

- 滋樹, 井ノ上 逸朗: A systematic approach to constructing genomic risk prediction model of common disease and assessing its clinical validity: A case study of rheumatoid arthritis., 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, Dec. 2010.
- H) 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 斎藤 卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊: ベーチェット病の新規感受性遺伝子 TRIM39, 日本人類遺伝学会第55回大会, Oct. 2010.
- I) 崔 泰林, 中岡 博史, 秋山 康一, 田嶋 敦, 井ノ上 逸朗: アレイ CGH による非閉塞性無精子症 Y 染色体構造異常の網羅的な検出, 日本人類遺伝学会第55回大会, Oct. 2010.
- J) 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 斎藤 卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊: HLA 領域に位置する新規ベーチェット病感受性遺伝子, 第19回日本組織適合性学会大会, Sep. 2010.
- K) 秋山 康一, 中岡 博史, 安野 勝史, 成田 暁, 田嶋 敦, 羽田 明, 井ノ上 逸朗: 日本人集団のゲノムワイド関連解析からみえてきた脳動脈瘤感受性遺伝子多型, 日本人類遺伝学会第54回大会, Sep. 2009.
- L) 崔 泰林, 中岡 博史, 秋山 康一, 田嶋 敦, 井ノ上 逸朗: アレイ CGH による無精子症 Y 染色体構造異常の検出, 日本人類遺伝学会第54回大会, Sep. 2009.
- M) 中岡 博史, 高橋 朋子, 崔 泰林, 田嶋 敦, 井ノ上 逸朗: 臨床情報と 9p21 領域の遺伝的多型情報を用いた脳動脈瘤感受性に関する多変量ロジスティック回帰分析, 日本人類遺伝学会第54回大会, Sep. 2009.
- N) 倉田 里穂, 中岡 博史, 田嶋 敦, 斎藤 卓磨, 細道 一善, 椎名 隆, 目黒 明, 水木 信久, 井ノ上 逸朗, 猪子 英俊: ベーチェット病感受性領域の SNP 関連解析から病態解明, 日本人類遺伝学会第54回大会, Sep. 2009.
- O) 猪子 英俊, 倉田里穂, 中岡博史, 斎藤 卓磨, 細道一善, 田嶋敦, 椎名隆, 目黒明, 水木信久, 井ノ上逸朗. ベーチェット病感受性領域の SNP 関連解析から病態解明, 厚生労働科学研究難治性疾患克服研究事業 ベーチェット病に関する調査研究, 第二回ベーチェット病班会議, Dec. 2009.
- P) 倉田里穂, 中岡博史, 田嶋敦, 斎藤卓磨, 細道一善, 椎名隆, 目黒明, 水木信久, 井ノ上逸朗, 猪子英俊. ベーチェット病感受性領域の SNP 関連解析, 第8回生体機能研究会, Aug. 2009.
- H. 知的財産の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

Table 1. Description of five simulation scenarios of meta-analysis of genome-wide association data sets.

Scenario	k	$n_{case}/n_{control}$	k denotes the number of included studies and n_{case} and $n_{control}$ are the number of cases and controls within each study, respectively.
I	5	500/500	
II	10	500/500	
III	20	500/500	
IV	10	1000/1000	
V	5	2000/2000	

Table 2. Re-analysis of published meta-analyses of non MHC polymorphisms on risk of RA.

