

201007002B

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

(ヒトゲノムテーラーメイド研究事業)

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール
および遺伝子検査システムの開発

平成20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 猪子 英俊

平成23(2011)年 5月

【目 次】

班員名簿

I. 総合研究報告

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール および遺伝子検査システムの開発に関する研究	5
--	---

研究代表者 猪子英俊

資料1 「関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測アルゴリズム の開発に関する研究」	11
資料2 「リウマチ感受性遺伝子解析に関する研究」	29
資料3 「関節リウマチとHLA 6座との包括的関連解析に関する研究」	35
資料4 「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」	51
資料5 「等温増幅法による多型解析法の開発に関する研究」	59

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	73
--------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	91
------------------	----

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツールおよび遺伝子検査システムの開発
に関する研究班

班員名簿

区分	氏名	所属
研究代表者	猪子 英俊	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
研究分担者	井ノ上逸朗 田中 正史 岡 晃 光永 滋樹 木下 健司 太田 正穂	国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝研究部門 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解析学 信州大学医学部法医学
研究協力者	鈴木 康夫 佐藤 慎二 本間 康彦 椎名 豊 桑名 正隆 柏瀬 貢一 田嶋 敦 成田 暁 中岡 博文 崔 泰林 細道 一善 國井 七絵	東海大学医学部内科学系リウマチ内科学 東海大学医学部内科学系リウマチ内科学 東海大学医学部内科学系循環器内科学・検診センター 東海大学医学部内科学系循環器内科学・検診センター 慶應義塾大学医学部リウマチ内科 東京都赤十字血液センター検査一部 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝研究部門 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 国立遺伝学研究所総合遺伝研究系人類遺伝研究部門 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
総合研究報告書

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測ツール
および遺伝子検査システムの開発に関する研究

研究代表者 猪子英俊
(東海大学医学部基礎医学系分子生命科学教授)

研究要旨

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

関節リウマチ感受性遺伝子領域の SNP 解析

RA 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。

まず関節リウマチとの遺伝学的な関連に加え、その発症などに極めて重要な遺伝子がこれら領域に網羅的に含んでいる RA の感受性遺伝子領域を 35 個厳選した。続いて詳細な臨床情報を有する患者群ならびに健常者群を対象としてこれらの SNP の遺伝子型を決定した。関節リウマチの病型分類に基づき、その各病型ならびに領域別に疾患との関連を調査した結果、5 領域において病型との有意な関連を見出した。HLA classII 領域では少関節型、*CD244* 遺伝子領域ではムチランス型、*MRPL48* 遺伝子領域では少関節型、*PRKCH* 遺伝子領域ではリウマトイドファクター・ネガティブならびに *FTO* 遺伝子領域ではムチランス型との関連がそれぞれ認められた。さらに、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。

これまでに報告されている RA 感受性遺伝子から 26 種類を選び、long-range PCR で遺伝子領域を増幅後リシーケンシングにより希少変異 (rare variant) の探索を行ったが、RA

特異的な rare variant は検出できなかった。今後対象領域を拡大して探索を行う必要があると考えられた。

HLA タイピング

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

アルゴリズム開発のためのメタアナリシスと易罹患性モデルの構築

予測アルゴリズムの精度を上げるためには、疾患との関連が広く追認されている DNA 多型を用いることが重要であると考え、独立して行われた研究成果を統合する統計手法であるメタアナリシスに着目した。シミュレーション実験を行い、遺伝的関連解析のメタアナリシスにおける研究間異質性が統計的推論に及ぼす影響について検討した。その結果、5,000 から 20,000 検体を用いたゲノム全域関連解析のメタアナリシスにおいて、異質性の増加に伴い、検出力が低下し、ゲノムワイド有意水準を満たした場合にオッズ比が過大推定される「勝者の呪い」という現象が起こることを明らかにした。

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

Missing heritability という言葉で表されるように、未だ同定されていない関節リウマチ

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

等温増幅方による遺伝子多型解析法の開発

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、またサイバーグ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。

