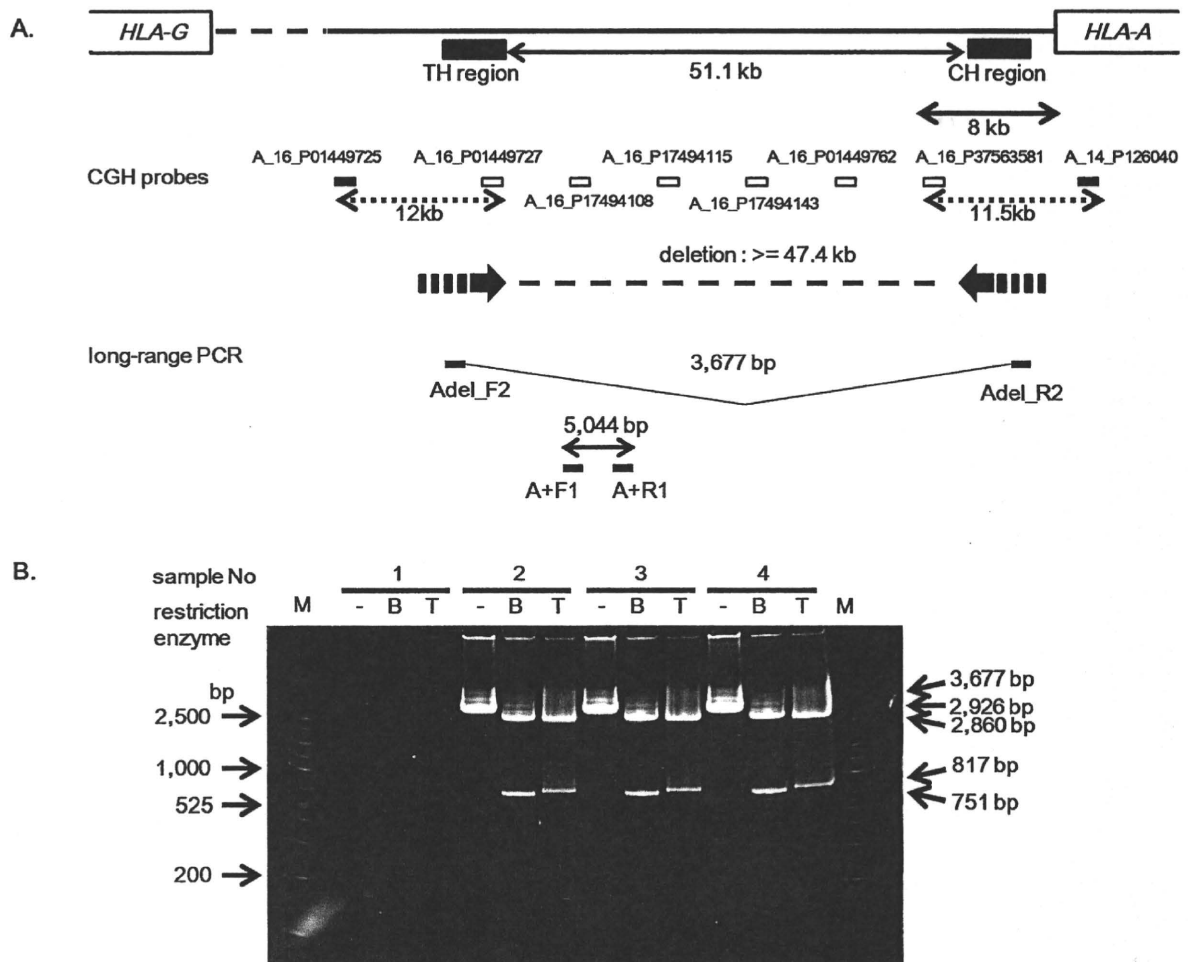
ID	HLA-A		HLA-B		DRB1	
RA_M1	*24:02		*52:01	*59:01	*04:05	*15:02
RA_M2	*24:02	*26:02	*40:01	*40:06	*04:05	*09:01
RA_M3	*24:02		*52:01	*59:01	*04:05	*15:02
RA_M4	*24:02		*35:01	*40:02	*09:01	*15:01
RA_M5	*02:01	*24:02	*35:01	*52:01	*09:01	*15:02
RA_M6	*11:01	*24:02	*48:01	*54:01	*04:05	*09:01
RA_M7	*24:02		*40:02	*52:01	*04:05	*15:02
RA_M8	*11:01	*24:02	*40:01	*40:06	*04:05	*09:01
RA_M9	*24:02	*33:03	*44:03	*51:01	*09:01	*15:02
RA_M10	*24:02	*31:01	*07:02	*35:01	*01:01	*14:01
RA_M11	*02:06	*24:02	*15:11	*48:01	*04:05	*04:07
RA_M12	*02:01	*26:03	*40:01	*51:01	*09:01	*12:01

