

ITIM を介して抑制性シグナルを伝達し、アポトーシスを誘導する。CD22 に対するヒト化抗体エブラツズマブは CD22 に結合すると速やかに細胞内に埋入し、ITIM を介して負のシグナルを伝達する。また、CD20 抗体と異なり B 細胞除去は部分的で、安全面での優位性が期待される<sup>17)</sup>。

欧米の中～高度の疾患活動性を有する SLE 227 症例に対する第 II 相 EMBLEM 試験では、プラセボ対象に異なる濃度のエブラツズマブを投与し、12 週後に BILAG, SLE 疾患活動性指数 (SLEDAI), 医師による疾患活動性全般評価の 3 項目から構成される SLE 反応性指数 (SRI) を主要評価項目とした。その結果、実薬 600mg を毎週 4 回投与群の 45.9%, 1200mg を隔週 2 回投与した群の 40.5% が SRI を満たし、プラセボ群の 21.1% に対して有意に高い反応性を有した。特に、心呼吸器系、神経精神系における改善が顕著であった。また、有害事象の発現にも差がなかった。本邦でも SLE に対して第 II 相試験を実施中である。

### 6.3 CTLA4-Ig

B 細胞や T 細胞が活性化される際には B 細胞受容体 (BCR) や T 細胞受容体 (TCR) からの主シグナルと共に、共刺激分子からのシグナルの共存が必須である。共刺激分子の異常は、免疫系の異常活性化や自己免疫疾患の発症に繋がる。斯様な観点から共刺激分子を治療標的とする生物学的製剤の開発が進行してきた (図 5)。

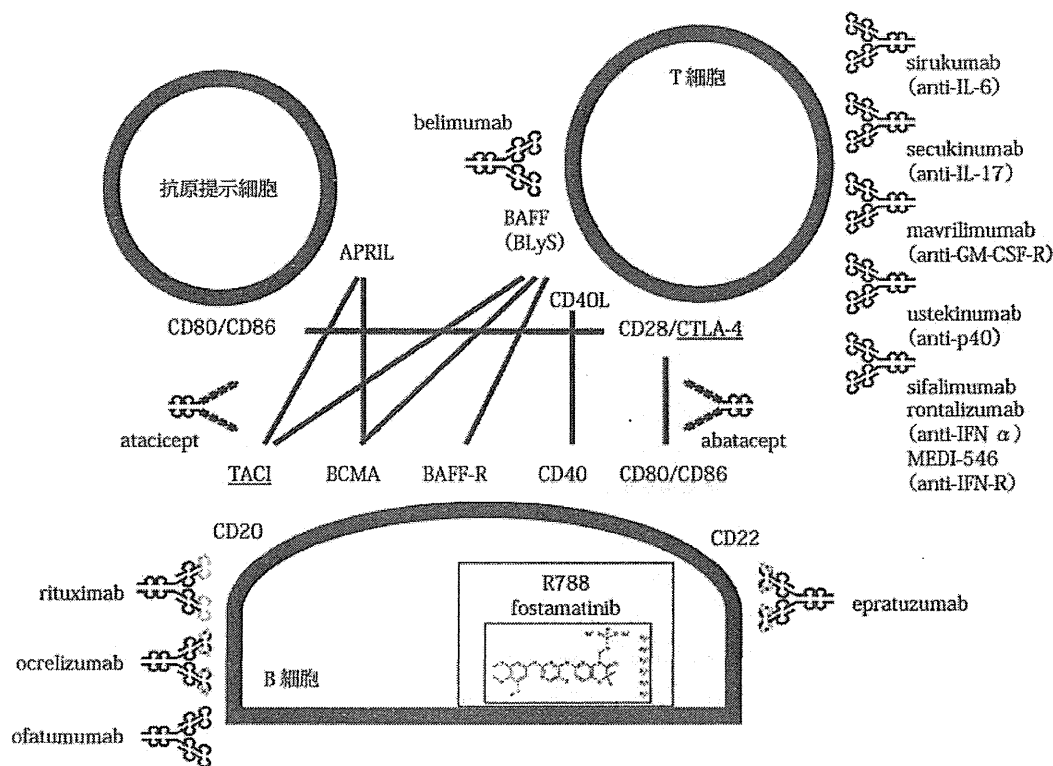


図 5 SLE の治療における生物学的製剤の最前線

T 細胞に発現する CD28 は、B 細胞などの抗原提示細胞に発現する CD80/CD86 をリガンドとする代表的な共刺激分子である。また、CTLA-4 は同じリガンドを介して T 細胞に対して負のシグナルを伝達する。CD28 を介するシグナルを阻害する CTLA4-Ig 融合蛋白アバタセプトは、本邦でも RA に承認され、MTX や TNF 阻害薬に治療抵抗性の疾患活動性の高い症例に対しても、高い治療効果が評価されている。SLE に対しては多関節炎、漿膜炎、円盤状皮疹を有する疾患活動性の高い症例にアバタセプト 10 mg/kg を投与し、1 年後の疾患活動性はプラセボと差がなかった。しかし、治療薬の評価基準が的確でなかったなどの理由から、現在、ループス腎炎に対する治験を再計画中である。

#### 6.4 抗BAFF抗体

B細胞の代表的な共刺激分子であるBAFFは、T細胞やマクロファージなどの細胞表面、及び、可溶性BAFFとして産生され、B細胞上のBAFF-R、BCMA、TACIと結合し、B細胞の分化、増殖、抗体産生、クラススイッチを誘導する。また、SLE患者血清中で疾患活動性に応じて可溶性BAFF濃度が上昇することから、SLEの病態への関与が示唆されてきた。

海外では、SLEDAI  $\geq 6$  の中等度の疾患活動性を呈するSLE患者865例に対する第Ⅲ相BLISS-52試験では、ベリムマブ10 mg/kg 4週間隔投与により52週後にSLE反応性指数(SLE responsive index; SRI)がプラセボに対して有意に改善した。実薬では自己抗体価の低下、補体価の上昇が認められたが、有害事象、重篤な副作用、感染症等は実薬群とプラセボ群で有意差がなかった<sup>18)</sup>。同時に実施されたBLISS-76試験で同様の有意な改善が認められた。その結果、欧米ではSLEに対して初めて適応承認を得た生物学的製剤となり、高く注目されている。ただ、その効果は比較マイルドであり、将来的にはB細胞除去療法との併用などの検討も必要である。本邦でも、SLEを対象に治験申請中である。また、海外では別の会社からも抗BAFF抗体やBAFF受容体抗体を用いた治験が実施されている。

#### 6.5 TACI-Ig

アタセプトは、BAFFとAPRILの双方に対する受容体であるTACIの細胞外領域と、ヒトIgG1のFc領域の融合蛋白で、B細胞の活性化を制御する。米国では、SLEに対するアタセプト投与による第Ⅰ相試験が実施された。アタセプト群では、重篤な副作用を認めず、B細胞数の約60%減少、自己抗体価や補体価の改善を可能とした。また、SLEDAIによる疾患活動性スコアが6以上の症例の3分の2が0にまで改善した。現在、非腎症SLEに対して第Ⅲ相試験が進行している。

#### 6.6 抗IFN $\alpha$ 抗体

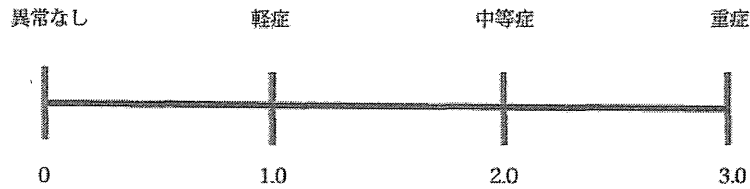
SLEの病態形成においてIFN $\alpha$ は重要な役割を担うとされるが、遺伝子解析でもIFN関連遺伝子の高発現が明らかになった。B細胞や樹状細胞ではToll様受容体が高発現し、細菌、DNA、RNAなどの刺激を受容して、抗体やIFN $\alpha$ 等のサイトカインの産生が誘導され、IFN $\alpha$ は樹状細胞の活性化、サイトカイン産生、リンパ球の活性化を介してSLEの病態形成に関与する。実際、抗IFN $\alpha$ 抗体シファリムマブの投与により、IFN関連遺伝子の転写が制御され、SLEの疾患制御が期待される。本邦でもSLEに対してシファリムマブの国際共同試験を実施中である。また、同じ会社からIFN受容体に対する抗体MED-546の臨床試験を準備中で、シファリムマブよりもさらに高い効果が期待される。更に、別の会社から、IFN $\alpha$ 抗体ロンタリズムマブを用いたSLEに対する治験が海外で実施されている。

#### 6.7 抗IL-6受容体抗体

SLEの病態に於いても、IL-6等の炎症性サイトカインの関与が示されている。米国では、RAに対して保険収載されている抗IL-6受容体抗体トシリズマブを用いて、SLEに対する第Ⅰ相試験が実施された<sup>19)</sup>。16例のSLEに対して、トシリズマブ2,48 mg/kgを2週毎に12週間投与し、20週目に評価した。その結果、疾患活動性スコアであるSLEDAIの4ポイント以上の改善を15例中8例で認め、特に、関節炎に奏功した。また、dsDNA抗体値も高用量群で低下した。現在、次相試験の準備中との情報である。

### 7. 治療効果判定(臨床試験デザイン)

SLEの治療は、副腎皮質ステロイド薬や免疫抑制薬等の非特異的手法が中心である。しかし、発症や病態形成のプロセスに関与する遺伝子、シグナル分子、液性因子等はいずれも治療の重要な標的になるはずであり、基礎研究から治療応用へのトランスレーションが本格化するものと期待される。最近の臨床試験では、英国SLE評価指数(BILAG)、SLE疾患活動性指数(SLEDAI)、医師による全般評価(図6)、これらを組合せたSRIが治療効果判定に使用される。



- 0.3ポイントまでの悪化は許容される
- ・評価は医師が実施すること
- ・各評価時には必ず前回のスコアを参照すること
- ・3は患者において想定しうる最も高い重症度を示す

図6 医師による全般評価

BILAG 指数は、1988年に英国のグループが重症度に応じた治療指針の設定を目的として提唱し、改訂を経て現在の形となった。症候や検査値異常を全身症状、及び、皮膚粘膜、神経系、筋骨格系、心血管・呼吸器系、消化器系、眼病変、腎症、血液異常の8つの臓器障害に分けて、各系で重症度を半定量化する。各系の重症度は、どの程度の治療が必要かを前提にランク付けされる。カテゴリーAは大量のステロイド薬と免疫抑制薬の併用を要する臨床症候や検査値異常である。カテゴリーBは少量ステロイド薬や抗炎症薬などの治療を要する症候や異常、カテゴリーCは抗炎症薬などによる対症療法で十分な状態、カテゴリーDは以前障害されたことがあるが現在は症候や異常がない状態、カテゴリーEは現在にも過去にも障害がない場合を示す。例えば、一般的全身症状については、37.5℃以上の発熱、5%/月以上の体重減少、リンパ節腫脹/脾腫、易疲労/全身倦怠/脱力、食欲低下/嘔気/嘔吐のうち、発熱と他の2項目があればカテゴリーAと分類され、高用量のステロイド薬と免疫抑制薬の併用の適応となる。例として腎系および神経系の指標を図7、図8に示す。BILAG 指数は、感度と特異度は80%を超え、高疾患活動性を識別する際に特に有用である。また、評価方法は煩雑であるが、評価者間などでのバラつきが少ないことから、臨床試験の導入基準や有効性評価に汎用されている。9系のうち1以上のカテゴリーA、2以上のカテゴリーBの出現がないと治療効果ありと判定される。