研究分担者 井ノ上逸朗
東海大学医学部基礎医学系分子生命
科学 教授

研究分担者 田中 正史
東海大学医学部基礎医学系分子生命
科学 教授

研究分担者 岡 晃
東海大学医学部基礎医学系分子生命
科学 講師

研究分担者 光永 滋樹
東海大学医学部基礎医学系分子生命
科学 教授

研究分担者 木下 健司
武庫川女子大学薬学部ゲノム機能解
析学 教授

研究分担者 太田 正穂
信州大学医学部法医学 准教授

以下の項目の詳細については資料1~4に
詳述した。

A. 研究目的

本研究は関節リウマチ（RA）感受性遺伝子の多型と、病型および抗CCP抗体等の診療情報との関連解析に基づくアルゴリズム開発により発症初期に病態進行を予測し、それによる適切な投薬・治療での患者QOLの向上を目指すとともに、それらの診断に用いるための感受性遺伝子の SNP、HLAの迅速・簡便な検査法を開発することにより、“ベンチワークからベッドサイドへ”の医療の実現を目的としている。

B. 研究方法

本研究のために、①診療情報および多型解析結果のデータベースの構築とそれに

基づく予測アルゴリズムの開発、② データベース構築のためのSNP解析と関連解析、③データベース構築のためのHLAのタイピングと関連解析、④ 簡便・迅速・安価な多型検査システムの開発、に関しそれぞれサブグループを形成し実行した。

C. 研究結果

① 診療情報および多型解析結果のデータベースの構築とそれに基づく予測アルゴリズムの開発

*HLA-DRB1*だけを含むモデルとSNPsの情報を追加したモデルを比較したところ、*HLA-DRB1*だけを含むモデルのAUC=65.9%に対し、*HLA-DRB1*とSNPsを含むモデルのAUCは68.4%であり、AUCの有意な上昇が認められた($P=2.8 \times 10^{-6}$)。さらに、抗CCP抗体やリウマチ因子の検査結果による関節リウマチ病型分類によって、遺伝的多型による予測モデルの識別能が異なるかどうかを検討した。リウマチ因子・抗CCP抗体陽性患者ではAUCは70.9%と増加したのに対し、陰性患者はAUCが58.8%と低値であった。

② データベース構築のためのSNP解析と関連解析

病型を層別化しない状態で関連解析を行った結果(mode :log-additive)、HLA領域におけるrs17191234で $P=8.4 \times 10^{-9}$ 、*MRPL48*遺伝子領域におけるrs7935825で $P=9.3 \times 10^{-4}$ 、*PRKCH*遺伝子領域におけるrs12887002で $P=9.3 \times 10^{-4}$ という関連が示された。

病型を少関節炎型、多関節炎型、ムチランス型に分け、層別化して解析を行い、以下の結果を得た。少関節炎型でのみ関連のあ

るSNPが検出された領域はHLA-ClassII領域におけるrs9277386で $P=1.2 \times 10^{-4}$ 、OR=2.88 (mode :recessive)、ならびに*MRPL48*遺伝子領域におけるrs3817514で $P=2.0 \times 10^{-4}$ 、OR=2.56 (mode :recessive)、ムチランス型では*CD244*遺伝子領域におけるrs3573389で $P=1.2 \times 10^{-3}$ 、OR=7.66 (mode :recessive)、ならびに*FTO*遺伝子領域におけるrs2665272で $P=5.4 \times 10^{-3}$ 、OR=3.50 (mode :log-additive)。

③データベース構築のためのHLAのタイピングと関連解析

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。*DPB1*02:01*と*DPB1*04:01*はこれらの*DRB1*アリルとは独立して、それぞれRA感受性とRA抵抗性を付与した。また、HLAハプロタイプの重要性が示唆された。

④ 簡便・迅速・安価な多型検査システムの開発

96 ウェル・プレートの1ウェルの底面に16種類のプローブを固定し、ウェル中で等温増幅反応を行うことにより、low resolutionでのHLA-DRB1タイピングが可能となった。プローブの反応性の有無の判定は肉眼的に可能であった。

D. 考察

① 診療情報および多型解析結果のデータベースの構築とそれに基づく予測アルゴリズムの開発

罹患性予測モデルの識別能はAUCで0.68であり、他の多因子疾患と比べると高

い数値であるものの、臨床応用を考える上では sub-optimal な水準であった。しかし、抗 CCP 抗体・リウマトイド因子陽性患者に対しては AUC が 0.71 と高値を示した一方、陰性患者では 0.59 と低い数値であったことから、病態予測への可能性が期待される。

② データベース構築のための SNP 解析と関連解析

臨床情報別に集団を層別化して解析した結果では 5 領域において、関連を示唆する SNP が検出された。この 5 領域での関連は層別化したときのみ観察される関連であり非常に興味深い。

③ データベース構築のための HLA のタイピングと関連解析

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 領域の重要性が示唆され、さらに 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が示唆された。

④ 簡便・迅速・安価な多型検査システムの開発

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 の全アレ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。

