

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

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

研究代表者 桃原 茂樹 東京女子医科大学医学部 教授

研究要旨：国内患者数が最多（約 80 万人）の自己免疫疾患である関節リウマチ（RA）をモデルケースに、common disease を対象とした大規模な疾患感受性遺伝子多型同定を創薬基盤整備に結びつけることが本研究の最大の目的である。まず国内の主要な RA 関連遺伝子研究機関を結集し、20,000 人を超えるサンプルに対してゲノムワイド関連解析（GWAS）を行ってメタ解析を実施し、さらに 25,000 人以上のサンプルを用いて追認解析を行った結果、9 つの新規疾患感受性遺伝子領域をはじめとして日本人における RA 感受性遺伝子多型（common allele）を包括的に同定した（Nature Genetics 2012）。さらにこの解析の枠組みを国際共同研究に拡張し、日本人を含むアジア人集団および欧米人集団で構成された 10 万人以上のサンプルに対する GWAS メタ解析を実施し、42 の新規領域を含む、101 の疾患感受性遺伝子領域を同定した（Nature 2014）。さらに、得られた疾患感受性遺伝子情報を多様な生物学的データベース（SNP の機能分類、遺伝子発現量解析、ヒストン修飾機構、メンデル型遺伝病、悪性腫瘍体細胞変異、ノックアウトマウス形質、PubMed 論文データテキストマイニング、蛋白質間相互作用、パスウェイ解析）と統合するビッグデータ解析を通じて、関節リウマチの新たな病態を明らかにした。また、創薬データベース上に登録された既存もしくは臨床試験中のヒト疾患治療薬のターゲット遺伝子と疾患感受性遺伝子とのつながりを、蛋白-蛋白相互作用を考慮したネットワーク解析に基づき評価し新規治療薬候補を探す、新しいゲノム創薬手法を開発し、新規治療薬候補を同定した（CDK4/6 阻害薬；Nature 2014）。本研究の成果は、大規模ゲノム解析を通じて疾患病態の解明や新規創薬に貢献できる可能性を切り拓いたものであり、創薬基盤整備に大きく寄与するものと考えられる。

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

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

研究分担者：山田 亮
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授

研究分担者：山中 寿
東京女子医科大学医学部 教授

研究分担者：三森 経世
京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学 教授

研究協力者：岡田 随象
理化学研究所ゲノム医科学研究センター
客員研究員

研究協力者：高地 雄太
理化学研究所ゲノム医科学研究センター

研究協力者：明前 敬子
理化学研究所ゲノム医科学研究センター

研究協力者：寺尾 知可史
京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター

研究協力者：大村 浩一郎
京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学

研究協力者：猪狩 勝則
東京女子医科大学医学部

A. 研究目的

関節リウマチ（RA）は国内患者数が最多（約 80 万人）の自己免疫疾患であり、社会的逸失利益の大きい疾患である。病因として喫煙などの環境因子に加え、ゲノム網羅的関連解析（GWAS）により多くの遺伝因子が明らかになったが、少なからず人種差が存在している。また病状や薬物反応性には大きな個人差が認められるが、遺伝因子の違いが背景にあると考えられている。本研究課題の目的は RA をモデルケースとして common disease の創薬基盤整備を実現化させることである。この目的のために国内の主要な RA 関連遺伝子研究機関を結集し特色ある研究組織を構成した。まず、それぞれの研究機関で RA の疾患感受性をターゲットとした GWAS を既に研究開始時点で済みであり、RA の遺伝子解析に関して十分なノウハウの蓄積が得られていた。さらに統計遺伝学専門家が参加することで高次元な数学処理を必要とする解析も可能となった。RA 患者 5 千名の 10 年を超える臨床データが蓄積された大規模コホート（IORRA）を有しており、遺伝子多型について様々な側面から詳細な検証が可能となった。

さらに国内で実施した GWAS メタ解析

の枠組みを世界規模に拡張して国際共同研究を実施した。これらの国内、国際共同研究によって同定された疾患感受性領域の情報をを用いたビッグデータ解析を通じて、関節リウマチの疾患病態の解明や common disease の創薬基盤整備を目指すことが本研究の最大の目的である。

同時に主要な自己抗体の陰性・陽性患者別の遺伝背景の解明のほか、エクソーム塩基配列解析により rare variant の評価も行う。これらの解析を介して、特定の病態に標的を絞った創薬シーズが得られることも期待できる。

