

201207010A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

ゲノム網羅的関連解析の大規模メタ解析を基盤としたcommon
diseaseのテーラーメイド医療実用化()に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 桃原 茂樹

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
ゲノム網羅的関連解析の大規模メタ解析を基盤としたcommon diseaseのテーラーメイド医療実用化に関する研究-----	3
桃原 茂樹 東京女子医科大学	
II. 分担研究報告	
1. 関節リウマチ感受性遺伝子 <i>NFKB1E</i> および <i>RTKN2</i> の機能性多型に関する研究-----	11
山本 一彦 理化学研究所ゲノム医科学研究センター	
2. 次世代シーケンサーを用いた関節リウマチにおける稀な疾患感受性遺伝子多型同定に関する研究-----	17
松田 文彦 京都大学	
3. GWASメタ解析を基盤とした関節リウマチ重症化関連因子の同定に関する研究----	21
桃原 茂樹、山中 寿 東京女子医科大学	
4. 抗CCP抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索に関する研究-----	25
三森 経世 京都大学	
5. GWASメタ解析、診断・予後予測モデルの作成、最適化に関する研究-----	29
山田 亮 京都大学	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	35

I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

ゲノム網羅的関連解析の大規模メタ解析を基盤とした
common diseaseのテーラーメイド医療実用化に関する研究

研究代表者 桃原 茂樹 東京女子医科大学医学部 教授

研究要旨：昨年度実施した大規模GWASメタ解析を踏まえ、新規疾患感受性遺伝子の機能解析、疾患感受性遺伝子をターゲットとした関節破壊関連因子の同定、次世代シーケンサーを用いた稀な疾患感受性遺伝子多型（rare allele）の同定、GWASメタ解析およびrare allele解析の結果を受けた診断・予後予測モデルの作成ならびに最適化に関する研究、新規疾患感受性遺伝子解析のサブ解析としての抗CCP抗体陰性患者における疾患感受性遺伝子の同定を行うなど当初の研究計画通りに研究が進行しており、目覚ましい成果であったと考えている。

研究代表者：桃原 茂樹
東京女子医科大学 医学部 教授

研究分担者：山本 一彦
理化学研究所ゲノム医科学研究センター
チームリーダー

研究分担者：松田 文彦
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究分担者：山中 寿
東京女子医科大学医学部 教授

研究分担者：三森 経世
京都大学大学院医学研究科臨床免疫学
教授

研究分担者：山田 亮
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

因として喫煙などの環境因子に加え、ゲノム網羅的相関解析（GWAS）により多くの遺伝因子が明らかになったが、少なからず人種差が存在している。また病状や薬物反応性には大きな個人差が認められるが、遺伝因子の違いが背景にあると考えられている。本研究課題の目的はRAをモデルケースとして common disease のテーラーメイド医療を実現化させることである。現在、実現化にあたり以下の問題点が挙げられている。1.現時点で確定している遺伝子多型では十分に疾患感受性を説明出来ない、2.疾患発症や重症度などの予測モデルが必要であるが、多因子を変数とする適切な統計モデルが確立されていない、3.構築したモデルを validation するコホートに乏しい。これらの問題解決のため国内の主要なRA 関連遺伝子研究機関を結集し特色ある研究組織を構成した。計画初年度は本研究計画における中心プロジェクトとして国際的にも大規模な GWAS のメタ解析（患者 4074 名、対照 16891 名）と追認解析（患者 5000 名超、対照 20000 名超）を行い、common allele の包括的な同定に成功している。平成 24 年度は

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）は国内患者数が最多（約 80 万人）の自己免疫疾患であり、社会的逸失利益の大きい疾患である。病

GWAS メタ解析の結果を基盤とした各種サブ解析に加え、rare allele の同定を進め、さらに rare allele を含めた診断・予後予測モデルの作成ならびに最適化についての検討も行った。

B. 方法

本研究目的を達成するため、これまで独立して RA 関連遺伝子に関する GWAS を行ってきた国内の主要研究機関を結集して学術コンソーシアムを組織した (GARNET コンソーシアム)。

GWAS メタ解析の結果を受け、同定した疾患感受性遺伝子の機能解析を行うこととし、まず *NFKBIE* および *RTKN2* に着目し、検討を行った (担当: 山本)。原因となっている多型の探索・同定のために、in silico および in vitro の方法を組み合わせた多型の評価を行った。in silico での評価として、各種ゲノムデータベース (HapMap プロジェクト、1000 ゲノムプロジェクト) から周辺領域の一塩基多型 (SNP) を抽出し、翻訳領域にあるものについてはアミノ酸配列の置換をもたらすかどうかを、非翻訳領域にあるものについては、転写活性に影響を与えるか否かを評価した。in vitro での評価として、遺伝子発現に影響を与えている可能性の高い多型周辺配列については、ゲルシフトアッセイによる核内タンパクの結合の評価、およびルシフェラーゼアッセイによる転写増強・抑制活性の評価を行った。

rare allele 解析 (担当: 松田) の対象は濃厚な家系例を示す一家系 8 名 (患者を含めた同胞の 8 名のうち 4 名罹患) および、関節破壊の進行の早い RA 患者 69 名の合計 77 名とした。アジレント社の sure select を用いてエクソーム濃縮を行い、イルミナ社の Hi-seq を用いて全エクソームシーケンスを行い、RA 患者の各塩基配列を決定した。同時に健常対照者 99 名の DNA を用いてライフテクノロジー社の kit にてエクソーム濃縮を行い、同社の次世代シーケンサーである

