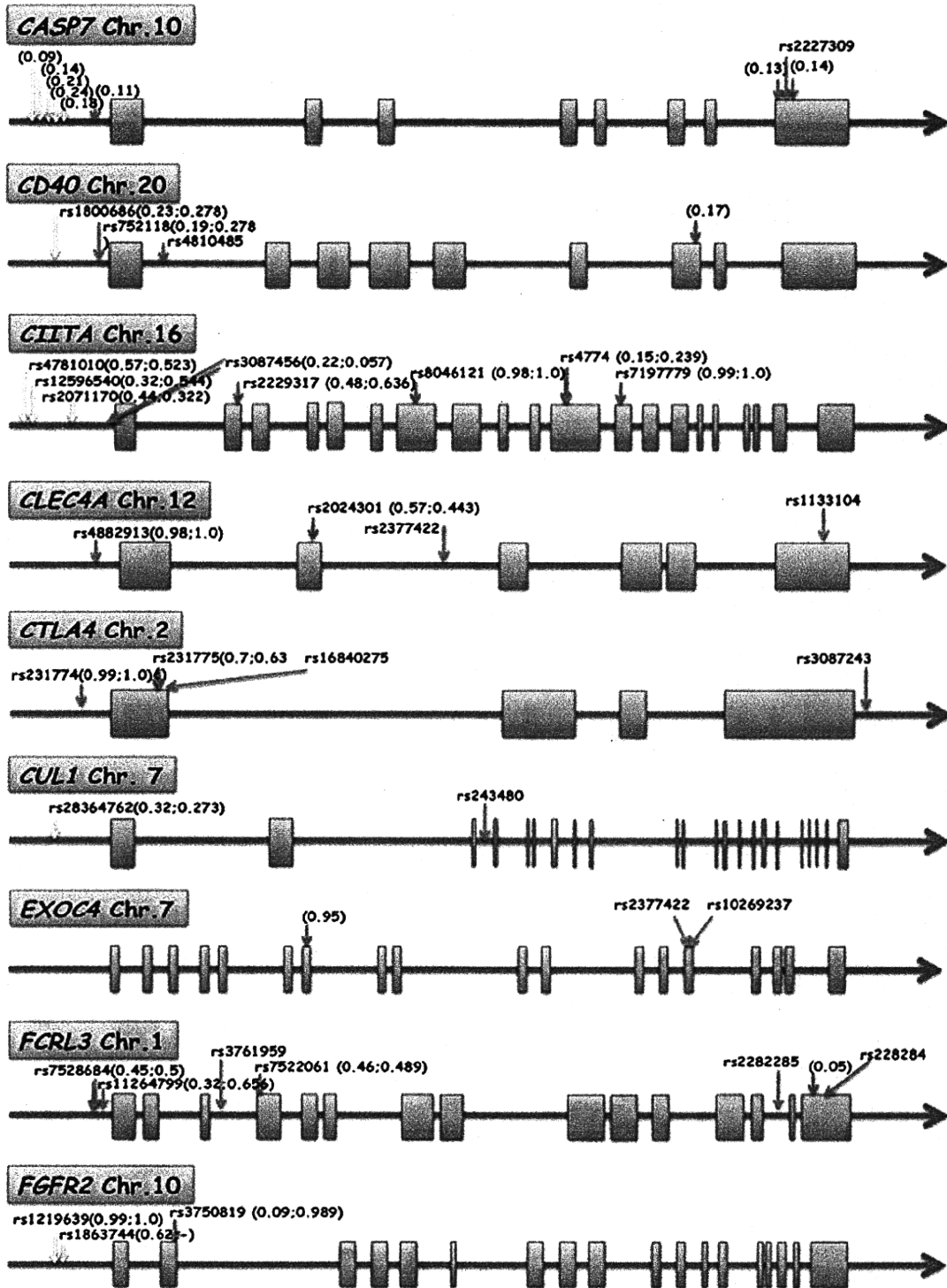


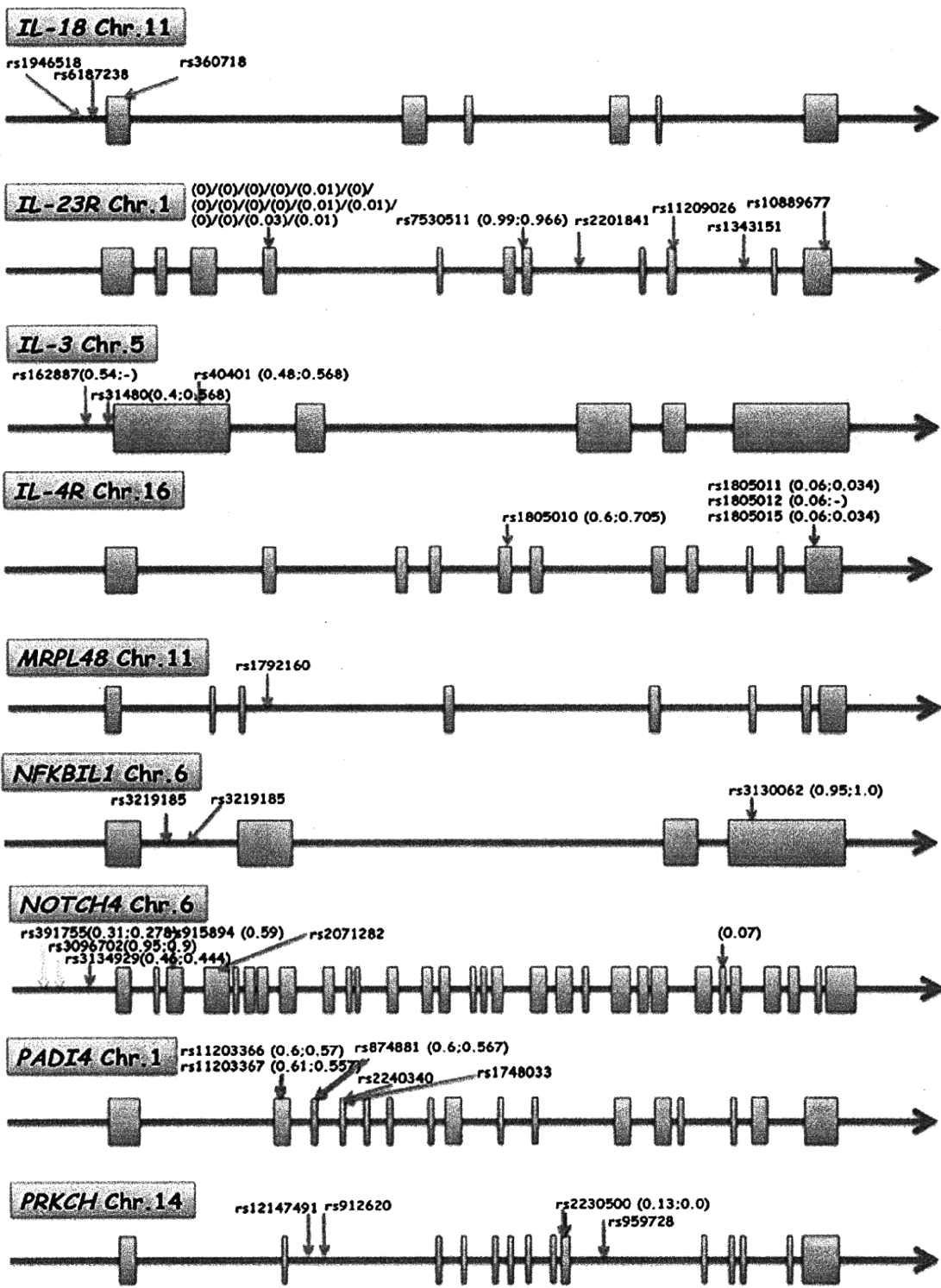
Table 1. 関節リウマチ感受性遺伝子のリシーケンシングにより検出された SNP

遺伝子	非同義置換			同義置換			第1エクソン上流			5'UTR			3'UTR			イントロン		
	合計	新規SNP	既知SNP	合計	新規SNP	既知SNP	合計	300bp以内	600bp以内	合計	新規SNP	既知SNP	合計	新規SNP	既知SNP	合計	新規SNP	既知SNP
CASP7	2	2	0	1	1	0	6	1	5	3	3	0	2	2	0	88	88	0
CD40	1	1	0	0	0	0	2	1	1	1	0	1	0	0	0	19	2	17
CITTA	4	0	4	2	0	2	4	1	3	0	0	0	2	1	1	133	20	113
CLEC4A	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	20	0	20
CTLA4	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	6	0	6
CUL1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	8	86
EXOC4	1	1	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	487	286	201
FCRL3	2	1	1	0	0	0	2	2	0	1	0	1	3	0	3	38	10	28
FGFR2	1	0	1	2	0	2	2	0	2	0	0	0	1	0	1	189	10	179
IL18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	29	22	7
IL23R	17	16	1	3	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	185	65	120
IL3	1	0	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	1	0	2	1	1
IL4R	4	0	4	2	0	2	0	0	0	0	0	0	5	3	2	49	3	46
MRPL48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0	2	157	5	152
NFKBIL1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	15	16
NOTCH4	2	1	1	9	2	7	3	1	2	2	1	1	0	0	0	69	5	64