Table 2. Primers used in this study

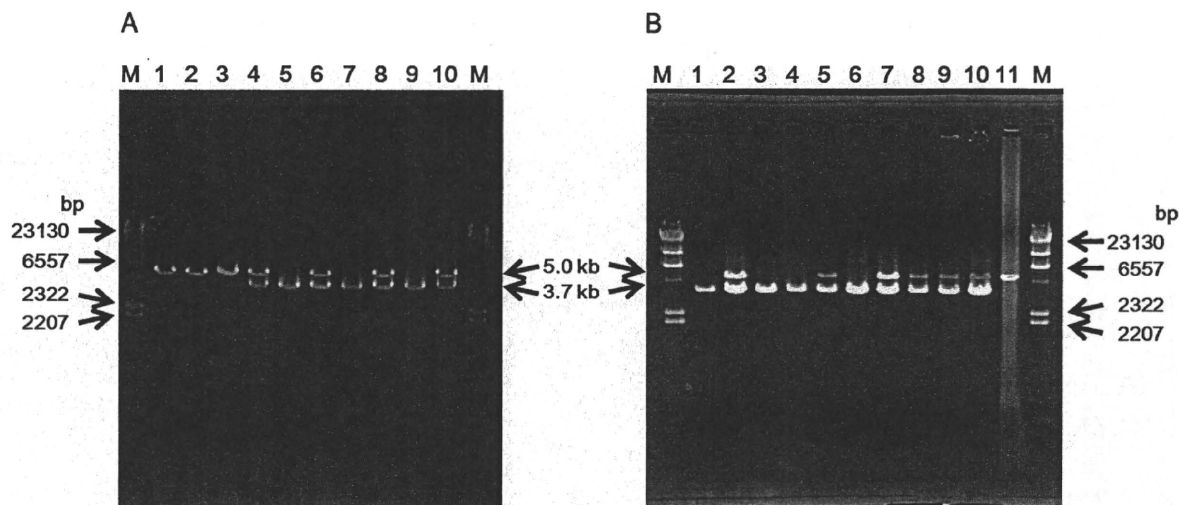
Primer name	Sequence 5'-3'	Position in NC_000006.11
Adel_F2	5'-CAGTGAACAGACATCCTACAGAATGGGAGA-3'	29850471-29850500
Adel_R2	5'-CCCATGACCTGCTACGTAAGTCTTTTC-3'	29908962-29908991
A+F1	5'-CTATAATATCGCCCTCCCTCTGGTCTTGAG-3'	29856608-29856637
A+R1	5'-TGTTGTCCAATCCTATCCCCTAAAAGGAAC-3'	29861622-29861651

Table 3. Repetitive sequences in the boundary region across the deletion: RepeatMasker analysis of the PCR product from RA-M7