E. 結論

関節リウマチの病型・病態進行予測ツールとそれに多型情報を提供するための簡便な多型検査システムのプロトタイプが完成した。今後、高精度の予測を可能にいくためには、遺伝子型情報だけでなく、性別や喫煙習慣といった臨床情報をモデルに採り込むことも重要である。さらに rare variant のような感受性遺伝子の探索とその結果のモデルへの採り込みも必要である。検査システムについては、SNP タイピングの multiplex 化が必要である。さらにより熱伝導率が良いプラスチックプレートが作成できれば、より robust 性の高いシステムが構築可能となるであろう。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

各資料に記載した。

H. 知的財産の出願・登録状況

各資料に記載した。

資料 1

関節リウマチをモデルとした病型・病態進行予測アルゴリズムの開発

分担研究者

井ノ上 逸朗 国立遺伝学研究所 教授

中岡 博史 国立遺伝学研究所 研究員

研究要旨

本研究では、関節リウマチをモデル疾患として、DNA 多型情報と抗 CCP 抗体等の診療情報を利用した多変量解析に基づき、病型・病態進行予測アルゴリズムの開発を行う。

予測アルゴリズムの精度を上げるためには、疾患との関連が広く追認されている DNA 多型を用いることが重要であると考え、独立して行われた研究成果を統合する統計手法であるメタアナリシスに着目した。シミュレーション実験を行い、遺伝的関連解析のメタアナリシスにおける研究間異質性が統計的推論に及ぼす影響について検討した。その結果、5,000 から 20,000 検体を用いたゲノム全域関連解析のメタアナリシスにおいて、異質性の増加に伴い、検出力が低下し、ゲノムワイド有意水準を満たした場合にオッズ比が過大推定される「勝者の呪い」という現象が起こることを明らかにした。

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

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

A. 研究目的

関節リウマチは慢性の全身性炎症性疾患であり、主たる病態は年余にわたって持続する慢性滑膜炎である。炎症の結果として

関節は徐々に破壊され、運動機能障害を呈する。発症や病態の進展には複数の遺伝要因および環境要因が関与する、多因子疾患であるとされている。関節リウマチ感受性

遺伝子の DNA 多型情報と抗 CCP 抗体等の診療情報などから、発症初期に病態進行を予測することが可能となれば、適切な投薬と治療方針の決定に役立つと考えられる。

予測アルゴリズムの精度を上げるためには、疾患との関連が広く追認されている SNP を用いることが重要であると考え、独立して行われた複数の研究の結果を統合することで、検出力および遺伝的効果の推定精度を向上させることができるという利点をもつ統計手法であるメタアナリシスに着目した。

近年、多くの多因子疾患における感受性遺伝子同定研究において、複数のゲノム全域関連解析データセットをメタアナリシスの手法で統合し、検出力を高めることで、次々と感受性遺伝子の同定に成功している。メタアナリシスでは、研究間に潜むさまざまな違い、つまり異質性(heterogeneity)について検討することも重要である。そこで、シミュレーション実験により、遺伝的関連解析のメタアナリシスにおける研究間異質性を評価する統計量の特長や研究間異質性の度合いと偽陽性率および検出力との関係性を評価する。

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

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

し、その妥当性を関節リウマチ症例 1,300 検体、対照 1,500 検体を用いて検証する。

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

B. 研究方法

メタアナリシスにおける研究間異質性を評価する統計量の特長や研究間異質性の度合いと偽陽性率および検出力との関係性を評価するシミュレーション実験を行った。統合する研究の数、各研究あたりのサンプル数、疾患感受性アレル頻度、リスクアレルのオッズ比、これらパラメータの組み合わせを変化させたシミュレーション実験を行うことで、パラメータ間の相互作用についても評価した。シミュレーション実験は各パラメータ・セットに対して 100,000 反復実行した。Table 1 にシミュレーション・シナリオの概略を示す。

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

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

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

より正確な罹患性予測を実現するために必要な新規感受性遺伝子数を明らかにする

ため、シミュレーション実験を行った。AUC=0.80 に到達するために必要な遺伝子数を求めた(抗 CCP 抗体を関節リウマチ診断マーカーとして用いた場合の AUC が 0.8 程度であることから、臨床的有用性が期待できる AUC 値を 0.8 と設定した)。

