

発強皮症モデルマウスから背部皮膚を採取し、一部をパラフィン包埋し、6 μ m 切片を作成した。ヘマトキシリン&エオジン染色を行い、一検体中 10 箇所をランダムに選び、真皮の厚さを測定した。

4) 皮膚のハイドロキシプロリン測定

ハイドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。背部皮膚検体を 6 mm パンチにて採取し、Total Collagen kit (QuickZyme Biosciences, Leiden, The Netherlands) を用いて測定した。

5) 皮膚における各種遺伝子の mRNA 発現量の検討

各マウス皮膚より RNeasy spin column (Qiagen inc.)を用いて mRNA を抽出し、 α 2(I) collagen (COL1A2)、matrix metalloproteinase (MMP)-13、connective tissue growth factor (CTGF)、transforming growth factor (TGF)- β 1、interferon (IFN)- γ 、tumor necrosis factor (TNF)- α 、interleukin (IL)-4、IL-6、IL-10、IL-13、IL-17A、VCAM-1、ICAM-1 の発現量を定量的 real-time PCR で測定した。それぞれの検体は triplicate で測定し、平均値を解析に用いた。

6) 細胞培養

強皮症皮膚線維芽細胞は強皮症患者の病変部である前腕皮膚から単離、培養した。正常皮膚線維芽細胞は強皮症患者と年齢、性別がほぼ一致した健常人の前腕皮膚から単離、培養した。これらの検体の採取は被験者の同意および施設の承認を得た上で行った。皮膚線維芽細胞培養には 10%牛胎児血清、抗生剤、抗真菌剤を添加した変法イーグル培地を使用した。室温

37 $^{\circ}$ C、CO₂ 濃度 5%に保持したインキュベーター内で単層培養し、3~7 回継代した細胞を使用した。

7) 免疫ブロッティング

培養皮膚線維芽細胞から whole cell lysate を作成し、各 15 μ g の検体を 10%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を1次抗体と反応させた後、horse-radish peroxidase と結合した二次抗体と反応させ、enhanced chemiluminescence で発光させた。

8) 培養細胞における各種遺伝子の mRNA 発現量の検討

培養細胞から RNeasy spin column (Qiagen inc.)を用いて mRNA を抽出した。cDNA の合成には ReverTra Ace qPCR MasterMix (TOYOBO, Osaka, Japan)を使用した。定量的 real-time PCR には THUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いた。

9) Promoter assay

ヒト COL1A2 遺伝子 promoter の-722bpから+58 領域に firefly luciferase reporter 遺伝子を結合させて-722 COL1A2/Lux construct を作成した。また、ヒト MMP1 遺伝子 promoter の全長を含む DNA 断片に同様に firefly luciferase reporter 遺伝子を結合させて MMP1/Lux construct を作成した。これらと併せて renilla luciferase construct を X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA)を用いてヒト正常皮膚線維芽細胞に transfection した。24 時間培養したのち、上述と同様にファスジル存在および非存在下で 2 ng/ml TGF- β 1にて 24 時間刺激を加えた。Whole cell lysate を回収し、

luciferase 活性を Dual-Luciferase assay kit (Promega, Madison, WC, USA)にて測定した。Renilla luciferase activity にて補正した相対 luciferase activity を解析した。

10) Intracellular cytokine staining

前述と同様の方法でBLMを7日間投与したマウスを作成し、翌日腋窩リンパ節、鼠径リンパ節を採取した。リンパ節からリンパ球を回収し、1 $\mu\text{g/ml}$ の brefeldin A (GolgiStop; BD Pharmingen) 存在下で 10 ng/ml の PMA と 1 $\mu\text{g/ml}$ の ionomycin (Sigma-Aldrich)にて4時間刺激した。その後、細胞を FACS buffer (1% ウシ胎児血清含有 PBS)により洗浄し、細胞表面を抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD19 抗体にて染色した。サンプルを fixative/permeabilization buffer (BD Pharmingen)にて処理し、抗 IL-4 抗体(11B11), 抗 IL-17A 抗体 (TC11.18H10)、抗 IL-6 抗体 (XMG1.2; all from BioLegend)にて染色を行った。細胞を洗浄後、FACSVerse flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)にて解析を行った。