	Polymorphism	Chromosome	Total sample size				Cochran's Q	FEM			REM		
			Cases	Controls	P^2 (%)	OR		95% CI	P	OR	95% CI	P	
C5	rs7574865	2q32.3	18,405	19,181	48.7	0.013	1.232	1.191-1.274	3.97E-34	1.254	1.194-1.317	1.72E-19	
	rs7528684	1q23.1	9,756	9,012	50.8	0.015	1.083	1.038-1.129	0.0002156	1.090	1.025-1.160	0.00614392	
	rs1800629	6p21.33	1,462	2,306	81.6	2.61E-09	0.952	0.824-1.100	0.507	0.999	0.697-1.432	0.995	
	rs3761847	9q33.2	10,979	12,959	83.4	1.09E-10	1.129	1.088-1.171	9.17E-11	1.183	1.072-1.306	0.00080812	
	rs2812378	9p13.3	11,011	21,194	0.0	0.602	1.109	1.069-1.150	2.70E-08	1.109	1.069-1.150	2.70E-08	
2	rs4810485	20q13.12	10,988	21,292	7.5	0.372	0.868	0.833-0.904	9.76E-12	0.868	0.831-0.907	2.62E-10	
	rs42041	7q21.2	11,023	21,207	34.9	0.111	1.082	1.040-1.125	0.00009619	1.081	1.025-1.141	0.00423641	
	rs2240340	1p36.13	12,577	18,745	77.8	7.63E-07	1.091	1.053-1.131	2.03E-06	1.161	1.065-1.266	0.00069893	
	rs2476601	1p13.2	6,950	7,887	16.7	0.280	1.638	1.523-1.761	2.03E-40	1.650	1.520-1.791	7.32E-33	
	rs2073838	5q31.1	12,717	10,499	14.3	0.307	1.114	1.054-1.178	0.00012814	1.109	1.043-1.180	0.00096685	
A	rs16944	2q13	3,462	3,145	8.5	0.363	1.073	0.998-1.154	0.058	1.075	0.992-1.164	0.077	
	rs1143634	2q13	1,654	1,723	64.8	0.00238336	0.832	0.729-0.948	0.00595953	0.798	0.628-1.015	0.06576824	
	rs2004640	7q32.1	6,566	5,340	30.3	0.167	0.903	0.856-0.952	0.0001447	0.900	0.843-0.961	0.00174806	
	rs396991	1q23.3	2,422	2,490	63.6	0.00495305	1.074	0.986-1.170	0.104	1.037	0.890-1.208	0.645	
	rs3087243	2q33.2	6,329	5,330	29.0	0.196	0.894	0.845-0.945	0.00008495	0.891	0.832-0.954	0.00096685	
P3-OLIG3	rs6920220	6q23.3	8,637	9,888	0.0	0.805	1.262	1.201-1.326	3.93E-20	1.262	1.201-1.326	3.93E-20	
F1B	delta32 (rs333)	3p21.31	2,768	3,441	45.9	0.085	0.741	0.647-0.849	0.00001491	0.723	0.589-0.886	0.00180851	
	rs1061622	1p36.22	3,393	2,071	51.0	0.070	0.985	0.898-1.081	0.753	1.030	0.885-1.200	0.701	
	rs17266594	4q24	3,550	3,960	21.3	0.279	0.970	0.901-1.044	0.420	0.957	0.875-1.047	0.337	
P3-OLIG3	rs10499194	6q23.3	4,533	7,399	67.5	0.015	0.820	0.771-0.871	1.77E-10	0.802	0.716-0.898	0.00013345	

0	20q13.12	rs4810485	T/G	157	550	569	246	675	569	(1.10-1.39)	(1.09-1.40)	(1.13-1.27)
									4.7×10 ⁻⁴	0.81	4.7×10 ⁻⁴	0.87
										(0.72-0.89)	(0.72-0.91)	(0.83-0.90)
s with nominally significant association signals ($P<0.05$)												
f30	5q21.1	rs26232	T/C	78	503	699	116	621	757	0.86	0.86	0.90
										(0.77-0.98)	(0.75-0.98)	(0.87-0.94)
22A4	5q31.1	rs2073838	A/G	169	553	559	151	647	692	1.14	1.17	1.11
										(1.02-1.27)	(1.04-1.32)	(1.05-1.18)
3	2q11.2	rs11676922	T/A	357	627	293	371	742	378	1.11	1.11	1.14
										(1.00-1.24)	(0.99-1.24)	(1.10-1.18)
L3	1q23.1	rs7528684	G/A	236	619	429	253	682	557	1.11	1.08	1.16
										(1.00-1.23)	(0.97-1.22)	(1.09-1.24)
s showing the same direction of effect												
ED2	2p14	rs934734	G/A	45	392	843	30	446	1,017	1.14	1.17	1.13
										(0.99-1.31)	(1.01-1.36)	(1.09-1.17)
Γ4	2q32.3	rs7574865	T/G	176	567	537	169	669	655	1.10	1.10	1.23
										(0.98-1.23)	(0.97-1.24)	(1.19-1.27)
A4	2q33.2	rs3087243	A/G	89	457	734	96	592	798	0.92	0.96	0.89
										(0.82-1.04)	(0.84-1.10)	(0.85-0.95)
F1	9q33.2	rs3761847	A/G	290	659	334	310	780	398	1.05	1.03	1.13
										(0.95-1.17)	(0.92-1.16)	(1.09-1.17)
LA	10p15.1	rs706778	T/C	414	621	246	458	738	299	1.05	1.05	1.12
										(0.95-1.17)	(0.93-1.17)	(1.09-1.16)

s showing the opposite direction of effect or

AIP3	6q23.3	rs10499194	T/C	8	171	1,103	6	174	1,315	1.18	0.11	1.17	0.16	0.82
											(0.96-1.46)	(0.94-1.47)		(0.77-0.87)

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

Table 4. 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.