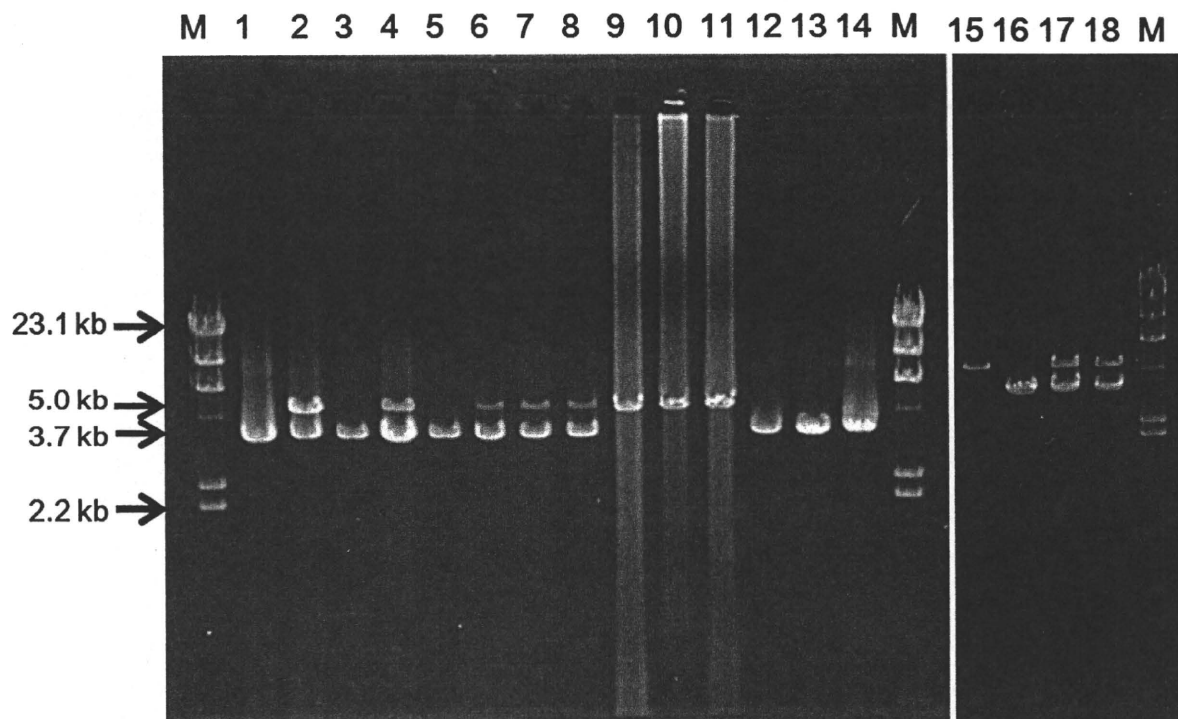
Position in RA-M7		strand	% div.	Position in repeat		Name	Family	Class
begin	end			begin	start			
2	963	+	8.9	5193	6163	L1PA10	L1	LINE
1052	1150	+	22.0	6	103	MLT1F1	ERVL-MaLR	LTR
1151	1532	+	14.2	1	375	THE1C	ERVL-MaLR	LTR
1533	1977	+	22.0	104	561	MLT1F1	ERVL-MaLR	LTR
2055	2334	-	21.8	1	287	AluJo	Alu	SINE
2340	2488	+	31.1	2230	2389	Charlie9	hAT-Charlie	DNA
2498	2783	+	23.1	3	302	MLT1E3	ERVL-MaLR	LTR
2784	3090	+	9.4	1	304	AluY	Alu	SINE
3091	3347	+	23.1	303	573	MLT1E3	ERVL-MaLR	LTR
3581	3629	-	20.4	2813	2865	L2	L2	LINE



**Figure 1** PCR amplification of the boundary region across the deletion near the HLA-A locus with the *HLA-A\*24:02* allele. **A**, Schematic illustration of the deleted region around the HLA-A gene. Closed boxes indicate positive probes in the array CGH analysis of *A\*24:02*. Open boxes indicate negative probes in the array CGH analysis of *A\*24:02*. The boundary region with a mosaic fragment between the TH and CH regions, which are highly homologous to each other, was amplified across the break point in long-range PCR using the Adel\_F2 and Adel\_R2 primers from *A\*24:02*. **B**, SDS-PAGE patterns of the PCR products using the primers Adel\_F2 and Adel\_R2. “-” indicates the absence of the restriction enzyme. “B” and “T” indicate *BsrD1* and *Taq1* digests, respectively. M, DNA size marker; 50 bp - 2500 bp ladder.