7.腎症 (初回評価時)
カテゴリーA: 1, 4 または 5 を含む以下の項目の2つ以上該当 1. 尿蛋白 (> 1 g/24, または hr 3+, 4+) 2. 悪性高血圧: 1 ヶ月以内の血圧上昇 > 170/110 (第5点), IV度以上の網膜変化 (出血, 浸出) を伴う場合 3. クレアチニン・クリアランス < 50 mL/min (72 L/DAY) 4. 活動性尿沈渣; 感染症なしに白血球 > 5 個, 赤血球 > 5 個, または赤血球円柱 5. 活動性腎炎の組織所見 (過去3 ヶ月以内); WHO 分類基準による。炎症を伴わない硬化性変化のみでは活動性腎炎の所見とは見なさない
カテゴリーB: 以下の項目の1つ以上該当 1. カテゴリーAの項目のいずれか1つ該当 2. 尿蛋白 ≥ 2+ 3. 24時間尿蛋白 > 0.5g, < 1g
カテゴリーC: 以下の項目の1つ該当 1. 尿蛋白 = 1+ 2. 血圧 > 140/90 mmHg (第5点) 3. 血清クレアチニン > 1.47 g/dL
カテゴリーD: 腎症の既往
カテゴリーE: 腎症の既往なし

図7 BILAG による腎症の疾患活動性指標 (初回評価時)

3. 神経系 (初回評価)
カテゴリー A: 以下の項目の 1 つ以上該当 1. 意識レベルの低下 (急速に進行する意識レベルの減弱) 2. 急性精神症状, せん妄, または錯乱状態; 妄想, 幻覚, 思考散乱, 著明な非論理的思考, 奇妙あるいは緊張性行動を特徴とする現実認知の重度の障害 3. けいれん大発作 4. 脳卒中または脳虚血症状 (ルーブス炎症性のもの。脳血管障害, 脳血栓によるものは除く) 5. 無菌性髄膜炎 6. 多発性単神経炎 7. 上行性または横断性脊髄炎 8. 末梢または脳神経障害 9. 舞蹈病 10. 小脳性運動失調
カテゴリー B: 以下の項目の 1 つ以上該当 1. 頭痛 (重度で持続性); 非麻薬性鎮痛剤では寛解しない持続性頭痛 2. 器質性うつ病; 身体症状を伴う抗うつ剤治療を要する高度のうつ状態 3. 器質性脳症候群, 偽脳腫瘍を含む; 代謝異常, 精神病または薬物に起因しない見当識, 記憶その他の知的機能の障害。臨床症状が短期 (通常数時間から数日) に発現し, 日内変動する傾向がある (a) 集中力および周囲への関心持続の低下を伴う意識混濁 (b) ①認知障害: 誤解, 錯覚または幻覚, ②会話錯乱, ③不眠または日中眠気, ④精神運動活動の亢進または低下 (c) 失見当識および記憶力低下 4. 視神経乳頭浮腫 / 綿花状白斑
カテゴリー C: たまに見られる偏頭痛
カテゴリー D: 症状の既往, 現在は症状消失
カテゴリー E: 症状の既往なし

図 8 BILAG による神経系の疾患活動性指標 (初回評価時)

SLEDAI は国際的に汎用される疾患活動性指標で, 統計学的解析によって抽出された臨床症候や検査成績に基づく基準項目を重要度に従って点数化したものである。幾つかの変法があるが, Safety of Estrogens in SLE (SELENA)-SLEDAI が汎用される (図 9)。けいれん発作, 精神症状, 器質性脳症候群などがあれば 8 点, 多発関節炎や尿円柱, 尿潜血などがあれば 4 点とする。合計点が 3 点以上で軽~中等度の疾患活動性, 12 点以上であれば高度の疾患活動性ありと判定し, 薬剤治療の開始や増量を含む評価の対象となる。また, 4 ポイント以上の改善があれば, 治療効果ありと判定される。妥当性と再現性に優れているとされ, 臨床試験では治療効果判定の目的でしばしば使用される。しかし, スコアリングには中枢神経系に偏りがあり, また, 発熱とは 38℃以上で感染によるものを除外するなどとした注釈が夫々の項目に付記されており, 使用には留意を要する。

加重値	スコア	項目	定義
8		痙攣	慢性的なものではない。新たな出現又は悪化
8		精神症状	思考障害、機能不能
8		器質的脳障害	ADLの他覚的障害
8		視力障害	SLEの網膜病変
8		脳神経障害	知覚又は運動神経障害
8		ループス頭痛	片頭痛ではなく、麻薬性鎮痛薬に反応しない活動性ループス脳炎によると判断される重度の持続性頭痛
8		脳血管障害	動脈硬化性のものを除外する
8		血管炎	皮膚の評価又は生検あるいは血管造影による血管炎の所見
4		関節炎	紅斑又は腫脹を伴う圧痛関節が2関節以上認められる
4		筋炎	クレアチンホスホキナーゼ(CK)上昇、アルドラーゼ上昇、筋電図変化又は生検上筋炎を伴う近位筋の筋痛/筋力低下
4		尿円柱	顆粒円柱又は赤血球円柱
4		血尿	SLEに起因する血尿の場合、赤血球>5個/視野(高倍率視野)
4		蛋白尿	ベースライン値を上回る>0.5g/24hr(Pr/Cr>50mg/mmol)
4		糖尿	SLEに起因する糖尿の場合、白血球>5個/視野
2		皮疹	炎症性皮疹
2		脱毛	病的な斑状又はびまん性の脱毛の新たな出現又は持続
2		粘膜潰瘍	口腔粘膜又は鼻腔粘膜潰瘍の新たな出現又は持続
2		胸膜炎	胸膜摩擦音、胸水貯留、又は胸膜肥厚を伴う胸痛
2		心膜炎	心膜摩擦音、心嚢水貯留、又は心電図又は心エコー異常を伴う心膜性疼痛
1		発熱	SLEに起因する発熱の場合、38℃以上
1		血小板数<100,000×10 <sup>9</sup> /視野	
1		白血球数<3,000×10 <sup>9</sup> /視野	
2		それぞれに対し2ポイント：低補体血症、Farr法による抗dsDNA抗体増加	

図9 SELENA-SLEDAIによる疾患活動性の評価

## 文 献

- 1) Hahn BH. Systemic lupus erythematosus. In "Harrison's Principles of Internal Medicine, 18th edition" ed : Fauci A, et al. McGraw-Hill, Columbus, pp2724-2735, 2011
- 2) Vasudevan AR, Ginzler EM. Clinical features of systemic lupus erythematosus. In Rheumatology, 5th edition" ed : Hochberg MC, et al. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp1229-1246, 2010
- 3) Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med 365 : 2110-21, 2011
- 4) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 25 : 1271-7, 1982
- 5) Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 40 : 1725, 1997
- 6) Hahn BH. Targeted therapies in systemic lupus erythematosus : successes, failures and future. Ann Rheum Dis 70 Suppl 1 : i64-i66, 2011
- 7) Bertsias G, Ioannidis JP, Boletis J, et al ; Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. Ann Rheum Dis. 2008 ; 67 : 195-205
- 8) Bertsias GK, Ioannidis JP, Aringer M, et al. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus with neuropsychiatric manifestations : report of a task force of the EULAR standing committee for clinical affairs. Ann Rheum Dis. 2010 ; 69 : 2074-82
- 9) Mosca M, Tani C, Aringer M, et al. European League Against Rheumatism recommendations for monitoring patients with systemic lupus erythematosus in clinical practice and in observational studies. Ann Rheum Dis. 2010 ; 69 : 1269-74

- 10) Looney RJ, Anolik J, Sanz I. A perspective on B-cell-targeting therapy for SLE. *Mod Rheumatol* (2010) 20 : 1-10
- 11) Tanaka Y. Treatment of inflammatory immunologic disease 4. B cell targeting therapy using the anti-CD20 antibody rituximab in inflammatory autoimmune diseases. *Intern Med* (2007) 46 : 1313-5
- 12) Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, et al. Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis* (2007) 66, 470-475
- 13) Tanaka Y, Yamamoto K, Takeuchi T, et al. A multi-center phase I/II trial of rituximab for refractory systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol* (2007) 17, 191-197
- 14) Iwata S, Saito K, Tokunaga M, et al. Phenotypic changes of lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus who are in longterm remission after B cell depletion therapy with rituximab. *J Rheumatol* 2011 ; 38 : 633-41
- 15) Tokunaga M, Fujii K, Saito K, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Tanaka Y. Down-regulation of CD40 and CD80 on B cells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab. *Rheumatology* 2005 ; 44 : 176-82
- 16) Merrill JT, Neuwelt CM, Wallace DJ, et al. Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus : the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial. *Arthritis Rheum.* (2010) 62 : 222-33
- 17) Jacobi AM, Goldenberg DM, Hiepe F, Radbruch A, Burmester GR, Dörner T. Differential effects of epratuzumab on peripheral B cells of patients with systemic lupus erythematosus versus normal controls. *Ann Rheum Dis* 2008 ; 67 : 450-457
- 18) Navarra S, Guzmán RM, Gallacher AE, et al ; BLISS-52 Study Group. Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2011 ; 377 : 721-31
- 19) Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH, et al. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus : data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum* 2010 ; 62 : 542-52

# 全身性エリテマトーデス

田中良哉

全身性エリテマトーデス (SLE) は妊娠可能年齢の女性に好発する全身性自己免疫疾患 (膠原病) である。皮膚、関節、心、腎、漿膜、神経、血管など全身の臓器を侵し、多彩な臨床症候を呈する。患者数は約10万人とされ、発症年齢は20~30歳代が多く、男女比は1:9~10である。

SLEの診断には、米国リウマチ学会 (ACR) の1997年SLE改訂分類基準が汎用される。また、欧州リウマチ学会 (EULAR) は、2008年にSLEの管理、2010年に神経精神SLE (NPSLE) の管理のためのガイドラインを発表している。

## 診断

初期治療は予後を左右するがゆえに、まず、迅速、確実に診断する。①主訴に関する問診、理学的所見、②生命予後に関する臓器障害の評価や緊急性の判定、③疾患活動性の評価、④感染症や心疾患などの合併症の検索などに留意したアプローチを行う。SLEの診断には、ACRの1997年SLE改訂分類基準が汎用される (表1)。病歴と理学的所見からSLEを考慮したうえで、検査成績や画像所見を併せて総合的に評価して診断する。

