

- the HLA class III region. *Genomics*. 2001;71(3):263-70.
25. Lin CH, Cho CL, Tsai WC, Ou TT, Wu CC, Yen JH, et al. Inhibitors of kB-like gene polymorphisms in rheumatoid arthritis. *Immunol Lett*. 2006;105:193-7.
 26. Tamiya G, Shinya M, Imanishi T, Ikuta T, Makino S, Okamoto K, et al. Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet*. 2005;14:2305-21.
 27. Mu H, Chen JJ, Jiang Y, King MC, Thomson G, Criswell LA. Tumor necrosis factor a microsatellite polymorphism is associated with rheumatoid arthritis severity through an interaction with the HLA-DRB1 shared epitope. *Arthritis Rheum*. 1999;42:438-42.
 28. Matthey DL, Hassell AB, Dawes PT, Ollier WE, Hajeer A. Interaction between tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms and the HLA-DRB1 shared epitope in rheumatoid arthritis: influence on disease outcome. *Arthritis Rheum*. 1999;42:2698-704.
 29. Yang HC, Liang YJ, Chung CM, Chen JW, Pan WH. Genome-wide gene-based association study. *BMC Proc*. 2009;3 Suppl 7:S135.
 30. Ando K, Kanazawa S, Tetsuka T, Ohta S, Jiang X, Tada T et al. Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts. *Oncogene*. 2003;22:7796-803.
 31. Yan Z, Ferucci ED, Geraghty DE, Yang Y, Lanier AP, Smith WP, Zhao LP, Hansen JA, Nelson JL. Resequencing of the human major histocompatibility complex in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls in Alaska Natives of Southeast Alaska. *Tissue Antigens*. 2007;70:487-94.

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) 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.
- 2) 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.

- 3) 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 I. Case subjects used in this study

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

Table II. Rheumatoid arthritis susceptible and protective HLA alleles

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 種類の希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っとも重篤であり、その遺伝的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*, *EXOC4*, *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。特徴的な希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希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 (Tables 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.