**Figure 2** Duplex PCRs using two PCR primer pairs discriminating between the deletion-positive and -negative genomic DNAs. Smaller bands correspond to the PCR product from the haplotype carrying the deletion, and larger bands correspond to the haplotype not carrying the deletion. **A**, SDS-PAGE pattern of duplex PCR product using healthy individual DNAs. M, molecular size marker,  $\lambda$ -DNA/Hind III digest; 1, *A\*02:07*, *A\*33:03*; 2, *A\*02:06*, *A\*02:07*; 3, *A\*26:02*, *A\*33:03*; 4, *A\*24:02*, *A\*31:01*; 5, *A\*24:02* homozygote; 6, *A\*24:02*, *A\*16:01*; 7, *A\*24:02* homozygote; 8, *A\*24:02*, *A\*26:01*; 9, *A\*24:02* homozygote; 10, *A\*02:01*, *A\*24:02*. **B**, SDS-PAGE pattern of duplex PCR products using arthritis mutilans DNAs. M, molecular size marker,  $\lambda$ -DNA/Hind III digest; 1, *A\*24:02* homozygote; 2, *A\*24:02*, *A\*26:02*; 3, *A\*24:02* homozygote; 4, *A\*24:02* homozygote; 5, *A\*11:01*, *A\*24:02*; 6, *A\*24:02* homozygote; 7, *A\*11:01*, *A\*24:02*; 8, *A\*24:02*, *A\*33:03*; 9, *A\*24:02*, *A\*31:01*; 10, *A\*02:06*, *A\*24:02*; 11, *A\*02:02*, *A\*26:03*.



**Figure 3** The deletion related to *A\*24:02* observed in the *A\*24* and *A\*23* allele groups. All genomic DNAs were obtained from healthy individuals. M, DNA size marker,  $\lambda$ -DNA/Hind III digest; 1, *A\*24:02* homozygote; 2, *A\*24:02*, *A\*31:01*; 3, *A\*24:02*, *A\*24:20*; 4, *A\*02:02*, *A\*24:20*; 5, *A\*24:02*, *A\*24:08*; 6, *A\*02:06*, *A\*24:08*; 7, *A\*01:01*, *A\*24:02*; 8, *A\*01:01*, *A\*24:02*; 9, *A\*02:01*, *A\*26:02*; 10, *A\*01:01*, *A\*02:06*; 11, *A\*26:01*, *A\*32:01*; 12, *A\*24:02*, *A\*24:04*; 13, *A\*24:02*, *A\*24:04*; 14, *A\*24:02*, *A\*24:07*; 15, *A\*02:07*, *A\*11:01*; 16, *A\*24:02* homozygote; 17, *A\*01:01*, *A\*23:01*; 18, *A\*02:02*, *A\*23:01*.