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

C. 研究結果

全ての研究に共通する単一の効果を仮定する母数モデル (FEM) を用いた場合、遺伝的効果の異質性に依りて偽陽性率の増加が顕著であった (Figure 1 上段)。一方、研究間で遺伝的効果の異質性を許容する変量モデル (REM) を用いた場合、偽陽性率の増加は比較的小さかった (Figure 1 下段)。また、異質性の検定 (Cochran's Q test; $P < 0.1$) の検出力が 0.8 未満となるシミュレーション条件下であっても、FEM を利用した場合、偽陽性率が増加することが分かっ

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

さらに、症例・対照を計 5,000 から 20,000 検体を用いたゲノムワイド関連解析のメタアナリシスにおいて、異質性の増加に伴い、遺伝子 - 疾患の関連を同定する検出力が低下し (Figure 2 上段)、ゲノムワイド有意水準を満たした場合にオッズ比が過大推定される「勝者の呪い」という現象が起こることを明らかにした (Figure 2 下段)。

この現象は、統合されるトータルのサンプル数が少なく、リスクアレルの頻度が低く、オッズ比の真値が小さい場合に顕著であることが分かった。また、トータルのサンプル数が同一の場合、統合する研究の数を少なくし、各研究あたりのサンプル数を大きくした場合に、研究間異質性の及ぼす影響が大きく、検出力の低下および統合オッズ比推定値の過大評価の度合いが顕著となることを明らかにした (Nakaoka & Inoue 2009, J Hum Genet; Nakaoka & Inoue 2010, Encyclopedia of Life Sciences)。

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

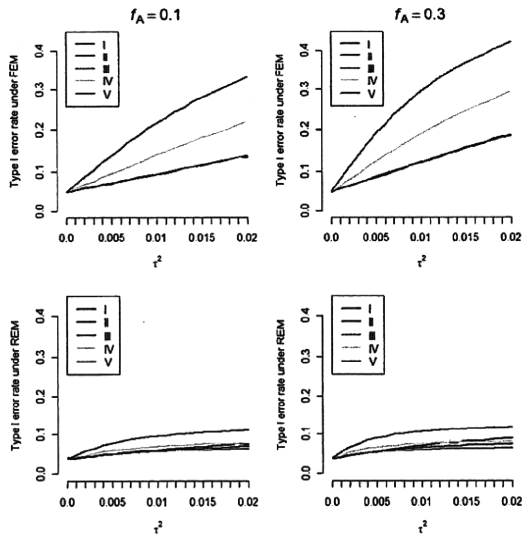
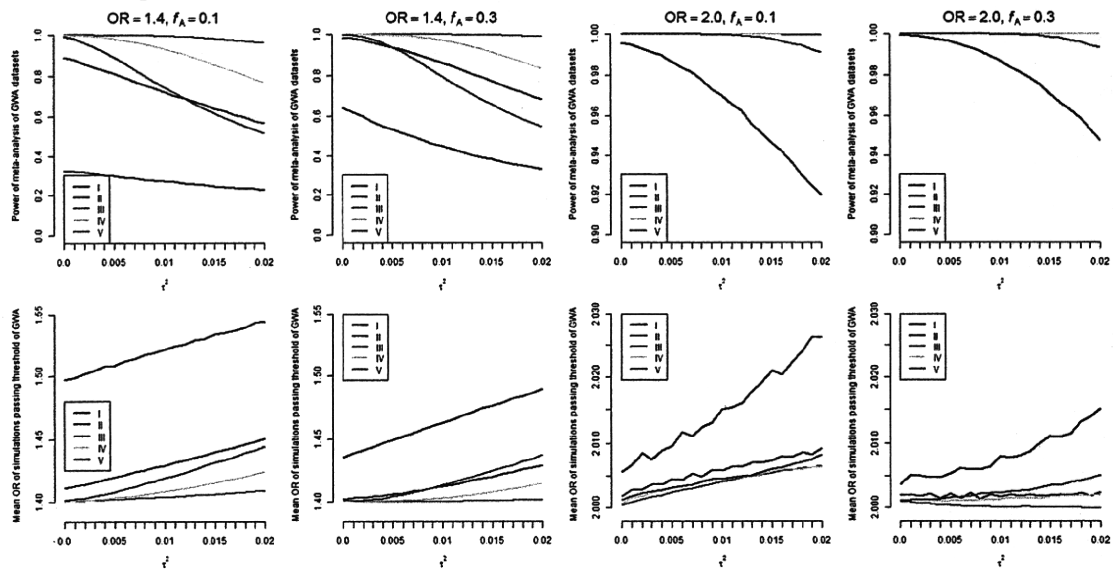
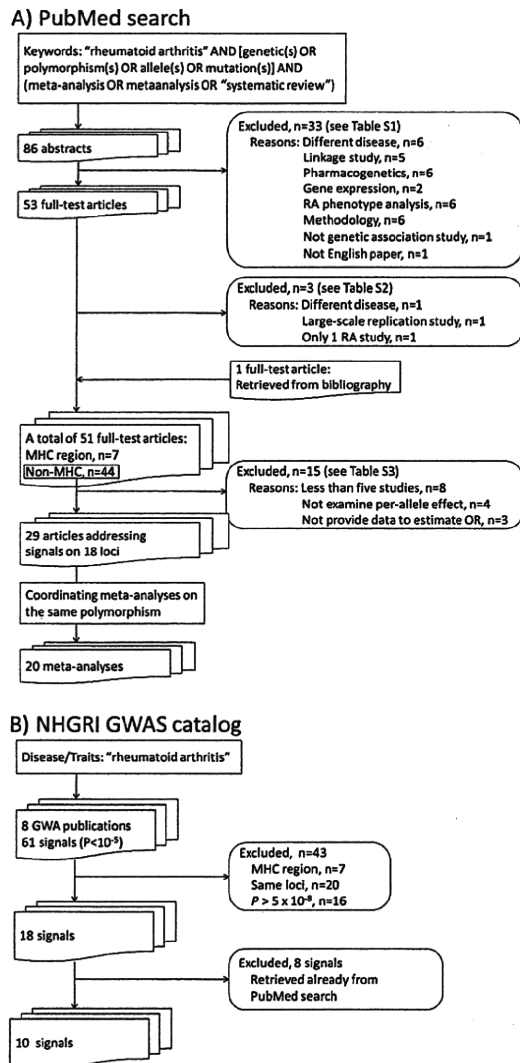