11) 血管透過性試験

PBS に 0.1 % となるように Evans blue dye を溶解し、200 μl を尾静注にて注入した。30 分後に安楽死させ、皮膚の血管からの色素の漏出を肉眼にて観察した。

12) FITC-dextran injection による皮膚血管網の可視化

マウスの尾静脈から FITC-dextran を注射し、5 分後にマウスを sacrifice した。背部皮膚を剥離し、蛍光顕微鏡下で真皮と脂肪組織境界部の血管構造を観察した。

13) 免疫組織染色

野生型マウス、4 週間連日ファスジルまたは PBS を投与した *Fli1*^{+/+}マウスから最終投与日の翌日に背部皮膚を採取し、上述通りに切片を作成した。抗 α -SMA 抗体、抗 VE-cadherin 抗体、抗 PECAM-1 抗体を用いて免疫染色を行い、比較検討した。

14) 統計学的解析

2 群間の比較には Mann-Whitney U test を使用した。p < 0.05 を有意とした。

なお、患者検体の取り扱いには、文部科学省、厚生労働省の指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1) ファスジルは BLM による皮膚硬化を減弱する

BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて、ファスジルは皮膚肥厚を有意に抑制し(図 1A、B)、皮膚におけるハイドロキシプロリン含有量も有意に抑制した(図 1C)。また、BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、ファスジルは *COL1A2* 遺伝子および *CTGF* 遺伝子の mRNA の発現量を抑制し、*MMP13* 遺伝子の mRNA の発現量を亢進させた(図 1D)。

2) 皮膚線維芽細胞においてファスジルは抗線維化作用を示す

TGF- β 1 にて刺激した正常皮膚線維芽細胞において、ファスジルは *COL1A2* 遺伝子の mRNA の発現量を減少させ、*MMP1* 遺伝子の mRNA の発現量を亢進させた(図 2A)。また、同じ条件下において、ファスジルは I 型コラーゲン蛋白の発現量を抑制し、MMP-1 蛋白の発現量は亢進させた。一方、強皮症皮膚線維芽細胞においてもファスジルは同様の効果を示した(図 2B)。ファスジルが転写活性に及ぼす影響についてさらに検

討したところ、正常皮膚線維芽細胞において、*COL1A2* 遺伝子および *MMP1* 遺伝子の転写活性に対して TGF- β 1 が及ぼす影響は、ファスジル投与により用量依存的に抑制された(図 2C)。

3) ファスジルは BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚において、各種サイトカインを調節することで、皮膚硬化の減弱に寄与する

BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚におけるサイトカインの産生量について検討したところ、ファスジルは *Ccl2*、*Il4*、*Il6*、*Il10*、*Il13*、*Il17a* 遺伝子の mRNA の発現量を抑制した(図 3A)。

4) ファスジルは BLM 誘発強皮症モデルマウスの皮膚所属リンパ節におけるリンパ球数を減少させ、CD4/CD8 比を下げる

皮膚所属リンパ節および脾臓から回収した細胞を FACS にて解析した。リンパ節におけるリンパ球総数は減少し、CD4/8 比はリンパ節、脾臓ともに低下した(図 3B)。

5) ファスジルは CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞からの IL-4、IL-6、IL-17A 産生を抑制し、CD19 陽性 B 細胞からの IL-6 産生を抑制する

末梢リンパ節から回収した細胞を FACS にて解析した。ファスジル投与によって CD4 陽性細胞および CD8 陽性細胞における IL-4、IL-6、IL-17A の平均蛍光シグナル強度は減弱し、CD19 陽性細胞における IL-6 の平均蛍光シグナル強度も減弱した(図 3C)。