PADI4	3	0	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	189	16	173
PRKCH	1	0	1	3	0	3	0	0	0	0	0	0	4	1	3	282	14	268
PTPN22	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	2	38
REL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	4
RTN1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	252	198	54
RUNX1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	16	15
SLC22A4	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	111	7	104
STAT4	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	181	22	159
SUJMO4	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TNFSF11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	66	3	63
合計	45	22	23	28	7	21	26	11	15	11	6	5	28	9	19	2752	818	1934

Table 2. サンガー法により確認した SNP

遺伝子名	Chr.	位置	dbSNP flag	健康人コントロール		RA	
				N	遺伝型	N	遺伝型
CLEC4A	12	8278181	rs2024301	11	A/A:A/T:T=3:7:1 A:T=13:9 (A=0.59,T=0.41)	15	A/A:A/T:T=5:9:1 A:T=19:11 (A=0.63,T=0.37)
IL4R	16	27356203	rs1805010	11	A/A:A/G/G=1:6:4 A:G=8:14 (A=0.36,G=0.64)	-	-
IL3	5	131396478	rs31480	11	C/C:C/T:T=2:5:4 C:T=9:11 (C=0.41,T=0.59)	15	C/C:C/T:T=3:10:2 C:T=16:14 (C=0.54,T=0.46)
CASP7	10	115457264	indel	12	T/T:T/G:G=12:0:0 T:G=24:0 (T=1.0,G=0.0)	15	T/T:T/G:G=15:0:0 T:G=30:0 (T=1.0,G=0.0)