SOLID を用いて全エクソームシーケンスを行った。それらデータを元に健常対照群の各塩基配列を決定した。対照群のデータおよび理化学研究所の他疾患のデータ、公開データベース (DBSNP, 1000 人ゲノム, EDP) のデータを基に、de novo mutation (新規遺伝子変異) の確定を行った。家族例については疾患群 4 例と非疾患群 4 例の比較を行い、分布の不均衡を示す de novo mutation および遺伝子、染色体領域の解析を行った。非家系例については de novo mutation の蓄積の検定のほか、稀な変異の分布における検定を行い、分布の偏りについて遺伝子領域ごとに評価した。

GWAS メタ解析により同定された疾患感受性遺伝子をターゲットに疾患重症化関連遺伝子の同定を試みた (担当: 桃原、山中)。発症 5 年時の両手 X 線を用いた Sharp van der Heijde score (SHS, hands) により関節破壊を評価した。発症 5 年時の Sharp van der Heijde score (SHS, hands) が入手可能だった 865 例を対象とした。遺伝要因として昨年行った大規模 GWAS メタ解析で GWAS 水準をクリアした 13 遺伝子領域、非遺伝要因として性、発症年齢、抗 CCP 抗体、リウマトイド因子、喫煙歴について検討した。まずそれぞれの候補要因について対数化した SHS を従属変数とした単回帰分析を行い、有意水準 0.05 をクリアした候補要因をステップワイズ回帰分析による最終解析に用いた。最終的に得られた関節破壊関連因子についてその保有数と SHS との関連も確認した。

抗 CCP 抗体は RA に特異的な自己抗体だが、陰性患者も 20% 程度存在すると考えられている。抗 CCP 抗体陰性 RA における疾患感受性遺伝子を同定するために、抗 CCP 抗体陰性 RA 670 例と対照 16891 例による GWAS メタ解析を行い、抗 CCP 抗体陰性 RA 902 例と対照 3764 例にて追認試験を行った (担当: 三森)。

rare allele 解析の結果を受けた診断・予

後予測モデルの作成ならびに最適化に向け、本体研究で得られたrare alleleデータに加え、既報の生物学的知見・既発表のrare alleleデータを参考にコンピュータシミュレーションにてデータを作成した。rare allele探索に関する研究ならびにrare alleleに関するケース・コントロール解析手法に関する研究について、それぞれモデルを設定し、それらのパフォーマンスをモンテカルロ法によって評価した。

C. 結果

NFKBIE、*RTKN2*の各遺伝子翻訳領域には、アミノ酸置換を伴う非同義SNP (non-synonymous SNP ; nsSNP) が、各2個ずつ存在し、これらの組み合わせで、それぞれ二つのハプロタイプを構成していた。これらのnsSNPが遺伝子機能に与える影響をリポーターアッセイで評価したところ、*NFKBIE*のリスクハプロタイプでNF- κ B活性が上昇することが明らかになった。*NFKBIE*はNF- κ B活性を抑制するタンパクであるI κ B ϵ をコードするため、リスクハプロタイプではこれらのアミノ酸置換で、I κ B ϵ の抑制能が低下することが示唆された。一方で、*RTKN2*遺伝子ではこれらのアミノ酸置換がタンパク機能に与える影響が小さいことを確認した。アレル別の発現量定量的結果から、両遺伝子領域ともに、遺伝子発現に影響を与える遺伝子多型の存在が示唆されたため、in silicoおよびin vitroの方法を組み合わせ多型の評価スクリーニングを行った結果、*NFKBIE*領域に1 SNP、*RTKN2*遺伝子領域に2 SNPの遺伝子発現を制御する候補多型が明らかになった。これらの多型は転写因子の結合を量的に変化させることによって転写活性に影響を与えているものと考えられた。*NFKBIE*遺伝子の多型 (rs22332424) では、リスクアレルで転写活性が下がり、一方で、*RTKN2*遺伝子の候補多型 (rs61852964、rs12248974) は、いずれもリスクアレルで遺伝子発現

量を増加させた。*NFKBIE*がNF- κ B活性を負に制御し、*RTKN2*が正に制御することを考慮すると、いずれの多型もリスクアレルでNF- κ B活性を量的に高めることが考えられた。

rare allele 解析の基盤として rare allele 探索に関する研究結果を使用した。10回以上読まれた変異のみを解析に採用した。全遺伝子変異は 86941 個であり、疾患群の変異平均 Call 成功率は 91.4%、対照群は 69.6%であった。家系例については 8名共に塩基配列が決定された遺伝子多型は 75395 個であり、内 19455 個が少なくとも一つの変異を家系内で認めた。1000 個の変異が患者群にのみ変異を認めた。113 個が罹患患者 4 名のみに変異を認めた。罹患患者 4 名にのみ変異を認める de novo mutation を 3 つのみであり、その全てが 3 番染色体上にあり、アミノ酸変異をもたらすものであった。また、他の variant の分布の評価から、染色体 3 番の多くの領域が罹患患者 4 名で共有されている可能性が示された。非家系例について de novo mutation に着目した解析を行い、12552 の de novo mutation を同定した。4 名に変異を認めるものを 4 つ、3 名に変異を認めるものを 17 同定した。複数人に認める de novo mutation を複数持つ遺伝子は 8 つであった。次に、de novo mutation に限らず、稀な exon 上の変異の分布の偏りを遺伝子ごとに評価を行った(C-alpha テスト)。対照群でアレル頻度 2.5%以下の変異で Call 成功率 90%以上の多型を対象に解析を行った結果、3203 遺伝子が少なくとも一つの変異を含んでおり、p 値 0.0005 以下を示す領域を 12 同定した。関節破壊関連遺伝子の同定では、抗CCP抗体陽性 (P=3.76 X 10⁻⁵)、リウマトイド因子陽性 (P=0.00043)、女性 (P=0.0020)、若年発症 (P=0.014)、HLA-DRB1 SE (P=0.00012)、*PADI4* (P=0.016) が単回帰分析で有意水準をクリアした。これらの候補要因についてステップワイズ回帰分析を行った結果、リウマトイド因子陽