6) ファスジルは強皮症血管障害モデルマウスにおける血管透過性亢進を改善する

Fli1^{+/+}マウスおよび *Fli1* ECKO マウスでは Evans blue 色素の過剰な漏出が見られたが、ファスジル投与で明らかにその漏出が抑制された(図 4A)。

7) ファスジルは強皮症血管障害モデルマウスにおける皮膚血管網の構造異常を改善する

Fli1^{+/+}マウスおよび *Fli1* ECKO マウスの皮膚では小動脈瘤の形成や細動脈の狭窄などの微小血管の構造異常が見られたが、ファスジル投与によりそれらの異常は明らかに減少した(図 4B)。

8) ファスジルは強皮症血管障害モデルマウスにおける血管内皮細胞同士の細胞接着異常、壁細胞の被覆異常を改善する

Fli1^{+/+}マウスでは、皮膚微小血管における α -SMA、VE-Cadherin、PECAM-1 の発現の低下が見られたが、ファスジル投与でこれらの発現が回復した(図 4C)。

9) ファスジルは皮膚微小血管内皮細胞における血管の安定性に関わる分子の発現を調節する
Fli1^{+/+}マウスから単離した皮膚微小血管内皮細胞において、ファスジルは *Cdh5*、*Pecam1*、*Slp1* 遺伝子の mRNA の発現量を亢進させ、*Mmp9* 遺伝子の発現量を抑制した(図 4D)。

D. 考案

Rho キナーゼ阻害薬であるファスジルは、血管の攣縮を抑制するのみでなく、抗線維化作用、免疫調節作用、血管リモデリング調節作用など様々な作用を有する可能性のあることが報告されている。自己免疫疾患に関しても、ループスマデルマウス、コラーゲン誘導関節炎モデルや実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルなどにおいてファスジルが病態を改善させる効果があることが示唆されているが、自己免疫疾患の一つである全身性強皮症に対するファスジルの効果に関しては、今まで検討されていなかった。今回の我々

の研究では、ファスジルはBLM誘発強皮症モデルマウスが呈する皮膚硬化、炎症反応を抑制する効果を示した。また *Fli1*^{+/+}マウスおよび *Fli1* ECKOマウスを用いてファスジルが血管障害を改善させる作用を有することを示した。これによりファスジルは強皮症モデルマウスに見られる線維化、炎症、血管障害を改善することが示唆された。

皮膚線維芽細胞において、ファスジルは *COL1A2* 遺伝子の mRNA の発現量を抑制することを示した。これにより、ファスジルが I 型コラーゲン産生を抑制することが示唆された。ファスジルはさらに *MMP1* 遺伝子の mRNA の発現量、蛋白量を増加させることで、コラーゲンの分解を亢進させることが示唆された。これらのコラーゲンの産生の抑制、分解の亢進を介して、I 型コラーゲンの蛋白の沈着を抑制することが、ファスジルが抗線維化作用を有する1つの機序であることが示された。

次に全身性強皮症の病態に重要と考えられている炎症・免疫異常について検討した。強皮症において、MCP-1⁷⁾、IL-4⁸⁾、IL-6、IL-13、IL-17A はその病態への関与が指摘されており、患者血清、または病変皮膚におけるこれらのサイトカイン・ケモカイン濃度が上昇していることが報告されている^{9) 10)}。ファスジル投与により、BLM 誘発強皮症モデルマウス皮膚においてこれらの遺伝子の mRNA の発現量が低下した。また、強皮症発症初期の炎症期には T 細胞は Th2 優位な状態となり、IL-4、IL-13 といったサイトカインが上昇し、皮膚の線維化を促進する方向に作用するが、強皮症発症後数年経過した萎縮期になると、T 細胞は Th1 優位の状態となり、皮膚硬化が減弱す