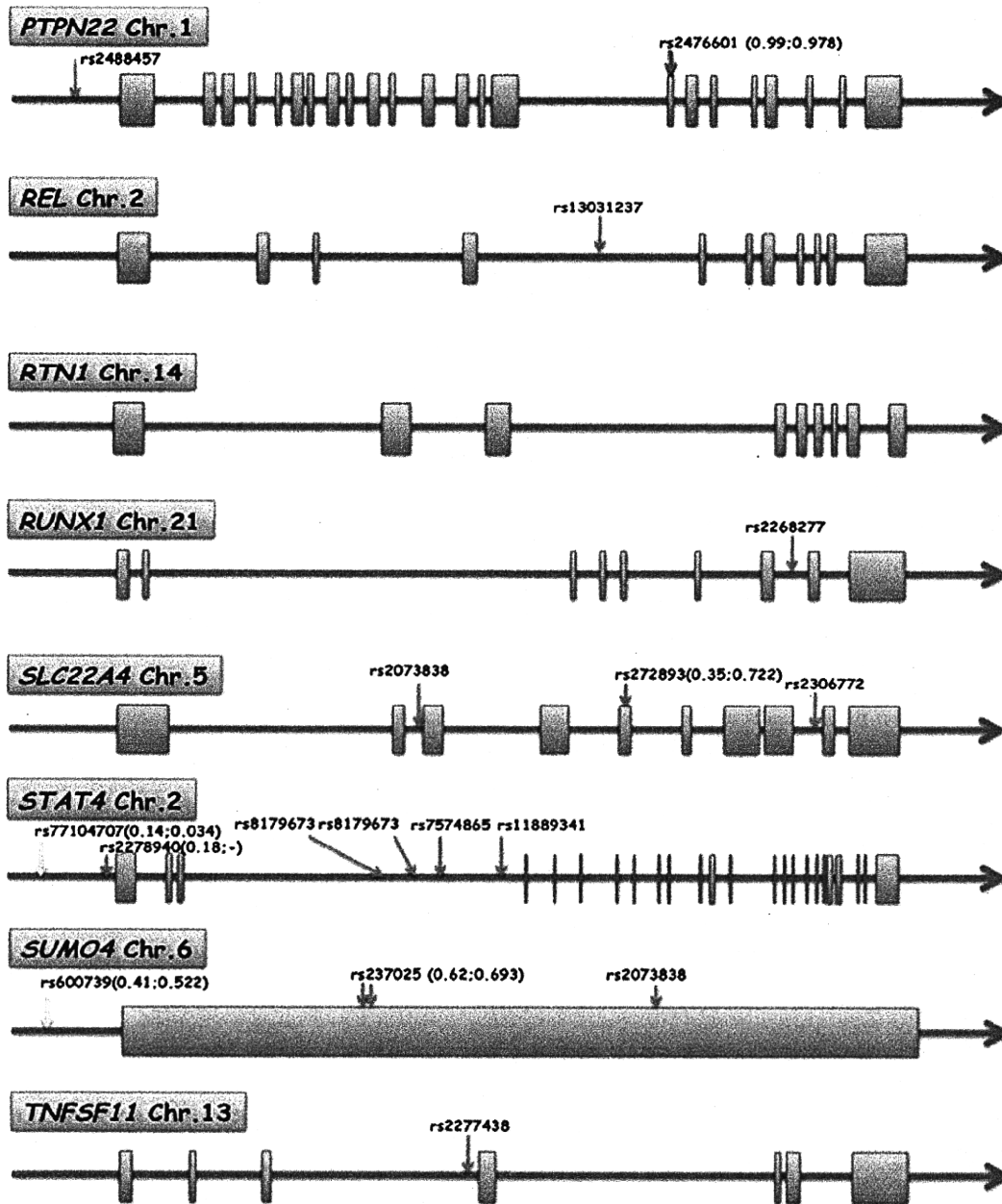


Figure 1 26 遺伝子で検出された SNP。括弧内は（シーケンスデータの頻度、HapMap での頻度）を示す。

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

等温増幅法による多型解析法の開発に関する研究

分担研究者	光永 滋樹	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	教授
協力者	奥平 裕子	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	
協力者	吉川 枝里	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	
分担研究者	太田 正穂	信州大学医学部法医学	准教授
分担研究者	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

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

Human leukocyte antigens (HLA) は関節リウマチ (RA) や全身性エリテマトーデス (SLE) のような自己免疫疾患を中心とした様々な疾患 (1,2)、あるいはスティーブン・ジョンソン症候群や肝障害のような重篤な医薬品副作用 (3, 4) との関連が報告されている。また、single nucleotide polymorphism (SNP) のような多型が多因子疾患 (5)、あるいは薬剤応答性 (6,7) に関与していることもよく知られている。

本研究では「関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール」に必要な HLA や SNP の情報を提供するための遺伝子検査システムの開発を目的としている。RA は多因子疾患であり、発症の原因は遺伝要因が約6割であり、その1/3は HLA であるといわれている (8)。そのため、必要となる遺伝子検査システムは、HLA 特に DRB1 と SNP を同時に、同一プラットフォーム上で解析できる必要がある。さらに、特殊な機器を必要とせず、医療機関全般で使われ得ることが望ましい。以上を勘案し等温増幅でマルチプレックス化可能な方法の開発を行った。

本研究で開発した遺伝子検査システムは関節リウマチだけでなく、他の疾患や医薬品副作用、応答性の予測にも使われ得ると考えられる。

B. 研究方法

1) DNA 検体

文書によるインフォームドコンセントを取得した関節リウマチ患者または健常人から得た末梢血から QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) あるいは Quick-Gene 610L and QuickGene DNA whole blood kit L (FUJIFILM, Tokyo, Japan) を用いて DNA を抽出し、以後の研究に用いた。あるいは同様に文書によるインフォームドコンセントを取得した健常人から得た末梢白血球を EBV で不死化した B-LCL から QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) により DNA を抽出した。