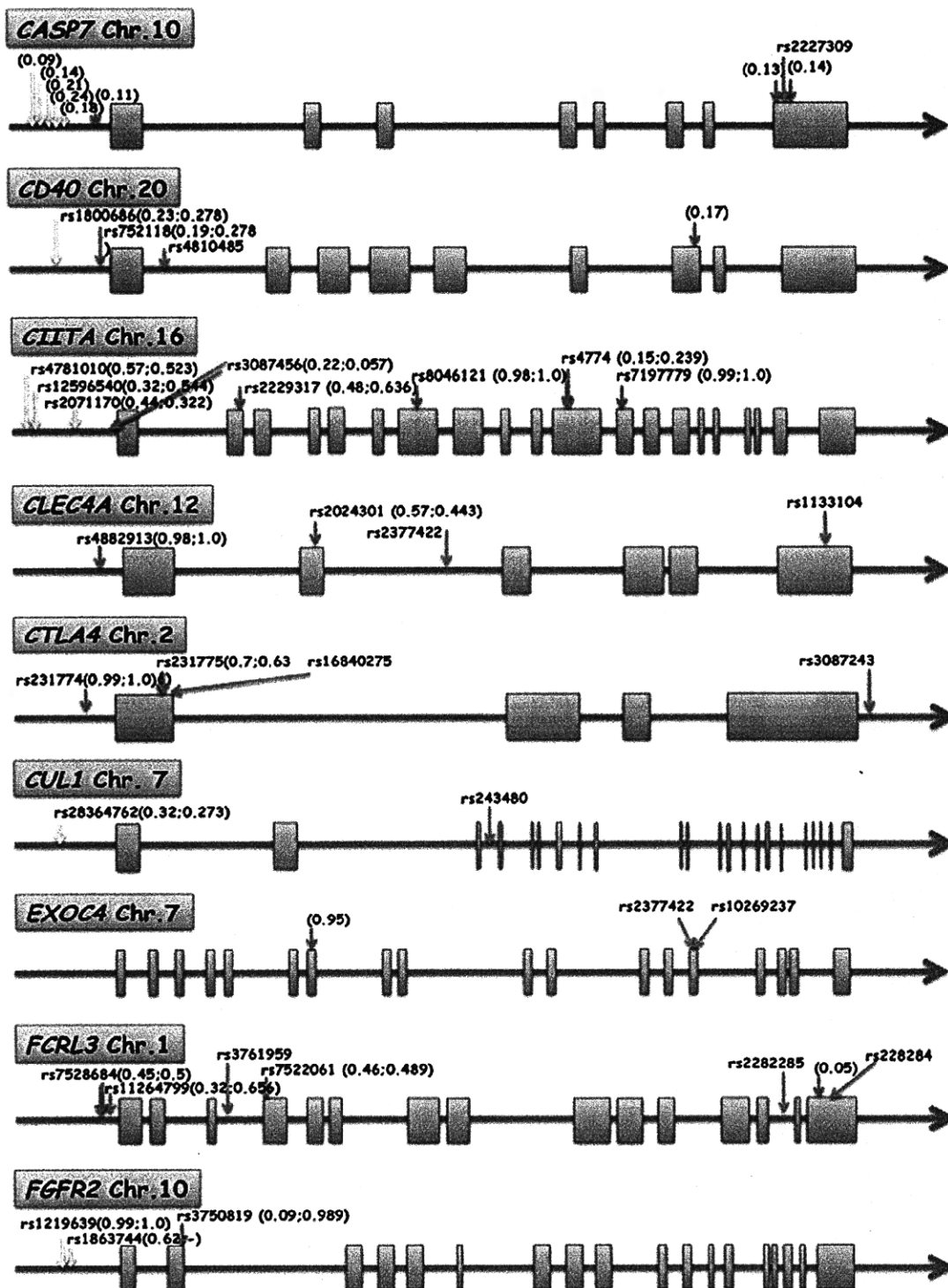
- 2) 國井七絵、光永滋樹、細道一善、奥平裕子、鈴木康夫、本間康彦、井ノ上逸朗、猪子英俊：関節リウマチ感受性遺伝子における希少多型・変異の探索。
BMB2010（神戸）2010.