性以外が関節破壊と有意な関連を示すことが明らかとなった。さらにこれらの関節破壊関連因子の保有数と関節破壊との間に有意な傾向が確認できた。

抗 CCP 抗体陰性 RA 670 例、対照 16891 例の GWAS メタ解析を行った結果、GWAS のみでは 5×10^{-8} の有意水準を満たす SNP はなく、上位 35 遺伝子領域の SNP を用いて追認試験を行った (抗 CCP 抗体陰性 RA 902 例、対照 3746 例) 結果、1 つの遺伝子領域が有意水準に達し、3 つの領域が suggestive な関連を示した。

D. 考察

本研究の最終目標は RA をモデルとした common disease のオーダーメイド医療を実現させることである。具体的には、遺伝子型をベースに個人の病態や薬剤の効果を予測する診断モデルの樹立、さらには特定の遺伝子を狙って抑えることによる日本人にふさわしい、副作用の少ない、より効果的な治療法の開発目標としている。

遺伝子多型は遺伝子の機能を質的量的に変化させて、表現型 (自己免疫疾患においては個人が示す免疫反応の強さなど) に影響するが、計画初年度に行った大規模な GWAS メタ解析により比較的頻度の高い遺伝子型 (common allele) のうち主要なものについてはほぼ同定したと考えている。今回はこれに加え、疾患と関連する遺伝子多型には頻度が低いもの (rare allele) を包括的なアプローチにより網羅的に同定したことで、オーダーメイド医療の実現に一步近づいたと考えている。さらに疾患重症化遺伝子の同定、特異的自己抗体陰性患者における疾患感受性遺伝子の同定、疾患感受性遺伝子の機能解析を進め、RA のオーダーメイド医療の基盤となる病態解明につながる研究を進めることが出来た。

E. 結論

当初の研究計画通りに研究が進行しており、目覚ましい研究成果が得られたと考

えている。

F. 健康危険情報

研究の結果、得られた成果の中に特に健康危険情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, et al. Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF-kappaB pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. PLoS genetics. 2012 Sep;8(9):e1002949.

2. Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, et al. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. Nature genetics. 2012 May;44(5):511-6.

3. Onuki R, Yamada R, Yamaguchi R, Kanehisa M, Shibuya T. Population model-based inter-diplo type similarity measure for accurate diplo type clustering. Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology. 2012 Jan;19(1):55-67.

4. Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, et al. PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. PLoS one. 2013;8(4):e61045.

5. Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, Maruya E, Katayama M, et al. ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on

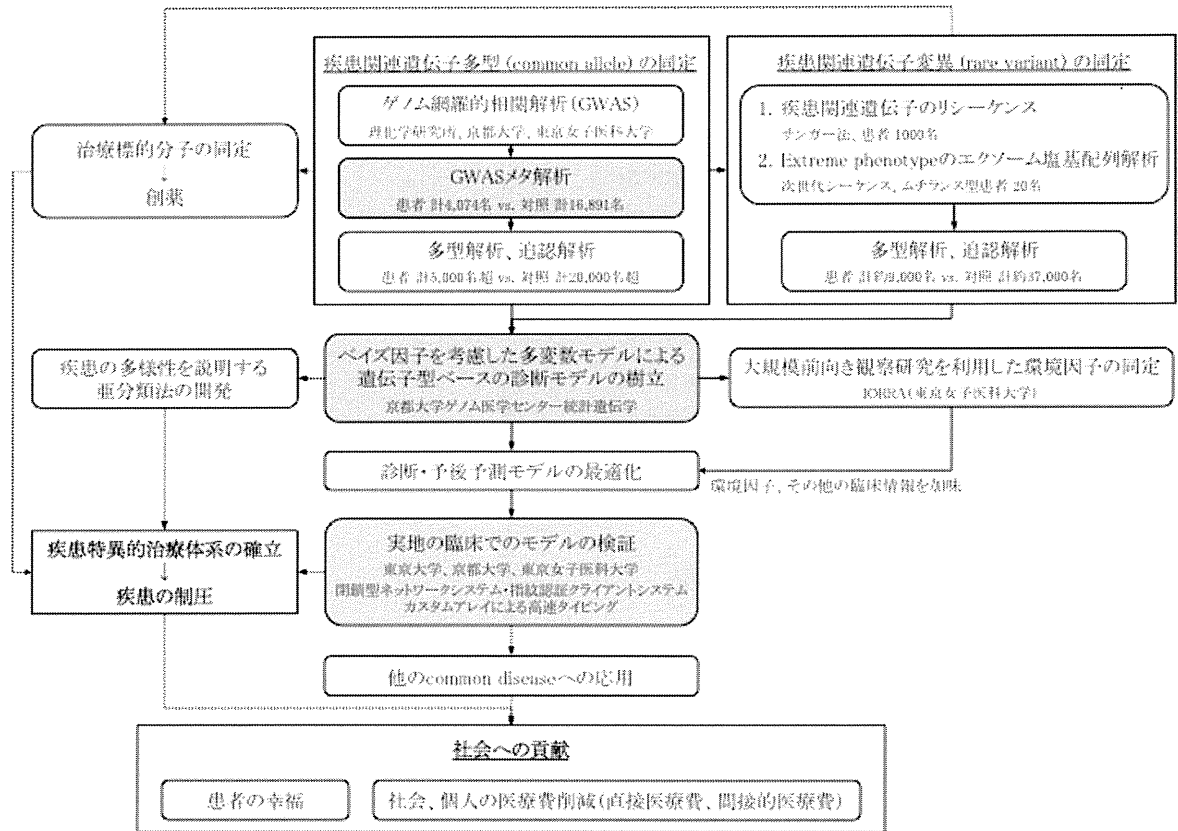
RF positivity in Japanese. PLoS one. 2012;7(7):e40067.

6. Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, et al. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. Arthritis and rheumatism. 2013 Feb;65(2):472-80.

7. Ohmura K, Terao C, Mimori T. Recent advances on the genetics of rheumatoid arthritis: current topics and the future. Inflamm Regen 2012;32(3):90-98.

H. 知的財産権の出願・登録状況
予定なし

流れ



II. 分担研究報告

分担研究報告書

関節リウマチ感受性遺伝子 *NFKBIE* および *RTKN2* の機能性多型に関する研究

研究分担者 山本 一彦 理化学研究所ゲノム医科学研究センター チームリーダー

研究要旨：本研究では、関節リウマチのゲノムワイド関連解析で明らかにされた候補遺伝子領域のうち、*NFKBIE* および *RTKN2* 遺伝子領域に注目し、疾患の原因となっている機能性多型の探索同定を行った。その結果、*NFKBIE* には2つの非同義一塩基多型（nsSNP）と1つの制御性SNP（rSNP）が存在し、遺伝子機能を質的・量的に変化させることが明らかになった。同様に、*RTKN2* 遺伝子領域には、2つのrSNPが遺伝子発現を調節していることが明らかになった。各遺伝子多型は、連鎖不平衡にあり、ハプロタイプで協調して疾患発症に寄与している可能性が考えられた。また、いずれの遺伝子においても、疾患の発症のリスクを有するアレル（ハプロタイプ）において、細胞内のNF- κ B活性を高めることが明らかになった。したがって、これらの遺伝子を標的としてNF- κ Bの活性を抑えることが有効な治療につながることを示唆された。

研究分担者：山本 一彦
理化学研究所ゲノム医科学研究センター
チームリーダー

研究協力者：高地 雄太、明前 敬子
理化学研究所ゲノム医科学研究センター

その機能解析を行った。また、両遺伝子ともに、関節リウマチの病態において重要と考えられるNF- κ B活性に影響を与えることが示唆されているため、これらの多型がNF- κ B活性に与える影響も評価した。

A. 研究目的

我々はこれまでに、関節リウマチのゲノムワイド関連解析およびそのメタ解析によって、20を超える遺伝子領域が疾患発症に関与していることを明らかにしてきた。しかし、同定された領域の多くでは、原因となっている遺伝子多型が明らかでなく、疾患発症に関与する機序は不明である。本研究では、関節リウマチ感受性遺伝子のうち、日本人で特に寄与の高い *NFKBIE* (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon) および *RTKN2* (Rhotekin 2) 遺伝子領域に注目して、疾患の原因となりうる多型の探索および

B. 方法

原因となっている多型の探索・同定のために、in silico および in vitro の方法を組み合わせた多型の評価を行った。まず、各種ゲノムデータベース (HapMap プロジェクト、1000 ゲノムプロジェクト) より、*NFKBIE* および *RTKN2* 周辺領域の一塩基多型 (SNP) を抽出した。これらのうち、翻訳領域にあるものについては、アミノ酸配列の置換をもたらすかどうか評価した。非翻訳領域にあるものについては、転写活性に影響を与える可能性が考えられたため、SNP 周辺配列について、配列の保存性や homology から算出される Regulatory Potential (RP)

score、および各種エピゲノムデータベース (ChIP-seq や DNase-seq) のデータを用いて、遺伝子発現制御に与える影響を *in silico* に評価した。次に、遺伝子発現に影響を与えている可能性の高い多型周辺配列については、ゲルシフトアッセイによる核内タンパクの結合の評価、およびルシフェラーゼアッセイによる転写増強・抑制活性の評価を *in vitro* に評価を行った。

(倫理面への配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析に関する実験および個人情報の取り扱い、理化学研究所および研究協力機関の倫理委員会の承認を受け、同委員会の作製した指針 (文部科学省、厚生労働省及び経済産業省合同ヒトゲノム・遺伝子解析研究指針に基づく) のもとに行った。

C. 結果

NFKBIE、*RTKN2*の各遺伝子翻訳領域には、アミノ酸置換を伴う非同義SNP (non-synonymous SNP ; nsSNP) が、各2個ずつ存在し、これらの組み合わせで、それぞれ二つのハプロタイプを構成していた (表1)。これらのnsSNPが遺伝子機能に与える影響を、NF-κBリポーターアッセイで評価したところ、*NFKBIE*のリスクハプロタイプで、NF-κB活性が上昇することが明らかになった (図1)。*NFKBIE*はNF-κB活性を抑制するタンパクであるIκBεをコードするため、リスクハプロタイプではこれらのアミノ酸置換 (P175L およびV194A) で、IκBεの抑制能が低下することが示唆された。一方で、*RTKN2*遺伝子では、リスクハプロタイプと非リスクハプロタイプでは、NF-κB活性へ与える影響の差は認められなかったため、これらのアミノ酸置換がタンパク機能に与える影響は小さいと考えられた。

表1. 各遺伝子における nsSNP およびハプロタイプ頻度

	nsSNP		頻度	
	rs2233434	rs2233433	患者	健常者
<i>NFKBIE</i>				
Non-risk	A	C	0.75	0.78
Risk	G	T	0.25	0.21
	nsSNP		頻度	
	rs3125734	rs61850830	患者	健常者
<i>RTKN2</i>				
Non-risk	A	C	0.86	0.88
Risk	G	T	0.11	0.09