B. 研究方法

本研究班を主体として GARNET コンソーシアム（Genetics and Allied research in Rheumatic diseases Networking consortium）を結成した。まず各機関で行った GWAS データ（discovery set：患者計 4074 名、対照計 16891 名）を HapMap Phase II を参照として遺伝子型の推定を行い、GWAS メタ解析を実施した（担当：山田、山本）。ゲノムワイド水準をクリアした SNP も含め、上位の SNP について TaqMan 法を用いて追認解析（replication set：患者計 5,277 名、対照計 21,684 名）を行い、日本人における疾患感受性遺伝子多型を包括的に同定した（担当：桃原、山本、松田、三森）。

さらに GARNET コンソーシアムに加え、米国ハーバード大学を中心とした国際共同研究を実施し、アジア人集団および欧米人集団で構成された 10 万人以上のサンプルを対象とした GWAS メタ解析を実施した。各コホートより得られた一塩基多型（SNP）ジェノタイプデータに対して 1000 Genomes Project 参照ゲノム配列に基づく遺伝子型の推定を行い、X 染色体を含む全ゲノム領域を網羅する 1,000 万 SNP における関節リウマチ罹患リスクとの因果関係を評価した（担当：山本、松田、桃原、山田）。

RA の疾患感受性遺伝子領域と多様な生

物学的データベース (SNP の機能分類、遺伝子発現量解析、ヒストン修飾機構、メンデル型遺伝病、悪性腫瘍体細胞変異、ノックアウトマウス形質、PubMed 論文データテキストマイニング、蛋白質間相互作用、パスウェイ解析) との網羅的な照合を実施した。また、創薬データベース上に登録された既存もしくは臨床治験中のヒト疾患治療薬のターゲット遺伝子と疾患感受性遺伝子とのつながりを、蛋白-蛋白相互作用を考慮したネットワーク解析に基づき評価し新規治療薬候補を探す、新しいゲノム創薬手法の開発を目指した。

その他、次世代シーケンサーを用いた rare variant 解析 (担当 山本、松田)、長期観察コホートを用いた骨折リスク遺伝子の解析 (担当 桃原、山中)、RA における重要なサブタイプである抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索 (担当 三森)、疾患関連遺伝子の同定と臨床展開のための数理統計学的手法に関する研究 (担当 山田) を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、各研究者の所属する機関内倫理審査委員会における審査を適切に行った上で実施された。DNA 試料の採取や臨床情報の取得は、インフォームドコンセントに基づき行われた。

C. 研究結果

まず、これまで独立して RA 関連遺伝子に関する GWAS を行ってきた国内の主要研究機関 (理化学研究所、京都大学、東京女子医科大学) で行った GWAS のメタ解析の結果、7 領域でゲノムワイド水準をクリアした (HLA-DRB1、CCR6、NFKB1E、TNFAIP3、ARID5B、PTPN2、PADI4)。

次いで、 $P < 5.0 \times 10^{-4}$ を示した領域のうち既知の疾患感受性領域を除く 47 遺伝子領域について、TaqMan 法を用いて追認解析 (replication set: 患者計 5,277 名、対照計 21,684 名) を行い、最終的に 9 つの RA の新規疾患感受性遺伝

子 (*B3GNT2*, *ANXA3*, *CSF2*, *CD83*, *NFKB1E*, *ARID5B*, *PDE2A-ARAP1*, *PLD4*, *PTPN2*) を含む 23 遺伝子領域で疾患感受性との関連を確認し、日本人における比較的頻度の高い疾患感受性遺伝子多型 (common allele) を包括的に同定した。公開されていた欧米人による GWAS メタ解析データを参照したところ、このうち少なくとも 15 領域で欧米人と疾患感受性領域を共有することを確認した。また日本人 RA で関連を認めた 23 遺伝子領域について全身性エリテマトーデス患者 891 例、バセドウ病患者 1,783 例を用い疾患感受性との関連を検討したところ、*ANXA3* 遺伝子領域が全身性エリテマトーデスと、*B3GNT2* と *ARID5B* がバセドウ病と関連していることも確認した (Nature Genetics 2012)。

多くの疾患感受性領域を欧米人と共有していることが示唆されたことで、同様の枠組みを用いて 10 万人規模の国際共同研究による GWAS メタ解析を行った。その結果、42 の新規領域を含む、101 個の関節リウマチ感受性遺伝子領域を同定した (SNP P 値 $< 5.0 \times 10^{-8}$ 、表 1)。感受性遺伝子領域内の SNP のリスクは人種間で正の相関関係を示し、欧米人およびアジア人の間で関節リウマチの遺伝的背景が共通していることがあらためて示唆された (Nature 2014)。