Figure 2. Simulations for the powers in random effects model (REM) meta-analyses of detecting a gene-disease association at the significance level of 5.7×10^{-7} (the top row) and the mean OR of the simulations passing the threshold (the bottom row) as the function of τ^2 , disease allele frequency $f_A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



PubMed および NHGRI GWAS catalog による網羅的文献検索の概容を Figure 3 に示す。

Figure 3. Flowchart detailing the exclusion and inclusion criteria and the number of studies excluded and included at each step of the electronic database searches. A) PubMed, and B) NHGRI GWAS catalog.



抽出した文献のメタアナリシスの結果を Table 2 に示す。結果として、以下の遺伝的多型について関節リウマチ感受性との関連

が認められた。

HLA-DRB1 の 6 アレル [DRB1*01:01, DRB1*09:01, DRB1*10:01, DRB1*04:04, DRB1*04:01, DRB1*04:05]、23 SNPs [rs7574865 (*STAT4*); rs3087243 (*CTLA4*); rs7528684 (*FCRL3*); rs3761847 (*TRAFT1*); rs2812378 (*CCL21*); rs4810485 (*CD40*); rs42041 (*CDK6*); rs2240340 (*PADI4*); rs2476601 (*PTPN22*); rs2073838 (*SLC22A4*); rs2004640 (*IRF5*); rs6920220 (*TNFAIP3*); rs10499194 (*TNFAIP3*); rs3093024 (*CCR6*); rs874040 (*RBPJ*); rs11676922 (*AFF3*); rs13017599 (*REL*); rs6859219 (*ANKRD55*); rs934734 (*SPRED2*); rs2736340 (*BLK*); rs26232 (*C5orf30*); rs13315591 (*PXK*); rs706778 (*IL2RA*)] および微小欠失 [rs333 (*CCR5*)].

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

選択した遺伝子型多型の関節リウマチリとの関連を単変量および多変量ロジスティック回帰分析で評価した結果を Table 3 に示す。

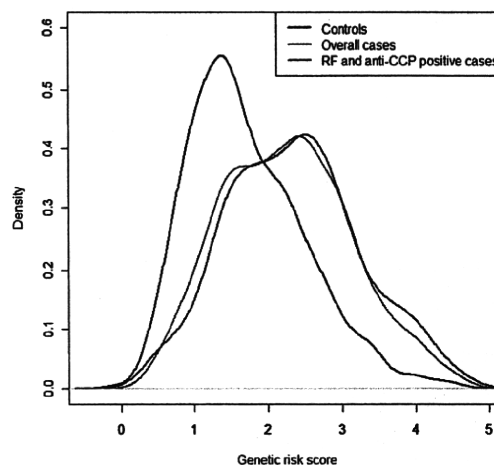
CCR6 ($P=4.1 \times 10^{-5}$; OR=1.25), *PADI4* ($P=1.5 \times 10^{-4}$; OR=1.23), *BLK* ($P=3.2 \times 10^{-4}$; OR=1.24) と *CD40* ($P=4.7 \times 10^{-4}$; OR=0.80) の 4 SNPs では高度に有意な関連が認められた。また、*C5orf30*, *SLC22A4*, *AFF3*, *FCRL3* では $P < 0.05$ 水準で有意差が確認でき、*SPRED2* と *STAT4* は関節リウマチのリスクとの関連傾向が見られた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