### (1) 臨床所見

一般的に、発熱、易疲労感、倦怠感、多発関節炎などの非特異的な全身症状が1週間以上持続した後に臓器障害が発現することが多い。顔面蝶形紅斑や円板状紅斑などの特徴的な皮膚所見を約80%に伴い、紫外線曝露を契機に増悪する。爪周囲紅斑や無痛性口腔内潰瘍、レイノー現象を認めることもある。また、非びらん性関節炎を高頻度に伴う。多臓器病変を併発し、腎障害による持続性蛋白尿や細胞性円柱、精神障害や血管障害などの中枢神経病変、汎血球減少症や凝固異常などの造血系障害も高頻度にみられる (図1)。

### (2) 検査所見

一般検査では、汎血球減少、赤沈亢進、蛋

白尿、尿沈渣異常などを呈する。免疫学的検査では、高γグロブリン血症、免疫複合体高値、低補体血症を呈する。抗核抗体はほぼ全例で陽性で、SLEのスクリーニングにも用いられる。抗Sm抗体は約25%で陽性だが特異性が高く、抗dsDNA抗体は約70%で陽性で、抗体価は疾患活動性と相関する。抗リン脂質抗体、抗RNP抗体、抗SS-A抗体なども約30~50%で陽性となる。漿膜炎 (胸膜炎、心膜炎、腹膜炎) やNPSLEの診断には画像所見が有用である。

### (3) 診断

病歴、症状、理学的所見からSLEを考慮したうえで、検査成績や画像所見を併せて総合的に評価し、ACRの1997年SLE改訂分類基準を用いて診断する (表1)。SLE腎症 (ループス腎炎) の診断には、組織学的検査が有用である。

## 管理・治療

SLEの治療の必要性、ステロイド療法の初期治療量、免疫抑制薬の適応は、①疾患活動性、②障害臓器、③病型分類、④感染症や心疾患などの合併症などを総合評価して決定する。疾患活動性や重症臓器病変があれば、大量ステロイド薬と免疫抑制薬の併用療法を速

やかに開始し、逆に、これらがなければステロイド薬の適応は慎重に決定する。

(1) 疾患活動性、臓器障害の評価

疾患活動性の評価には、厚生省（現・厚生労働省）特定疾患自己免疫疾患調査研究班 SLE疾患活動性判定基準（表2）、英国SLE評価指数（BILAG）、SLE疾患活動性指数（SLEDAI）などが用いられる。最近の臨床試験における薬効評価には、BILAG、SLEDAI、医師による全般評価の組み合わせによるSLE反応性指標（SRI）が使用される。また、ループス腎炎は高頻度に併発する臓器障害で、病理形態学的分類によって治療や予後が異なるため、2003年改訂国際腎臓病学会・腎臓病理学会の組織分類による組織診断の実施が望ましい。

厚生省重症度判定基準やACRの重症臓器

表1 SLEの分類基準(ACR1997年改訂分類基準より)

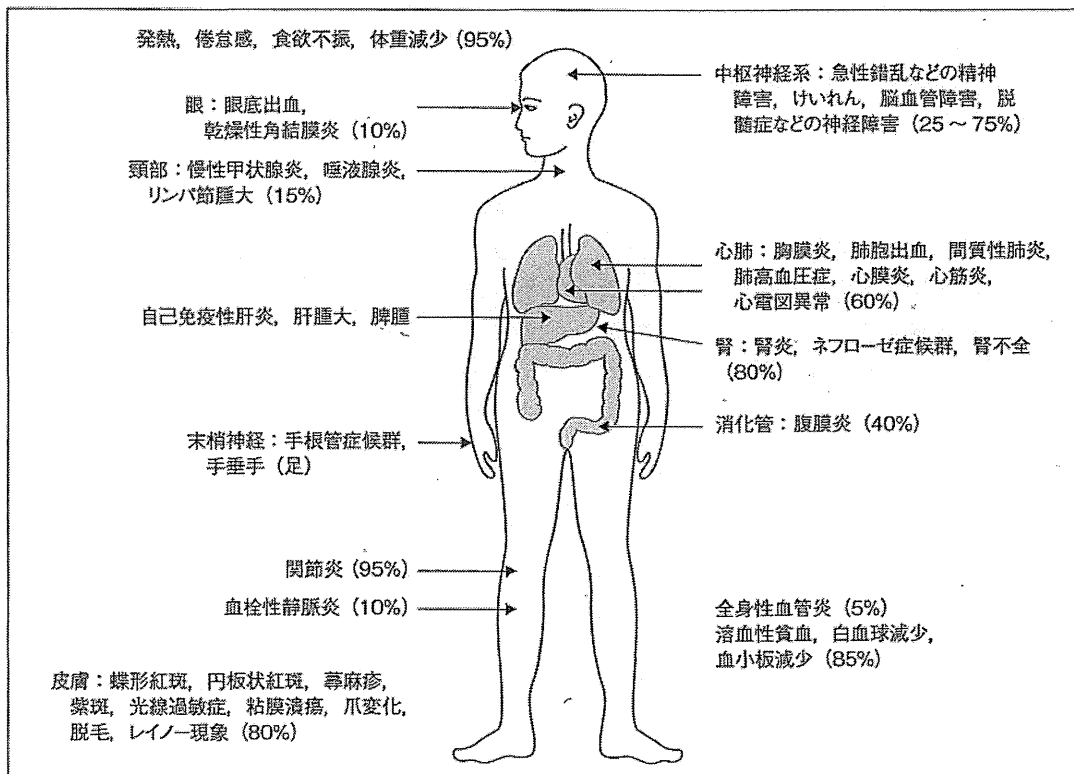
1. 顔面紅斑
2. 円板状皮疹
3. 光線過敏症
4. 口腔内潰瘍（無痛性で口腔あるいは鼻咽腔に出現）
5. 関節炎（2関節以上で非破壊性）
6. 漿膜炎（胸膜炎あるいは心膜炎）
7. 腎病変（0.5g/日以上の持続的蛋白尿か細胞性円柱の出現）
8. 神経学的病変（けいれん発作あるいは精神障害）
9. 血液学的異常（溶血性貧血または4,000/mm<sup>3</sup>以下の白血球減少または1,500/mm<sup>3</sup>以下のリンパ球減少または10万/mm<sup>3</sup>以下の血小板減少）
10. 免疫学的異常（抗dsDNA抗体陽性、抗Sm抗体陽性または抗リン脂質抗体陽性（抗カルジオリピン抗体、ループスアンチコアグラント、梅毒反応偽陽性）
11. 抗核抗体陽性

【診断の決定】

上記項目のうち4項目以上を満たす場合、全身性エリテマトーデスと診断する。

（難病情報センターHPより一部改変）

図1 SLEの臨床症候とその頻度





障害判定指針では、ネフローゼ症候群、急速進行性糸球体腎炎、腎不全、NPSLE、肺胞出血、肺高血圧症、著明な血小板減少症、全身性血管炎・血栓症などを重症臓器障害と判定する。

(2) 主要臓器病変がある症例の治療

EULARの2008年SLE、2010年NPSLEの管

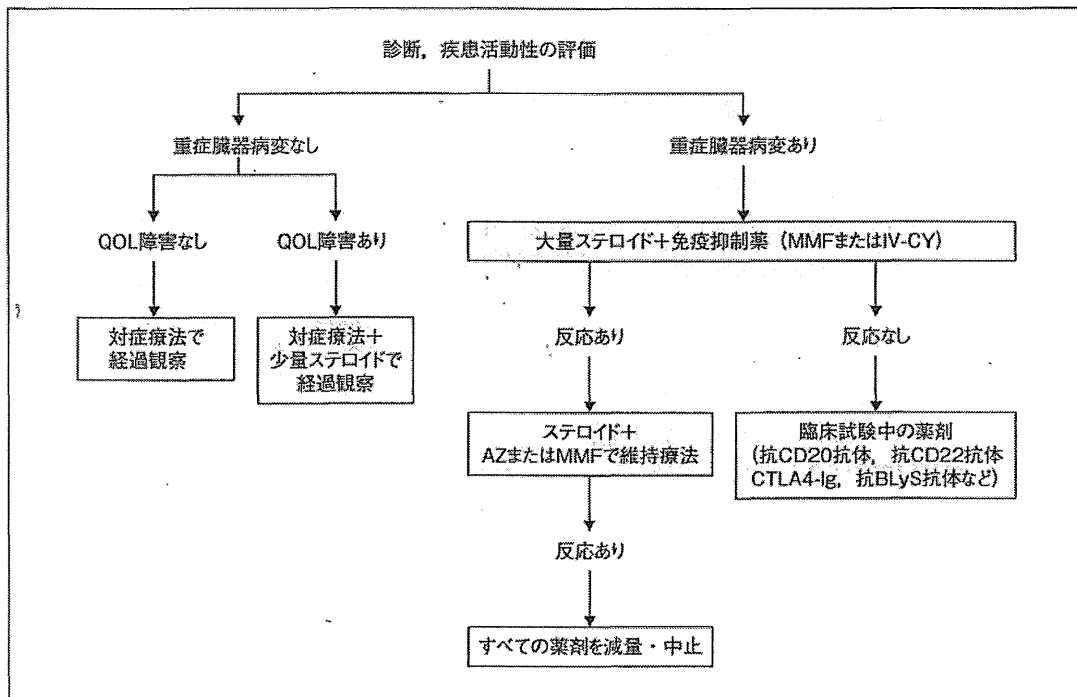
表2 SLE 疾患活動性判定基準

1. 発熱
2. 関節痛
3. 紅斑（顔面以外も含む）
4. 口腔潰瘍または大量脱毛
5. 赤沈亢進（ $\geq 30$ mm/h）
6. 低補体血症（C3 $< 60$ mg/dl, CH50 $< 20$ 単位）
7. 白血球減少症（ $\leq 4,000/\mu\text{l}$ ）
8. 低アルブミン血症（ $\leq 3.5$ g/dl）
9. LE細胞またはLEテスト陽性

9項目中3項目以上陽性ならば、活動性ありと判断する。  
 （厚生省特定疾患自己免疫疾患調査研究班昭和60年度報告）

理のためのガイドラインでは、ループス腎炎やNPSLEなどの主要臓器障害を有するSLEに対しては、ステロイド薬と免疫抑制薬の併用が推奨されている。また、「ハリソン内科学」のHahnの診断・治療のアルゴリズムは標準的な治療指針である。重症臓器病変を有し、疾患活動性が高ければ、大量ステロイド薬（プレドニゾン〈PSL〉換算1mg/kg/日）と免疫抑制薬の併用療法を速やかに選択すべきであるとされる（図2）。免疫抑制薬としては、シクロホスファミドパルス療法（IV-CY）やミコフェノール酸モフェチル\*（MMF）が推奨されている。IV-CYは、10～20mg/kg/回を2～4週に1回、計6～12回点滴静注する。ループス腎炎に500mgを2週ごとに6回点滴静注するというプロトコルも使用される。NPSLEに対しても同様であるが、障害が抗リン脂質抗体症候群に起因す