る要因の一つとして作用すると考えられている¹¹⁾。BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいても Th2 関連のサイトカインが上昇することが報告されている。また、近年 IL-17A が SSc の病態に関与しているとする報告がある¹²⁾¹³⁾。そこでファスジルが BLM 誘導強皮症モデルマウスのリンパ球のサイトカイン産生に及ぼす影響を検討したところ、ファスジル投与により IL-4、IL-6、IL-17A 産生が抑制されることが示された。さらにファスジル投与により皮膚所属リンパ節におけるリンパ球総数も減少し、炎症反応が軽減することが示唆された。これらの結果から、ファスジルは BLM 誘発強皮症モデルマウスにおいて炎症反応を軽減させ、線維化促進させるサイトカイン産生を減少することで、皮膚の線維化を抑制する可能性が示唆された。全身性強皮症の病因はいまだ不明であるが、転写因子 Fli1 の恒常的な発現低下が本症の線維化と血管障害に関与している可能性が示唆されている¹⁴⁾。そこで今回強皮症血管障害モデルマウスとして *Fli1*^{+/+}マウスおよび *Fli1* ECKO マウスを用いて、ファスジルの血管異常に対する効果を検討した。*Fli1*^{+/+}マウスおよび *Fli1* ECKO マウスでは血管透過性の異常な亢進と皮膚の血管構造の異常が見られるが、ファスジル投与でこれらの異常が改善した。これらの血管障害の背景として、血管内皮細胞における転写因子 Fli1 の発現低下が血管新生に必要な一連の遺伝子プログラムを活性化し、血管の安定性を低下させることが一因として考えられていることから¹⁵⁾、ファスジルがこれらの遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。血管内皮細胞同士の細胞接着においては VE-Cadherin や PECAM-1 が、血管内皮細胞と壁細胞の細胞間接着においては PDGFB や

S1P₁ 受容体が、基底膜のリモデリングにおいては、MMP2 や MMP9 が重要な役割を果たしていると言われている。ファスジル投与により強皮症血管障害モデルマウスの皮膚微小血管内皮細胞における *Cdh5*、*Pecam1* 遺伝子の発現が増加しており、これにより血管内皮細胞間の結合が回復することが示唆された。また、ファスジル投与で *S1p1* 遺伝子の発現が上昇することから、血管内皮細胞と壁細胞の結合が強まり、壁細胞の被覆が安定化すると考えられた。さらに、*Mmp9* 遺伝子の発現が減少することから、ファスジル投与で血管基底膜のリモデリングが抑制され、血管の安定性に寄与する可能性が示唆された。

今回我々は BLM 誘導強皮症モデルマウス、*Fli1*^{+/+}マウスおよび *Fli1* ECKO マウスを用いて、Rho キナーゼ阻害薬ファスジルが皮膚硬化、炎症、血管障害に及ぼす影響を検討した。ファスジルは皮膚線維芽細胞に直接作用し抗線維化作用を示すほか、炎症抑制作用や、血管異常を改善する作用を有することが示された。今後はこれらの分子メカニズムを調べていくと同時に臨床応用の可能性を検討する予定である。

E. 結論

ファスジル投与によって、強皮症モデルマウスにおける線維化、炎症反応、血管障害が改善することが明らかとなり、同薬が全身性強皮症の疾患修飾薬となる可能性が示唆された。

F. 文献

- 1.Asano Y. Future treatments in systemic sclerosis. *J Dermatol*; 37: 54-70. 2010
- 2.Stirzaker RA, Biswas PS, Gupta S, Song L,

Bhagat G, Pernis AB. Administration of fasudil, a ROCK inhibitor, attenuates disease in lupus-prone NZB/W F1 female mice. *Lupus*; 21: 656-61. 2012

- 3.Ma Z, Zhang J, Du R, Ji E, Chu L. Rho kinase inhibition by fasudil has anti-inflammatory effects in hypercholesterolemic rats. *Biol Pharm Bull*; 34: 1684-9. 2011