2) HLA の genotyping

PCR-SSOP-Luminex 法 (9) (LABTyping 101, VERITAS, Tokyo, Japan、またはジェノサーチ HLA-DRB1 Ver.2, MBL, Nagoya, Japan) あるいは Sequence based typing (SBT) 法

(AlleleSEQR HLA, Abbott Japan) を用いて行った。

3) SNP の genotyping

イルミナ社の Beads Express を用いた GoldenGate-assay により行った。一部は対象とする SNP を含む領域を PCR で増幅後、direct sequencing により遺伝子型を決定した。

4) プライマーおよびプローブデザイン

プライマーおよびプローブは Nearest neighbor method (10) により T_m を計算し、等温増幅反応の温度である 65°C 付近になるようにした。また、プライマーの F2 および F3 の 3'末端近傍、F1 の 5'末端近傍に多型領域がくるようにプライマーを設計した。プローブは 5'末端を C6 アミノ化してプラスチック基板に固定した。

5) 等温増幅反応(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP 反応)

20 ng の DNA を含む全量 20 μL の反応液で LAMP (11) を行った。プラスチック基板上での LAMP の場合以外は、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。

6) プラスチック基板上での等温増幅反応

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。

7) 倫理的配慮

本研究は東海大学医学部の「医の倫理委員会」の承認を受け、3省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を初めとする関連ガイドラインに従い実施した。

C. 結果

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種類ある

(<http://www.bmdc.jrc.or.jp/stat.html>)。これを血清学的タイピングと同程度のresolutionになるように15群に分け、14種類のプローブを用いることにより(Table 1)15群がタイピング別可能であった(Fig. 1)。図に示すように、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。

この方法はlow resolutionであるのでDR4に属する7種類のDRB1アリル(Table 1)は区別できない。そのため日本人集団で、関節リウマチと最も強い関連を示すDRB1*04:05を特定できない。しかし、DRB1*04:05を特異的に増幅する等温増幅は可能であった(Fig. 2)。また、このDRB1*04:05特異的増幅産物をDR4特異的プローブ(RG4P)を用いてプラスチック基板上で検出することも可能であった(データは示していない)。

関節リウマチの遺伝要因はHLAが1/3程度であるが、病態進行予測のためには他の遺伝子のSNP情報が必要である。よって、本研究プロジェクトの井ノ上グループおよび岡グループから情報を得て、代表的SNPのタイピングを行った。その結果をFigure 3に示した。SNP特異的増幅が可能であり、AとTのように T_m の差が小さいものでもタイピングが可能であった。さらに、この増幅産物にサイバークリーンを滴下することにより、肉眼的にも容易に判定が可能であった(Fig. 4)。

D. 考察

本研究において、等温増幅法によりHLA-DRB1のlow resolutionタイピングが可能であることを示した。さらに、日本人集団で最も関節リウマチと強い関連を示すDRB1*04:05も特異的に増幅可能であった。DRB1の全アリルを増幅する条件とDRB1*04:05の特異的増幅条件は同じであるので、同一プラットフォーム上でタイピング可能である。これらは「関節リウマチの病型・病態進行予測ツール」に必要なHLA情報を提供するためのプロトタイプになり得ると考えられる。

我々が用いている等温増幅法(改良LAMP法)は4種類のプライマーで6種類の多型領域を認識させることが可能である。そのためHLAアリルの多型領域のシス・トランスの位置関係も区別が可能である。しかし、この方法はsingleplexであり、multiplex化のためプラスチック基板上に固定したプローブの特性でタイピングを行う

場合は、全 DRB1 アリルを増幅するプライマーを用いるので、シス・トランスの位置関係を区別できない。そのため“ambiguity”が生じる。例えば DRB1*15:01/15:02 のホモ接合体と DRB1*1501/15:02、DRB1*16:02 のヘテロ接合体はどちらも RG2P, 15cP のプローブに反応するので (Table 1) 区別できない。Ambiguity を少なくするためには、今後群特異的増幅の検討や、アリル特異的増幅との組み合わせの検討が必要である。

RA 感受性遺伝子の SNP タイピングについても、等温増幅法によるアリル特異的増幅が可能であり、それを可視化することも可能であった。さらに、等温増幅の条件は HLA と同一であるので同一のプラットフォーム上でタイピングが可能である。プラスチック基板上での SNP タイピングの場合、プラスチックプレートの熱伝導率が良くないために非特異的増幅が起こり、すべての SNP で可能にはなっていない。今後の検討課題である。

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. 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. Chen P, Lin JJ, Lu CS, Ong CT, Hsieh PF, Yang CC, et al. Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan. *N Engl J Med.* 2011;364:1126-33.
4. Hirata K, Takagi H, Yamamoto M et al. Ticlopidine-induced hepatotoxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case-control study. *Pharmacogenomics J* 2008; 8(1): 29-33.
5. The Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000

- cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661.
- Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 2009; 302: 849-57.
- Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *Pharmacogenomics J* 2007; 7: 99-111.
- Raychaudhuri S, Remmers EF, Lee AT, et al. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* 40, 1216, 2008
- Itoh Y, Mizuki N, Shimada T, Azuma F, Itakura M, Kashiwase K, Kikkawa E, Kulski JK, Satake M, Inoko H. High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics.* 2005; 57: 717-29.
- SantaLucia J Jr: A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:1460-5.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E63.