リウマチ感受性遺伝子解析に関する研究

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。

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関節リウマチ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* 遺伝子領域ではリユー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。

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成することである。

この目標達成のために、詳細な臨床情報を伴うリウマチ患者検体、ならびに健常者検体を用いて、既知のリウマチ感受性領域の多型情報を収集し、SNP 多型情報および診療情報の統合データベースを構築するためのデータを獲得す

ることが、本研究の目的である。

さらに、病型・病態進行予測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

現在までに、主に SNP を多型マーカーとした候補遺伝子アプローチおよび全ゲノム関連

解析により、多くの関節リウマチ感受性遺伝子が見出されている。さらに我々は、全ゲノムに配置したマイクロサテライトを使用するという独自の手法により、複数の感受性遺伝子を同定している (*Hum Mol Genetics* 14: 2305-21, 2005.)。したがって、すべてとは言いきれないが、発症に対して比較的効果の高い感受性遺伝子は網羅的に同定されていると考えられる。そこで、これらの複数の感受性遺伝子を対象に、詳細な臨床情報を有する検体を用いて遺伝子型タイピングを行うことにより、病型・病態進行予測に基づくリウマチの進行予防を目指すデータベース構築への重要な情報源とすることを目指すこととした。そこでまず、我々が同定した感受性遺伝子領域をはじめ、多くの文献を精査することにより感受性遺伝子領域を厳選した。また選抜された領域において、SNP を選択する基準として、実験上のクオリティー確保ならびに効率化を図るため、日本人集団において MAF (Minor Allele Frequency) 0.1 以上の SNP、さらに pair-wise r^2 を算出し、 $r^2 > 0.8$ で規定される LD ブロックについては tagging して候補 SNP をリストアップした。一方、実際の遺伝子型タイピングには illumina 社の BeadsExpress による goldengate-Assay を用いる。そこで基本的に各プライマー・プローブセットはカスタムデザインとなるため、コンバージョンレートが高いと予測される SNP をさらに厳選した。最終的に関節リウマチの感受性遺伝子領域を 35 個厳選し、平均解像度 6.0kb にて合計 SNP 数 1,152 個配置した。これらの領域は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。続いて詳細な臨床情報を有する患者 380 個体ならびに健常者 570 個体を対象としてイルミナ社の Beads Express によりこれらの SNP の遺伝子型を決定した。

さらに、メタアナリシスを行う目的で、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抽出した 37 個の SNP を解析対象とした。また、統計学的検出力の増加を図るため、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患者 1,288 検体、健常者 1,505 検体を用い、通常の TaqMan assay 法により遺伝子型の決定を行った。

C. 研究結果

結果が得られない個体が多い SNP は解析対象から除外することとしこの基準を 5%以上とした。その結果、163 SNP (14.1%) がこれに該当した。続いて、多型が認められなかった SNP ならびにハーディーワインバーグ平衡から偏りのある SNP を検出したところ、それぞれ 15 SNP (1.3%)、30 SNP (2.6%) となった。最終的に今後の解析に使用可能な SNP は 944 SNP (81.9%) となった。一方、全検体中、極端に実験成績が悪い検体は一つも認められなかった。得られたデータを基に、まずは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。

続いて、病型を層別化して関連解析を行った。その分類は二種類で一つは少関節炎型、多関節炎型、もしくはムチランス型、もう一つはリュウマトイドファクター (RF) 陽性もしくは陰性とした。その結果、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)、
さらに RF 陽性では *PRKCH* 遺伝子領域におけ
る rs11627926 で $P=1.2 \times 10^{-4}$ 、OR=0.38
(mode :dominant)であった。