関連が認められなかった 5 SNPs のうち、4 SNPs ではメタアナリシスと効果の方向が同じであった。

予測モデルの妥当性評価の結果を Table 4 に示す。*HLA-DRB1* だけを含むモデルと SNPs の情報を追加したモデルを比較したところ、*HLA-DRB1* だけを含むモデルの AUC=65.9% に対し、*HLA-DRB1* と SNPs を含むモデルの AUC は 68.4% であり、AUC の有意な上昇が認められた ($P=2.8 \times 10^{-6}$)。

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

Figure 4. Distribution of risk scores by phenotypic status for the integrative model, where six *HLA-DRB1* alleles and 14 SNPs were included. The curves were generated with a Gaussian kernel density smoother.



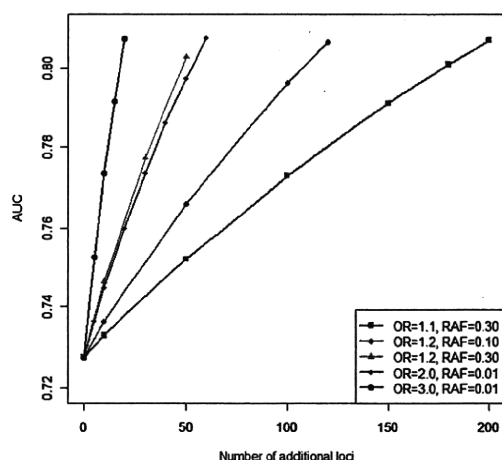
罹患性予測モデルの識別能 (AUC=71%) は sub-optimal な水準であった。これは、関節リウマチの遺伝的寄与の大部分が未だ同定されていないためであると考えられる。そこで、シミュレーション実験を用いて、どの程度の遺伝的座位を同定すれば遺伝子スクリーニングとして有用な予測の正確度 (AUC=0.80) に到達するかを検証した (Figure 5)。

Common disease-common variant (CDCV) 仮説のもと、オッズ比が 1.2 でアレル頻度 0.3 を仮定したシミュレーション・シナリオでは、50 座位を同定することで、AUC=80% に到達する。最新の関節リウマチのゲノムワイド関連解析で同定された SNPs のオッズ比が 1.2 を下回っていることから、より現実的なシナリオとして、オッズ比が 1.1 でアレル頻度 0.3 を仮定した場合、180 座位が必要となる。

CDCV 仮説に基づくゲノムワイド関連解析では捉えられない、低頻度ながら効果の大きい変異が存在するという multiple rare variants (MRV) 仮説に基づき、オッズ比が

3.0でアレル頻度0.01を仮定すると、20座位が必要となる。オッズ比が2.0でアレル頻度0.01と仮定した場合は50座位を要するという結果が得られた。

Figure 5. Simulation study addressing how many additional loci should be mapped for the establishment of excellent genetic risk prediction.



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

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

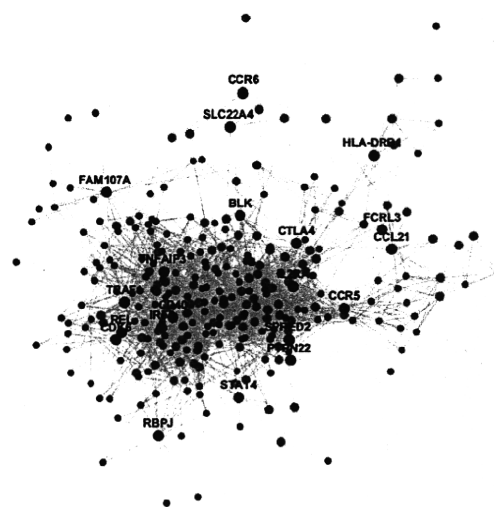


Figure 6. Result of network analysis. The known genes that are associated with rheumatoid arthritis are shown in black vertex. The genes that are ranked in the top 100 are highlighted in red. The genes ranked in the top 300 are colored in blue.