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)*
 - 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

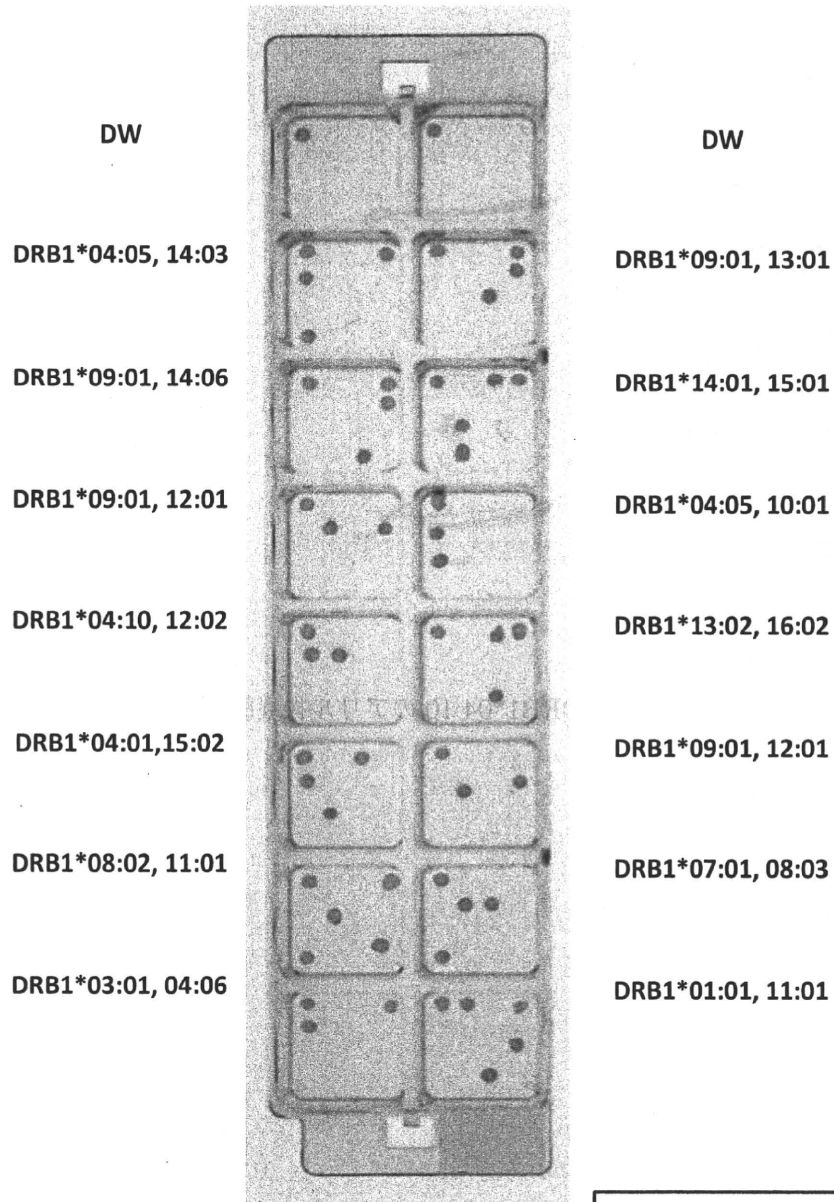
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Table 1 DRB1 アリルのグループ分けと反応するプローブ

DRB1 Allele	Probe
DRB1*01:01	RG1P, dr1406P
DRB1*15:01/02	RG2P, 15cP
DRB1*16:02	RG2P
DRB1*13:01/02	RG356P, dr13P
DRB1*11:01	RG356P, dr1101P
DRB1*14:03	RG356P, dr08P
DRB1*03:01	RG356P
DRB1*14:06	RG356P, dr1406P
DRB1*14:01/05/07/12/29	RG356P, dr1401/05/07P
DRB1*04:01/03/04/05/06/07/10	RG4P
DRB1*12:01/02	RG512.8P
DRB1*08:02/03/09	RG512.8P, dr08P
DRB1*07:01	RG7P
DRB1*09:01	RG9P
DRB1*10:01	RG10P
Positive Control	GPC

