

診票に、患者自身が必要事項を記入し郵送にて申し込む形をとっている。申し込み方法は電話でも案内している（妊娠と薬情報センター：TEL:03-5494-7845）。

- 胎児に CHB が現れる時期は主に妊娠 18 週から 24 週の間とされ、特にリスクが高い症例ではこの時期に胎児超音波検査（以下胎児心エコーとする）を繰り返し行い、CHB の早期発見に努めることが必要である。海外では NLE を出産するリスクの高い妊婦においては毎週、胎児心エコーを行う管理指針が提案されている[15]。わが国での診療現場の状況を考慮すると、妊娠 16 週～26 週頃において 1～2 週間の間隔で定期的に観察することが望ましいが、適切な観察の間隔のコンセンサスはなく、技術的にも高度な技術が要求されること、時間的な負担が大きいという問題点がある。

CQ4. 抗SS-A抗体陽性女性におけるCHB発症予防を含めた妊娠中の診療方針は？

1. 抗SS-A抗体陽性女性の胎児がCHBを発症するのは低率のため、抗SS-A抗体陽性の妊婦全員にCHB発症予防を目的として経胎盤的ステロイド投与を行うことは適切ではなく、ハイリスク症例を抽出することが望ましい。
2. CHBのハイリスク症例（CQ2参照）は、胎児心拍が確認できたら比較的早い時期に、胎児不整脈や心機能を評価できる施設へ転医することが望ましい。
3. 現時点で確立した予防方法はない。個々の症例について十分なカウンセリングや同意を得た上で、専門的に対応可能な施設で慎重に行う。

解説

- 抗SS-A抗体陽性女性の胎児がCHBを発症する率はおおよそ約1%と低率であり、経胎盤的ステロイド投与のCHB発症予防効果も確立していないこと、母体、胎児の合併症の可能性があることなどから、抗SS-A抗体陽性母体全員にステロイドの予防投与は行われていない。
- CHB発症のハイリスク症例（CQ2参照）については母体の再評価ならびに予防措置の検討のために胎児心拍が確認できたら比較的早い時期に専門施設に紹介することが望ましい。
- 抗SS-A抗体が陽性で第1子がCHBであった場合の、第2子以降のその繰り返し率はおおよそ20%である。文献上、このような症例を対象として、積極的に経胎盤的ステロイド投与を行う方法（妊娠12週からベタメタゾン2mgを処方、20週から2週間毎に半減する方法）が報告されている[7]。胎盤移行性の高いフッ化ステロイドを使用することについては児への中枢神経発達への影響や有効性について結論が出ていない状況では慎重に検討する必要がある。これまでフッ化ステロイドであるベタメタゾンの効果や副作用についてはデキサメタゾンと同様に考えられてきたが、最近ではベタメタゾンの方が児の中枢神経発達への影響が少ないという報告が出てきている。早産児の肺成熟を目的に母体に投与された症例での研究ではあるが、ベタメタゾン投与はデキサメタゾン投与と違い、児の神経発達への影響（生後18～22ヶ月時点での）は認めなかったことが示され、その理由としてステロイド受容体を介した作用機序に差があるからではないかと考察されている[16]。胎盤通過性の違い（ベタメタゾン：30-50%、デキサメタゾン：100%）[17]が関係している可能性もある。
- 母体へのステロイド投与以外に、NLE発症の予防として、二重膜濾過法による血漿交換療法、大量ガンマグロブリン療法[18]などが報告されている。二重膜濾過法は母児に対する安全性については問題ないと考えられるが、その有効性には議論の余地があり、費用対効果の面からも行わ

れなくなっている。後者については有効性を証明できていない。

◇ CQ4に関連した海外のプロトコールの紹介

まず、現時点では抗 SS-A 抗体陽性妊娠例の児の標準的 CHB スクリーニング方法や発症時の治療法に関して全世界共通のガイドラインは存在しない。しかし CHB の発症時期を考慮し全米の NLE 児のコホート研究 (Research Registry for Neonatal Lupus: RRNL) を行っているニューヨーク大学の Jill P. Buyon 医師らのプロトコールは、PRIDE study[19]で用いられたものと同様、胎児心エコーを妊娠第 16 週～26 週は毎週行い、その後は 34 週まで 2 週毎に行う、となっている。薬物による予防方法として免疫グロブリン療法の NLE 発症予防効果が期待されたが、ハイリスク症例を対象にした前向き試験(PITCH study)[18]では NLE の発症予防効果は示されなかった。今のところ日本では使用できないが、ヒドロキシクロロキンがハイリスク症例において NLE 発症予防効果が期待できるという疫学データが発表され[20]、今後前向き研究の結果が待たれる。

CQ5. 胎児期、新生児期の CHB の管理は？

1. 胎児期の管理は、胎児心機能・不整脈評価が可能な施設にて行い、分娩および新生児管理は、緊急ペースメーカー治療が可能な施設で行う。
2. CHB、徐脈への対応のみでなく、合併する可能性がある心筋炎や心内膜線維弾性症 (EFE) の診断、治療が重要である。
3. 胎児水腫合併例および心機能低下例は予後不良であるが、早期娩出による直接的な治療、胎内での経過観察、あるいは胎内治療のいずれの管理法も有効性は証明されていない。従って、症例ごとに適切な治療・管理指針を検討すべきである。
4. 胎児心不全や CHB に対する経胎盤的治療として、母体へのステロイド投与と β 刺激剤投与が報告されているが、現時点で対象例の選別や投与方法、またその有効性や安全性は確立されていない。胎内治療を行う場合は、十分なカウンセリングの元で同意を得た上で、専門的に対応可能な施設で慎重に行う。
5. II度以上の房室ブロックが診断された場合は胎盤通過性のあるフッ化ステロイド (ベタメタゾン、デキサメタゾン) の母体投与を検討する。ただし、現時点でその投与方法や安全性は確立されておらず、個々の症例について十分なカウンセリングの元で同意を得た上で、専門的に対応可能な施設で慎重に行う。
6. III度 (完全) 房室ブロックと診断された場合は出生後にペースメーカー治療が必要となることが多いため、産科医、小児循環器科医、小児心臓外科医が揃った専門的な施設において各科で連携をとり適切な出生時期、分娩方法、出生後の管理について十分な話し合いと準備をしていく。
7. 新生児期のペースメーカー植込みについて明確な適応基準はなく、また的確な方法 (一時的ペーシングか、植込み術か)、デバイスの選択、電極の位置、モード設定などについてコンセンサスは得られていない。また、かえって心機能を低下させたり、拡張型心筋症の原因になりうることを認識しつつ管理を行う。

解説

- 母体の自己抗体 (抗 SS-A 抗体) による CHB を発症した胎児では、およそ 50%の症例が新生児期に、最終的に 70-90%の症例がそれ以降に恒久的なペースメーカー植込みが行われている