- 4.Mouchaers KT, Schalij I, de Boer MA, Postmus PE, van Hinsbergh VW, van Nieuw Amerongen GP, et al. Fasudil reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension: comparison with bosentan and sildenafil. *Eur Respir J*; 36: 800-7. 2010

- 5.Ishimaru K, Ueno H, Kagitani S, Takabayashi D, Takata M, Inoue H. Fasudil attenuates myocardial fibrosis in association with inhibition of monocyte/macrophage infiltration in the heart of DOCA/salt hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*; 50: 187-94. 2007

- 6.Zhou H, Li YJ, Wang M, Zhang LH, Guo BY, Zhao ZS, et al. Involvement of RhoA/ROCK in myocardial fibrosis in a rat model of type 2 diabetes. *Acta Pharmacol Sin*; 32: 999-1008. 2011

- 7.Hasegawa M, Sato S, Takehara K. Augmented production of chemokines (monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta) in patients with systemic sclerosis: MCP-1 and MIP-1alpha may be involved in the development of pulmonary fibrosis. *Clin Exp Immunol*; 117: 159-65. 1999

- 8.Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, Takehara K. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4),

IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol*; 24: 328-32. 1997

9. Radstake TR, van Bon L, Broen J, Hussiani A, Hesselstrand R, Wuttge DM, et al. The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes. *PLoS One*; 4: e5903. 2009

10. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekmann L, et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther*; 11: R147. 2009

11. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, Takehara K, Sato S. Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis. *J Rheumatol*; 33: 275-84. 2006

12. Okamoto Y, Hasegawa M, Matsushita T, Hamaguchi Y, Huu DL, Iwakura Y, et al. Potential roles of interleukin-17A in the development of skin fibrosis in mice. *Arthritis Rheum*; 64: 3726-35. 2012

13. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts. *J Immunol*; 188: 3573-83. 2012

14. Asano Y, Bujor AM, Trojanowska M. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci*; 59: 153-62. 2010

15. Asano Y, Stawski L, Hant F, Highland K, Silver R, Szalai G, et al. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *Am J Pathol*; 176: 1983-98. 2010

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Toyama T, Asano Y, Sato S, Kadono T et al.: ROCK inhibitor fasudil ameliorates dermal fibrosis, immune abnormalities, and vascular instability in systemic sclerosis model mice.

第42回日本臨床免疫学会総会 2014.9 (東京)

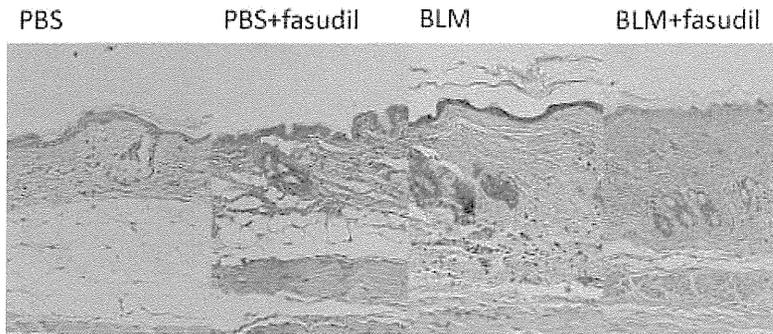
Toyama T, Asano Y, Sato S, Kadono T et al.: Fasudil ameliorates fibrosis, vasculopathy, and immune abnormalities in animal models of systemic sclerosis

The 39th Annual Meeting of the JSID, Osaka, Japan 2014.12

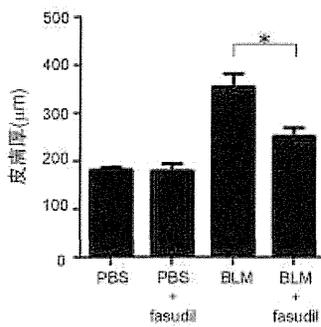
H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