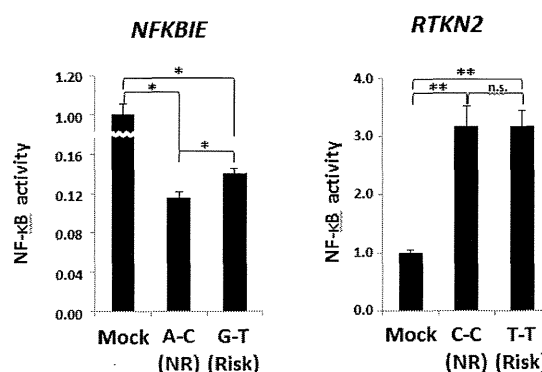


図1. 各遺伝子が NF-κB 活性に与える影響

一方で、アレル別の発現量定量的結果から、両遺伝子領域ともに、遺伝子発現に影響を与える遺伝子多型の存在が示唆されたため、*in silico* および *in vitro* の方法を組み合わせて多型の評価スクリーニングを行った (図2)。

Step	解析領域の定義	<i>NFKBIE</i> 6p21.1	<i>RTKN2</i> 10q21.2
Step 1	疾患と強い関連を認めたSNPを含むLDブロック $P < 1.0 \times 10^{-5}$ in the GWAS	44,136,140 - 44,394,125	63,610,652 - 63,739,041
Step 2	パブリックデータベースからSNPの抽出		
	A) 1000G (IPT+CHB+CHS: 177 検体) B) HapMap (IPT: 90 検体)	111 SNPs	207 SNPs
Step 3	発現制御への <i>In silico</i> での評価		
	3a) Regulatory Potential (RP) score	53 SNPs	97 SNPs
	3b) ChIP-seq and DNase-seq data A) Transcription factor binding B) Histone modification C) DNase hypersensitivity	21 SNPs	10 SNPs
Step 4	疾患との関連の評価 Imputation-based GWAS data $P < 0.05$	14 SNPs	10 SNPs
Step 5	<i>In vitro</i> の茶を用いた評価		
	5a) Electrophoretic mobility shift assay 5b) Luciferase assay	3 SNPs 1 SNPs	6 SNPs 2 SNPs

図2. 各遺伝子領域の制御性多型の同定

その結果、*NFKBIE*領域に1 SNP、*RTKN2*遺伝子領域に2 SNPの遺伝子発現を制御する候補多型が明らかになった。これらの多型は転写因子の結合を量的に変化させることによって転写活性に影響を与えているものと考えられた。*NFKBIE*遺伝子の多型 (rs22332424) では、リスクアレルで転写活性が下がり (図3)、一方で、*RTKN2*遺伝子の候補多型 (rs61852964、rs12248974) は、いずれもリスクアレルで遺伝子発現量を増加させた (図4)。*NFKBIE*がNF- κ B活性を負に制御し、*RTKN2*が正に制御することを考慮すると、いずれの多型もリスクアレルでNF- κ B活性を量的に高めることが考えられた。

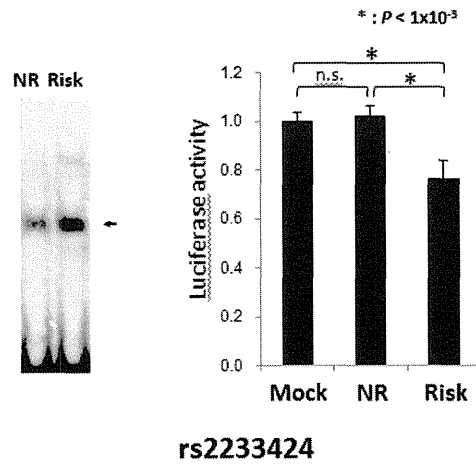


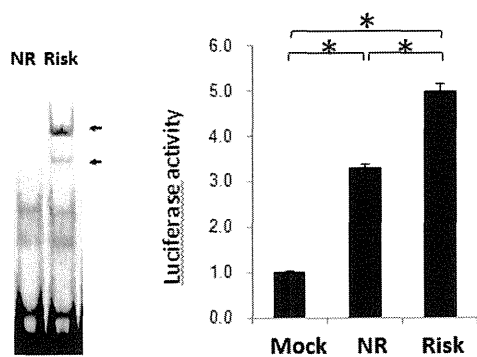
図4. *RTKN2*の発現制御多型

D. 考察

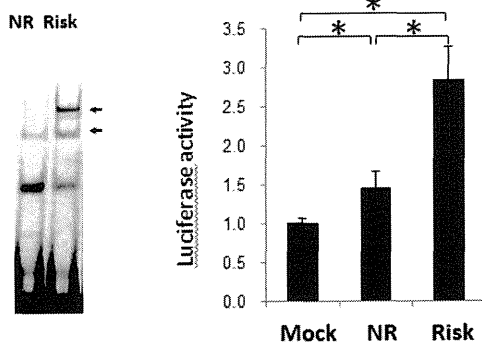
NFKBIE、*RTKN2* 遺伝子領域において、疾患原因となりうる機能性多型の探索を行ったが、両領域ともに複数の候補多型が明らかになった (*NFKBIE*、2 nsSNPs、1 rSNP; *RTKN2*、2 rSNP、図5)。*NFKBIE*の2つの nsSNP (P175L/rs2233433; V194A/rs2233434)は、いずれのアミノ酸置換も、タンパク機能に与える影響は軽微であることが予測されたが、NF- κ B リポーターアッセイでは、リスクアレルにて NF- κ B の抑制能が低下していた。同様に、候補制御性多型 (rs2233424) のリスクアレルでは、転写因子の結合を介して、遺伝子発現が低下することが明らかになった。これらの候補多型は、強い連鎖不平衡にあり、ハプロタイプを構成するが、いずれのリスクアレルにおいても、*NFKBIE* の機能を低下させる (その結果 NF- κ B 活性を増強することから、協調して疾患発症にかかわっていることが考えられた。

同様に、*RTKN2*の2つのrSNP

(rs61852964およびrs12248974) は、強い連鎖不平衡にあり、いずれもリスクアレルで発現が増加する。*RTKN2*は主にCD4陽性T細胞に発現し、Rho binding domainを持つことからRho-effectorタンパクであることが示唆されている。強制発現株の解析では、NF- κ B活性を増強することが知られているが、リスクアレル



rs61852964



rs12248974

で*RTKN2*の発現量が高くなることは、T細胞におけるNF-κB活性の増強が疾患発症に関与していることを示唆するものである。

are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. PLoS genetics. 2012 Sep;8(9):e1002949.