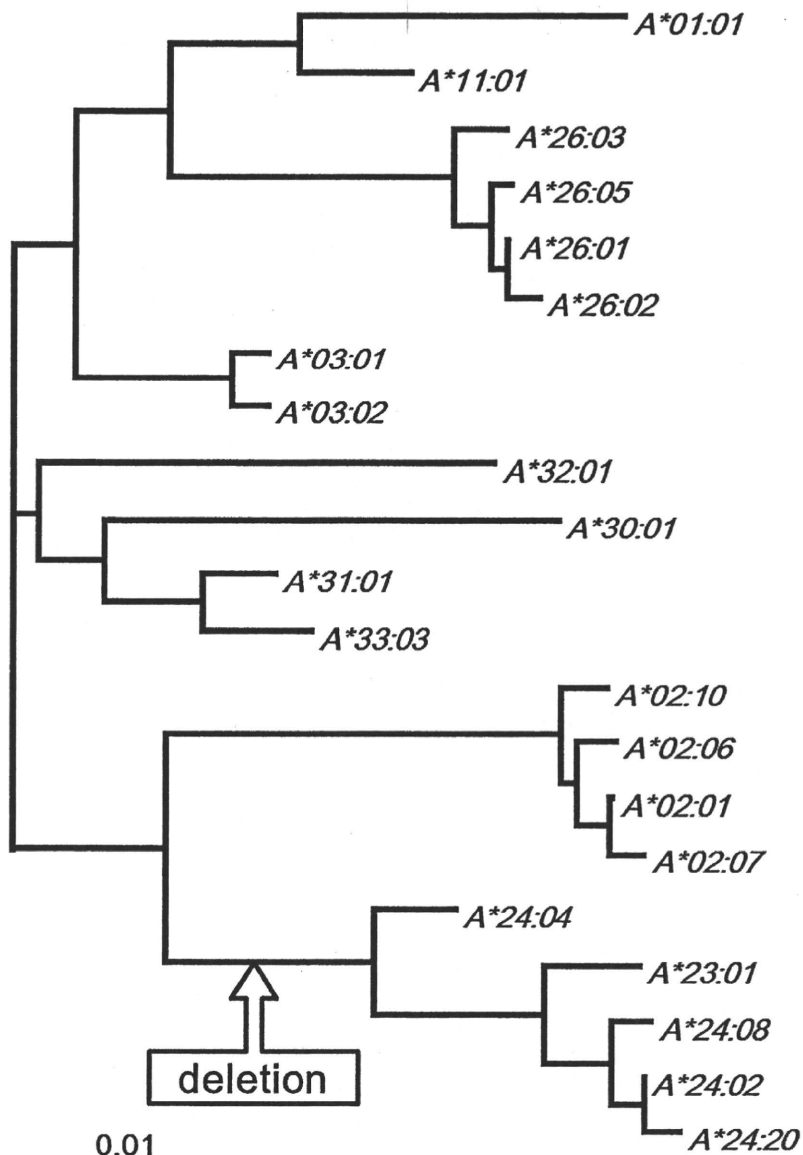
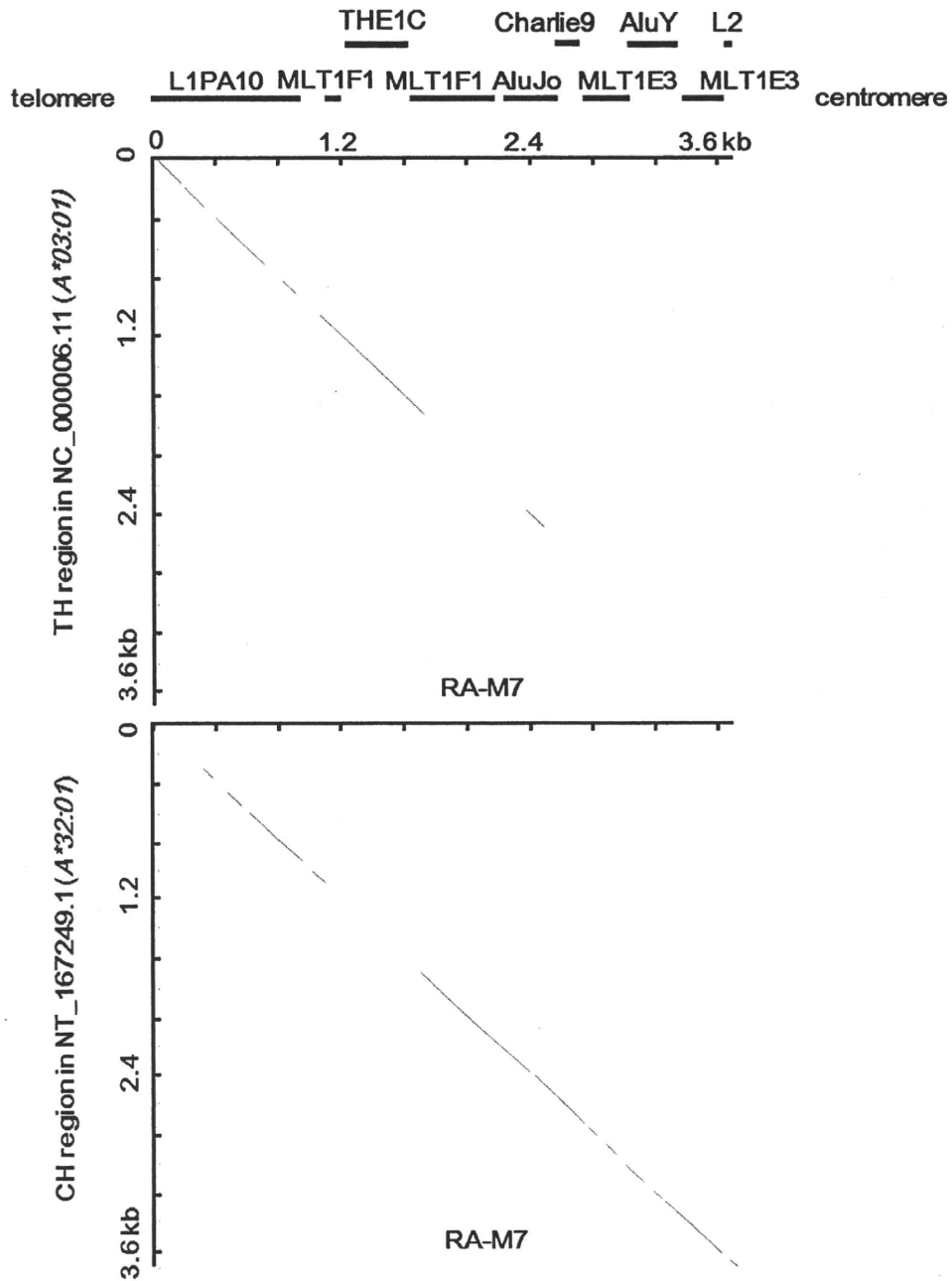