表 1 : 101 個の関節リウマチ感受性遺伝子領域の一覧

TNFRSF14-MMEL1	DNASE1L3-ABHD6-PXK	GRHL2	PLD4-AHNAK2
TNFRSF9	IL20RB	PVT1	RASGRP1
PADI4	CLNK	TRAF1-C5	LOC145837
MTF1-INPP5B	C4orf52	IL2RA	TXNDC11
LOC339442	TEC	PRKCC	IRF8
PTPN22	ANKA3	GATA3	C10BP
CD2	IL2-IL21	Top14	MED1
IL6R	ANKRD55	ZNF438	IKZF3-CSF3
FCRL3	C5orf30	WDFY4	PTPN2
LY9-CD244	IL3-CSF2	ARID5B	CD226
FCGR2A	IRF4	RTKN2	TYK2
FCGR2B	CD83	SFTPD	ILF3
LOC100506023	HLA-DRB1	TRAF6-RAG1/2	CD40
PTPRC	ETV7	CD5	IFNGR2
LBH	NFKBIE	FADS1-FADS2-FADS3	RCAN1
REL	ATG5	ARAP1	RUNX1-LOC100506403
B3GNT2	TNFAIP3	CEP57	UBASH3A
SPRED2	PP1L4	ATM	ICOSLG-AIRE
AFF3	TAGAP	CXCR5	UBE2L3-YDJC
ACOXL	CCR6	ETS1	IL2RB
STAT4	JAZF1	CDK2	SYNGR1
CFLAR-CASP8	CDK6	CDK4	P2RY10
CD28	IRF5	SH2B3-PTPN11	IRAK1
CTLA4	BLK	COG6	
PLCL2	CCL19-CCL21	PRKCH	
EOMES	TPD52	RAD51B	

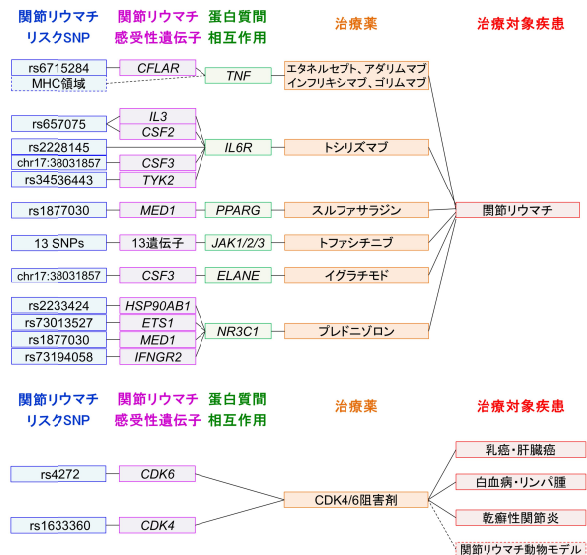
(赤字: 本研究で新規同定した 42 の感受性遺伝子領域)

生物学的データベースとの網羅的なビッグデータ解析を通じて、これらの感受性領域が遺伝子発現量の調節機能を有していること、制御性 T 細胞における細胞特異的なヒストン修飾調節領域と重複していること、原発性免疫不全症候群および造血器悪性腫瘍の原因遺伝子群やノックアウトマウスで造血系・免疫機構関連の形質を示す遺伝子群と有意に共通していることが明らかとなった。主要適合抗原領域 (major histocompatibility [MHC] region) を除く 100 の関節リウマチ感受性遺伝子領域に含まれる 377 の遺伝子に対して、上記データベース情報に基づく絞込みを行い、関節リウマチの病態に機能的な寄与を与えると考慮される 98 遺伝子をリストアップした。

これらの機能的な遺伝子群に対する創薬データベース解析の結果、蛋白-蛋白相互作用を介したネットワークを通じて、関節リウマチ感受性遺伝子群と既存の関節リウマチ治療薬のターゲット遺伝子群が強固に結びついていることが判明した (リスク比=2.2, P 値=0.0035; トシリズマブに対する *IL6R* 遺伝子や JAK 阻害剤に対する *JAK1/2/3* 遺伝子など。図 1 上段)。さらに、他疾患に対する既存の治療薬標

的が関節リウマチ感受性遺伝子と重複している場合、その治療薬を関節リウマチ治療に適応拡大できる可能性が示唆された (乳癌における CDK4/6 阻害薬など。図 1 下段)