[21],[22],[23]。このため、分娩および新生児管理は嚴重な新生児循環器管理が可能で、かつ緊急ペースメーカー治療が可能な施設で行うことが望まれる。

- 母体の自己抗体（抗 SS-A 抗体）は胎児の伝導系以外に心筋や心内膜も障害し、心筋炎や EFE が引き起こされることが証明されている[24]。CHB は発症せずに、これらの心筋障害のみを発症する胎児もいる。心拍数（徐脈）よりも、この心筋炎や EFE、それに伴う心機能障害の方が胎児期や新生児期の予後を左右することも少なくない[21],[25]。しかし、これらの病変は胎児心エコーでの診断精度が高くなく、新生児期の状態を出生前に正確に予測できないこともある。したがって、胎児期の管理は、可能な限り胎児心エコー検査および胎児心疾患管理に習熟した施設にて行い、分娩、新生児期管理を行う施設と十分な連携をとることが望まれる。
- 胎児水腫合併および心機能低下は予後不良因子として指摘されている[21],[25]。対応としては、早期娩出による直接的な治療、胎内での経過観察、あるいは胎児治療のいずれかを選択することとなるが、どの管理法も有効性は証明されていない[24]。胎内治療としてステロイド投与やβ刺激剤の投与にて胎児水腫が改善したとの報告もあるが、自然経過との比較研究はなく、有効性は証明されていない。また早期娩出になった低出生体重児でも体外ペーシングは可能では有るが、胎児水腫合併例では心筋障害も強いため嚴重な循環管理も要求され、早期娩出により予後改善するとの研究報告もない。個々の胎児の未熟性や、それぞれの治療の利点・欠点を踏まえて、十分なカウンセリングのもとに管理方針を決定する。
- 母体へのステロイド投与による経胎盤的胎内治療は、CHB 自体の治療と、合併する心筋炎や EFE などの治療の 2 つの目的がある。
 - PRIDE studyでは、房室ブロックが可逆的な段階とされるI、II度房室ブロックを胎児エコーにより早期に発見し、PR 間隔が延長しているI度の症例に対して経胎盤的ステロイド（デキサメタゾン）投与することによりIII度（完全）房室ブロックへの進行の抑制を試みている。しかし、I度ないしII度CHBでは自然経過にて改善する症例もあることから、ステロイド治療の効果によるものか判定しにくい上に、プロトコール自体が患者にも医師にも負担が大きい点も課題とされている[26]。
 - III度（完全）房室ブロックと診断された場合は、通常、不可逆的であるためステロイドの経母体投与は無効（ステロイド治療で改善したとの症例報告もあるが）であるが、胎児心不全の治療に有効なことがある[24]。しかし、CHB胎児への全例投与では予後改善の効果は無かったとの多施設研究も有り[23]、治療対象をCHB全症例とするか心筋障害所見を有する症例とするか結論は出ていない。有効性や安全性が確立していない現状では、個々の症例について十分なカウンセリングや同意を得た上で、専門的に対応可能な施設で慎重に行う。
 - 使用するステロイドとしては、胎盤通過性のあるフッ化ステロイド（デキサメタゾンまたはベタメタゾン）の使用報告が有り、4-8mg/日を母体に内服投与されている[23],[24]。抗 SS-A 関連 CHB の胎児治療目的に母体を介してデキサメタゾンを投与された児 13 例（生後 13 ヶ月から 60 ヶ月）を対象とした研究で、中枢神経発達に悪い影響を与えていなかったという報告もある[27]が、妊娠中のフッ化ステロイドの長期投与については、母児への影響（母体：耐糖能異常、妊娠高血圧症候群など、胎児：中枢神経発達、胎児発育不全、羊水過少、副腎不全など）を考慮し、専門施設において慎重に検討し、十分なカウンセリング

グのもとで同意を得た上で行う必要がある[27]。その際には、同じフッ化ステロイドでもベタメタゾンとデキサメタゾンには差がある (CQ4 参照) ことを考慮する。

- 母体へのβ刺激剤投与による経胎盤的胎児治療は、胎児の心室拍数が5-10%ほど増加する症例があり、胎児水腫が改善したとの報告もあり、有効性が証明されている[23]。ただし、心拍数の増加には有効だが、現時点では予後改善についての有効性は証明されていない。また、使用の適応については、55bpm未満とされている報告もあるが定まったものは無い。β刺激剤としては、日常的に子宮収縮抑制剤として使用されている塩酸リトドリンやテルブタリンが使用されている。
- 新生児期治療としてのペースメーカー植込みは、電極の位置、ペーシングモードなどにより、かえって心不全が悪化したり、数か月の経過で拡張型心筋症へ進行することがあるため、適応と方法について慎重な判断が要求される。電極の位置では、右室流出路などのペーシングで心筋収縮の同期が悪いことが報告されている。レート設定の点では、新生児の正常心拍数である130-150bpmで心室ペーシングを行ったところ急激に心不全が悪化し、設定心拍数を下げたところ改善した症例が報告されている。また、DDDペーシングでは速い心房拍数での心室拍数となり心機能が低下し、VVIペーシングへ変更することで改善したとの報告もある[28]。また、新生児期は問題がなくても、数か月後に拡張型心筋症を呈して、設定心拍数を下げることで改善した報告もある[29]。最適な条件についてのコンセンサスはないが、個々の症例において心エコー検査にて心室収縮の同期状況や心拍出量の経時的モニターにて慎重に設定を行う事が推奨される。

◇ CQ5に関連した海外のプロトコールの紹介

CQ4で記述したニューヨーク大学のJill P. Buyon医師らのプロトコールでは、CHB発症時の治療効果の確固たるエビデンスはないとしながらもRRNLや欧州の疫学データ[30]より、胎児がII度CHBを発症した場合にはデキサメタゾン経口4mg/日の投与を開始している。ただし、III度CHBに進行してしまった場合には改善させることはできないというPRIDE studyや、RRNLのデータ[31]と母体への副作用を考慮しステロイド投与は原則漸減中止するとしている。

【文献】

1. Buyon JP: Cardiac manifestations of neonatal lupus erythematosus: guidelines to management, integrating clues from the bench and bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2009;5:139-148
2. Buyon JP, et al : Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *J Am Coll Cardiol.* 1998;31:1658-1666
3. Boh EE : Neonatal lupus erythematosus. *Clin Dermatol.* 2004;22:125-128
4. Hornberger LK, et al: Spectrum of cardiac involvement in neonatal lupus. *Second J Immunol.* 2010;72:189-197
5. Cimaz R, et al : Incidence and spectrum of neonatal lupus erythematosus : a prospective study infants born to mothers with anti-Ro autoantibodies. *JPediatr.* 2003;142 : 678
6. 宮野 章、他 : 酵素免疫測定法による抗SS-A/B抗体標準化の検討. *臨床リウマチ* 2012; 24: 247-259

7. Jaeggi E, et al: The importance of the level of maternal anti-Ro/SSA antibodies as a prognostic marker of the development of cardiac neonatal lupus erythematosus a prospective study of 186 antibody-exposed fetuses and infants. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2778-2784
8. 和氣徳夫、他：抗 SS-A 抗体陽性妊婦における抗体値と児完全房室ブロック罹病に関する検討。厚生労働科学研究費補助金成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業「自己抗体陽性女性の妊娠管理指針の作成及び新生児ループスの発症リスクの軽減に関する研究」平成 23 年度 総括・分担研究報告書, 2012; 18-21
9. Anami A, et al: The predictive value of anti-SS-A antibodies titration in pregnant women with fetal congenital heart block. *Mod. Rheumatol.* 2012 Jul 4. [Epub ahead of print]
10. 村島温子：免疫抑制薬。薬物治療コンサルテーション 妊娠と授乳（伊藤真也・村島温子編集）南山堂 2010;175-180
11. 中西 功：降圧薬。薬物治療コンサルテーション 妊娠と授乳（伊藤真也・村島温子編集）南山堂 2010;260-266
12. 中村 靖：母体疾患へのステロイド投与の適用と胎児への影響。日本周産期・新生児医学会雑誌 2004;40:682-686
13. Shinohara k, et al: Neonatal Lupus Erythematosus: Results of Maternal Corticosteroid Therapy. *Obstetrics & Gynecology.* 1999;93:952-957
14. 村島温子：妊娠中の薬剤使用とリスク評価—妊娠と薬情報センターの役割—。産婦人科の実際 2011;60:1323-1330
15. Buyon JP, et al: Neonatal lupus : Review of proposed pathogenesis and clinical data from the US-based research registry for neonatal lupus. *Autoimmunity* 2003;36:41-50
16. Lee BH, et al: Neurodevelopmental outcomes of extremely low birth weight infants exposed prenatally to dexamethasone versus betamethasone. *Pediatrics.* 2008; 121:289-296
17. Ballard P, et al: Glucocorticoid levels in maternal and cord serum after prenatal betamethasone therapy to prevent respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 1975;56: 1548-1554
18. Friedman DM, et al: Evaluation of fetuses in a study of intravenous immunoglobulin as preventive therapy for congenital heart block. *Arthritis Rheum* 2010;62:1138-1146
19. Friedman DM, et al: Utility of Cardiac Monitoring in Fetuses at Risk for Congenital Heart Block The PR Interval and Dexamethasone Evaluation (PRIDE) Prospective Study. *Circulation.* 2008;117:485-493
20. Izmirly PM, et al: Maternal use of hydroxychloroquine is associated with a reduced risk of recurrent anti-SSA/Ro-antibody-associated cardiac manifestations of neonatal lupus. *Circulation* 2012;126:76-82
21. Izmirly PM, et al: Maternal and fetal factors associated with mortality and morbidity in a multi-racial/ethnic registry of anti-SSA/Ro-associated cardiac neonatal lupus.