2. 学会発表

1. Myouzen K et al. Functional variants of NFKBIE and RTKN2 genes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in Japanese. The American Society of Human Genetics 2012 Annual Meeting in San Francisco.

H. 知的財産権の出願・登録状況
予定なし

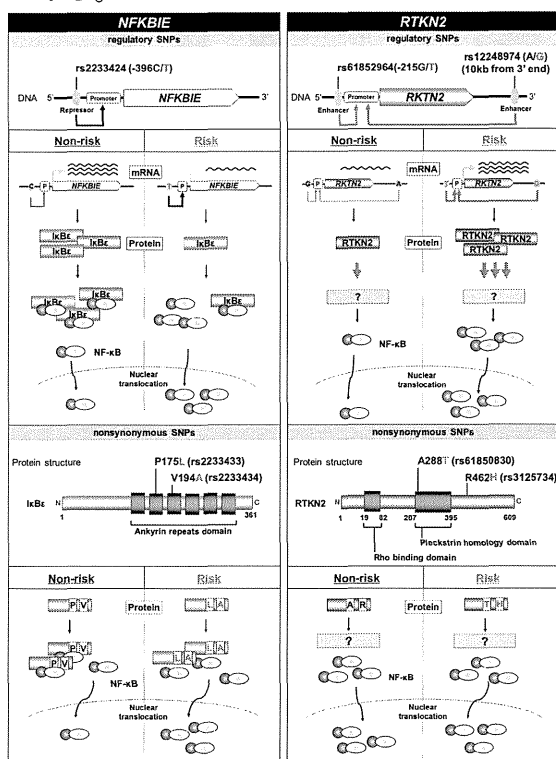


図5. *NFKBIE*および*RTKN2*遺伝子の候補原因多型

E. 結論

NFKBIE、*RTKN2*ともに原因多型のリスクアレルを有することによりNF-κBの活性化が亢進し、関節リウマチの感受性を高めていると考えられる。したがって、これらの遺伝子を標的として、NF-κBの抑制を図ることが有効な治療につながる可能性がある。

F. 健康危険情報

研究の結果、得られた成果の中に特に健康危険情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, et al. Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF-kappaB pathway

分担研究報告書

次世代シーケンサーを用いた関節リウマチにおける稀な疾患感受性遺伝子多型同定に関する研究

研究分担者 松田 文彦 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究要旨：関節リウマチ(RA)において、これまでのアレイに基づいた全ゲノム関連解析で見出せなかった頻度が稀な疾患感受性遺伝子多型を同定するために、家系例8例、非家系例69例のDNAを用いて次世代シーケンサーにて全エクソン領域塩基配列決定を行った。その結果、家系例では染色体3番の関与が強く示唆された。非家系例では稀な疾患感受性遺伝子多型を有する合計12領域の候補を同定した。

研究分担者：松田 文彦
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究協力者：寺尾 知可史
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 助教

A. 研究目的

関節リウマチ(RA)において、一般人口集団において頻度が低く、これまでのアレイに基づいた全ゲノム関連解析で見出せなかった稀な疾患感受性遺伝子多型を同定する

B. 方法

東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センターを受診した RA 患者のうち、濃厚な家系例を示す一家系 8 名(患者を含めた同胞の 8 名のうち 4 名罹患)および、関節破壊の進行の早い RA 患者 69 名の合計 77 名を対象とした。末梢血白血球から DNA を抽出し、理化学研究所にてアジレント社の sure select を用いてエクソーム濃縮を行い、イルミナ社の次世代シーケンサーである Hi-seq を用いて全エクソームシーケンスを行った。それらデータを

元に理化学研究所の統計解析チームにより既に確立された塩基配列決定法により、RA 患者の各塩基配列を決定した。京都大学医学研究科附属ゲノムセンターにて収集された健常者 302 例の末梢血白血球から DNA を抽出した。そのうち、99 名の DNA を用いてライフテクノロジーズ社の kit を用いてエクソーム濃縮を行い、同社の次世代シーケンサーである SOLID を用いて全エクソームシーケンスを行った。それらデータを元にゲノム医学センターにて確立された塩基配列決定法により、対照群の各塩基配列を決定した。対照群のデータおよび理化学研究所の他疾患のデータ、公開データベース(DBSNP, 1000 人ゲノム, EDP)のデータを基に、de novo mutation(新規遺伝子変異)の確定を行った。

家族例については疾患群 4 例と非疾患群 4 例の比較を行い、分布の不均衡を示す de novo mutation および遺伝子、染色体領域の解析を行った。非家系例については de novo mutation の蓄積の検定のほか、稀な変異の分布における検定を行い、分布の偏りについて遺伝子領域ごとに評価した。

(倫理面への配慮)

本研究はヘルシンキ宣言にのっとりデザインされ、各施設の倫理委員会で承認されたものである。対象者からは全員書面で同意を得た。同意の撤回の自由は保証されている。

C. 結果

10 回以上読まれた変異のみ解析に採用した。全遺伝子変異は 86941 個であり、疾患群の変異平均 Call 成功率は 91.4%、対照群は 69.6%であった。