図 1 : 関節リウマチ感受性遺伝子と治療薬ターゲット遺伝子、治療薬治療対象疾患が形成するネットワーク



次世代シーケンサーを用いた rare variant 解析、長期観察コホートを用いた骨折リスク遺伝子の解析、RA における重要なサブタイプである抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索、疾患関連遺伝子の同定と臨床展開のための数理統計学的手法についても一定の結果が得られている。

D. 考察

ゲノムワイド関連解析の結果得られた疾患感受性遺伝子には、疾患病態の解明や創薬に有用な情報が含まれており、多様な生物学的・創薬データベースとの網羅的な解析を行うことによりそれらの情報を引き出すことが可能になると考えられた。本研究においては、これらのアプローチが関節リウマチにおいて有用なことが示され、今後は他の common disease における有効性の検討も有用と考えられた。

E. 結論

大規模ゲノム研究を通じて、関節リウマチを含む common disease の疾患病態の解明や新規創薬への貢献が可能になると考えられた。創薬基盤整備における新たな手法を開発したことは、本研究の大きな成果であると考えている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham RR, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny JC, Carroll RJ, Eyler AE, Greenberg JD, Kremer JM, Pappas DA, Jiang L, Yin J, Ye L, Su DF, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra HJ, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl EA, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo MH, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen MJ, van Riel PL, van de Laar MA, Guchelaar HJ, Huizinga TW, Dieudé P, Mariette X, Louis Bridges Jr S, Zernakova A, Toes RE, Tak PP, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapää-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi HK, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M; the RACI consortium; the GARNET consortium, Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland LW, Criswell LA, Karlson EW, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu JS, Bae SC, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen PK, Raychaudhuri S, Stranger BE, De Jager PL, Franke L, Visscher PM, Brown MA, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM. Genetics of rheumatoid

arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature 2014,506:376-81

2. Yoshida S, Ikari K, Furuya T, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. GC polymorphism associated with serum 25-hydroxyvitamin D level is a risk factor for hip fracture in Japanese patients with rheumatoid arthritis: 10-year follow-up of the Institute of Rheumatology, Rheumatoid Arthritis cohort study. Arthritis Res Ther 2014,16:R75

3. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Kaji K, Komura K, Hasegawa M, Koder M, Muroi E, Fujikawa K, Seshima M, Yamada H, Yamada R, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Common and Distinct Clinical Features in Adult Patients with Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies: Heterogeneity within the Syndrome. PLoS One 2013,8:e60442

4. Cui J, Stahl EA, Saevarsdottir S, Miceli C, Diogo D, Trynka G, Raj T, Mirkov MU, Canhao H, Ikari K, Terao C, Okada Y, Wedrén S, Askling J, Yamanaka H, Momohara S, Taniguchi A, Ohmura K, Matsuda F, Mimori T, Gupta N, Kuchroo M, Morgan AW, Isaacs JD, Wilson AG, Hyrich KL, Herenius M, Doorenspleet ME, Tak PP, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE, Wolbink GJ, van Riel PL, van de Laar M, Guchelaar HJ, Shadick NA, Allaart CF, Huizinga TW, Toes RE, Kimberly RP, Bridges SL Jr, Criswell LA, Moreland LW, Fonseca JE, de Vries N, Stranger BE, De Jager PL, Raychaudhuri S, Weinblatt ME, Gregersen PK, Mariette X, Barton A, Padyukov L, Coenen MJ, Karlson EW, Plenge RM. Genome-Wide Association Study and Gene Expression Analysis Identifies CD84 as a Predictor of Response to Etanercept Therapy in