Circulation 2011;124:1927-1935

22. Lopes LM, et al: Perinatal outcome of fetal atrioventricular lock. One-hundred-sixteen cases from a single institution. *Circulation* 2008;118:1268-1275
23. Elisson H, et al: Isolated atrioventricular block in the fetus: A retrospective, multinational, multicenter study of 175 patients. *Circulation* 2011;124:1919-1926
24. Trucco SM, et al: Use of intravenous gamma globulin and corticosteroids in the treatment of maternal autoantibody-mediated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:715-723
25. Miyoshi T, et al: Evaluation of transplacental treatment for fetal congenital bradyarrhythmia - Nationwide survey in Japan - *Circ J* 2012;76:469-476
26. Jaeggi E, et al: Prolongation of the atrioventricular conduction in fetuses exposed to maternal anti-Ro/SS-A and anti-La/SSB antibodies did not predict progressive heart block. A prospective observational study on the effects of maternal antibodies on 165 fetuses. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57:1487-1492
27. Brucato A, et al: Normal neuropsychological development in children with congenital complete heart block who may or may not be exposed to high-dose dexamethasone in utero. *Ann Rheum Dis*. 2006;65:1422-1426
28. Silvetti MS, et al: Determinants of early dilated cardiomyopathy in neonates with congenital complete atrioventricular block. *Europace* 2010;12:1316-1321
29. Chen C, et al: Restoration of cardiac function by setting the ventricular pacing at a lower range in an infant with congenital complete atrioventricular block and dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2008;131:e38-e40
30. Izmirly PM, et al: Neonatal lupus: advances in understanding pathogenesis and identifying treatments of cardiac disease. *Curr Opin Rheumatol*. 2012;24:466-472
31. Izmirly PM, et al: *Arthritis Rheum* 2012;64 suppl: S703

【参考資料】

1. 本研究に用いた症例調査データベースの内訳

66 施設（産科系、内科系、その他）から 758 症例。うち、本研究の登録条件を満たす 732 症例を対象とした。

2. 本研究の特徴と限界

本研究では、全国の医療機関の協力により、700 例を越える抗 SS-A 抗体陽性妊娠例の登録を達成した。このような大規模な抗 SS-A 抗体陽性妊娠の登録研究はわが国には前例がなく、本登録より新たな知見が得られることが期待される。しかしながら、抗 SS-A 抗体陽性妊娠は比較的少ない妊娠例であり、それからさらに少数の CHB 発症をエンドポイントとした分析を行うには、700 例の登録でもなお統計的検出力の不足は常につきまとう問題である。したがって、今回の研究結果で有意な関連が検出できなくても、それによって直ちにその関連が否定されるものではない。一方、未知のバイアスによって、偶然に有意な関連を検出する可能性もある。

その他の本研究の限界について列挙する。第 1 に、本研究では抗 SS-A 抗体陽性妊娠例を多施設から集積しているものの、抗 SS-A 抗体検査の標準化はなされていない。第 2 に、現時点では抗 SS-A 抗体検査は、一般に妊娠判明時にルーチンで行われているわけではないため、大多数の無症候性抗 SS-A 抗体陽性妊娠例は、本研究では把握できていない。第 3 に、事前に予測した CHB の発症率（約 1%と予想）から割り出した予想症例数（7 例程度）よりも、実際に登録された新生児心ブロックの症例数の方が多かった（約 50 例、妊娠前に抗体陽性であることが判明した症例に限っても約 20 例）ことは、CHB 非発症例よりも発症例の方が登録されやすかった可能性を示唆する。第 4 に、抗 SS-A 抗体陽性妊娠例が、児の CHB 発症をきっかけに判明するなど、妊娠前には判明していなかった場合、そうした症例の多くは妊娠中には症状が乏しく治療を受けていないため、その例を含めて症状や治療についての分析をすると結果を歪める可能性がある。

本研究の実施に当たっては、これらの限界点に極力留意しつつ分析を行った。例えば、第 3 の問題に対しては、症例対照研究の手法を用いて解析することとし、第 4 の問題に対しては、臨床症状や治療に関する分析では症例を妊娠前に抗 SS-A 抗体陽性であることが判明した症例に限ることとした。

本研究で得られた結果として、抗 SS-A 抗体高値が CHB 発症のリスク因子で、DID 法で 32 倍をカットオフ値とすることが有用である可能性が示されたことと、妊娠 16 週以前からのプレドニゾン換算 10mg/日以上投与が CHB の発症予防につながる可能性が示されたことがある。

本研究で構築したデータベースからは CHB のリスク因子、予防因子を明らかにする以外にも多く情報が得られる可能性があるが、それらについては今後学会や論文などで呈示していきたいと考えている。いずれにしても結果の解釈に当たっては、これらの限界点に注意する必要がある。

3. 本研究で集積した症例データベースからの単純集計（一部抜粋）

《注意》以下は本研究の登録条件を満たす全症例を対象としたもので、CHBを発症してから抗SS-A抗体陽性が判明した症例やCHB既往があるために予防治療を行った症例も含まれている単純集計であり、ここで示されている数値のみを取り上げて臨床での判断根拠とすることは、適切ではないことに留意されたい。

① 抗SS-A抗体の測定法の内訳（定性のみの施設あり）（有効対象 725例）

	症例数
DID	292
ELISA	500
DID+ELISA	67

② 抗SS-A抗体陽性妊娠例（732例）の抗SS-B抗体とCHB発症の有無との関係

	症例数	CHB発症あり	CHB発症なし
抗SS-B抗体陽性	188	18	171
抗SS-B抗体陰性	474	34	442
抗SS-B抗体不明	70	1	69

③ 抗SS-A抗体陽性妊娠例（732例）の基礎疾患

基礎疾患	症例数		
なし	157		
あり	575	SS	275
		SLE	281
		MCTD	40
		RA	31
		APS	30
		その他	49

④ その他自己抗体の測定状況と陽性率（対象 732例）

	抗核抗体	抗DNA抗体	抗U1RNP抗体	抗Sm抗体	抗リン脂質抗体	抗甲状腺抗体
測定数(%)	680(92.9)	566(77.3)	437(59.7)	434(59.3)	587(80.2)	215(29.3)
陽性数(%)	638(93.8)	173(30.6)	122(27.9)	41(9.4)	70(11.9)	75(34.9)