Figure 6に示すように、関節リウマチ感受性遺伝子は高度に結合したネットワークを構成することがわかる。

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

D. 考察

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

罹患性予測モデルの識別能は AUC で 0.68 であり、他の多因子疾患と比べると高

い数値であるものの、臨床応用を考える上では sub-optimal な水準であった。しかし、抗 CCP 抗体・リウマトイド因子陽性患者に対しては AUC が 0.71 と高値を示した一方、陰性患者では 0.59 と低い数値であったことから、病態予測への可能性が期待される。

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

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

E. 結論

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

一方、新規感受性遺伝子同定に向けたアプローチも継続する必要がある。次世代シ

ーケンサーの登場により多因子疾患の感受性稀少変異同定が期待される。そのためには、疾患感受性稀少変異が集積している可能性の高い遺伝子群を効率よく選定するアルゴリズム開発が重要となるだろう。本研究で行ったネットワーク解析で上位にランクされた遺伝子群をリシーケンシングし、疾患感受性稀少変異を同定することで、遺伝的寄与の大部分が未だ同定されていない関節リウマチにおいて、感受性遺伝子についての新たな知見が得られると期待される。疾患感受性遺伝子全貌解明から、疾患発症メカニズムをよりよく理解することで、画期的な治療法開発の足掛かりとなるだろう。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

- The Winner's Curse. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd.
- D) Kurata, R., Nakaoka, H., Tajima, A., Hosomichi, K., Shiina, T., Meguro, A., Mizuki, N., Ohono, S., Inoue, I., and Inoko, H. (2010). TRIM39 and RNF39 are associated with Behcet's disease independently of HLA-B *51 and -A *26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 533-537.
- E) Cui, T.L., Nakaoka, H., Akiyama, K., Kamura, H., Hosomichi, K., Bae, J., Cheong, H., Shin, H., Yada, T., and Inoue, I. (2010). Positional effects of polymorphisms in probe-target sequences on genoplot images of oligonucleotide microarrays. *Genet. Mol. Res.* 1, 524-531.
- F) Akiyama, K., Narita, A., Nakaoka, H., Cui, T., Takahashi, T., Yasuno, K., Tajima, A., Kirschke, B., Yamamoto, K., Kasuya, H. et al. (2010). Genome-wide association study to identify genetic variants present in Japanese patients harboring intracranial aneurysms. *J. Hum. Genet.* 10, 656-661.
- G) Yasuno K, Bilguvar K, Bijlenga P, Kee ALS, Kirschke B, Auburger G, Simon M, Krex D, Arlier Z, Nayak N, Ruigrok Y, Niemela M, Tajima A, Frauberg M, Tamas D, Wirjatijasa F, Hata A, Jordi B, Oszwald A, Kasuya H, Gulam Z, Schoch B, Pankaj S, Stuer C, Roelof R, Beck J, Sola T, Ricciardi F, Aromaa A, Illig T, Schreiber S, Duijin CM, Berg LH, Claire P, Carole P, Roder C, Ozturk A, Gaal E, Jeremy W, Berg D, Geisen C, Christoph F, Paul S, Alex F, State MW, Wichmann HE, Breteler MMB, Wijmenga C, Mane S, Juan JE, Sandalcioglu IE, Meyer B, Raabe A, Daniel R, Jaaskelainen A, Hemesniemi J, Rinkel GJE, Zewnbutsu H, Inoue I, Palotie A, Cambien F, Nakamura Y, Lifton RP, Guenel M. (2010) Genome-wide association study of intracranial aneurysms identifies 5 risk loci. *Nat. Genet.* 42, 420-425.
- H) Yoshihara K, Tajima A, Yahata T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Kotera K, Masuzaki H, Tashiro H, Katabuchi H, Inoue I, Tanaka K. (2010) Gene expression profile for predicting survival in advanced-stage serous ovarian cancer across two independent databases. *PLoS One* 5, e9615.
- I) Imaizumi T, Tanaka H, Tajima A, Tsuruga K, Oki E, Sashinami H, Matsumiya T, Yoshida H, Inoue I, Ito E. (2010) Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) is induced by IFN-gamma in human mesangial cells in culture: possible involvement of RIG-I in the inflammation in lupus nephritis. *Lupus* 19, 830-836.
- J) Yoshihara K, Tajima A, Komata D,