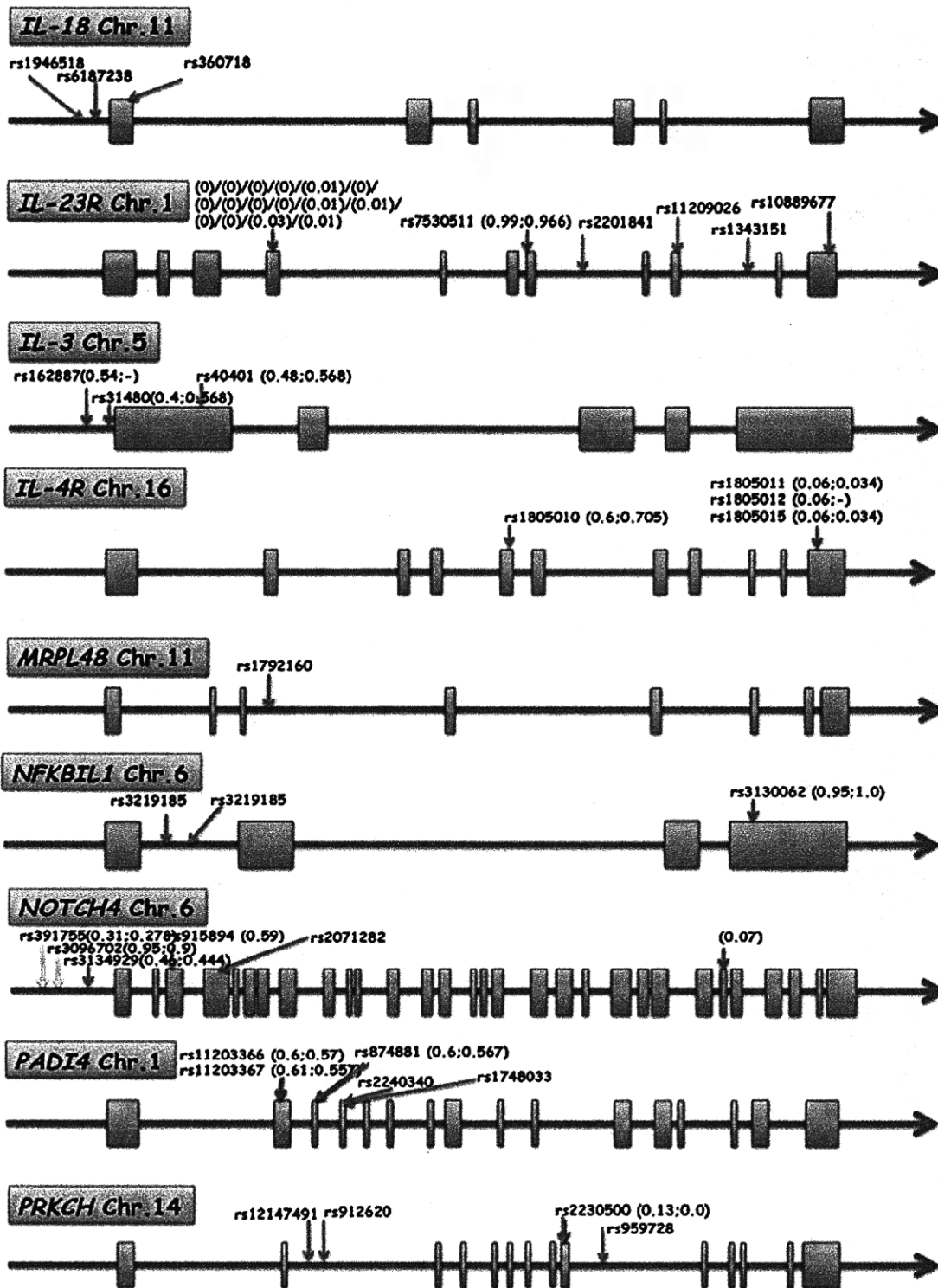
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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	86	8	0
CD40	1	1	0	0	0	0	2	1	1	1	0	0	1	0	0	19	2	17
CIITA	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	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	8	86
EXOC4	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	487	266	201
FCRL3	2	1	1	0	0	0	2	2	0	1	0	1	3	0	3	38	10	28
F6FR2	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
MARPL8	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	3	0	0	0	69	5	64
PAD14	3	0	3	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	189	16	173
PRKG1	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
RUND1	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
SUMO4	1	0	1	0	0	0	1	0	0	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													

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/T=5:9:1	A:T=19:11 (A=0.63,T=0.37)
IL4R	16	27356203	rs1805010	11	A/A:A/G: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/T=2:5:4	C:T=9:11 (C=0.41,T=0.59)	15	C/C:C/T:T/T/T=3:10:2	C:T=16:14 (C=0.54,T=0.44)
CASP7	10	115457264	indel	12	T/T:T/G:G/G=12:0:0	T:G=24:0 (T=1.0,G=0.0)	15	T/T:T/G:G/G=15:0:0	T:G=30:0 (T=1.0,G=0.0)