家系例については 8 名共に塩基配列が決定された遺伝子多型は 75395 個であり、内 19455 個が少なくとも一つの変異を家系内で認めた。1000 個の変異が患者群にのみ変異を認めた。113 個が罹患患者 4 名にのみ変異を認めた。罹患患者 4 名にのみ変異を認める de novo mutation を 3 つのみであり、その全てが 3 番染色体上にあり、アミノ酸変異をもたらすものであった。また、他の variant の分布の評価から、染色体 3 番の多くの領域が罹患患者 4 名で共有されている可能性が示された。

非家系例について de novo mutation に着目した解析を行い、12552 の de novo mutation を同定した。4 名に変異を認めるものを 4 つ、3 名に変異を認めるものを 17 同定した。複数人に認める de novo mutation を複数持つ遺伝子は 8 つであった。次に、de novo mutation に限らず、稀な exon 上の変異の分布の偏りを遺伝子ごとに評価を行った(C-alpha テスト)。対照群でアレル頻度 2.5%以下の変異で Call 成功率 90%以上の多型を対象に解析を行った結果、3203 遺伝子が少なくとも一つの変異を含んでおり、p 値 0.0005 以下を示す領域を 12 同定した。

D. 考察

Call 成功率の差は、エクソーム濃縮の手法およびシーケンサーの違いと塩基配列決定アルゴリズムの相違によるものと考えられた。

家系例については祖先由来の 3 番染色体

が強い浸透率を持って RA 発症にかかわっている可能性があると考えられた。3 番染色体は、これまでの全ゲノム関連解析において RA 発症との関連を示した領域はごくわずかであり、それら遺伝子には疾患群のみに認める de novo mutation は認めず、他の遺伝子領域の関与が疑われた。家系例について疾患群 4 例のみに認められた de novo mutation は非家系例については一例も認めず、同じ遺伝子領域の de novo mutation は 3 領域のうち 2 領域で認めたが、各一人ずつであり、原因領域の同定の手掛かりは得られなかった。

非家系例については最も強い p 値は 1.4×10^{-10} に達したが、同領域の de novo mutation 14 個のうち、アミノ酸変異を伴うものは 4 つであり、アミノ酸変異を伴う de novo mutation が特に集積しているという結果は得られなかった。2 番目の p 値は 2×10^{-5} であり、統計学的有意差を得るにはさらなる解析が必要であると考えられた。

E. 結論

家系例では染色体 3 番の疾患への関与が強く示唆された。今後さらなる領域の絞り込みと遺伝的多型の機能解析を行う予定である。非家系例では合計 12 領域の RA 発症関連領域候補が選定された。今後別の手法でも解析を行い、候補領域の選定を進めるほか、独立したサンプルを用いて追認解析を行う予定である。また、次世代シーケンサー間の塩基配列決定法の違いによる影響を避けるため、疾患群と同様の方法を用いた対照群でも解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

研究の結果、得られた成果の中に特に健康危険情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y,

Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, et al. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis and rheumatism*. 2013 Feb;65(2):472-80.

2. Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, Maruya E, Katayama M, et al. ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PloS one*. 2012;7(7):e40067.

3. Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, et al. Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF-kappaB pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS genetics*. 2012 Sep;8(9):e1002949.

2. 学会発表

1. Terao C, et al. Three groups of joint synovitis in rheumatoid arthritis -analysis in KRAMA database-. 日本免疫学会

H. 知的財産権の出願・登録状況
予定なし

分担研究報告書

GWASメタ解析を基盤とした関節リウマチ重症化関連因子の同定に関する研究

研究代表者 桃原 茂樹 東京女子医科大学 教授
研究分担者 山中 寿 東京女子医科大学 教授

研究要旨：関節リウマチ患者の病態は患者により大きく異なるが、その背景には遺伝要因の違いがあると考えられる。GWASにより得られた日本人RAにおける疾患感受性遺伝子をターゲットに骨関節破壊関連因子の同定を試み、HLA-DRB1とPADI4が骨関節破壊と関連することを同定した。同時に非遺伝要因の解析を進め、若年発症、女性、抗CCP抗体陽性も骨関節破壊と関連することを同定した。

研究代表者：桃原 茂樹
東京女子医科大学 医学部 教授

研究分担者：山中 寿
東京女子医科大学 医学部 教授

研究協力者：猪狩 勝則
東京女子医科大学 医学部 准教授

A. 研究目的

関節リウマチ (RA) は病勢の悪化に伴い多関節破壊を生じ、日常生活動作に大きな支障をきたす。その発症および進展には多くの遺伝要因が関与していることと考えられており、特にゲノム網羅的関連解析 (GWAS) が可能となって以来、精力的に遺伝背景の解明が進められている。本研究の目的は、GWASにより得られた日本人 RA における疾患感受性遺伝子をターゲットに骨関節破壊との関連を検討し、同時に非遺伝要因の関与も明らかにすることである。

B. 方法

発症5年時の両手X線を用いた Sharp van der Heijde score (SHS, hands)により関節破壊を評価した。罹病期間を揃えることで関節破壊に強い影響を与える罹病期間の影響を排除することを試みた。IORRA

DNA collection のうち 865 例で手の SHS が得られており、これを解析対象とした。遺伝要因として昨年行った大規模 GWAS メタ解析で GWAS 水準をクリアした 13 遺伝子領域：HLA-DRB1 (shared epitope, SE), rs2240340 (*PADI4*), rs2230926 (*TNFAIP3*), rs3093024 (*CCR6*), rs11900673 (*B3GNT2*), rs2867461 (*ANXA3*), rs657075 (*CSF2*), rs12529514 (*CD83*), rs2233434 (*NFKBIE*), rs10821944 (*ARID5B*), rs3781913 (*PDE2A-ARAP1*), rs2841277 (*PLD4*), rs2847297 (*PTPN2*)、非遺伝要因として IORRA データベースから抽出した性、発症年齢 (画像取得年齢-5)、抗 CCP 抗体、リウマトイド因子、喫煙歴を加えた。手の SHS については正規分布していなかったため (図 1)、対数化した SHS を従属変数とし、まずそれぞれの候補要因について単回帰分析を行い、有意水準 0.05 をクリアした候補要因をステップワイズ回帰分析による最終解析に用いた。最終的に得られた関節破壊関連因子についてその保有数と SHS との関連も確認した。