図2 SLE 急性期治療のためのアルゴリズム



(Hahn BH, 2008)

際には、適切な抗凝固療法を行う。

初期治療に反応性を認めた際は、臨床症候や検査成績を参照に2～4週間に10%ずつ減量し、ステロイド薬とアザチオプリン (AZ) またはMMFを用いた維持療法へ移行する。初期治療に反応しない際は、抗BAFF抗体や抗CD20抗体などの生物学的製剤の使用が考慮される。わが国では、免疫抑制薬としてタクロリムス水和物とミゾリピンが、ループス腎炎に対して適応承認されている。

### (3) 主要臓器病変がない症例の治療

EULARの2008年SLEの管理のためのガイドラインでは、主要臓器病変を伴わないSLEの治療には、抗マラリア薬 (ヒドロキシクロロキン) とステロイド薬が推奨されている (表3)。非ステロイド抗炎症薬 (NSAIDs) は副作用の危険性が少ない患者に期間限定で慎重に投与する。治療に反応しない患者、ステロイド薬を維持量にまで減量できない患者には、AZ、MMF\*やメトトレキサート\* (MTX) などの免疫抑制薬の使用を考慮する。Hahnのアルゴリズムでは、重症臓器病変がなければ、対症療法や無治療にて経過観察可能とされる。そのような症例は1/4程度存在する。関節炎、筋痛、発熱などにより日常生活に支障を来す際には、少量のステロイド薬 (PSL換算0.07～0.3mg/kg/日) で経過観察する。

### (4) 副作用とその対策

わが国では、SLEの死因の第1位は感染症で20～50%を占め、おもにステロイド薬や免疫抑制薬などの治療薬による免疫機能低下に起因する。特に、ステロイドパルス療法、大量ステロイド薬、免疫抑制薬の使用の際には、ニューモシスチス肺炎、結核などの日和見感染症の予防と管理が望まれる。また、胃腸障害、骨粗鬆症、耐糖能異常、高脂血症などのステロイド薬の高頻度の副作用に対して

表3 2008年EULARのSLEの管理のためのガイドライン

<p><b>全身管理</b></p> <p><b>予後</b></p> <p>SLE患者では、新たな臨床症候 (皮疹、関節炎、漿膜炎、神経症状、けいれん/精神症状) の出現、一般検査 (血算、血清クレアチニン、蛋白尿、尿沈渣)、免疫学的検査 (血清C3、抗dsDNA抗体、抗Ro/SSA抗体、抗La/SSB抗体、抗リン脂質抗体、抗RNP抗体) が、全身および主要臓器障害の予後判定に有用であり、患者評価の際に考慮すべきである。症例に応じて画像所見 (脳MRI) や組織所見 (腎生検) も予後判定に必要となる。</p> <p><b>モニタリング</b></p> <p>新たに出現した皮疹、関節炎、漿膜炎、神経障害 (けいれん/精神症状) などの臨床症候の数やタイプ、一般検査 (血算)、免疫学的検査 (血清C3/C4、抗C1q、抗dsDNA抗体)、全般的活動性指数は、SLEやループス腎炎の疾患活動性や増悪の評価の指標となる。</p> <p><b>合併症</b></p> <p>SLE患者では、感染症 (尿路感染症など)、動脈硬化、高血圧、脂質異常、糖尿病、骨粗鬆症、骨壊死、悪性腫瘍 (特に非ホジキンリンパ腫) など、SLEや治療に伴う合併症のリスクが高い。これらのリスク因子を見極め、迅速な評価と慎重な経過観察をすることが推奨される。</p> <p><b>治療</b></p> <p>主要臓器病変を伴わないSLEの治療には、抗マラリア薬とステロイドが有用である。NSAIDsは副作用の危険性が少ない患者に期間限定で慎重に投与する。治療に反応しない患者、ステロイドを維持量にまで減量できない患者には、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェテル (MMF) やメトトレキサート (MTX) などの免疫抑制薬の使用を考慮する。</p> <p><b>補助療法</b></p> <p>皮膚症状のある患者では、紫外線保護を考慮すべきである。ライフスタイルの改善 (禁煙、体重コントロール、運動) も有用であり、推奨される。患者の治療や状態に応じて、低用量アスピリン、カルシウムとビタミンD、ビスホスホネート、スタチン、アンジオテンシン変換酵素阻害薬などの降圧薬による補助療法を考慮する。エストロゲンによるホルモン補充療法も可能であるが、使用リスクも検討すべきである。</p> <p><b>神経精神SLE (NPSLE)</b></p> <p><b>診断</b></p> <p>SLE患者における神経精神障害の診断手順 (臨床症候、検査成績、神経学的所見、画像所見) は、SLEによらない同障害の診断と同様に行う。</p> <p><b>治療</b></p> <p>視神経炎、急性昏迷状態/昏睡、脳神経または末梢神経症、精神障害、横断性脊髄炎/脊髄症などの主要な精神神経障害を伴うSLEに対しては、免疫抑制薬が</p>
---

有効である。

#### 妊娠

##### (a) 母体

妊娠率には影響がない。妊娠により疾患活動性が悪化することもあるが、通常は軽度である。ループス腎炎や抗リン脂質抗体を有する患者では、子癩の危険性が高く、より慎重な経過観察を要する。

##### (b) 胎児

母体がループス腎炎、抗リン脂質抗体、抗Ro/SSA抗体、抗La/SSB抗体を有する際には、胎児は流産、死産、早産、子宮内成長障害、胎児性心ブロックなどの多様な影響を受ける。プレドニゾロン、アザチオプリン、ヒドロキシクロロキン、低用量アスピリンは妊娠期間でも使用可能であるが、MMF、シクロホスファミド、MTXは避けるべきである。

#### 抗リン脂質抗体症候群 (APS)

抗リン脂質抗体を有するSLEでは、低用量アスピリンは血栓や妊娠合併症の1次予防のために考慮してよい。血栓の他の危険因子も検討すべきで、エストロゲン製剤は危険性を増す。妊娠していないAPSによる血栓症を有するSLE患者に対しては、長期的な経口抗凝固薬が血栓症の2次予防に有効である。妊娠中のAPSを伴うSLE患者には、妊娠合併症や血栓症を減らすために、非分画または低分子量ヘパリンと低用量アスピリンの併用を考慮すべきである。

#### ループス腎炎 モニタリング

腎生検、尿沈渣、蛋白尿、腎機能などの独立した予後予測因子を併せて総合的に評価する必要がある。免疫学的検査(血清C3、抗dsDNA抗体)は治療反応性の予測には限定的で、補助的な指標にすぎない。

#### 治療

増殖性ループス腎炎では、ステロイドと免疫抑制薬の併用療法が腎障害の進行に対して有効である。長期的有効性はシクロホスファミド中心の治療法で認められるが、有害事象とも関連性が高い。短期ないし中期的な試験では、MMFはシクロホスファミドパルス療法と同等の効果を示し、毒性が少ない。6カ月の治療に反応しない際には、治療強化を考慮する。寛解導入後の再燃は少なくなく、慎重な経過観察を要する。

#### 終末期腎症

SLEの透析と腎移植の成績は非糖尿病非SLE患者の成績と同等であり、移植も選択肢の一つである。

(EULAR, 2008)

#### 【参考文献】

- Hahn BH : Systemic lupus erythematosus. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17th edition. Fauci A, et al. ed. p2075, McGraw-Hill, Columbus, 2008.
- Bertsias G, et al : EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. Ann Rheum Dis 67 : 195, 2008.
- 山本一彦 他 : SLE治療の手引き. 厚生労働科学研究費補助金自己免疫疾患に関する調査研究班. p1, 2010.

は、適切な管理や指導を十分に行う。

#### (5) 生物学的製剤の使用

ステロイド薬や免疫抑制薬は副作用の多い非特異的治療であり、特定の標的分子制御を目的とした生物学的製剤が期待される。しかし、欧米でも抗BAFF抗体が承認されているのみで、多くの薬剤は臨床試験段階にある。また、抗CD20抗体は一部の症例で奏効するが、日和見感染症の問題もあり、米国食品医薬品局 (FDA) からはオフラベル使用に対して警告がなされている。

\*保険適用注意

## 経過・予後

SLEの予後は、1960年代のステロイド薬の普及により飛躍的に改善し、5年生存率は90%以上、10年生存率70~90%、20年生存率50~70%といわれる。ただ、発症年齢が20~30歳代であることを考慮すると、この生存率は決して高いとはいえない。わが国では、SLEの死因の第1位は感染症で20~50%を占め、第2位はSLEに伴う間質性肺炎、肺胞出血、肺高血圧症、第3位はSLEに伴う脳・心血管障害などの順である。肺病変による死亡率が海外に比べて高い傾向にあり、感染症は国内外ともに第1位である。原病、および、ステロイド薬や免疫抑制薬などによる免疫抑制状態の十分な管理が必要である。

## Original article

doi:10.1093/rheumatology/kes427

# An association analysis of *HLA-DRB1* with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis in a Japanese population: effects of \*09:01 allele on disease phenotypes

Kenichi Shimane<sup>1,2</sup>, Yuta Kochi<sup>1,2</sup>, Akari Suzuki<sup>2</sup>, Yukinori Okada<sup>1,2,3</sup>, Tomonori Ishii<sup>4</sup>, Tetsuya Horita<sup>5</sup>, Kazuyoshi Saito<sup>6</sup>, Akiko Okamoto<sup>1</sup>, Norihiro Nishimoto<sup>7</sup>, Keiko Myouzen<sup>2</sup>, Michiaki Kubo<sup>8</sup>, Michito Hirakata<sup>9</sup>, Takayuki Sumida<sup>10</sup>, Yoshinari Takasaki<sup>11</sup>, Ryo Yamada<sup>1,12</sup>, Yusuke Nakamura<sup>13</sup>, Naoyuki Kamatani<sup>3</sup> and Kazuhiko Yamamoto<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Objective.** To re-evaluate the roles of *HLA-DRB1* alleles in susceptibility to SLE and RA and their effects on autoantibody status in large-scale Japanese cohorts.

**Methods.** A total of 656 SLE, 2410 RA and 911 control subjects, who were all Japanese, were genotyped for *HLA-DRB1* alleles using sequence-specific oligonucleotide probes. The association of alleles with disease susceptibility was tested by logistic regression analysis and by the relative predispositional effect method. The association with autoantibody status was examined by the standard  $\chi^2$  test.

**Results.** *HLA-DRB1*\*15:01, \*09:01, \*08:02 and \*04:01 were significantly associated with SLE susceptibility, while shared epitope (SE) alleles and *DRB1*\*09:01 were associated with RA susceptibility. The compound heterozygote of *DRB1*\*09:01/\*15:01 conferred an increased risk for SLE compared with the homozygotes for *DRB1*\*09:01 and \*15:01 and was associated with earlier onset of disease, whereas the compound effect of *DRB1*-SE/\*09:01 was not clear in RA. *DRB1*\*09:01 was significantly associated with the appearance of anti-Sm antibody in SLE as well as ACPA in RA, while protectively associated with anti-dsDNA antibody in SLE. No significant interaction was observed between *DRB1*\*09:01 and smoking status for the appearance of ACPA, unlike that observed in SE alleles in RA.