⑤ 抗SS-A抗体価とCHB発症の関係

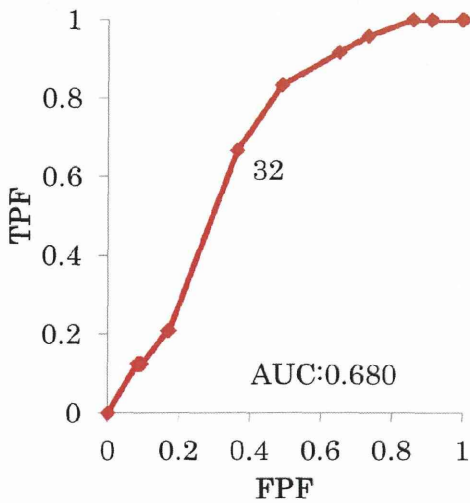


図1. 抗体価(DID法)とCHB発症におけるROC曲線での検討 (n=231)

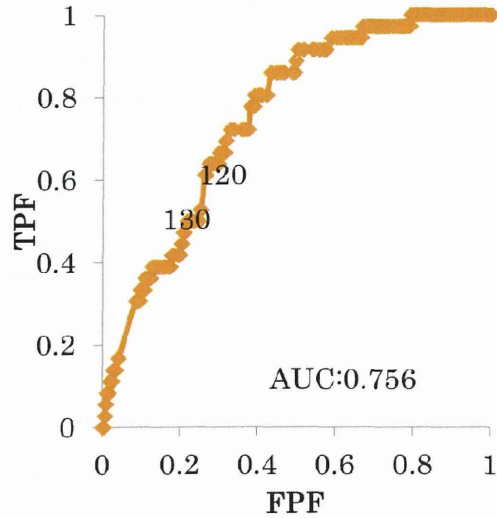
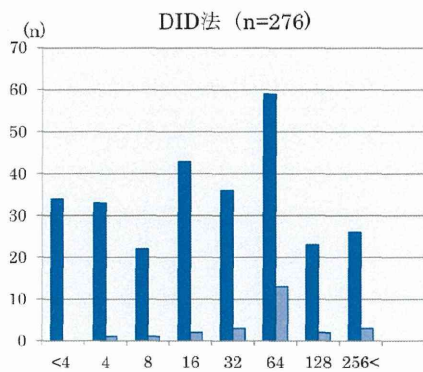


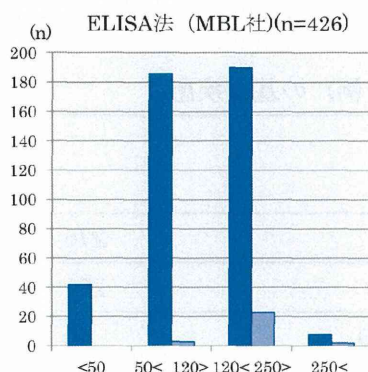
図2. 抗体価(ELISA法)とCHB発症におけるROC曲線での検討(n=452)

図3. 測定法別の抗SS-A抗体価とCHB発症の関係

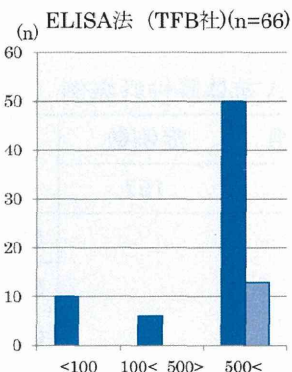
■ : CHB発症なし ■ : CHB発症あり



抗体価	CHB非発症	CHB発症	CHB既往
<4	34	0	0
4	33	1	1
8	22	1	3
16	43	2	3
32	36	3	3
64	59	13	3
128	23	2	3
256<	26	3	1



抗体価	CHB非発症	CHB発症	CHB既往
<50	42	0	0
50< 120>	186	3	1
120< 250>	190	23	5
250<	8	2	0

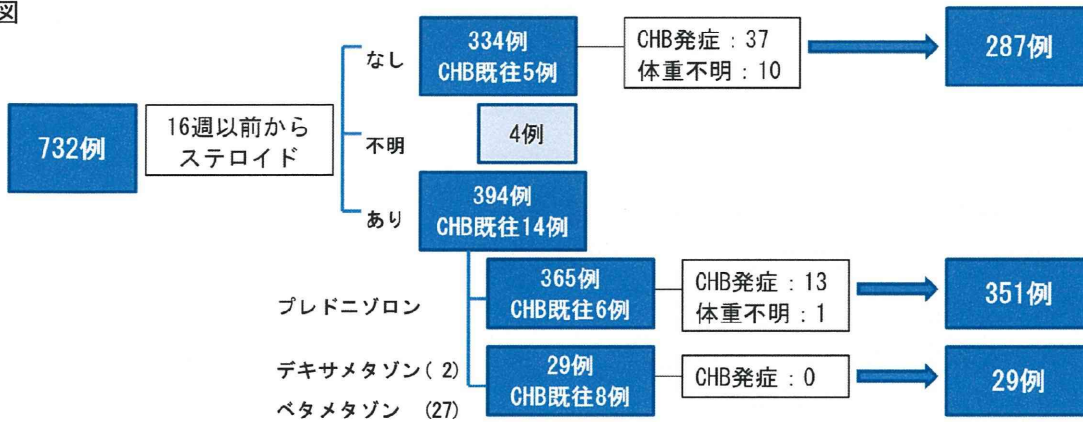


抗体価	CHB非発症	CHB発症	CHB既往
<100	10	0	0
100< 500>	6	0	0
500<	50	13	5

症例データベースを用いたROC曲線解析により、CHB発症を予測するためのカットオフをDID法では32倍と設定した(図1)が、4倍、8倍でそれぞれ1症例ずつ、16倍で2症例と32倍未満でもCHBを発症している症例があることにも留意した説明が必要である。ELISA法全体では120-130U/mlをカットオフ値とできるのではないかと考察がされた(図2)。ELISA法(MBL社)に絞っても同様の傾向にあるが、120未満の3症例(83,101,112)でもCHB発症があった(図3)。ELISA法(TFB社)では500U/ml以上は最終値を出していない場合が多く、本法単独でカットオフ値をどこに定められるか今後の課題である。なお、参考までにそれぞれの表にCHB既往症例数を示した。

⑥ 妊娠初期（16週以前）からのステロイド投与の有無、種類と児の体重

図



表

	症例数	早産	児の子宮内発達 (SD)
ステロイド投与なし	287	51 (18%)	-0.53±1.18
プレドニゾロン	351	106 (30%)	-0.54±1.34
フッ化ステロイド	29	4 (14%)	-1.48±1.27
デキサメタゾン	2		
ベタメタゾン	27		

図：フッ化ステロイドを妊娠16週以前から投与された29例（CHB既往の8例を含み、ほとんどがCHB予防目的と考えられる）では全くCHB発症がなかったのに対し、プレドニゾロン投与例では365例（CHB既往の6例を含む）中、13例にCHBが発症、ステロイド非投与例では334例（CHB既往の5例を含む）中、37例にCHBが発症していた。

表：母体へのステロイド投与が児の発育に及ぼす影響を見るために、それぞれの群でCHBを発症せず、かつ出生時体重の明らかな症例の在胎期間別出生時体重基準値（性別・初経別も考慮した）からの標準偏差（SD）を比較したところ、フッ化ステロイド剤投与群でやや低い傾向にあった。

厚生労働科学研究費補助金 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業
「自己抗体陽性女性の妊娠管理指針の作成及び
新生児ループスの発症リスクの軽減に関する研究」研究班

【手引き編集者名簿】

国立成育医療研究センター母性医療診療部 村島温子
九州大学病院総合周産期母子医療センター 福嶋恒太郎
九州大学病院産科婦人科 穴見 愛
筑波大学医学医療系小児内科学 堀米仁志
久留米大学医学部小児科学 前野泰樹
筑波大学医学医療系社会健康医学 山岸良匡
筑波大学医学医療系内科 坪井洋人
聖路加国際病院アレルギー膠原病内科 岸本暢将