- Yamamoto T, Kodama S, Fujiwara H, Suzuki M, Onishi Y, Hatae M, Sueyoshi K, Fujiwara H, Kudo Y, Inoue I, Tanaka K. (2009) Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates ZEB2 in tumor progression and prognosis. *Cancer Sci.* 100, 1421-1428.
- K) Nakaoka H, Inoue I. (2009) Meta-analysis of genetic association studies: methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse. *J. Hum. Genet.* 54, 615-623.
- L) Brookes AJ, Lehvaslaiho H, Muilu J, Shigemoto Y, Oroguchi T, Tomiki T, Mukaiyama A, Konagaya A, Kojima T, Inoue I, Kuroda M, Mizushima H, Thorisson GA, Dash D, Rajeevan H, Darlison MW, Woon M, Fredman D, Smith AV, Senger M, Naito K, Sugawara H. (2009) The phenotype and genotype experiment object model (PaGE-OM): a robust data structure for information related to DNA variation. *Hum. Mutat.* 30, 968-977.
- M) Ruigrok YM, Rinkel GJ, Wijmenga C, Kasuya H, Tajima A, Takahashi T, Hata A, Inoue I, Krischek B. (2009) Association analysis of genes involved in the maintenance of the integrity of the extracellular matrix with intracranial aneurysms in a Japanese cohort. *Cerebrovasc. Dis.* 28, 131-134.
- N) Koike A, Nishida N, Inoue I, Tsuji S, Tokunaga K. (2009) Genome-wide association database developed in the Japanese Integrated Database Project. *J. Hum. Genet.* 54, 543-546.
- O) Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, Inoue I, Maki K. (2009) Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor genes in a Japanese population. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 136, 536-541.
- P) 10. Kang E-H, Yamaguchi T, Tajima A, Nakajima T, Tomoyasu Y, Watanabe M, Yamaguchi M, Park S-B, Maki K, Inoue I. (2009) Association of the growth hormone receptor gene polymorphisms with mandibular height in a Korean population. *Arch. Oral. Biol.* 54, 556-562.
- Q) Sekigawa T, Tajima A, Hasegawa T, Hasegawa Y, Inoue H, Sano Y, Matsune S, Kurono Y, Inoue I. (2009) Gene-expression profiles in human nasal polyp tissues and identification of genetic susceptibility in aspirin intolerant asthma. *Clin. Exp. Allergy* 39, 972-981.
- R) Murakami Y, Aly HH, Tajima A, Inoue I, Shimotohno K. (2009) Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a. *J. Hepatol.* 50, 453-460.
- S) 中岡博史、井ノ上逸朗:ゲノム情報を含む医学情報処理の将来. (2011) 医学の

歩み. 236, 667-674.

T) 中岡博史、井ノ上逸朗: ゲノムインフォマティクス--システム医学に向けて-- (2010) 日本臨床 68 巻 増刊号 8, 93-99.

U) 中岡 博史、井ノ上 逸朗. 日本人における脳動脈瘤感受性遺伝子座. Annual Review 循環器 2010、III 診断と治療 - 最新の進歩 G. 大動脈疾患・末梢動脈疾患・その他、270-276.

2. 学会発表

i) 国際学会

A) Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue: The winner's curse in meta-analysis of genome-wide association studies., *ASHG 60th Annual Meeting*, Washington, D.C., Nov. 2010.

B) Hiromi Miura, Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue: Genotype-phenotype relationships of susceptibility loci from genome-wide association studies in intracranial aneurysm., *ASHG 60th Annual Meeting*, Washington, D.C., Nov. 2010.

C) Tailin Cui, Hirofumi Nakaoka, Koichi Akiyama, Atsushi Tajima and Ituro Inoue: Screening for microdeletions on the Y chromosome using array CGH in 72

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

D) Koichi Akiyama, Akira Narita, Hirofumi Nakaoka, Tailin Cui, Atsushi Tajima and Ituro Inoue: Genome-wide association study with gender adjustment to search for genetic variants responsible for intracranial aneurysms in Japanese population., *ASHG 60th Annual Meeting*, Washington, D.C., Nov. 2010.

E) Riho Kurata, Hirofumi Nakaoka, Atsushi Tajima, Takuma Saito, Kazuyoshi Hosomichi, Takashi Shiina, Akira Meguro, Nobuhisa Mizuki, Hidetoshi Inoko and Ituro Inoue: SNP association study of Behçet's disease to unravel the genetic susceptibility and pathoetiology., *ASHG 59th Annual Meeting*, Honolulu, Oct. 2009.

ii) 国内学会

F) 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 斎藤 卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊: TRIM39 and RNF39 are associated with Behçet's Disease independently of HLA-B*51 and -A*26., 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, Dec. 2010.

G) 中岡 博史, 崔 泰林, 田嶋 敦, 光永