メタアナリシスのデータ提供のために実施
した TaqMan 法による 37 個の SNP の実験で
は増幅不良など実験の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

goldengate-Assay の実験のクオリティを

評価したところ、最終的なコールレートは
81.9%であった。本研究の各プライマー・プロ
ーブセットはすべてカスタムデザインである
ことを考慮するとこれは平均的な値であった。
また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。

さらに、メタアナリシスに向けた実験では、
残念ながら 7 個の SNP において、有用な遺伝
子型データを得ることができなかったが、その
他 30 個の SNP については質の高いデータを得
ることができた。さらに統計学的に強い関連
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。すでにこれまでの結果において、5 領
域で病型との関連を示す SNP を検出するこ
とに成功した。さらにメタアナリシスに向けた、
貴重なデータを得ることができた。これらのデ
ータを利用した診療情報のデータベース構築
と病態予測アルゴリズムの作成への重要な基
盤情報を収集することに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H. A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. Hum Genet. 2008 Apr;123(3):297-306.

- 2) Meguro A, Ota M, Katsuyama Y, Oka A, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. Association of the toll-like receptor 4 gene polymorphisms with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis.* 2008 May;67(5):725-7.
- 3) Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I, Inoko H. Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. *Hum Genet.* 2008 Jul;123(6):655-60.
- 4) Nishizaki R, Ota M, Inoko H, Meguro A, Shiota T, Okada E, Mok J, Oka A, Ohno S, Mizuki N. New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3. *Eye.* 2009 Jan;23(1):222-9.
- 5) Mano S, Endo TA, Oka A, Ozawa A, Gojobori T, Inoko H. Detecting linkage between a trait and a marker in a random mating population without pedigree record. *PLoS One.* 2009;4(3):e4956. Epub 2009 Mar 24.
- 6) Shojima J, Tanaka G, Keicho N, Tamiya G, Ando S, Oka A, Inoue Y, Suzuki K, Sakatani M, Okada M, Kobayashi N, Toyota E, Kudo K, Kajiki A, Nagai H, Kurashima A, Oketani N, Hayakawa H, Takemura T, Nakata K, Ito H, Morita T, Matsushita I, Hijikata M, Sakurada S, Sasazuki T, Inoko H. Identification of MICA as a susceptibility gene for pulmonary Mycobacterium avium complex infection.. *J Infect Dis.* 2009 Jun 1;199(11):1707-15.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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 Tongshima, 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) Riveira-Munoz E, He SM, Escaramís G, Stuart PE, Hüffmeier U, Lee C, Kirby B, Oka A, Giardina E, Liao W, Bergboer J, Kainu K, de Cid R, Munkhbat B, Zeeuwen PL, Armour JA, Poon A, Mabuchi T, Ozawa A, Zawirska A, Burden AD, Barker JN, Capon F, Traupe H, Sun LD, Cui Y, Yin XY, Chen G, Lim HW, Nair RP, Voorhees JJ, Tejasvi T, Pujol R, Munkhtuvshin N, Fischer J, Kere J, Schalkwijk J, Bowcock A, Kwok PY, Novelli G, Inoko H, Ryan AW, Trembath RC, Reis A, Zhang XJ, Elder JT, Estivill X. Meta-Analysis Confirms the LCE3C_LCE3B Deletion as a Risk Factor for Psoriasis in Several Ethnic Groups and Finds Interaction with HLA-Cw6. *J Invest Dermatol* 2010 Nov 25. Online publication

資料 3

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レルは *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 I 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 のアレ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 (ニッポーバイオメディカル、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 アレル、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しない群に分け、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 アレルの数を 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 アレルとの関連: HLA 6 座の特定のアレルはその頻度が、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 アレルとの有意な関連を示した (Table II)。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 アレルは、DRB1*04:05, *04:01, *10:01 であり、RA 抵抗性の DRB1 アレルは、DRB1*13:02, *14:05, *08:02 であった (Table II)。これらの HLA-DRB1 アレ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 ($p = 3.76 \times 10^{-9}$) 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 でのアレル頻度は 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 III と Table IV 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 II)、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 II)、*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 II)。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 IV)、*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 V)。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 VI)。

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, $p = 9.04 \times 10^{-4}$, 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 II)。この結果は、DR抗原B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 VI)。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型コラーゲンで免疫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 II)。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 III)。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 $p = 5.99 \times 10^{-10}$, 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： $p = 8.31 \times 10^{-21}$, 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：*NFKBIL1* (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 IV)。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.* 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, Revirion 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