【研究班名簿】

研究代表者 国立成育医療研究センター母性医療診療部 村島温子
研究分担者 順天堂大学医学部膠原病内科 高崎芳成
筑波大学医学医療系内科 住田孝之
九州大学環境発達医学研究センター研究推進部門ゲノム疫学分野 和氣徳夫
大阪府立母子保健総合医療センター検査科 中山雅弘
大阪府立母子保健総合医療センター母性内科 和栗雅子
筑波大学医学医療系小児内科学 堀米仁志
久留米大学医学部小児科学 前野泰樹
筑波大学医学医療系社会健康医学 山岸良匡
聖路加国際病院アレルギー膠原病内科 岸本暢将
国立成育医療研究センター周産期センター 左合治彦
国立成育医療研究センター母性医療診療部膠原病・一般内科 山口晃史
研究協力者 順天堂大学医学部膠原病内科 松平 蘭
筑波大学医学医療系内科 坪井洋人
九州大学病院総合周産期母子医療センター 福嶋恒太郎
九州大学病院産科婦人科 穴見 愛
大阪府立母子保健総合医療センター検査科 宮野 章
大阪府立母子保健総合医療センター母性内科 中西 功
国立成育医療研究センター周産期センター胎児診療科 杉林里佳
統計数理研究所データ科学研究系計量科学グループ 野間久史
東京大学先端科学技術研究センター 鎌倉洋樹
事務担当者 国立成育医療研究センター母性医療診療部 高貝マリコ

抗 SS-A 抗体陽性女性の妊娠に関する診療の手引き

平成 25 年 3 月 発行

編集責任者 村島温子

編 集 厚生労働科学研究費補助金 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業

「自己抗体陽性女性の妊娠管理指針の作成及び

新生児ループスの発症リスクの軽減に関する研究」研究班

研究班事務局 国立成育医療研究センター母性医療診療部

〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

TEL : 03-3416-0181 FAX : 03-5494-7406

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, Higasa K, Takahashi A, Horita T, Atsumi T, Ishii T, Okamoto A, Fujio K, Hirakata M, Amano H, Kondo Y, Ito S, Takada K, Mimori A, Saito K, Kamachi M, Kawaguchi Y, Ikari K, Mohammed OW, Matsuda K, Terao C, Ohmura K, Myouzen K, Hosono N, Tsunoda T, Nishimoto N, Mimori T, Matsuda F, Tanaka Y, <u>Sumida T</u> , Yamanaka H, <u>Takasaki Y</u> , Koike T, Horiuchi T, Hayashi K, Kubo M, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K.	A genome-wide association study identified AFF1 as a susceptibility locus for systemic lupus erythematosus in Japanese.	PLoS Genet.	8(1)	e100245 5	2012
Iizuka M, <u>Tsuboi H</u> , Matsuo N, Kondo Y, Asashima H, Matsui M, Matsumoto I, <u>Sumida T</u> .	The crucial roles of IFN- γ in the development of M3 muscarinic acetylcholine receptor induced Sjögren's syndrome-like sialadenitis.	Mod Rheumatol.		Epub ahead of print	2012
<u>Anami A</u> , <u>Fukushima K</u> , <u>Takasaki Y</u> , <u>Sumida T</u> , <u>Waguri M</u> , <u>Wake N</u> , <u>Murashima A</u> .	The predictive value of anti-SS-A antibodies titration in pregnant women with fetal congenital heart block.	Mod Rheumatol.		Epub ahead of print	2012
Mitchell JL, Cuneo BF, Etheridge SP, <u>Horigome H</u> , Weng HY, Benson DW.	Fetal heart rate predictors of long QT syndrome.	Circulation	126	2688- 2695	2012
<u>Kato Y</u> , <u>Takahashi-Igari M</u> , Inaba T, Sumazaki R, <u>Horigome H</u> .	Comparison of PR intervals determined by fetal magnetocardiography and pulsed Doppler echocardiography.	Fetal Diagn Ther.	32	109-115	2012
Miyoshi T, <u>Maeno Y</u> , <u>Sago H</u> , Inamura N, Yasukohchi S, Kawataki M, <u>Horigome H</u> , Yoda H, Taketazu M, Shozu M, Nii M, Kato H, Hayashi S, Hagiwara A, Omoto A, Shimizu W, Shiraishi I, Sakaguchi H, Nishimura K, Ueda K, Katsuragi S, Ikeda T.	Evaluation of transplacental treatment for fetal congenital bradyarrhythmia: - nationwide survey in Japan -.	Circulation Journal	76	469-476.	2012

Matsudaira R, Tamura N, Sekiya F, Ogasawara M, Yamanaka K, <u>Takasaki Y</u>	Anti-Ro/SSA Antibodies Are an Independent Factor Associated with an Insufficient Response to Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis.	J Rheumatol	38	2346-2354	2011
<u>Tsuboi, H.</u> , Wakamatsu, E., Iizuka, M., Nakamura, Y., Sugihara, M., Suzuki, T., Ogishima, H., Hayashi, T., Goto, D., Ito, S., Matsumoto, I., and <u>Sumida, T.</u>	Importnace of serine727 phosphorylated STAT1 in IFN γ -induced signaling and apoptosis of human salivary gland cells.	Int. J. Rheum. Dis.	14	86-91	2011
Ohata Y, Arahori H, Namba N, Kitaoka T, Hirai H, Wada K, <u>Nakayama M</u> , Michigami T, Imura A, Nabeshima Y, Yamazaki Y, Ozono K.	Circulating Levels of Soluble α -Klotho Are Markedly Elevated in Human Umbilical Cord Blood	J Clin Endocrinol Metab	96	E943-E947	2011
Yoshinaga M, Kato Y, Nomura Y, Hazek Di, Yasuda T, Takahashi K, Higaki T, Tanaka Y, Wada A, <u>Horigome H</u> , Takahashi H, Ueno K, Suzuki H, Nagashima M	The QT Intervals in Infancy and Time for Infantile ECG Screening for Long QT Syndrome	Journal of Arrhythmia	27	193-201	2011
村島温子	抗SS-A抗体・抗SS-B抗体陽性者の妊娠リスク	リウマチ科	47	617-621	2012
宮野 章、中山雅弘 新井次郎、山口晃史 村島温子	酵素免疫測定法による抗SS-A/B抗体標準化の検討	臨床リウマチ	24	247-259	2012
穴見 愛、福嶋恒太郎 湯元康夫、和気徳夫	新生児ループス(心ブロック)を発症した抗SS-A抗体陽性妊婦の検討	産婦人科の実際	60	929-939	2011
宮野 章、中山雅弘	妊婦における抗SS-A60- k Da avidity抗体に関する研究	臨床病理	59	219-225	2011
前野泰樹	胎児不整脈の診断と治療	周産期医学	41	59-64	2011
鎌倉洋樹、山岸良匡 村島温子	抗SS-A抗体陽性女性の妊娠症例の把握	日本医事新報	4491	62-64	2010

V. 研究成果の刊行物・別刷

A Genome-Wide Association Study Identified *AFF1* as a Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus in Japanese