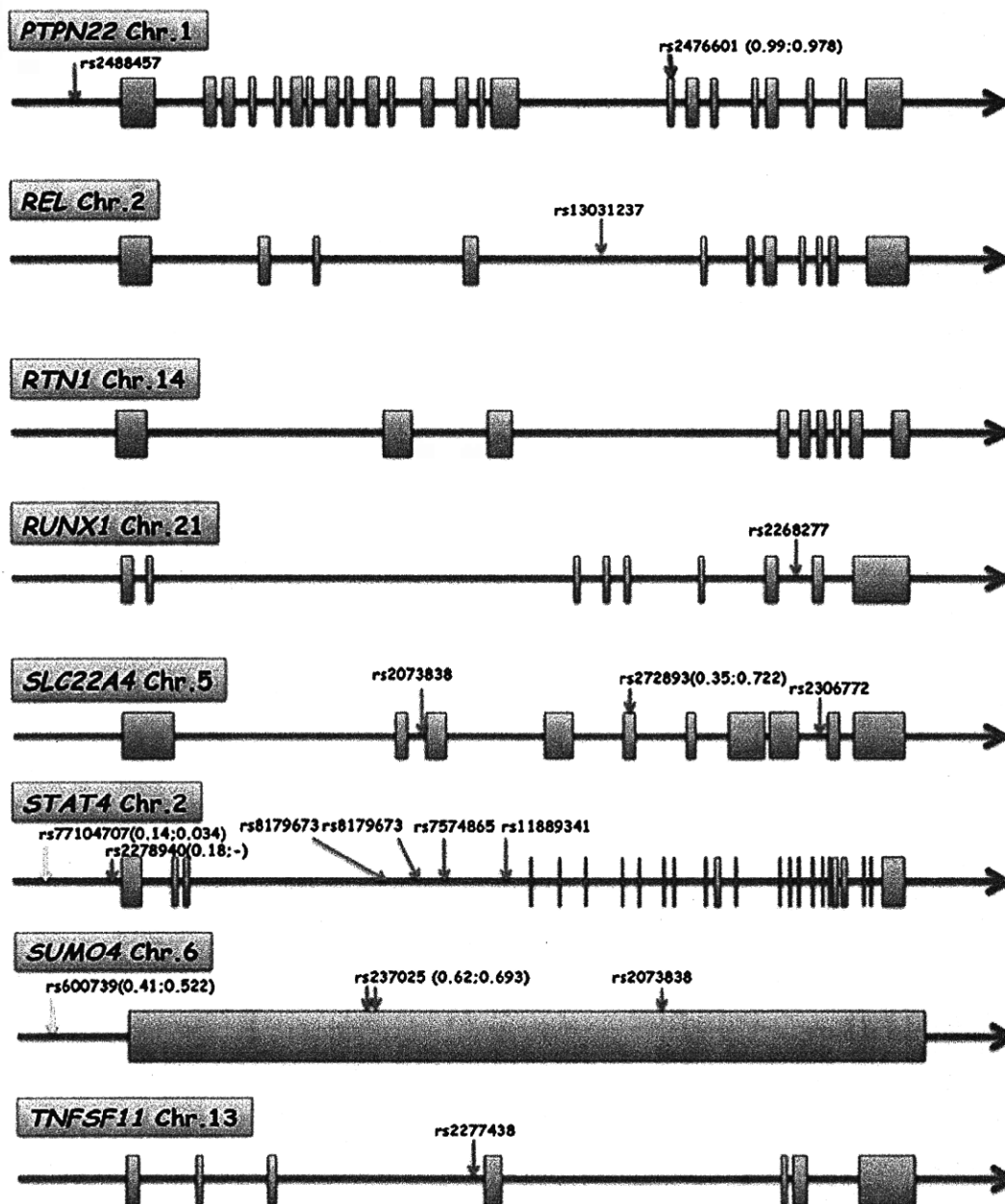


Figure 1. 26 遺伝子で検出された SNP。括弧内は（シーケンスデータの頻度、HapMap での頻度）を示す。

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

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

DNA polymerase の strand displacement (鎖置換反応) 活性を利用した等温増幅法では、サンプル DNA 中にランダムに存在するニックからの strand displacement も起こるので、サンプルの状態によっては非特異的反応が生じることが分かった。そのため反応液組成を検討し、非特異的反応を低減する方法を開発し、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 反応へ応用した。また、LAMP 反応で使われる外側の primer F3 と B3 は用いなくても増幅効率は実用的には問題がないことが分かった。

反応液組成を改良し、primer F3 と B3 を用いない改良 LAMP 法による HLA-DRB1 の low resolution タイピング法と、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、それら遺伝子の SNP タイピング法を開発した。これらのタイピングでは等温で増幅後、サイバークリーン I 滴下により、増幅の有無を肉眼的に判定可能であった。

HLA-DRB1 については、96 ウェル・プレートのウェル底面に 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方法も開発した。反応したプローブは発色により肉眼的に判定可能であった。これにより、HLA-DRB1 の low resolution タイピングが 96 ウェル・プレートの 1 ウェルだけを使うことにより可能となった。