A



B

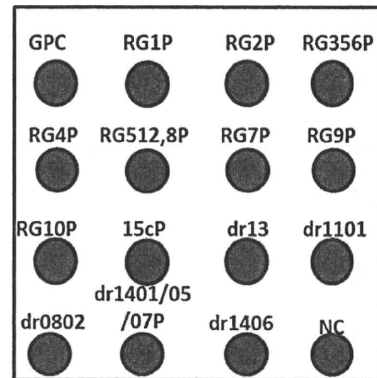


Figure 1. プラスチック基板上での等温増幅反応による HLA のタイピング。

A: 各 well は異なるサンプルで、全アレルを増幅するプライマーセットを用いて増幅を行った。
B: 固定したプローブの位置を示した。

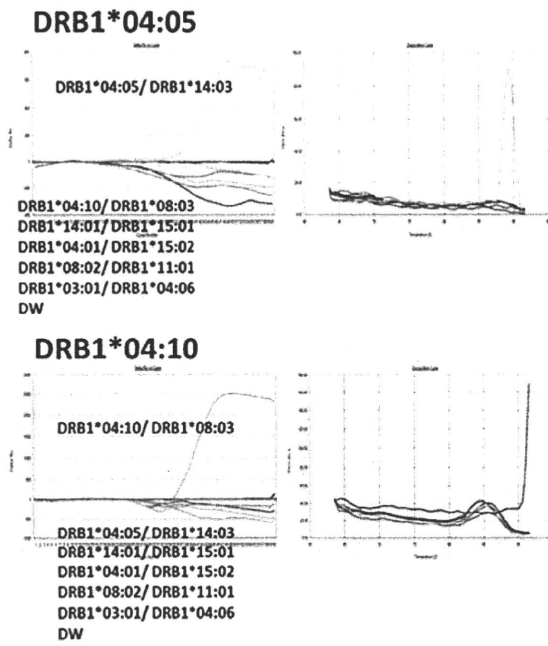


Figure 2. DRB1*04:05 および DRB1*04:10 のアレル特異的増幅。左側は増幅曲線。右側は同じものの解離曲線。

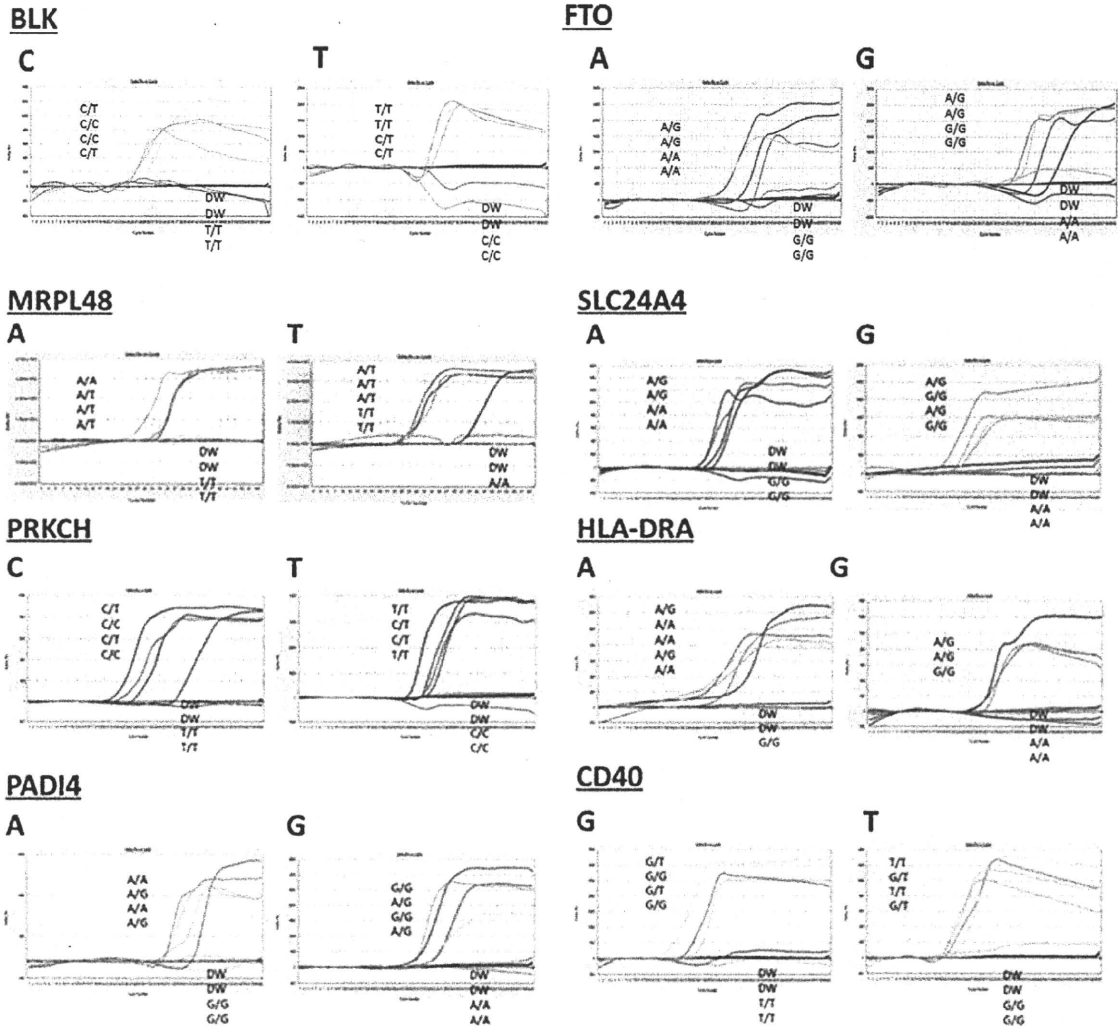


Figure 3. 等温増幅法による SNP のタイピング
 各遺伝子の SNP を SNP ごとに特異的に増幅した。遺伝子名と各 SNP の塩基は図中に示した。