**Conclusion.** We identified *HLA-DRB1* alleles associated with SLE and RA in a Japanese population and demonstrated a shared susceptibility of *DRB1*\*09:01 between the diseases as well as its effect on autoantibody production.

**Key words:** systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, human leukocyte antigen DRB1, autoantibody, genetics, association study, Asian population.

<sup>1</sup>Department of Allergy and Rheumatology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, <sup>2</sup>Laboratory for Autoimmune Diseases, Center for Genomic Medicine, Institute of Physical and Chemical Research, Yokohama, <sup>3</sup>Laboratory for Statistical Analysis, Center for Genomic Medicine, Institute of Physical and Chemical Research, Yokohama, <sup>4</sup>Department of Hematology and Rheumatology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, <sup>5</sup>Department of Medicine II, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, <sup>6</sup>First Department of Internal Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, <sup>7</sup>Laboratory of Immune Regulation, Wakayama Medical University, Wakayama, <sup>8</sup>Laboratory for Genotyping Development, Center for Genomic Medicine, Institute of Physical and Chemical Research, Yokohama, <sup>9</sup>Division of Rheumatology, Department of Internal

Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, <sup>10</sup>Division of Clinical Immunology, Graduate School of Comprehensive Human Science, University of Tsukuba, Tsukuba, <sup>11</sup>Department of Internal Medicine and Rheumatology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, <sup>12</sup>Center for Genetic Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto and <sup>13</sup>Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Submitted 18 April 2012; revised version accepted 12 December 2012.

Correspondence to: Yuta Kochi, Laboratory for Autoimmune Diseases, Center for Genomic Medicine, Institute of Physical and Chemical Research, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-Ku, Tokyo 113-8655, Japan. E-mail: ykochi@src.riken.jp

## Introduction

Genome-wide association studies for SLE and RA have discovered many disease susceptibility genes, where the strongest genetic link is seen in the HLA class II region for both diseases [1–3]. In European/Caucasian SLE patients, the HLA-DR3 serotype (or *HLA-DRB1\*03:01* for genotype) and DR2 (*DRB1\*15:01*) have been associated with disease risk [1, 2, 4, 5]. In Asian populations, the association of DR2 was also replicated in many studies, while the exact role of each individual allele comprising the DR2 serotype (*DRB1\*15:01* and *\*15:02* are common in Asians) has not been established [6–10]. In addition, an association of DR9 (*DRB1\*09:01*), which is rare in European populations, has been implicated in several Asian populations [6–8], although it was not replicated in others [9–11]. This inconsistency may be due to the relatively small sample sizes examined in these individual studies, and it needs to be further tested.

In RA, the disease-associated *DRB1* alleles (DR1/DR4/DR10) are different among European populations but share a conserved amino acid motif (QKRAA/QRRAA/RRRAA) at 70–74, which are now referred to as the shared epitope (SE) [12, 13]. Since ACPA has been recognized in RA, a strong association between SE alleles and the appearance of ACPA has been described [14–16]. Moreover, a gene–environmental interaction between *HLA-DRB1* and cigarette smoking was reported, showing that smokers who carry *DRB1*-SE alleles have a greater risk for the appearance of ACPA [17–19]. In Asian populations, the association of SE alleles has also been repeatedly reported [18, 20]. In addition, *DRB1\*09:01*, which is not classified as an SE allele, is another risk allele for RA in Asian populations, although the risk is moderate compared with that of SE alleles [18, 20]. The association between the appearance of ACPA and SE alleles has been replicated in Asian populations, but the effect of *DRB1\*09:01* on ACPA status is controversial [18, 21–23].

Another issue concerning the association of *HLA-DRB1* alleles with diseases is the genotypic effects, including the gene dosage effect of each allele and the combinational effect of two different alleles. In SLE, compound heterozygotes of susceptible alleles (i.e. DR2/DR3) confer a remarkably increased risk [1]. In European RA patients, compound heterozygotes of SE alleles (i.e. *DRB1\*04:01/\*04:04*) are significantly associated with severe disease in comparison with the homozygotes [24, 25]. In Asia, a study on Koreans demonstrated that the *DRB1\*04:05/\*09:01* heterozygote conferred a stronger risk for RA than the homozygote for *DRB1\*04:05* [26].

Here, to examine and refine the previous findings described so far, we investigated the associations of *HLA-DRB1* alleles with a predisposition to SLE and RA in a Japanese population using a large cohort composed of 656 SLE, 2410 RA and 911 control subjects. We also explored the effect of *DRB1* alleles on disease sub-phenotypes by examining the association between *DRB1* genotypes and autoantibody production in the patients.

## Patients and methods

### Subjects

The DNA samples of SLE patients [ $n = 656$ ; mean (s.d.) age at the time of enrolment = 43.2 (13.7) years; 89.8% female], RA patients [ $n = 2410$ ; mean (s.d.) age = 60.7 (16.7) years; 81.2% female] and control subjects [ $n = 911$ ; mean (s.d.) age = 52.4 (14.4) years; 25.8% female] were recruited through several medical institutes in Japan under the support of the autoimmune disease study group of Research in Intractable Diseases, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, for SLE patients, the BioBank Japan Project for RA patients [27] and the Midosuji Rotary Club for the controls. All 656 SLE subjects fulfilled the 1997 revised criteria of the ACR for SLE [28], and the RA subjects met the 1987 revised criteria of ACR for RA [29]. The control subjects were the same as those used in a previous study [30]. Subjects having a history of autoimmune diseases were excluded from control subjects based on a questionnaire. All subjects were Japanese and provided informed consent to participate in the study. The study was approved by the ethical committee of each institute (RIKEN Institute, University of Tokyo, Tohoku University, Hokkaido University, University of Occupational and Environmental Health, Wakayama Medical University, Keio University, University of Tsukuba, Juntendo University and Kyoto University).

### Genotyping of *HLA-DRB1*

High-resolution (four-digit) genotyping of *HLA-DRB1* was performed by a sequence-specific PCR method with a WAKFlow HLA typing kit (Wakunaga, Hiroshima, Japan) and a Luminex multi-analyte profiling system (xMAP; Luminex, Austin, TX), according to the manufacturer's instructions. For the analysis of RA patients, *DRB1* alleles that contained amino acid sequences QKRAA/QRRAA/RRRAA at 70–74 were classified as SE+.

### Autoantibody and smoking status

Clinical data for 562 SLE subjects (85.7%) were available. All individual ACR criteria were coded as positive, negative or missing. For the study of SLE patients, we obtained autoantibody status from these clinical data, including anti-dsDNA antibody, anti-Sm antibody, aCL and lupus anticoagulant (LAC). The number of subjects available for autoantibody status and the positivity rate for each autoantibody were as follows: anti-dsDNA,  $n = 541$ , 91.7%; anti-Sm,  $n = 451$ , 35.5%; anti-CL,  $n = 419$ , 33.9%; LAC,  $n = 349$ , 21.2%. All these autoantibodies except for LAC were examined by ELISA. LAC was detected by activated partial thromboplastin time and dilute Russell viper venom time according to the international guideline [31].

Sera from 2384 RA patients (98.9%) were available for the measurement of ACPA. ACPA was measured using the Mesacup CCP test (Medical and Biological Laboratories, Woburn, MA). The positivity rate of ACPA was 79.0%. Smoking status was available for 2294 patients (95.2%) and smoking rates were a total of 32.7%; male

82.2% and female 21.2%. The data were recorded as ever or never smoker. Ever smokers contained former and current smokers.

#### Statistical analysis

We performed logistic regression analyses in case-control studies to adjust for sex and age. In case-only analyses, we tested the association by the standard  $\chi^2$  test using  $2 \times 2$  contingency tables. Fisher's exact test was applied when a cell value was  $<5$ . Only alleles with frequencies  $>0.01$  in control samples were analysed, and Bonferroni's correction was applied for multiple testing (20 tests,  $\alpha = 0.0025$ ). The contingency tables were used to calculate the odds ratio (OR). Disease association was also assessed by the relative predispositional effect (RPE) [32]. When the disease is associated with two or more alleles of a locus, this method identifies the associations sequentially according to their strength. Thus the problem that a strong association with one allele can create misleading deviations in the frequencies of other alleles is alleviated. In the RPE analysis of RA, all the SE-carrying alleles were treated as a single SE allele. We calculated population-attributable risk (PAR) using the following formula:  $PAR = f(OR - 1)/(1 + f(OR - 1))$ , where  $f$  is the allele frequency. The mean age at disease onset was analysed by the Mann-Whitney  $U$  test. To evaluate a multiplicative interaction between alleles, we introduced the interaction term in a logistic regression model [19, 33–35]. We also evaluated the interaction by calculating three measures, including the relative excess risk due to interaction (RERI), the proportion attributable to interaction (AP) and the synergy index (S) [36].

We performed k-means cluster analysis to identify cluster groups of SLE patients with similar autoantibody patterns using the clinical data of anti-dsDNA, anti-Sm and anti-CL autoantibodies and LAC, as previously described [37]. We replaced missing data with the mean positive rate of each autoantibody in order to maximize the statistical power [34]. Then we compared autoantibody status and *DRB1* allele frequency among the three groups by  $\chi^2$  test using  $2 \times 3$  tables. All statistical analyses were performed using STATISTICA (StatSoft, Tulsa, OK).

## Results

### Distribution of *HLA-DRB1* alleles in SLE and RA

The allele distribution of *HLA-DRB1* in SLE, RA and control subjects is presented in Table 1. In SLE, only *DRB1\*15:01* showed a significant association with disease susceptibility ( $P = 4.2 \times 10^{-9}$ , OR 2.90). In the RPE analysis, *DRB1\*04:01*, *\*08:02* and *\*09:01* were significantly associated with SLE susceptibility ( $P < 0.0025$ ). As *DRB1\*15:01*, *\*08:02* and *\*09:01* were the three prominent alleles in our population showing a strong association with SLE and a substantial extent of PAR (0.117, 0.032 and 0.063, respectively), we focused on the *DRB1\*15:01*, *\*08:02* and *\*09:01* alleles for further analysis of SLE.

In RA, SE alleles, including *DRB1\*04:01* and *\*04:05*, displayed significant association with disease ( $P < 0.0025$ ), and *DRB1\*04:05* showed the highest risk ( $P = 4.9 \times$

$10^{-22}$ , OR 2.59). When we evaluated SE alleles collectively, they contributed to a substantial proportion of the RA risk when evaluated by PAR (= 0.233). After SE alleles were excluded collectively in the RPE analysis, only *DRB1\*09:01* was significantly associated with RA susceptibility ( $P = 3.8 \times 10^{-8}$ ). Thereafter we focused on SE alleles and *DRB1\*09:01* for further analysis of RA.