Figure 4  
tree of  
alleles  
by the

0.01

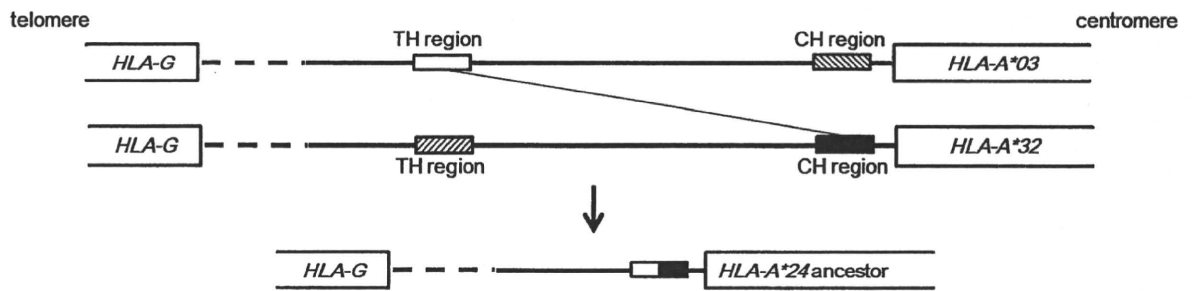
A  
phylogenetic  
HLA-A  
constructed

neighbor-joining (NJ) method using the sequences of exons 2 and 3. It was noted that all of the A\*24 alleles, such as A\*24:02, A\*24:04, A\*24:07, A\*24:08, A\*24:20, and A\*23:01 are deletion-positive, and all of the alleles in groups other than A\*24, such as A\*01:01, A\*11:01, A\*02:01, A\*02:02, A\*02:06, A\*02:07, A\*02:10, A\*26:01, A\*26:02, A\*26:03, A\*31:01, and A\*33:03, are deletion-negative as assessed by duplex long-range PCR.