Yukinori Okada^{1,2,3,9}, Kenichi Shimane^{1,2,9}, Yuta Kochi^{1,2,9*}, Tomoko Tahira⁴, Akari Suzuki¹, Koichiro Higasa³, Atsushi Takahashi³, Tetsuya Horita⁵, Tatsuya Atsumi⁵, Tomonori Ishii⁶, Akiko Okamoto², Keishi Fujio², Michito Hirakata⁷, Hirofumi Amano⁸, Yuya Kondo⁹, Satoshi Ito⁹, Kazuki Takada¹⁰, Akio Mimori¹¹, Kazuyoshi Saito¹², Makoto Kamachi¹³, Yasushi Kawaguchi¹⁴, Katsunori Ikari¹⁴, Osman Wael Mohammed¹⁵, Koichi Matsuda¹⁵, Chikashi Terao^{16,17}, Koichiro Ohmura¹⁶, Keiko Myouzen¹, Naoya Hosono¹⁸, Tatsuhiko Tsunoda¹⁹, Norihiro Nishimoto²⁰, Tsuneyo Mimori¹⁶, Fumihiko Matsuda¹⁷, Yoshiya Tanaka¹², Takayuki Sumida⁹, Hisashi Yamanaka¹⁴, Yoshinari Takasaki⁸, Takao Koike⁵, Takahiko Horiuchi²¹, Kenshi Hayashi⁴, Michiaki Kubo¹⁸, Naoyuki Kamatani³, Ryo Yamada^{1,17}, Yusuke Nakamura¹⁵, Kazuhiko Yamamoto^{1,2}

1 Laboratory for Autoimmune Diseases, Center for Genomic Medicine (CGM), RIKEN, Yokohama, Japan, **2** Department of Allergy and Rheumatology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan, **3** Laboratory for Statistical Analysis, CGM, RIKEN, Yokohama, Japan, **4** Division of Genome Analysis, Research Center for Genetic Information, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan, **5** Department of Medicine II, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Sapporo, Japan, **6** Department of Hematology and Rheumatology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan, **7** Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan, **8** Department of Internal Medicine and Rheumatology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan, **9** Division of Clinical Immunology, Doctoral Program in Clinical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Science, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan, **10** Departments of Medicine and Rheumatology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan, **11** Division of Rheumatic Diseases, National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan, **12** First Department of Internal Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu, Japan, **13** Department of Immunology and Rheumatology, Unit of Translational Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki, Japan, **14** Institute of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan, **15** Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Tokyo, Japan, **16** Department of Rheumatology and Clinical immunology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan, **17** Center for Genomic Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan, **18** Laboratory for Genotyping Development, CGM, RIKEN, Yokohama, Japan, **19** Laboratory for Medical Informatics, CGM, RIKEN, Yokohama, Japan, **20** Laboratory of Immune Regulation, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan, **21** Department of Medicine and Biosystemic Science, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that causes multiple organ damage. Although recent genome-wide association studies (GWAS) have contributed to discovery of SLE susceptibility genes, few studies have been performed in Asian populations. Here, we report a GWAS for SLE examining 891 SLE cases and 3,384 controls and multi-stage replication studies examining 1,387 SLE cases and 28,564 controls in Japanese subjects. Considering that expression quantitative trait loci (eQTLs) have been implicated in genetic risks for autoimmune diseases, we integrated an eQTL study into the results of the GWAS. We observed enrichments of cis-eQTL positive loci among the known SLE susceptibility loci (30.8%) compared to the genome-wide SNPs (6.9%). In addition, we identified a novel association of a variant in the AF4/FMR2 family, member 1 (*AFF1*) gene at 4q21 with SLE susceptibility (rs340630; $P = 8.3 \times 10^{-9}$, odds ratio = 1.21). The risk A allele of rs340630 demonstrated a cis-eQTL effect on the *AFF1* transcript with enhanced expression levels ($P < 0.05$). As *AFF1* transcripts were prominently expressed in CD4⁺ and CD19⁺ peripheral blood lymphocytes, up-regulation of *AFF1* may cause the abnormality in these lymphocytes, leading to disease onset.

Citation: Okada Y, Shimane K, Kochi Y, Tahira T, Suzuki A, et al. (2012) A Genome-Wide Association Study Identified *AFF1* as a Susceptibility Locus for Systemic Lupus Erythematosus in Japanese. *PLoS Genet* 8(1): e1002455. doi:10.1371/journal.pgen.1002455

Editor: Mark I. McCarthy, University of Oxford, United Kingdom

Received: May 16, 2011; **Accepted:** November 18, 2011; **Published:** January 26, 2012

Copyright: © 2012 Okada et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by a grant from the CGM, RIKEN, and a grant from the autoimmune disease study group of Research in Intractable Diseases, Japanese Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ykochi@src.riken.jp

† These authors contributed equally to this work.

Author Summary

Although recent genome-wide association study (GWAS) approaches have successfully contributed to disease gene discovery, many susceptibility loci are known to be still uncaptured due to strict significance threshold for multiple hypothesis testing. Therefore, prioritization of GWAS results by incorporating additional information is recommended. Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease that causes multiple organ damage. Considering that abnormalities in B cell activity play essential roles in SLE, prioritization based on an expression quantitative trait loci (eQTLs) study for B cells would be a promising approach. In this study, we report a GWAS and multi-stage replication studies for SLE examining 2,278 SLE cases and 31,948 controls in Japanese subjects. We integrated eQTL study into the results of the GWAS and identified *AFF1* as a novel SLE susceptibility loci. We also confirmed cis-regulatory effect of the locus on the *AFF1* transcript. Our study would be one of the initial successes for detecting novel genetic locus using the eQTL study, and it should contribute to our understanding of the genetic loci being uncaptured by standard GWAS approaches.

Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by autoantibody production, complement activation, and multi-organ damage [1]. Familial aggregation demonstrates that both genetic and environmental factors play a role in pathogenesis of SLE [2]. Genetic studies using candidate gene-approaches, and recently, genome-wide association studies (GWAS), have uncovered more than 25 SLE susceptibility genes, including *HLA-DRB1*, *IRF5*, *STAT4*, *ITGAM*, *BLK*, *TNFAIP3*, and others [3–18]. However, most of these studies were conducted in European populations [3–13,15,17], and few studies have been conducted in Asian populations [14,16,18]. Since the epidemiology of SLE has demonstrated that the prevalence of disease substantially differs among populations, genetic backgrounds of SLE should be also heterogeneous across populations [19,20]. Therefore, additional studies in Asians might provide novel insights. It is of note that GWAS for SLE in Chinese populations identified novel loci that had not been detected in Europeans, such as *ETS1*, *IKZF1*, and *WDFY1* [14,16].

Another issue raised by the previous GWASs for complex diseases is that many susceptibility loci still remained uncaptured, owing to its strict significance threshold for multiple hypothesis testing [21]. In SLE, for example, the 26 risk loci identified by the previous GWAS explained only an estimated 8% of the total genetic susceptibility to the disease [15]. Therefore, it is still important to examine the sub-loci of GWAS, in order to reveal the entire picture of genetic etiology. To effectively explore these uncaptured loci, prioritization of GWAS results by incorporating additional information implicated in the disease pathophysiology is recommended [22,23]. Considering that abnormalities in B cell activity play essential roles in SLE [1] and that expression quantitative trait loci (eQTL) have been implicated to comprise approximately a half of genetic risks for autoimmune diseases [24], prioritization based on an eQTL study for B cells would be a promising approach for SLE [25]. Moreover, an eQTL, itself assures the presence of functional variant(s) that regulate gene expression. Thus, eQTL increases the prior probability of the presence of disease-causal variant(s) in the locus more effectively

and unbiasedly, compared to other knowledge-based prioritizations such as gene pathway analysis [24].

Here, we report a GWAS and multi-stage replication studies for SLE examining 2,278 SLE cases and 31,948 controls in Japanese subjects. We integrated eQTL study into the results of the GWAS, which effectively enabled to detect a novel SLE susceptibility locus.

Results

GWAS for SLE

In the GWAS, 891 SLE cases and 3,384 controls in Japanese subjects were genotyped over 550,000 single nucleotide polymorphism (SNP) markers (Table S1, S2 and Figure 1). We applied stringent quality control (QC) criteria and evaluated associations of 430,797 autosomal SNPs, as previously described [26]. No substantial population stratification was demonstrated through principal component analysis (Figure S1) or a Quantile-Quantile plot of *P*-values (inflation factor, $\lambda_{GC} = 1.088$, Figure S2), suggesting homogenous ancestries of our study population [27].