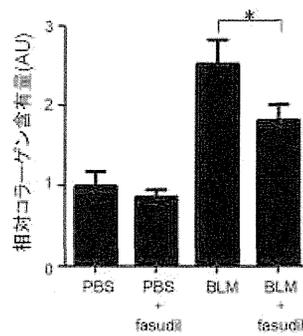
A



B



C



D

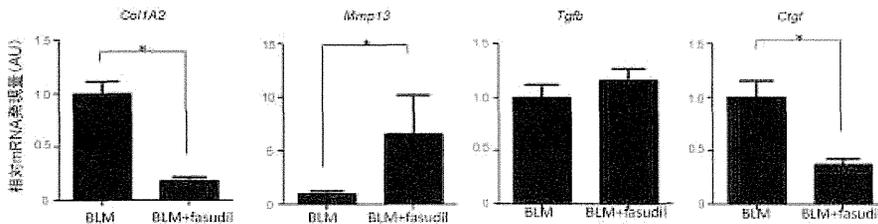


図 1: BLM 誘発強皮症モデルマウスにおけるファスジルの抗線維化作用

A. BLMあるいはPBSを4週間投与した後、背部皮膚の病理組織像(HE染色)を検討した。

B. BLMあるいはPBSを4週間投与した後、真皮膠原線維厚について検討した(* p < 0.05)。

C. BLMあるいはPBSを4週間投与した後、背部皮膚におけるヒドロキシプロリン含量について検討した(* p < 0.05)。

D. BLM投与4週間後の背部皮膚における線維化関連遺伝子の mRNA の発現量について、定量的 real-time PCR で検討した(* p < 0.05)。

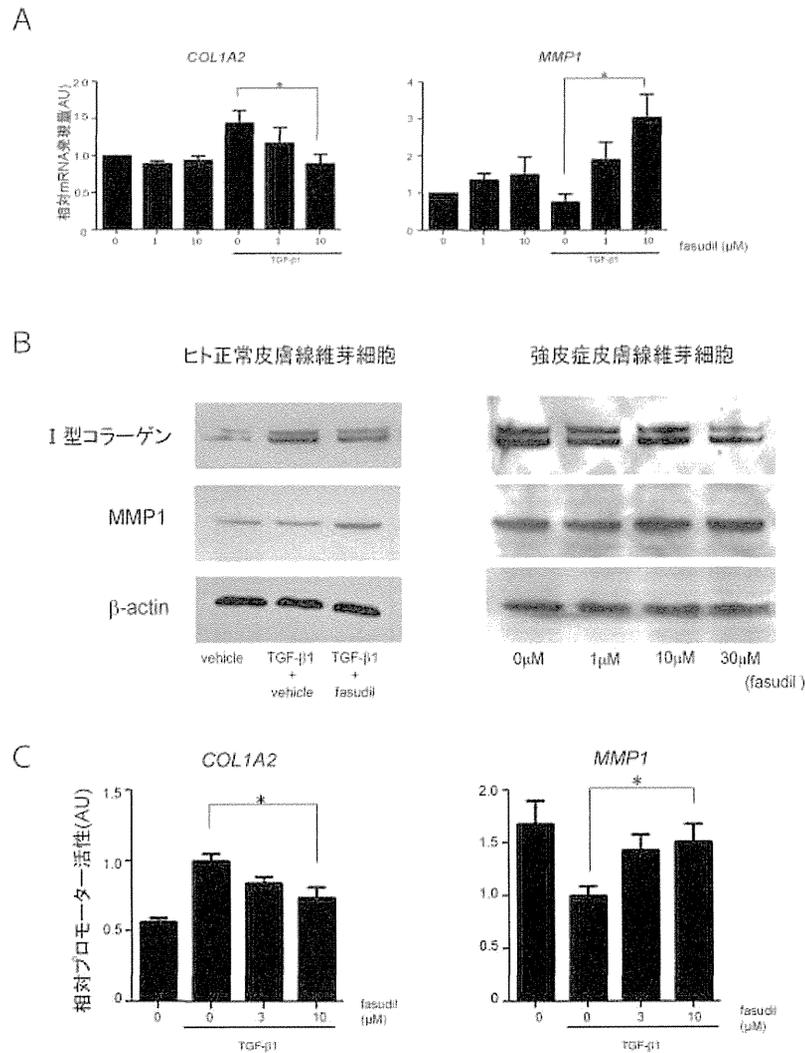


図 2: 培養皮膚線維芽細胞に対するファスジルの抗線維化作用

A. 正常皮膚線維芽細胞を fasudil 存在下で 1 時間培養した後、TGF- β 1 で 24 時間刺激した。*COL1A2* 遺伝子と *MMP1* 遺伝子の mRNA の発現量について、定量的 real-time PCR にて検討した(* p < 0.05)。

B. 正常皮膚線維芽細胞を 10 μ M の fasudil 存在下で 1 時間培養した後、TGF- β 1 で 24 時間刺激した。強皮症皮膚線維芽細胞については、fasudil を加えて 24 時間培養した。Whole cell lysate を用いて、immunoblotting で I 型コラーゲンと MMP1 の蛋白量について検討した。

C. 正常皮膚線維芽細胞に *COL1A2* 遺伝子プロモーターあるいは *MMP1* 遺伝子プロモーターを transfection し、24 時間後に無血清培地に交換し、更に 24 時間後に TGF- β 1 で刺激した。fasudil は TGF- β 1 で刺激する 1 時間前に培地に加えた。TGF- β 1 刺激 24 時間後にルシフェラーゼ活性を検討した(* p < 0.05)。