**Figure 5** Comparison of nucleotide sequences of the long-range PCR product from RA-M7 (HLA\*24:02 homozygote), which contains the boundary regions across the deletion, with those of HLA-A\*03:01 (NC\_000006.11) and those of HLA-A\*32:01 (NT\_167249.1). The upper dot plot was drawn by the comparison of RA-M7 with the TH region of HLA-A\*03:01 (NC\_000006.11). The lower dot plot was drawn by the comparison of RA-M7 with the CH region of HLA-A\*32:01 (NT\_167249.1). Repetitive sequence names and their positions in RA-M7, which were analyzed by RepeatMasker, are indicated above the dot plots.





**Figure 6** Schematic illustration model for genetic recombination explaining the generation of the deletion near the HLA-A locus with the A\*24 and A\*23 haplotypes. A single crossover event between the TH region of the HLA-A\*03 haplotype and the CH region of the HLA-A\*32 haplotype resulted in the generation of the deletion.

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

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

研究協力者	國井 七絵	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	奨励研究員
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
研究協力者	鈴木 康夫	東海大学医学部内科学系リウマチ内科	教授
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	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

全ゲノム関連解析 (GWAS) 等により、これまでに多数の関節リウマチ (RA) 感受性遺伝子が報告されている。しかし、これらにより説明可能な RA の遺伝的要因はまだ数%である。この原因のひとつとして GWAS では検出できない 希少変異 (rare variant) の存在が考えられる。よって、これまで報告されている RA 感受性遺伝子の rare variant 探索を行った。

報告されている RA 感受性遺伝子から 26 遺伝子を選び、その全エクソンおよび 5'UTR、3'UTR、イントロンを long-range PCR で増幅し、イルミナ社 Genome Analyzer GAIIx により塩基配列を解析し、報告されている塩基配列と比較して rare variant を探索した。対象は RA で重度の関節破壊がおこるムチランス型 RA11 例を用いた。

いくつかの非同義置換が見いだされたが、RA 患者に特徴的な非同義置換、あるいはひとつの遺伝子での、異なる位置に存在する非同義置換の集積は見いだせなかった。また、5'UTR、3'UTR およびイントロンにも RA 患者に特徴的な変異や、変異の集積は見いだせなかった。今後全エクソンを対象にした exome 解析を行う等、解析対象範囲を広げる必要があると考えられた。

A. 研究目的

関節リウマチ (RA: Rheumatoid Arthritis) は、世界的に広く分布する疾患であり、自己免疫機序が原因としてあげられているものの、未知な部分が多い。疫学研究、双生児研究、家系研究などの結果から、複合遺伝子性疾患であると考えられ、一卵性双生児における発症の一致率等から、RA の発症リスクは 60%程度が遺伝的要因であり、その 1/3 は HLA によると考えられている (1)。近年、多因子疾患の関連遺伝子同定には SNP やマイクロサテライトのような多型マーカーを用いた関連解析が行われてきた。特に、最近では数十万～100万程度の DNA プローブを固定した DNA マイクロアレイを用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、様々な疾患感受性遺伝子が明らかにされてきた。

しかし、DNA マイクロアレイに固定されている SNP プローブは、通常遺伝子頻度が 5% 以上のものであり、それよりも低い遺伝子頻度の SNP は原理的に検出できない。また、tagSNPs を用いる間接 LD マッピングでは、rare variant (5% よりも頻度が低い希少変異) と tagSNPs に頻度差があるため連鎖不平衡が弱く、検出力は低い。GWAS により現在までに同定された HLA 以外の RA 感受性遺伝子では、遺伝的要因の 3.6%程度しか説明できないと報告されている (2)。よって、遺伝子頻度が 5% 以下のレアバリエーションの探索が必要であり、次世代シーケンサを用いて、患者群と健常者群で塩基配列の比較解析を行うことは有力な方法であると考えられる。