We identified significant associations in six chromosomal loci that satisfied the genome-wide significance threshold of $P < 5.0 \times 10^{-8}$ (Table 1 and Figure 2A). These loci have been reported to be associated with SLE susceptibility (*STAT4*, *TNFAIP3*, *HIP1*, *BLK*, *ETS1*, and the HLA region) [3–18]. We also observed significant replications in 17 of the previously reported SLE susceptibility loci [3–18] ($\alpha = 0.01$; Table 2). Of these, significant replications were enriched in the loci identified through the studies in Asian populations (80%; 8 of the 10 loci), including *RASGRP3*, *IKZF1*, *HIP1*, *WDFY1*, intergenic region at 11q23, *ETS1*, *SLC15A1*, *ELF1*, and *HIC2-UBE2L3* [14,16,18], compared to those in European populations (56.3%; 9 of the 16 loci) [3–13,15,17].

Incorporation of eQTL study into GWAS results

For the selection of SNPs incorporated in the replication studies of the potential association signals, we evaluated cis-eQTL effects of the SNPs using publically available gene expression data [28], and prioritized the results of the GWAS. After applying QC criteria, we evaluated the expression levels of 19,047 probes assayed in lymphoblastoid B cell lines from Phase II HapMap East-Asian individuals [29] using Illumina's human whole-genome expression array (WG-6 version 1) [28]. For each of the SNPs included in our GWAS, probes located within ± 300 kbp regions were focused on as cis-eQTLs (average 4.93 probes per SNP). We denoted the SNPs which exhibited significant associations with expression levels of any of the corresponding cis-eQTLs as eQTL positive (false discovery rate (FDR) *Q*-values < 0.2). We observed enrichments of eQTL positive loci among the SLE susceptibility loci (30.8%; 8 of the 26 evaluated loci) including a well-known eQTL gene of *BLK* [11,25] (Table 2), compared to the genome-wide SNPs (6.9%) and compared even to the SNPs in the vicinity of expressed loci (among the SNPs located within ± 10 kbp of probes used for the expression analysis, 13.1% were eQTL positive; Table S3).

By prioritizing the results of the GWAS using the eQTL study, we selected 57 SNPs from 1,207 SNPs that satisfied $P < 1.0 \times 10^{-3}$ in the GWAS. We subsequently referred the associations of the selected SNPs using the results of the concurrent genome-wide scan for SLE in an independent Japanese population (Tahira T et al. Presented at the 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, October 21, 2009). In the scan, 447 SLE cases and 680 controls of Japanese origin were evaluated using a pooled DNA approach [30]. We selected SNPs if any association signals were observed in the neighboring SNPs of the

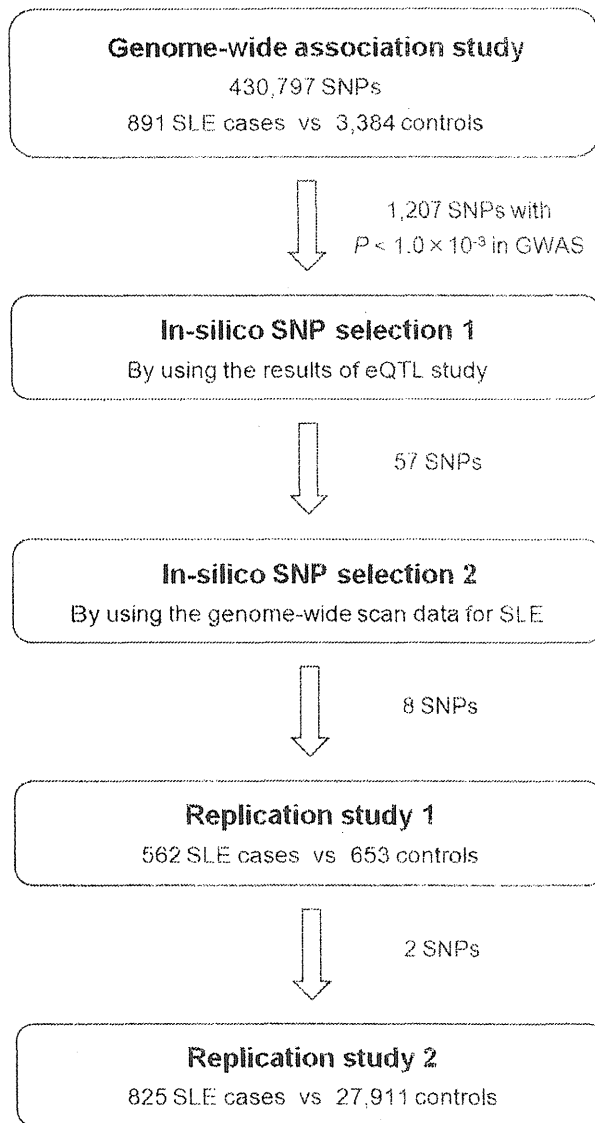


Figure 1. Design of the GWAS and multi-stage replication studies for SLE in Japanese subjects. A total of 2,278 SLE cases and 31,948 controls were enrolled. The clinical characteristics of the subjects are summarized in Table S1 and S2. Details of the genome-wide scan data for SLE referenced in the *in silico* SNP selection 2 are described elsewhere (Tahira T et al. Presented at the 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, October 21, 2009). doi:10.1371/journal.pgen.1002455.g001

pooled analysis. As a result, 8 SNPs remained for further investigation (Table S4).

Replication studies and identification of *AFF1*

Then, we performed two-stage replication studies using independent SLE cohorts for Japanese subjects (cohort 1 with 562 SLE cases and 653 controls, and cohort 2 with 825 SLE cases and 27,911 controls). First, we evaluated the selected 8 SNPs in the replication study 1. In the replication study 2, 2 SNPs that satisfied $P < 1.0 \times 10^{-4}$ in the combined study of GWAS and replication

study 1 were further evaluated (Figure 1). Among the evaluated SNPs, we observed significant replications in the SNP located in the genomic region of the *AFF1*/*FMR2* family, member 1 gene (*AFF1*) at 4q21 (rs340630; $P = 4.6 \times 10^{-3}$ and $P = 0.0094$ in the two individual cohorts, respectively; Table 3, Table S5, and Figure 2B). The combined study for the GWAS ($P = 1.5 \times 10^{-4}$) and the replication studies demonstrated significant associations of rs340630 that satisfied the genome-wide significance threshold ($P = 8.3 \times 10^{-9}$, OR = 1.21, 95% CI 1.14–2.30).

Cis-eQTL effect of rs340630 on *AFF1* transcripts

Since the landmark SNP in the *AFF1* locus, rs340630, was prioritized through the eQTL study as an eQTL positive SNP (Table 3), we further validated its cis-eQTL effect using Epstein-Barr virus (EBV)-transfected B cell lines established from Japanese individuals (Pharma SNP Consortium (PSC) cells, $n = 62$). The correlation between rs340630 genotypes and the expression levels of *AFF1* was significant in the PSC cells stimulated with phorbol myristate acetate (PMA) ($r^2 = 0.074$, $P = 0.033$; Figure 3A). The expression levels increased with the number of SLE-risk (A) alleles. To further confirm this cis-regulatory effect, we performed allele-specific transcript quantification (ASTQ) of *AFF1*. The transcript levels of each allele were quantified by qPCR using an allele specific probe for a SNP in the 5'-untranslated region (rs340638), which was in absolute LD with rs340630 ($r^2 = 1.0$, $D' = 1.0$). We examined PSC-cells ($n = 17$) that were heterozygous for both rs340630 and rs340638. The mean ratio of each transcript (A over G allele; the A allele comprises a haplotype with the risk (A) allele of rs340630) were significantly increased to 1.07 compared to the ratio of the amount of DNA (1.00, $P = 0.012$) (Figure 3B). These results suggest that rs340630, or SNP(s) in LD with it, are a regulatory variant predisposing SLE susceptibility through increased expression levels of *AFF1*.