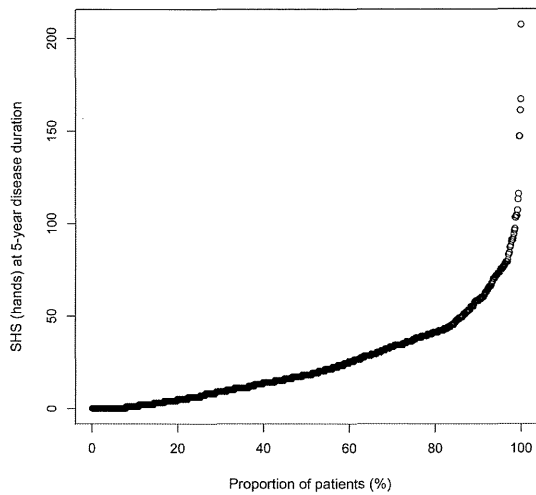


図 1. 発症 5 年時の SHS (手)の分布 (n=865)

C. 結果

単回帰分析で有意水準をクリアした候補要因は以下の通りである: 抗 CCP 抗体陽性 ($P=3.76 \times 10^{-5}$)、リウマトイド因子陽性 ($P=0.00043$)、女性 ($P=0.0020$)、若年発症 ($P=0.014$)、HLA-DRB1 SE ($P=0.00012$)、*PADI4* ($P=0.016$)。これらの候補要因についてステップワイズ回帰分析を行った結果、リウマトイド因子陽性以外が関節破壊と有意な関連を示すことが明らかとなった (図 2)。さらにこれらの関節破壊関連因子の保有数と関節破壊との間に有意な傾向が確認できた (図 3)。

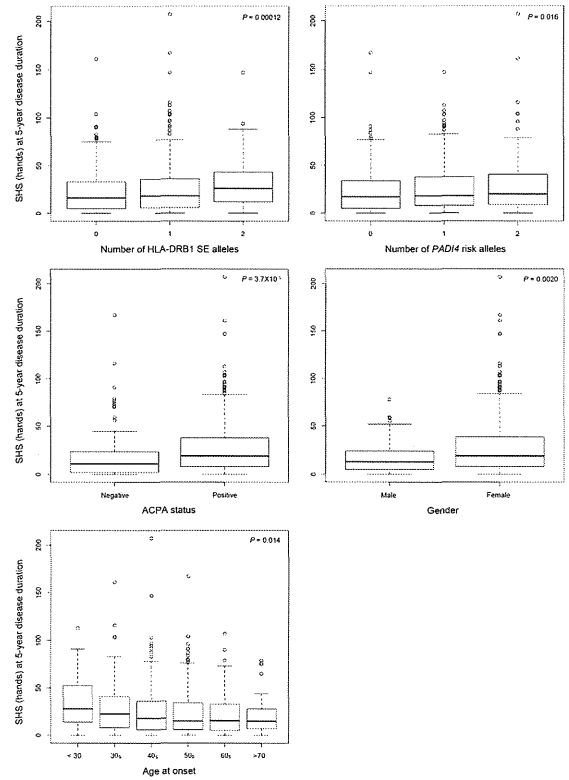


図 2. ステップワイズ回帰分析をクリアした各関節破壊関連因子と発症 5 年時の SHS (手)

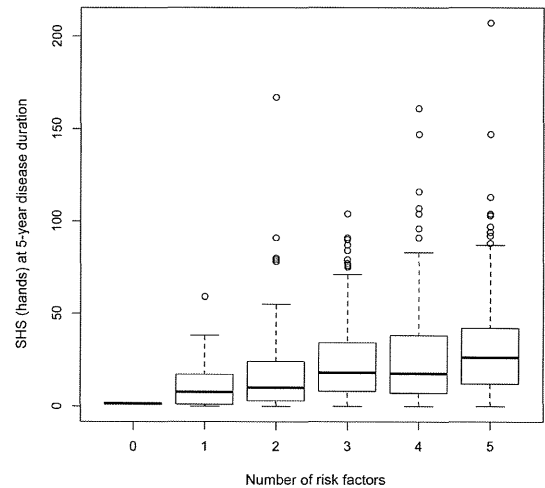


図 3. ステップワイズ回帰分析をクリアした各関節破壊関連因子の保有数と発症 5 年時の SHS (手)

D. 考察

抗 CCP 抗体陽性は確立された関節破壊関連因子であり、今回の結果の確からしさを担保する結果である。今回の解析で

遺伝要因を同定できただけでなく、非遺伝要因を含めて関節破壊関連因子を同定しえたことはオーダーメイド医療の展開において重要なマイルストーンとなり得る。すなわち関節破壊関連因子保有数に応じて治療介入の強度を変更することや、監視の頻度を変更することが可能となり、疾患発症後のオーダーメイド医療の実現につながる結果であると言える。

E. 結論

非遺伝的、遺伝的な関節破壊関連因子を複数同定した：抗 CCP 抗体陽性、女性、若年発症、HLA-DRB1-SE、*PADI4* リスクアレル。

F. 健康危険情報

研究の結果、得られた成果の中に特に健康危険情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, et al. *PADI4* and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. *PLoS one*. 2013;8(4):e61045.

H. 知的財産権の出願・登録状況 予定なし