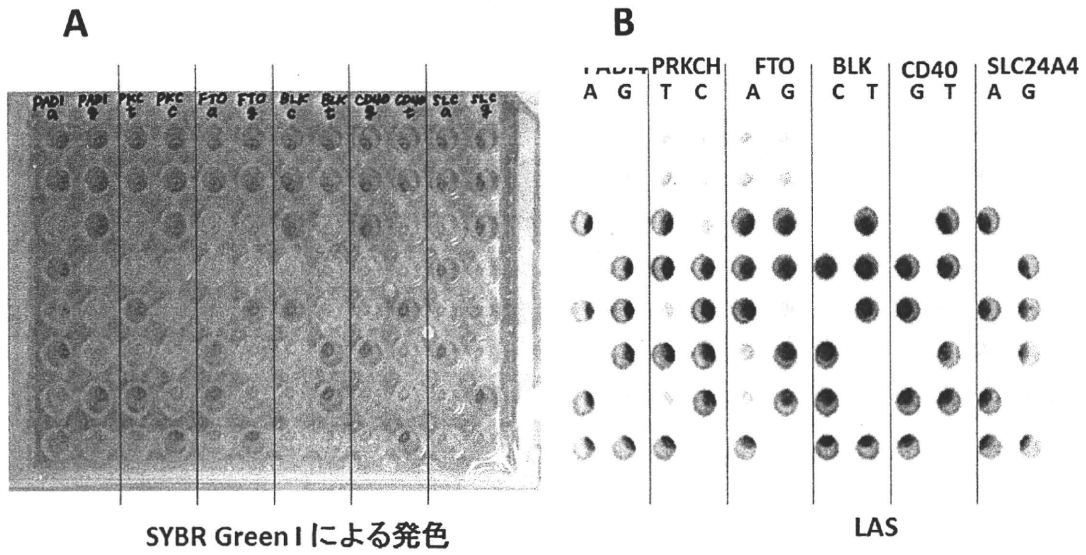


Figure 4. SNP 特異的増幅産物のサイバーグリーンによる可視化。
 A: 通常の写真。実際にはオレンジとグリーンで肉眼で容易に識別可能である。B: A と同じものを LAS (富士フィルム) を用いて SYBR Green I の蛍光を撮影したもの。A では白い well、B では黒い well が増幅した well。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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			in press
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.	<i>Immunogenetics</i>			in press
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			in press
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 (<i>Callithrix jacchus</i>)	Immunogenetics			in press
Ohtsuka, M., Miura, H., Nakaoka, H., Kimura, M., Sato, M., and Inoko, H.	Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into in vitro fertilized eggs.	Transgenic Res.			in press
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	Toll-like receptor 2 (TLR2) gene polymorphisms are not associated with sarcoidosis in the Japanese population	Mol Vis	17	731-6	2011
Ohta Y, Shiina T, Lohr RL, Hosomichi K, Pollin TI, Heist EJ, Suzuki S, Inoko H, Flajnik MF	Primordial linkage of β 2-microglobulin to the MHC	J Immunol	186	3563-71	

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	73	478-85	2011
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			In press
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	72	269-72	2011
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	131	1105-9	2011
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	131	1105-9	2011

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	16	1874-9	2010
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 (<i>Macaca fascicularis</i>) originating from the Indochinese region	Exp Anim	59	567-78	2010
Yonezawa T, Kurata R, Kimura M, Inoko H	Which CIDE are you on? Apoptosis and energy metabolism	Mol Biosyst	7	91-100	2011
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	38	E198	2010
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	11	123	2010
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	42	703-6	2010

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	30	723-33	2010
Nakaoka, H., Takahashi, T., Akiyama, K., Cui, T., Tajima, A., Kirschke, B., Kasuya, H., Hata, A., and Inoue, I.	Differential effects of chromosome 9p21 variation on subphenotypes of intracranial aneurysm: site distribution.	Stroke	8	1593-8	2010
Nakaoka, H., and Inoue, I.	The Winner's Curse.	Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd.			2010
Kurata, R., Nakaoka, H., Tajima, A., Hosomichi, K., Shiina, T., Meguro, A., Mizuki, N., Ohono, S., Inoue, I., and Inoko, H.	TRIM39 and RNF39 are associated with Behcet's disease independently of HLA-B *51 and -A *26.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	4	533-7	2010
Cui, T.L., Nakaoka, H., Akiyama, K., Kamura, H., Hosomichi, K., Bae, J., Cheong, H., Shin, H., Yada, T., and Inoue, I.	Positional effects of polymorphisms in probe-target sequences on genoplot images of oligonucleotide microarrays.	Genet. Mol. Res.	1	524-31	2010
Akiyama, K., Narita, A., Nakaoka, H., Cui, T., Takahashi, T., Yasuno, K., Tajima, A., Kirschke, B., Yamamoto, K., Kasuya, H. et al.	Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms.	J. Hum. Genet.	10	656-61	2010
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	医学の歩み	236	667-74	2011
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--	日本臨床	68 増刊 号 8	93-9	2010
光永滋樹、猪子英俊	Genome 情報と薬剤応答				

IV. 研究成果の刊行物・別刷

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

Shigeki Mitsunaga · Yuko Okudaira · Nanae Kunii · Tailin Cui · Kazuyoshi Hosomichi · Akira Oka · Yasuo Suzuki · Yasuhiko Homma · Shinji Sato · Ituro Inoue · Hidetoshi Inoko

Received: 19 December 2010 / Accepted: 25 February 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract In a structural aberration analysis of patients with arthritis mutilans, a 50 kb deletion near the *HLA-A* locus with *HLA-A*24:02* allele was detected. It was previously reported that *HLA-A*24:02* haplotype harbored a large-scale deletion telomeric of the *HLA-A* gene in healthy individuals. In order to confirm that the deletion are the same in patients with arthritis mutilans and in healthy individuals, and to identify the break point of this deletion, the boundary sequences across the deletion in *A*24:02* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) as a 3.7 kb genomic fragment and subjected to nucleotide sequence determination. A comparison of these genomic sequences with those of the non-*A*24:02* haplotype revealed that the

deleted genomic region spanning 50 kb was flanked by 3.7 kb repetitive element-rich segments homologous to each other on both sides in non-*A*24*. The nucleotide sequences of the PCR products were identical in patients with arthritis mutilans and in healthy individuals, revealing that the deletion linked to *A*24:02* is irrelevant to the onset of arthritis mutilans. The deletion was detected in all other *A*24* alleles so far examined but not in other *HLA-A* alleles, except *A*23:01*. This finding, along with the phylogenetic tree of *HLA-A* alleles and the presence of the 3.7 kb highly homologous segments at the boundary of the deleted genomic region in *A*03* and *A*32*, may suggest that this *HLA-A*24:02*-linked deletion was generated by homologous recombination within two 3.7 kb homologous segments situated 50 kb apart in the ancestral *A*24* haplotype after divergence from the *A*03* and *A*32* haplotypes.