Expression of *AFF1* in CD4⁺ and CD19⁺ peripheral blood lymphocytes

AFF1 is known to be involved in cytogenetic translocations of acute lymphoblastic leukemia (ALL) [31]. Its fusion protein with the mixed-lineage leukemia gene (*MLL*) is implicated in the regulation of transcription and the cell cycle of lymphocytes [31]. To investigate the expression pattern of *AFF1* in normal tissues, we evaluated the transcript levels of *AFF1* in a panel of various tissues. We observed prominent expression of *AFF1* in CD4⁺ and CD19⁺ peripheral blood lymphocytes, implying an important role for *AFF1* in helper-T-cells and B-cells (Figure 3C).

Discussion

Through a GWAS and multi-staged replication studies consisting of 2,278 SLE cases and 31,948 controls in Japanese subjects, our study identified that the *AFF1* locus was significantly associated with SLE susceptibility.

As well as the identification of the novel SLE susceptibility locus, we observed significant replications of associations in the previously reported susceptibility loci. The replications were especially enriched in the loci identified through the studies in Asian populations, compared to those in European populations. Considering the ethnical heterogeneities in the epidemiology of SLE [19,20], these observations suggest the similarities in the genetic backgrounds of SLE shared within Asian populations, and also the existence of the both common and divergent genetic backgrounds encompassed between European and Asian populations.

Table 1. Results of a genome-wide association study for Japanese patients with SLE.

rsID ^a	Chr	Position (bp)	Cytoband	Gene	Allele ^b	No. subjects		Allele 1 freq.		OR (95%CI)	P
						Case	Control	Case	Control		
rs10168266	2	191,644,049	2q32	<i>STAT4</i>	T/C	891	3,384	0.37	0.27	1.59 (1.42–1.78)	2.7×10^{-16}
rs9501626	6	32,508,322	6p21	HLA region	A/C	891	3,381	0.20	0.12	1.86 (1.62–2.13)	1.0×10^{-18}
rs2230926	6	138,237,759	6q23	<i>TNFAIP3</i>	G/T	891	3,377	0.11	0.069	1.75 (1.47–2.08)	1.9×10^{-10}
rs6964720	7	75,018,280	7q11	<i>HIP1</i>	G/A	891	3,384	0.25	0.19	1.43 (1.27–1.63)	1.3×10^{-8}
rs2254546	8	11,381,089	8p23	<i>BLK</i>	G/A	891	3,384	0.78	0.72	1.42 (1.61–1.25)	4.1×10^{-8}
rs6590330	11	127,816,269	11q24	<i>ETS1</i>	A/G	891	3,368	0.48	0.39	1.44 (1.30–1.60)	1.3×10^{-11}

^aSNPs that satisfied the threshold of $P < 5.0 \times 10^{-8}$ were indicated.

^bBased on forward strand of NCBI Build 36.3.

SLE, systemic lupus erythematosus; OR, odds ratio.

doi:10.1371/journal.pgen.1002455.t001

To effectively detect the novel SLE susceptibility locus, we integrated cis-eQTL effects of the SNPs and prioritized the results of the GWAS. In addition to identifying a novel locus for SLE-susceptibility, our study demonstrated approximately 30% of confirmed SLE-susceptibility loci were comprised of cis-eQTLs. We also confirmed cis-regulatory effect of the landmark SNP in the *AFF1* locus, rs340630, on *AFF1* transcripts, which had been prioritized through the eQTL study. These results would suggest that accumulation of quantitative changes in gene expression would accelerate the disease onset of SLE. It would also demonstrate the validity of applying eQTL study in the search of the susceptible genes for SLE or other autoimmune diseases, as previously suggested in the study for celiac disease [24]. To our knowledge, this is one of the initial studies to successfully discover a new locus by prioritizing GWAS results using eQTLs, and should contribute to the approaches assessing genetic loci still being uncaptured by recent large-scaled GWASs due to stringent significance threshold for multiple hypothesis testing [21].

We observed prominent expression levels of *AFF1* in CD4⁺ and CD19⁺ peripheral blood lymphocytes, which would imply an important role for *AFF1* in helper-T-cells and B-cells. In fact, *AFF1* is essential for normal lymphocyte development, as demonstrated in mice deficient for *AFF1*; severe reduction were observed in the thymic double positive CD4/CD8 population and the bone marrow pre-B and mature B-cell numbers [32]. The risk A allele of rs340630 demonstrated a cis-eQTL effect on the *AFF1* transcript with enhanced expression levels. As the *AFF1* locus was also demonstrated as an eQTL in primary liver cells [33], the cis-regulatory effect may hold in primary cells as well as lymphoblastoid cells used in the present study. However, because the mechanism of transcriptional regulation is substantially different among cell types [34], cell-type specific analyses including those for primary T-cells and B-cells are needed for understanding the precise role of *AFF1* variant in primary lymphocytes. Although further functional investigation is necessary, our observation suggested that *AFF1* is involved in the etiology of SLE through the regulation of development and activity of lymphocytes. It is of note that *AFF3*, which also belongs to the AF4/FMR2 family, is associated with susceptibility to autoimmune diseases [35].

One of our study's limitations is the selection of SNPs for the replication study using the results of the pooled DNA approach [30], which used a different genotyping platform from that of the present GWAS. Moreover, the association signals based on Silhouette scores in pooled analysis would be less reliable compared to those based on individual genotyping. Since direct comparisons of the association signals of the same single SNPs

between the studies would be difficult due to these issues, we adopted the complementary approach that referred the association signals of the multiple SNPs in the pooled analysis for each of the single SNPs in the GWAS, taking account of LD and physical distances between the SNPs. However, there would exist a possibility that the variant(s) truly associated with SLE was left not to be examined in the replication study. It should be noted that only 1 SNP among the 8 selected SNPs yielded the significant association with SLE, although further enrichments of the significant associations might be anticipated. To elucidate effectiveness and limitation of our approach, further assessments of the studies on the remaining loci would be desirable. It should also be noted that the control-case ratio of the subjects were relatively high in the replication study 2 ($= 33.8$), and this disproportionate ratio could have induced potential bias on the results of the association analysis of the SNPs. However, considering the homogeneous ancestries of the Japanese population [27] and that principal component analysis did not demonstrate significant population stratification in the control subjects of the replication study 2 (data not shown), the bias owing to population stratification might not be substantial.

In summary, through a GWAS and multi-staged replication studies in a Japanese population integrating eQTL study, our study identified *AFF1* as a novel susceptibility locus for SLE.

Materials and Methods

Subjects

We enrolled 2,278 systemic lupus erythematosus (SLE) cases and 31,948 controls. SLE cases enrolled in the genome-wide association study (GWAS) ($n = 891$) or part of the 2nd replication study ($n = 83$) were collected from 12 medical institutes in Japan under the support of the autoimmune disease study group of Research in Intractable Diseases, Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare: Hokkaido University Graduate School of Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, the University of Tokyo, Keio University School of Medicine, Juntendo University School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, University of Tsukuba, Tokyo Medical and Dental University, National Center for Global Health and Medicine, Nagasaki University, Wakayama Medical University, and Jichi Medical University. SLE cases ($n = 562$) and controls ($n = 653$) enrolled in the 1st replication study were collected from Kyushu University. Some of the SLE cases ($n = 742$) and controls ($n = 27,911$) enrolled in the 2nd replication study were collected from Kyoto University, Tokyo Women's