### Genotypic association analyses of *HLA-DRB1* with disease susceptibility

To analyse the combinational effect of the three major risk alleles of SLE, we grouped the SLE patients by the presence of *DRB1\*08:02*, *\*09:01* and *\*15:01* alleles (Table 2). When compared with the reference genotype (denoted as *X/X* in SLE), the homozygote *DRB1\*09:01\*09:01* showed a greater risk (OR 2.37) than the heterozygote *DRB1\*09:01/X* (OR 1.48), which implied the presence of a gene dosage effect. In contrast, no obvious gene dosage effect was seen in *DRB1\*15:01*, although a lack of statistical power was undeniable. Strikingly, the compound heterozygote *DRB1\*09:01\*15:01* conferred the highest risk for SLE (OR 7.42). The heterozygote *DRB1\*09:01\*15:01* showed a significantly increased risk for SLE in comparison with the homozygote for *DRB1\*09:01* ( $P = 0.0076$ , OR 5.05), while no significant difference was observed between the compound heterozygote and the homozygote for *DRB1\*15:01* ( $P = 0.52$ , OR 2.13), in which there was a lack of statistical power. When the multiplicative interaction between *DRB1\*15:01* and *\*09:01* was evaluated in a logistic regression model, the coefficient for the interaction term was not significant but marginal ( $P = 0.078$ ). However, the three measures for interaction as departures from additivity suggested a possible interaction [RERI 6.17 (95% CI  $-2.04$ , 14.38), AP 0.63 (95% CI 0.31, 0.96), S 3.39 (95% CI 1.22, 9.48)].

In the RA cohort, we grouped the patients by the presence of *DRB1-SE* and *\*09:01* (Table 2). In comparison with heterozygote *SE/Y*, homozygote *SE/SE* showed a significantly increased risk ( $P = 1.1 \times 10^{-6}$ , OR 2.69), which confirmed the gene dosage effect of SE alleles as previously described [24]. The homozygote of *DRB1\*09:01* suggested a moderately increased risk for RA compared with the heterozygote ( $P = 0.093$ , OR 1.69). As the risk of compound heterozygote *SE\*09:01* did not significantly exceed the risk of homozygote *SE/SE* nor *\*09:01\*09:01*, there was no dominant compound effect (data not shown). Likewise, no compound effect was detected in *\*0405\*0901* (data not shown), unlike the previous report in a Korean population [26].

In addition to analysing the genotypic effect of *HLA-DRB1* on disease susceptibility, we also analysed its effect on the age of disease onset. Among the genotypes of SLE patients, only the compound heterozygote *DRB1\*09:01\*15:01* conferred a significantly earlier onset of SLE when compared with *X/X* (24.3 vs 30.9 years,  $P = 4.3 \times 10^{-4}$ ) (Table 3). The same result was obtained when only female patients were analysed. In RA, the homozygote *SE/SE* and the compound heterozygote *SE\*09:01* were significantly associated with an earlier

TABLE 1 Distribution of *HLA-DRB1* alleles in 656 SLE patients, 2410 RA patients and 911 control subjects

<i>DRB1</i> allele <sup>a</sup>	No. of alleles (%)			SLE				RA				SE allele
	SLE cases ( <i>n</i> = 1312 alleles)	RA cases ( <i>n</i> = 4820 alleles)	Controls ( <i>n</i> = 1822 alleles)	Logistic regression		RPE test		Logistic regression		RPE test <sup>b</sup>		
				OR (95% CI)	<i>P</i> -value	<i>P</i> -value	PAR	OR (95% CI)	<i>P</i> -value	<i>P</i> -value	PAR	
*01:01	48 (3.7)	321 (6.7)	106 (5.8)	0.58 (0.36, 0.93)	0.024	-	-	1.14 (0.86, 1.51)	0.35	-	-	+
*04:01	29 (2.2)	117 (2.4)	18 (1.0)	2.93 (1.29, 6.66)	0.010	3.1 × 10 <sup>-4</sup>	0.019	2.51 (1.38, 4.55)	0.0025	-	-	+
*04:03	32 (2.4)	74 (1.5)	62 (3.4)	1.05 (0.57, 1.91)	0.88	-	-	0.47 (0.30, 0.72)	6.9 × 10 <sup>-4</sup>	-	-	-
*04:05	126 (9.6)	1208 (25.1)	235 (12.9)	0.62 (0.47, 0.84)	0.0023	-	-	2.59 (2.14, 6.73)	4.9 × 10 <sup>-22</sup>	-	-	+
*04:06	17 (1.3)	116 (2.4)	55 (3.0)	0.50 (0.24, 1.02)	0.058	-	-	0.80 (0.52, 1.23)	0.30	-	-	-
*04:10	27 (2.1)	123 (2.6)	24 (1.3)	0.98 (0.45, 2.12)	0.95	0.011	<0.001	1.90 (1.14, 3.18)	0.014	-	-	+
*08:02	81 (6.2)	123 (2.6)	64 (3.5)	1.95 (1.20, 3.15)	0.0066	3.8 × 10 <sup>-6</sup>	0.032	0.66 (0.44, 0.98)	0.038	-	-	-
*08:03	116 (8.8)	272 (5.6)	164 (9.0)	0.93 (0.67, 1.29)	0.64	-	-	0.61 (0.48, 0.79)	1.8 × 10 <sup>-4</sup>	-	-	-
*09:01	273 (20.8)	827 (17.2)	286 (15.7)	1.43 (1.11, 1.85)	0.0062	2.0 × 10 <sup>-6</sup>	0.063	1.12 (0.94, 1.34)	0.22	3.8 × 10 <sup>-8</sup>	0.018	-
*10:01	4 (0.3)	54 (1.1)	18 (1.0)	0.19 (0.057, 0.65)	0.0082	-	-	1.30 (0.66, 2.57)	0.45	-	-	+
*11:01	20 (1.5)	101 (2.1)	43 (2.4)	0.63 (0.31, 1.28)	0.20	-	-	0.98 (0.60, 1.57)	0.92	-	-	-
*12:01	49 (3.7)	163 (3.4)	72 (4.0)	1.10 (0.66, 1.82)	0.72	-	-	0.92 (0.64, 1.32)	0.65	-	-	-
*12:02	14 (1.1)	58 (1.2)	27 (1.5)	0.83 (0.33, 2.10)	0.70	-	-	0.93 (0.53, 1.66)	0.81	-	-	-
*13:02	45 (3.4)	193 (4.0)	97 (5.3)	0.71 (0.42, 1.19)	0.19	-	-	0.73 (0.53, 1.0)	0.73	-	-	-
*14:03	16 (1.2)	52 (1.1)	20 (1.1)	0.76 (0.33, 1.76)	0.53	-	-	0.78 (0.42, 1.46)	0.44	-	-	-
*14:05	22 (1.7)	53 (1.1)	30 (1.7)	0.95 (0.46, 1.98)	0.89	-	-	0.61 (0.34, 1.07)	0.084	-	-	-
*14:06	11 (0.8)	68 (1.4)	21 (1.2)	0.55 (0.22, 1.39)	0.21	-	-	1.08 (0.60, 1.95)	0.80	-	-	+
*14:54	44 (3.4)	109 (2.3)	48 (2.6)	0.92 (0.53, 1.59)	0.77	0.012	0.002	0.59 (0.39, 0.91)	0.017	-	-	-
*15:01	181 (13.8)	277 (5.8)	127 (7.0)	2.90 (2.03, 4.13)	4.2 × 10 <sup>-9</sup>	2.4 × 10 <sup>-10</sup>	0.117	0.89 (0.68, 1.17)	0.41	-	-	-
*15:02	113 (8.6)	414 (8.6)	246 (13.5)	0.60 (0.43, 0.82)	0.0017	-	-	0.54 (0.43, 0.67)	3.7 × 10 <sup>-8</sup>	-	-	-
Other alleles	44 (3.4)	97 (2.0)	59 (3.2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total SE+	-	1907 (39.6)	430 (23.6)	-	-	-	-	2.29 (1.96, 2.68)	5.1 × 10 <sup>-25</sup>	5.4 × 10 <sup>-34</sup>	0.233	-
Total SE-	-	2913 (60.4)	1392 (76.4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Alleles with frequencies of <0.01 are not listed. <sup>b</sup>SE alleles were excluded collectively in the RPE analysis of RA.



TABLE 2 Genotypic association analysis of HLA-DRB1 with disease susceptibility

DRB1 genotype	No. of subjects (%)		OR (95% CI)	P-value
	Cases	Controls		
SLE	<i>n</i> = 656	<i>n</i> = 911		
*08:02/*15:01	9 (1.4)	7 (0.8)	2.73 (1.00, 7.41)	0.041
*09:01/*15:01	49 (7.5)	14 (1.5)	7.42 (4.02, 13.71)	$3.6 \times 10^{-13}$
*08:02/*09:01	21 (3.2)	11 (1.2)	4.05 (1.92, 8.53)	$8.2 \times 10^{-5}$
*15:01/*15:01	4 (0.6)	5 (0.5)	1.69 (0.33, 7.95)	0.48
*15:01/X <sup>a</sup>	115 (17.5)	96 (10.5)	2.54 (1.86, 3.47)	$2.8 \times 10^{-9}$
*08:02/*08:02	2 (0.3)	0 (0)	-	0.104
*08:02/X	47 (7.2)	46 (5.0)	2.17 (1.40, 3.35)	$4.0 \times 10^{-4}$
*09:01/*09:01	28 (4.3)	25 (2.7)	2.37 (1.35, 4.16)	0.0020
*09:01/X	147 (22.4)	211 (23.2)	1.48 (1.14, 1.92)	0.0034
X/X	234 (35.7)	496 (54.4)	Reference	
RA	<i>n</i> = 2410	<i>n</i> = 911		
SE/*09:01	277 (11.5)	70 (7.7)	3.36 (2.49, 4.54)	$3.4 \times 10^{-16}$
SE/SE	351 (14.6)	45 (4.9)	6.63 (4.71, 9.34)	$1.1 \times 10^{-31}$
SE/Y <sup>b</sup>	928 (38.5)	270 (29.6)	2.90 (2.38, 3.54)	$1.4 \times 10^{-26}$
*09:01/*09:01	90 (3.7)	25 (2.7)	3.03 (1.90, 4.83)	$1.4 \times 10^{-6}$
*09:01/Y	370 (15.4)	166 (18.2)	1.86 (1.47, 2.35)	$1.9 \times 10^{-7}$
Y/Y	394 (16.3)	335 (36.8)	Reference	

<sup>a</sup>X: alleles other than DRB1\*08:02, \*09:01 and \*15:01. <sup>b</sup>Y: alleles other than DRB1-SE and \*09:01.