- Rheumatoid Arthritis. *PLoS Genet* 2013,9:e1003394
5. Terao C, Hashimoto M, Yamamoto K, Murakami K, Ohmura K, Nakashima R, Yamakawa N, Yoshifuji H, Yukawa N, Kawabata D, Usui T, Yoshitomi H, Furu M, Yamada R, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Three Groups in the 28 Joints for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database. *PLoS One* 2013,8:e59341
 6. Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T. PLD4 as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2013,65:472-80
 7. Terao C, Hashimoto M, Furu M, Nakabo S, Ohmura K, Nakashima R, Imura Y, Yukawa N, Yoshifuji H, Matsuda F, Ito H, Fujii T, Mimori T. Inverse association between air pressure and rheumatoid arthritis synovitis: an observational study. *PLoS One* 2014,9:e85376
 8. Terao C, Yoshifuji H, Kimura A, Matsumura T, Ohmura K, Takahashi M, Shimizu M, Kawaguchi T, Chen Z, Naruse TK, Sato-Otsubo A, Ebana Y, Maejima Y, Kinoshita H, Murakami K, Kawabata D, Wada Y, Narita I, Tazaki J, Kawaguchi Y, Yamanaka H, Yurugi K, Miura Y, Maekawa T, Ogawa S, Komuro I, Nagai R, Yamada R, Tabara Y, Isobe M, Mimori T, Matsuda F. Two susceptibility loci to Takayasu arteritis reveal a synergistic role of the IL12B and HLA-B regions in a Japanese population. *Am J Hum Genet* 2013,93:289-97.
 9. Suzuki T, Ikari K, Yano K, Inoue E, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. PADI4 and HLA-DRB1 are genetic risks for radiographic progression in RA patients, independent of ACPA status: results from the IORRA cohort study. *PLoS One* 2013,8:e61045
 10. Katayama M, Ohmura K, Yukawa N, Terao C, Hashimoto M, Yoshifuji H, Kawabata D, Fujii T, Iwakura Y, Mimori T. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. *PLoS One* 2013,8:e62231
 11. Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Kawaguchi T, Stahl EA, Kurreeman FA, Nishida N, Ohmiya H, Myouzen K, Takahashi M, Sawada T, Nishioka Y, Yukioka M, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Tohma S, Takasugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Matsuo K, Tanaka H, Tajima K, Suzuki T, Iwamoto T, Kawamura Y, Tani H, Okazaki Y, Sasaki T, Gregersen PK, Padyukov L, Worthington J, Siminovitch KA, Lathrop M, Taniguchi A, Takahashi A, Tokunaga K, Kubo M, Nakamura Y, Kamatani N, Mimori T, Plenge RM, Yamanaka H, Momohara S, Yamada R, Matsuda F, Yamamoto K. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat Genet* 2012,44:511-6
 12. Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, Tsunoda T, Takahashi A, Kubo M, Taniguchi A, Matsuda F, Ohmura K, Momohara S, Mimori T, Yamanaka H, Kamatani N, Yamada R, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF-kappaB pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese. *PLoS Genet* 2012,8:e1002949

13. Onuki R, Yamada R, Yamaguchi R, Kanehisa M, Shibuya T. Population model-based inter-diplotype similarity measure for accurate diplotype clustering. *J Comput Biol* 2012,19:55-67
14. Ohmura K, Terao C, Mimori T. Recent advances on the genetics of rheumatoid arthritis: current topics and the future. *Inflamm Regen* 2012,32:90-98
15. Terao C, Ohmura K, Ikari K, Kochi Y, Maruya E, Katayama M, Yurugi K, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese. *PLoS One* 2012,7:e40067
16. Terao C, Ikari K, Ohmura K, Suzuki T, Iwamoto T, Takasugi K, Saji H, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H, Matsuda F, Mimori T. Quantitative effect of HLA-DRB1 alleles to ACPA levels in Japanese rheumatoid arthritis: no strong genetic impact of shared epitope to ACPA levels after stratification of HLA-DRB1*09:01. *Ann Rheum Dis* 2012,71:1095-7
17. Terao C, Ohmura K, Kochi Y, Ikari K, Maruya E, Katayama M, Shimada K, Murasawa A, Honjo S, Takasugi K, Matsuo K, Tajima K, Suzuki A, Yamamoto K, Momohara S, Yamanaka H, Yamada R, Saji H, Matsuda F, Mimori T. A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. *Ann Rheum Dis* 2011,70:857-12
18. Suzuki T, Ikari K, Kawaguchi Y, Yano K, Iwamoto T, Kawamoto M, Toyama Y, Taniguchi A, Yamanaka H, Momohara S. Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility in Japanese rheumatoid arthritis patients. *Mod Rheumatol* 2012,:e-pub
19. Shidara K, Inoue E, Hoshi D, Tanaka E, Seto Y, Nakajima A, Momohara S, Taniguchi A, Yamanaka H. The influence of individual joint impairment on functional disability in rheumatoid arthritis using a large observational database of Japanese patients. *J Rheumatol* 2012,39:476-80
20. Nakajima A, Inoue E, Shidara K, Hoshi D, Sato E, Seto Y, Tanaka E, Taniguchi A, Momohara S, Yamanaka H. Standard treatment in daily clinical practice for early rheumatoid arthritis improved disease activity from 2001 to 2006. *Mod Rheumatol* 2011,21:594-7

流れ図 (申請時)