しかし未だコストの面から患者と健常者

各個人のゲノムをすべて解読し比較することは困難である。よって、GWAS により同定され、報告されている疾患感受性遺伝子の塩基配列の解析が有力な方法である。実際に、最近、1型糖尿病の感受性(候補)遺伝子10種の全エクソンの塩基配列を、通常のPCRで増幅し480人の患者と480人の健常者で比較解析して、4種類の稀少変異を同定したとの報告がなされている(3)。1型糖尿病で行われたように、これまでに報告されたRA感受性遺伝子で2つ以上の集団で再現できているものを中心に候補遺伝子を選定し、リシーケンシングによりrare variantの探索を行うこととした。対象としては、RAの中でも関節破壊の進行が早くもつとも重篤であり、その遺伝要因が注目されているムチランス型を選んだ。

## B. 研究方法

我々及び他グループよりRA感受性遺伝子として報告され、2つ以上の集団で再現されているものを中心に26遺伝子(*FCRL3*, *NOTCH4*, *PADI4*, *PTPN22*, *STAT4*, *REL*, *SLC22A4*, *RUNX1*, *IL23R*, *PRKCH*, *RANLK*, *MRPL48*, *RTN1*, *DCIR*, *IL3*, *IL18*, *IL4R*, *SUMO4*, *CUL1*, *FGFR2*, *EXO4*, *MHC2TA*, *CASP7*, *NFKBIL1*, *CTLA4*, *CD40*)を選定した。プロモーター領域、エクソン、イントロンを含む遺伝子の全領域をカバーする、計2.6 MbをLong-Range PCR法の系を作成した。ムチランス型11人分プールした増幅産物をIllumina社Genome Analyzer IIxの1レーンを用いてリシーケンスを行った。方法はペアエンド法(114 bp)を用いて塩基配列を決定した。各リードは26個のRA感受性遺伝子配列をリファレンスとして、BWA, SAMtoolsでマッピングし、希少多型・変異の探索を行った。特徴的な稀少変異の可能性があると考えられたものについては、サンガー法により個別検体ごとに稀少変異の有無を調べ、統計学的解析により関節リウマチとの関連を確認した。

## C. 結果

関節リウマチ感受性遺伝子として報告されている26遺伝子のリシーケンシングを行ったが、RA患者に特徴的な非同義置換は見いだせなかった(Table 1, 2)。プロモーター領域(上流300 bp以内)、5'UTR、

3'UTR およびイントロンにもRA患者に特徴的な変異は見いだせなかった。CASP7の第1エクソン上流300~330 bpにSNPの集積がみられたが(Fig. 1)、この領域にDNA結合蛋白質のモチーフは見いだせなかった。Long-Range PCR法を用いてrare variantの探索を行った遺伝子について、SNPは検出されたが(Fig. 1)ひとつの遺伝子でSNPが集積しているもの、また健常人コントロールとRA患者において差があるものは検出されなかった。(Table 2)

## D. 考察

これまでに報告され、他グループによる再現研究が行われているものを中心に選択したRA感受性遺伝子26種類において、rare variantによるRAに特徴的な非同義置換、あるいは非翻訳領域におけるrare variantの集積を検出することはできなかった。今後、対象遺伝子の範囲を広げ、全エクソンを対象としたexome解析のような手法でのrare variant探索が必要であると考えられた。

## E. 文献

1. 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.* 43, 30-37 (2000).
2. Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, Hackett R, Guiducci C, Burt NP, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 2008;40:1216-23.
3. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science.* 2009;324:387-9.

## 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

- 1) 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回日本組織適合性学会大会（東京）2010.
- 2) 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