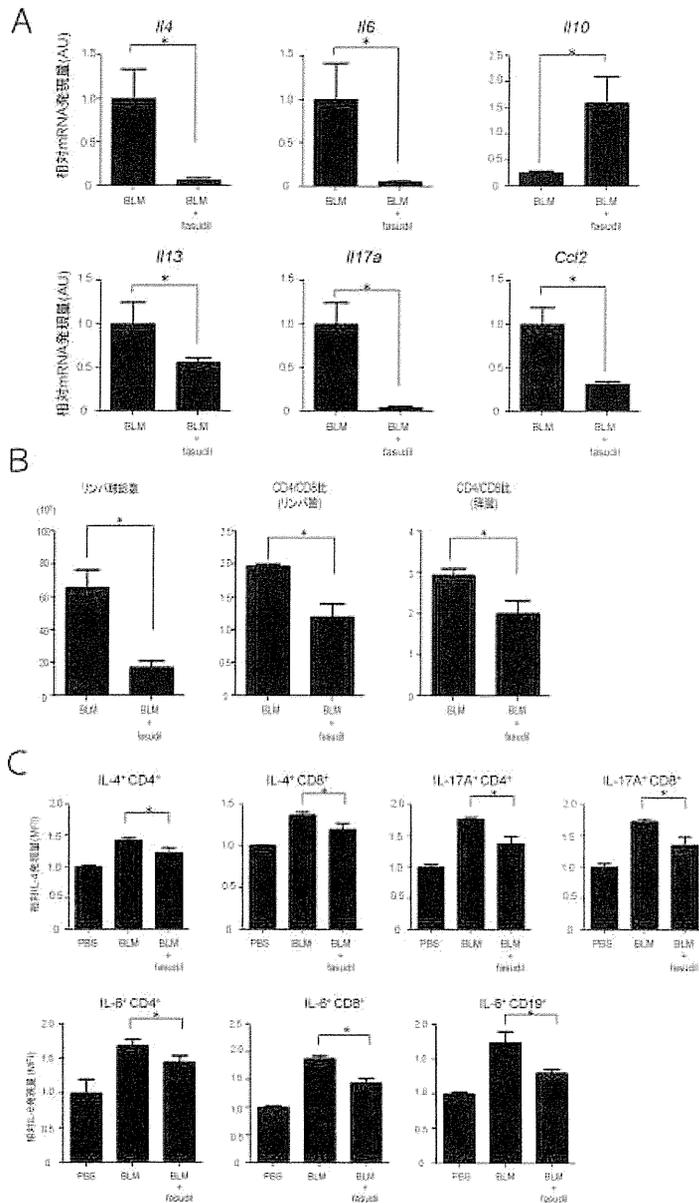


図 3: BLM 誘発強皮症モデルマウスにおける炎症にファスジルが及ぼす影響の検討

A. BLM 投与後 1 週間の背部皮膚におけるサイトカイン・ケモカインの発現量に対してファスジルが及ぼす影響を定量的 real-time PCR で検討した(* p < 0.05)。

B. BLM 投与 1 週間後に、皮膚所属リンパ節および脾臓におけるリンパ球数と CD4/CD8 比について flow cytometry で解析した(* p < 0.05)。