A. 研究目的

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。

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)、あるいはステイブン・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。

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、HLA 特に DRB1 のタイピングが重要であるが、RA 感受性遺伝子の SNP のタイピングも必要である。よって HLA 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。よって我々は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。

個別化医療においては、個人差すなわち多型を調べる molecular diagnostics (以下 MDx) が重要である。このための迅速・簡便・安価な方法の開発がヒトゲノムテラピー医療にもつながると考えられる。そして MDx の一つの方向性は、"decentralization" である。検査センターではなく、できるだけ患者に近い場所で迅速・簡便・安価な方法で MDx が可能となれば個別化医療の実現・活性化につながることも考えられる。我々が開発したのは、特殊な機器を必要としない等温増幅法と可視化による HLA の genotyping と SNP typing はこの方向性にも合致している。さらに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康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康人から得た末梢血白血球を 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℃ 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 μ L 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

LAMP 反応により HLA のタイピングを行った場合、サンプルの状態により非特異反応が起こる場合があることが分かった。このサンプルを ligase 処理すると増幅反応そのものが起こらなくなるが、それに DNase I を加えニックを生じさせると、用量依存的に特異反応から非特異反応の増加と変化した(Fig. 1)。これらの結果から LAMP 反応においては、サンプル DNA 中にランダムに存在するニックから strand displacement により生じた 1 本鎖にプライマーがアニールして伸長反応が起こり、標的 DNA 領域が増幅されと考えられた。一方、高濃度のベタインが存在すると 2 本鎖 DNA の部分的解離が起こり、DNA の熱変性による解離がなくても LAMP 反応は進行するとの報告がある(12)。よってベタイン存在下で増幅を行う通常の LAMP 反応においては、ベタインにより部分的に解離した DNA にプライマーがアニールして伸長反応が起こる特異的反応と、ランダムに存在するニックからの非特異反応が同時平行的に起こるため、サンプルの状態により結果にバラツキが生じると考えられる。

これらの結果をもとに反応液組成の再検討を行った。その結果を Fig. 2 に示した。反応液組成を改良することにより非特異反応を抑制できることが分かった。Figure 2B では二つの非特異的増幅が消失していることが分かる。

さらに、検討の結果 outer primer の F3 と B3 は反応に用いなくてもほぼ同様な増幅効率と特異性を保てることが分かった(Fig. 2)。それで、反応系の複雑さを低減するた

めに以下の実験では F3、B3 を用いないで行った。

次にこの反応系を用いて、HLA-DRB1 の low-resolution typing system を開発した。これは日本人集団でみられる DRB1 アリル 31 種類を 11 群に分け、各群の特異的増幅を行い、増幅の有無により DRB1 の血清学的レベルでのタイピング (low-resolution typing) を行うものである。60 分の反応終了後に、2 本鎖 DNA へのインターカレーターである SYBR Green I を滴下し、増幅の有無を調べることにより肉眼的に判定が可能となる。Figure 3 にその例を示した。11 群全てが特異的に増幅し、肉眼的に判定できることが分かった。LAS (富士フイルム) によりフィルターをかけて励起光を遮断して撮影したものを Figure 3B に示したが、容易に判定が可能であった。

以上の方法は増幅の有無によりタイピングを行うので、HLA の場合はアリルあるいはアリルグループ (群) の数だけ、biallelic な SNP の場合は 2 種類の増幅が必要である。よって、実用化して行くにはマルチプレックス化が必要であると考え、プラスチック基板上に複数のプローブ (プライマー) を固定した系で反応を行った。等温増幅の増幅産物はプラスチック基板上の特異的プローブ (プライマー) により捕捉され、Bst DNA polymerase の strand displacement 活性によりプローブ (プライマー) からの伸長反応が起こり、そのときに取り込まれる biotin-dUTP を利用して発色させるものである。HLA-DRB1 の全アリルを増幅させるプライマーセットを用いて増幅し、複数の特異的プローブ (プライマー) を固定しておけば、HLA タイピングが可能となる。

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. 4)。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. 5)。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 6 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グ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. 7)。

D. 考察