S. Mitsunaga · Y. Okudaira · N. Kunii · T. Cui · K. Hosomichi · A. Oka · I. Inoue · H. Inoko (✉)
Department of Molecular Life Sciences, Division of Basic Medical Science and Molecular Medicine,
Tokai University School of Medicine,
143 Shimokasuya, Isehara,
Kanagawa 259–1193, Japan
e-mail: hinoko@is.icc.u-tokai.ac.jp

Y. Suzuki · S. Sato
Department of Internal Medicine,
Tokai University School of Medicine,
143 Shimokasuya, Isehara,
Kanagawa 259–1193, Japan

Y. Homma
Department of Clinical Health Science,
Tokai University School of Medicine,
143 Shimokasuya, Isehara,
Kanagawa 259–1193, Japan

Keywords *HLA-A*24* · Deletion · Arthritis mutilans · Evolution

Introduction

The disease concordance rate of rheumatoid arthritis is about 12–15% in monozygotic twins, 3–4% in dizygotic twins, and 2–4% in non-twin siblings (Silman et al. 1993). The ratio of the risk of disease recurrence among the siblings of affected individuals to disease incidence in the general population (λ) is 5–10 (Wandstrat and Wakeland 2001). Therefore, the contribution of genetic predisposition to RA onset is relatively large. Arthritis mutilans is a very

severe rheumatoid arthritis and shows very destructive changes as a result of joint space narrowing, erosions, resorptive changes, and subluxation (Ochi et al. 1988). Expecting genome structural aberration, large deletions/insertions, and copy number variation due to the severe symptoms of arthritis mutilans, we conducted a structural aberration analysis using comparative genomic hybridization (CGH) array. A 50 kb deletion near the *HLA-A* locus was detected by the CGH array analyses in Japanese patients with arthritis mutilans. In the following analysis, 11 out of 12 patients with arthritis mutilans was found to have *A*24:02* allele, suggesting a possibility that this deletion may be linked to *HLA-A*24:02*, irrespective of the presence or absence of the disease.

The *HLA-A* locus in B-cell lines and peripheral leukocytes bearing genetically defined *A*24:02*, as well as serologically defined A24 and A23, was previously reported to accompany a large-scale deletion (el Kahloun et al. 1992; Geraghty et al. 1992; Venditti and Chorney 1992; Watanabe et al. 1997). So far, however, neither the break point nor the boundary sequences have been identified. It is very interesting to investigate whether or not the deletion near the *HLA-A* locus with *A*24:02* in arthritis mutilans is identical to that in healthy individuals and to determine when this deletion was generated in the evolutionary process of the *A*24* and its related allelic groups. Therefore, in the present study, we analyzed boundary sequences of the *A*24*-linked deletion by long-range polymerase chain reaction (PCR) followed by nucleotide sequence determination and a comparison between arthritis mutilans and healthy individuals. Based on this sequence information, we also analyzed the presence or absence of this deletion in the *A*24* allele and its related allele groups by duplex PCR.

Materials and methods

Subjects

Twelve Japanese patients with arthritis mutilans were enrolled from among outpatients of the Division of Rheumatology, Tokai University Hospital (Table 1). A total of 2,013 unrelated healthy Japanese control subjects were recruited from among visitors to the Health Evaluation and Promotion Center of Tokai University Hospital. All of the subjects gave written informed consent for genetic screening. Genomic deoxyribonucleic acids (DNAs) carrying *A*23:01*, which were distributed by the UCLA International Cell Exchange, were kindly gifted by Dr. Koichi Kashiwase of the Japanese Red Cross Tokyo Blood Center. The study was approved by the Ethics Committee of Tokai University School of Medicine.

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

Analysis of structural aberration and HLA typing

DNA extracted from peripheral blood using the conventional method was employed for the following analyses. The Human Genome CGH microarray kit (244 K) was used on a Hybridization Oven G2545A and a DNA Microarray Scanner G2565BA according to the manufacturer's instructions (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for the analysis of structural aberration. *HLA-A*, *HLA-B*, and *HLA-DRB1* allele typing was performed using the Luminex assay system and human leukocyte antigen (HLA) typing kits (WAKFlow HLA typing kit, Wakunaga, Osaka, Japan or LABType SSO, One Lambda, Canoga Park, CA, USA).

Polymerase chain reactions

The PCR primers used in this study are listed in Table 2, and their positions in the *HLA-A* gene region are shown in Fig. 1a. Long-range PCR for amplifying a 3,677 bp genomic segment that included the boundary region across the deletion near the *HLA-A* locus with *HLA-A*24* was performed in a 25 μ l aliquot using 320 nM PCR primers, Adel_F2 and Adel_R2 (Table 2), 32 ng of genomic DNA, 0.5 U of KOD FX polymerase (Toyobo, Osaka, Japan), 0.4 mM each of dNTP and 2 \times PCR buffer for KOD FX (Toyobo). The PCR thermal conditions were as follows: 94°C for 2 min; 5 cycles consisting of denaturation (98°C, 10 s), annealing, and extension (72°C, 5 min); 5 cycles consisting of denaturation (98°C, 10 s), annealing, and extension (70°C, 5 min); 5 cycles consisting of denaturation (98°C, 10 s), annealing, and extension (68°C, 5 min); 20 cycles consisting of denaturation (98°C, 10 s), annealing, and extension (66°C, 5 min); and 66°C for 7 min. Long-