TABLE 3 HLA-DRB1 genotype and the age at disease onset in SLE and RA patients

DRB1 genotype	Total patients			Only female patients		
	No. of subjects	Age at onset, mean (s.d.)	P-value <sup>a</sup>	No. of subjects	Age at onset, mean (s.d.)	P-value <sup>a</sup>
SLE						
*08:02/*15:01	9	26.7 (10.8)	0.45	8	24.6 (9.5)	0.28
*09:01/*15:01	44	24.3 (11.4)	$4.3 \times 10^{-4}$	37	24.7 (11.4)	0.0037
*08:02/*09:01	15	33.7 (16.0)	0.63	13	36.3 (15.7)	0.15
*15:01/*15:01	3	27.3 (5.5)	0.87	1	22 <sup>b</sup>	1.0
*15:01/X <sup>c</sup>	97	29.9 (13.5)	0.49	88	29.5 (12.8)	0.59
*08:02/*08:02	1	20 <sup>b</sup>	1.0	1	20 <sup>b</sup>	1.0
*08:02/X	39	31.5 (11.8)	0.57	35	31.4 (12.0)	0.48
*09:01/*09:01	20	30.4 (13.6)	0.99	18	28.2 (9.4)	0.83
*09:01/X	122	29.8 (14.4)	0.36	113	29.0 (13.5)	0.40
X/X	191	30.9 (12.9)	Reference	170	30.0 (11.7)	Reference
RA						
SE/*09:01	264	47.1 (14.2)	$2.4 \times 10^{-4}$	217	45.8 (14.4)	$2.3 \times 10^{-4}$
SE/SE	327	47.2 (13.9)	$1.0 \times 10^{-4}$	256	46.4 (13.6)	0.0012
SE/Y <sup>d</sup>	871	50.2 (14.7)	0.19	709	48.9 (14.6)	0.17
*09:01/*09:01	90	48.5 (13.8)	0.086	76	47.2 (13.5)	0.080
*09:01/Y	335	49.0 (14.5)	0.025	273	48.0 (13.9)	0.056
Y/Y	376	51.4 (14.7)	Reference	316	50.3 (14.9)	Reference

<sup>a</sup>Mann-Whitney *U* test was used. <sup>b</sup>Data of a single patient. <sup>c</sup>X: alleles other than DRB1\*08:02, \*09:01 and \*15:01. <sup>d</sup>Y: alleles other than DRB1-SE and \*09:01.



TABLE 4 Association of *HLA-DRB1* genotype and autoantibody status in SLE patients

<i>DRB1</i> genotype	No. of positive/negative patients (positive rate %)	OR (95% CI)	P-value
Anti-dsDNA antibody			
*08:02/*15:01	9/0 (100)	–	1.0
*09:01/*15:01	41/1 (97.6)	2.23 (0.30–99.53)	0.69
*08:02/*09:01	16/1 (94.1)	0.87 (0.11–40.29)	1.0
*15:01/*15:01 or X <sup>a</sup>	93/9 (91.2)	0.56 (0.22–1.44)	0.23
*08:02/*08:02 or X	36/2 (94.7)	0.98 (0.20–9.61)	1.0
*09:01/*09:01 or X	119/22 (84.4)	0.30 (0.14–0.65)	0.0014
X/X	183/10 (94.8)	Reference	
Anti-Sm antibody			
*08:02/*15:01	1/6 (14.3)	0.39 (0.008–3.35)	0.67
*09:01/*15:01	11/24 (31.4)	1.07 (0.48–2.36)	0.87
*08:02/*09:01	6/10 (37.5)	1.40 (0.48–4.07)	0.54
*15:01/*15:01 or X	25/55 (31.3)	1.06 (0.59–1.90)	0.85
*08:02/*08:02 or X	13/20 (39.4)	1.51 (0.69–3.30)	0.30
*09:01/*09:01 or X	58/70 (45.3)	1.93 (1.18–3.15)	0.0084
X/X	46/107 (30.1)	Reference	

<sup>a</sup>X: alleles other than *DRB1*\*08:02, \*09:01 and \*15:01.

onset of disease as compared with Y/Y ( $P=1.0 \times 10^{-4}$  and  $2.4 \times 10^{-4}$ , respectively) (Table 3).

#### Association between *DRB1* and autoantibody profile in SLE

Next we examined the difference in autoantibody status between genotypes in SLE patients. Considering that the number of homozygotic patients for *DRB1*\*08:02, \*09:01 and \*15:01 was small, a dominant genetic model was used for this analysis. The *DRB1*\*09:01-bearing genotypes (\*09:01/\*09:01 or \*09:01/X) showed a significant risk for anti-Sm ( $P=0.0084$ , OR 1.93), while it showed a protective effect for anti-dsDNA ( $P=0.0014$ , OR 0.30) (Table 4). No significant association with autoantibody status was observed for either *DRB1*\*15:01-bearing genotypes or the *DRB1*\*09:01/\*15:01 heterozygote, although a lack of statistical power was likely.

The relationship observed between *DRB1*\*09:01 and the status of anti-dsDNA and anti-Sm in the SLE patients prompted us to test whether *HLA-DRB1* affected the autoantibody profiles in SLE. Previously To *et al.* [37] performed a cluster analysis of the autoantibody profiles in European SLE patients and showed that SLE patients could be divided into three distinct clusters: cluster A (anti-Sm and anti-RNP), cluster B (anti-dsDNA, anti-Ro and anti-La) and cluster C (anti-dsDNA, aCL and LAC). Cluster A showed a significantly higher positive rate of anti-Sm antibody and a lower rate of anti-dsDNA antibody than the two other clusters. Therefore we speculated that Japanese SLE patients could also be sub-clustered by autoantibody profiles, where *DRB1* alleles could be involved. We performed k-mean cluster analysis using autoantibody profiles containing anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, aCL and LAC. Similar to the results reported, we found three distinct autoantibody clusters (Table 5). The prevalence of each autoantibody was statistically

different among clusters, except for the anti-dsDNA antibody for which the difference was marginal. Then we compared each allele frequency of *DRB1*\*08:02, \*09:01 and \*15:01 among the three clusters and found that the frequency of *DRB1*\*09:01 significantly differed among the clusters ( $P=0.010$ ). In Cluster 1, characterized by a higher positivity rate of anti-Sm and a lower rate of anti-dsDNA, a higher allele frequency of *DRB1*\*09:01 and lower frequency of *DRB1*\*15:01 were observed as compared with the other clusters. The allele frequency of *DRB1*\*09:01 in Cluster 1 was significantly higher than that of Clusters 2 and 3 ( $P=0.0027$  and  $0.035$  by  $\chi^2$  tests, respectively) (Table 5). The approach of replacing missing data with the mean positive rate is one of the established methods [34], but might lead to false-positive findings. Therefore we also performed k-mean cluster analysis based on casewise deletion and identified similar cluster groups and *DRB1*\*09:01 frequency distributions among the groups. However, the difference of allele frequencies among the clusters was marginal ( $P=0.09$ ), suggesting that validation studies using larger sample sizes would be required.

#### Association of *DRB1* and ACPA status in RA and its interaction with smoking

We evaluated the association of *DRB1*-SE alleles as well as *DRB1*\*09:01 with ACPA status in our population. When genotype frequencies of *DRB1* were compared between ACPA-positive RA patients ( $n=1884$ ) and negative patients ( $n=501$ ), the SE-bearing genotypes (SE/SE or SE/Y) as well as \*09:01-bearing genotypes (\*09:01/\*09:01 or \*09:01/Y) conferred significantly increased risk of the appearance of ACPA (Table 6). A significant gene dosage effect of SE was observed for the association with ACPA status (SE/SE vs SE/Y,  $P=6.2 \times 10^{-6}$ , OR 2.60), while that of *DRB1*\*09:01 was not significant (\*09:01/

TABLE 5 Cluster analysis of autoantibody profiles in SLE patients

	Cluster 1 Sm (n = 114)	Cluster 2 dsDNA only (n = 306)	Cluster 3 dsDNA/CL/LAC (n = 142)	P-value
Autoantibody positivity (%)				
Anti-dsDNA	87.6	91.4	95.4	0.063
Anti-Sm	100	10	38.4	<0.001
aCL	9.2	12.3	100	<0.001
LAC	12.6	13.8	44.1	<0.001
Allele frequency (%)				
*15:01	10.1	14.9	16.2	0.12
*08:02	6.6	5.4	7.4	0.49
*09:01	27.6	18.2	19.7	0.01

CL: cardiolipin.

TABLE 6 Association of HLA-DRB1 genotype and ACPA status in RA patients

DRB1 genotype	Smoking status	No. of patients (%)		OR (95% CI)	P-value
		ACPA positive (n = 1884)	ACPA negative (n = 501)		
SE/*09:01		238 (12.6)	34 (6.8)	4.93 (3.27, 7.44)	$1.2 \times 10^{-15}$
SE/SE		320 (17.0)	27 (5.4)	8.35 (5.37, 12.98)	$1.8 \times 10^{-25}$
SE/Y <sup>a</sup>		756 (40.1)	166 (33.1)	3.21 (2.47, 4.17)	$4.0 \times 10^{-19}$
*09:01/*09:01		71 (3.8)	18 (3.6)	2.78 (1.60, 4.84)	$2.0 \times 10^{-4}$
*09:01/Y		269 (14.3)	94 (18.8)	2.02 (1.48, 2.75)	$7.6 \times 10^{-6}$
Y/Y		230 (12.2)	162 (32.3)	Reference	
		n = 1796	n = 474		
SE/*0901	Ever	67 (3.7)	6 (1.3)	7.60 (3.17, 18.19)	$2.7 \times 10^{-7}$
	Never	160 (8.9)	26 (5.5)	4.19 (2.57, 6.81)	$1.8 \times 10^{-9}$
SE/SE	Ever	101 (5.6)	5 (1.1)	13.74 (5.40, 34.94)	$1.6 \times 10^{-11}$
	Never	209 (11.6)	21 (4.4)	6.77 (4.04, 11.34)	$3.7 \times 10^{-15}$
SE/Y	Ever	252 (14.0)	47 (9.9)	3.65 (2.44, 5.45)	$8.4 \times 10^{-11}$
	Never	470 (26.2)	111 (23.4)	2.88 (2.08, 4.0)	$1.1 \times 10^{-10}$
*0901/*0901	Ever	22 (1.2)	4 (0.8)	3.73 (1.21, 15.32)	0.011
	Never	44 (2.4)	12 (2.5)	2.49 (1.25, 4.96)	0.0076
*0901/Y	Ever	88 (4.9)	32 (6.8)	1.87 (1.16, 3.02)	0.0097
	Never	169 (9.4)	59 (12.4)	1.95 (1.32, 2.88)	$7.5 \times 10^{-4}$
Y/Y	Ever	67 (3.7)	51 (10.8)	0.89 (0.57, 1.39)	0.62
	Never	147 (8.2)	100 (21.1)	Reference	

<sup>a</sup>Y: alleles other than DRB1-SE and \*09:01.

\*09:01 vs \*09:01/Y,  $P = 0.27$ , OR 1.38). There was no obvious dominant compound effect in neither SE/\*09:01 nor \*04:05/\*09:01 (data not shown).

Next, we assessed gene-environment interactions between smoking and SE or DRB1\*09:01 alleles in developing ACPA. A larger effect on ACPA development was observed in ever smokers than in never smokers, when patients carried double SE alleles (double SE/ever

smoker: OR 13.74; double SE/never smoker: OR 6.77) (Table 6). In order to investigate the interactions between smoking and SE or DRB1\*09:01, we examined the interaction terms in a logistic regression model. The logistic coefficient for the interaction term between SE and smoking was significant ( $P = 0.047$ ). However, that between DRB1\*09:01 and smoking was not significant ( $P = 0.34$ ), although lack of statistical power should be considered.

We also evaluated the interaction between smoking and *DRB1* alleles by calculating the three measures (RERI, AP and S). We found interactions only in SE alleles [double SE: RERI 7.34 (95% CI -6.55, 21.24), AP 0.51 (95% CI 0.01, 1.0), S 2.23 (95% CI 0.72, 6.94); single SE: RERI 1.32 (95% CI -0.35, 2.99), AP 0.31 (95% CI 0.01, 0.61), S 1.68 (95% CI 0.92, 3.06)], but not in *DRB1*\*09:01 (data not shown).

## Discussion

In the present analysis of *HLA-DRB1* locus in Japanese SLE and RA patients using one of the largest cohorts ever examined in Asian populations, we demonstrated that *DRB1* alleles were associated with susceptibility as well as disease subphenotype, where the *DRB1*\*09:01 allele, prominent in Asian populations, has a significant impact in both diseases.

In SLE, *HLA-DRB1*\*15:01, \*09:01, \*08:02 and \*04:01 were significantly associated with disease susceptibility in our population, where the association of \*08:02 and \*04:01 has not been previously described in Asian populations. In contrast to \*15:01, we did not observe a significant association in *DRB1*\*15:02. As the \*15:02 allele is rarely observed in European populations, and the majority of previous studies in Asian populations examined these alleles together as DR2 (or DR15) serotypes, the differential role of these two alleles had not been clearly defined. As for the amino acid sequence, these alleles only differ at position 86 (a valine for *DRB1*\*15:01 and a glycine for *DRB1*\*15:02). This amino acid constitutes the P1 pocket of the DR $\beta$  molecule and is considered to be critical for antigen presentation [38]. The influence of other HLA genes on the haplotype of *DRB1*, such as *DQB1*, should also be considered. In this context, the positive association of *DRB1*\*15:02 observed in Taiwanese and Thais [39, 40], unlike in our population, could be explained by the primary association of *DQB1*\*05:01, considering that the *DRB1*\*15:02 is in strong linkage disequilibrium with *DQB1*\*06:01, not with *DQB1*\*05:01, in a Japanese population.

In the genotypic comparison, we found that the compound heterozygote *DRB1*\*09:01/\*15:01 showed a remarkable contribution to increased risk of SLE as well as earlier disease onset. A compound heterozygote of *DRB1* haplotypes may have an increased probability of presenting self-antigens, leading to increased predisposition and earlier onset of disease. Alternatively, the *trans*-complementing heterodimers formed by *DQA* and *DQB* genes on the haplotype of *DRB1*\*09:01 and \*15:01 could also explain the increased effect of heterozygote, as was suggested in a study of Type 1 diabetes (T1D) [41]. In contrast to SLE, no obvious compound heterozygote effect of *DRB1*-SE/\*09:01 (or \*04:05/\*09:01) was observed in RA, possibly because the stronger effect of SE alleles may dominate that of *DRB1*\*09:01 in RA.

We demonstrated a positive association of *DRB1*\*09:01 with anti-Sm antibody formation, but a negative association with anti-dsDNA antibody in SLE patients, implying that differential mechanisms involving different DR

molecules underlie the appearance of these autoantibodies. A recent study in European patients reported that an SNP in the HLA class II region was associated with anti-dsDNA antibody-negative patients, which may support our findings [42]. To *et al.* [37] found that SLE patients could be grouped into several autoantibody patterns, and one of the groups was characterized by a higher positivity rate of anti-RNP and anti-Sm and a lower rate of anti-dsDNA antibodies. This grouping by autoantibody patterns was also applicable to the population we examined. In addition, as differential distribution of *DRB1* alleles was also observed among the groups in our population, combinations of the class II haplotypes should affect autoantibody production in SLE and may influence clinical subphenotypes of SLE patients.

The association of SE alleles in ACPA-positive RA has been well established in both European and Asian populations [14–16, 18, 19]. This suggests an essential role of the SE alleles in presenting citrullinated self-antigens. In addition, a gene–environment interaction between SE alleles and smoking has been demonstrated for the onset of RA [18, 19]. These suggest a pathological series of smoking, citrullination of self-proteins and antigen presentation by SE alleles [43]. However, whether this is also the case for *DRB1*\*09:01 is not clear. Two previous studies in Japanese populations suggested that *DRB1*\*09:01 but not SE alleles is associated with ACPA-negative RA [21, 22]. The study by Furuya *et al.* [21] indicated a significant association of *DRB1*\*09:01 with ACPA-negative RA ( $P=0.016$ , OR 2.2). Another study by Terao *et al.* [22], in which the ACPA-negative patients (502 subjects) used in the present study were also included, showed a marginal association with ACPA-negative RA ( $P=0.062$ , OR 1.16). However, the effect of *DRB1*\*09:01, independent of SE alleles, on ACPA-positive RA was not evaluated in these studies. Another study in a Korean population showed that *DRB1*\*09:01 made a significant contribution to the appearance of ACPA independently of SE ( $P=1.10 \times 10^{-3}$ , OR 2.49) [18], which corresponds to our observation (Table 6). Taken together, this evidence suggests that *DRB1*\*09:01 confers risk for both ACPA-positive and ACPA-negative RA. Moreover, as no significant gene–environmental interaction was observed between smoking and *DRB1*\*09:01 for the appearance of ACPA, *DRB1*\*09:01 may not function in the same pathological series of SE alleles, as mentioned.

The amino acid sequence of *DRB1*\*09:01 at 70–74 (RRRAE) is different from that of the SE alleles. As both *DRB1*\*14:05 and \*14:54, the only alleles that share the RRRAE epitope in the Japanese population, displayed a negative trend for the risk of RA, it may be unlikely that this epitope alone can explain the susceptibility of *DRB1*\*09:01 to RA. A recent study examining all possible epitopes in the DR molecule showed that two new epitopes (VH<sup>11,13</sup> and LA<sup>67,74</sup>) in addition to the classical SE exhibited a predisposition to RA in European populations [44]. Haplotypes involving *DRB1*\*09:01 have been reported to be associated with autoimmune diseases other than RA and SLE, including T1D, Graves' disease,

mixed CTD and microscopic polyangiitis in Asian populations [45–48], suggesting that these autoimmune diseases share the same pathological pathway. Although the DR9 molecule itself may play an important role in disease pathogenesis, it is also known that *DRB1\*09:01* is in linkage with *DRB4*, a paralogue of *DRB1* that also encodes DR $\beta$  chains. *DRB4* is only present in haplotypes of *DRB1\*04*, *\*07* and *\*09*. Its presence has been found to be associated with the progression of RA [49] and the presence of ACPA [50]. Therefore the association of *DRB1\*09:01* could be secondary to the effect of *DRB4* in RA. In addition, the exclusive presence of *DRB4* in *DRB1\*04* among SE alleles might explain the difference in the effect size between *DRB1\*04* alleles and other SE alleles (i.e. *\*01:01*).

In conclusion, we identified *HLA-DRB1* alleles associated with SLE and RA in a Japanese population and demonstrated a shared susceptibility of *DRB1\*09:01* between the diseases as well as its effect on autoantibody production. Further studies, such as structural analysis of the *DRB1\*09:01* product itself and analysis of other candidate causal variants of the *DRB1\*09:01* haplotype, are needed to clarify the exact role of the *DRB1\*09:01* haplotype in disease pathogenesis.

#### Rheumatology key messages

- A large-scale association study identified *HLA-DRB1* alleles associated with SLE and RA in the Japanese population.
- *HLA-DRB1\*09:01* allele is associated with susceptibility to both SLE and RA in the Japanese population.
- *HLA-DRB1\*09:01* allele affects autoantibody profiles of SLE and RA in Japanese patients.

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr A. Miyatake, the members of the Rotary Club of Osaka-Midosuji District 2660 Rotary International in Japan, the members of the autoimmune disease study group of Research in Intractable Diseases, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and the staffs of the BioBank Japan Project for supporting both the study and clinical sample collection. We also thank K. Kobayashi, M. Kitazato and other members of the Laboratory for Autoimmune Diseases, Center for Genomic Medicine, Institute of Physical and Chemical Research, for their helpful advice and excellent technical assistance.

**Funding:** This work was supported by a grant from the Center for Genomic Medicine, Institute of Physical and Chemical Research, and a grant from the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare.

**Disclosure statement:** The authors have declared no conflicts of interest.

#### References

- 1 Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD *et al*. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2002;71: 543–53.
- 2 Barcellos LF, May SL, Ramsay PP *et al*. High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet* 2009; 5:e1000696.
- 3 Jawaheer D, Li W, Graham RR *et al*. Dissecting the genetic complexity of the association between human leukocyte antigens and rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2002; 71:585–94.
- 4 Rioux JD, Goyette P, Vyse TJ *et al*. Mapping of multiple susceptibility variants within the MHC region for 7 immune-mediated diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:18680–5.
- 5 Fernando MM, Stevens CR, Walsh EC *et al*. Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet* 2008;4:e1000024.
- 6 Kim I, Kim YJ, Kim K *et al*. Genetic studies of systemic lupus erythematosus in Asia: where are we now? *Genes Immun* 2009;10:421–32.
- 7 Li CF, He XH, Teng Q, Jiang ZF. [Association of HLA-A, B, and DR haplotypes with genotype in Chinese children with systemic lupus erythematosus]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2003;41:422–5.
- 8 Hong GH, Kim HY, Takeuchi F *et al*. Association of complement C4 and HLA-DR alleles with systemic lupus erythematosus in Koreans. *J Rheumatol* 1994;21:442–7.
- 9 Zhang J, Ai R, Chow F. The polymorphisms of HLA-DR and TNF B loci in northern Chinese Han nationality and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Chin Med Sci J* 1997;12:107–10.
- 10 Lee HS, Chung YH, Kim TG *et al*. Independent association of HLA-DR and FCgamma receptor polymorphisms in Korean patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:1501–7.
- 11 Hashimoto H, Nishimura Y, Dong RP *et al*. HLA antigens in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 1994;23:191–6.
- 12 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.
- 13 Nepom GT, Byers P, Seyfried C *et al*. HLA genes associated with rheumatoid arthritis. Identification of susceptibility alleles using specific oligonucleotide probes. *Arthritis Rheum* 1989;32:15–21.
- 14 Huizinga TW, Amos CI, van der Helm-van Mil AH *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 van der Helm-van Mil AH, Verpoort KN, Breedveld FC *et al*. 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.