C. BLM 投与 1 週間後に、末梢リンパ節から回収した細胞を用いて CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD19 陽性 B 細胞における IL-4, IL-6, IL-17A の産生量について flow cytometry にて解析した(* p < 0.05)。

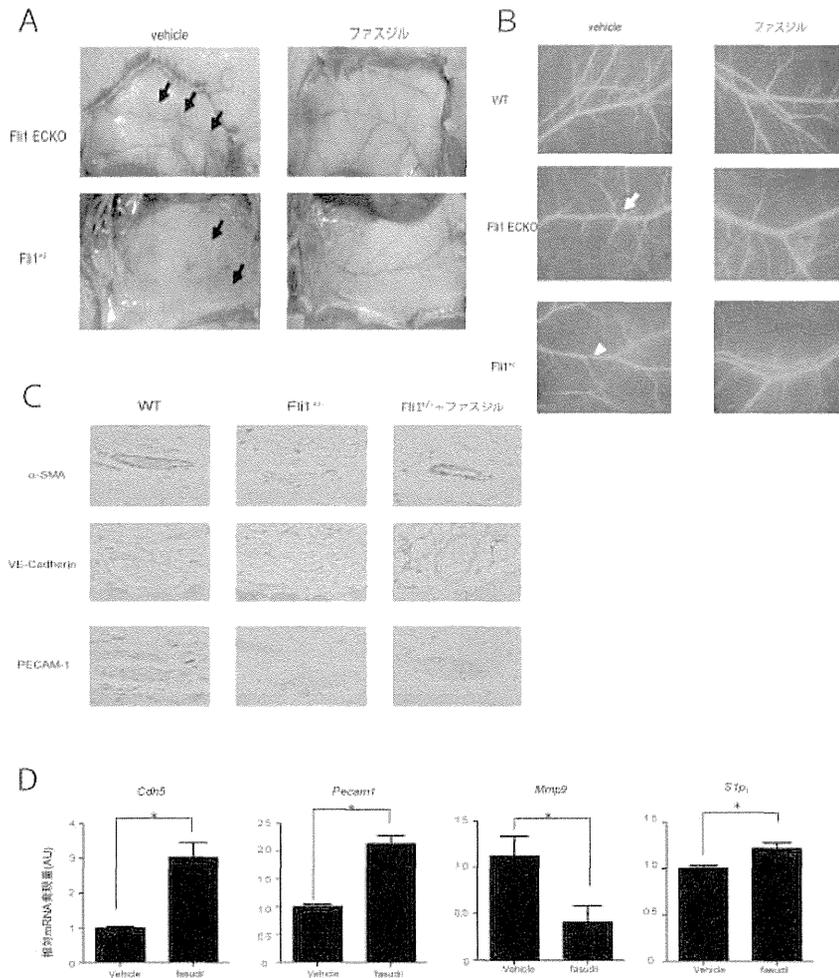


図 4: 強皮症血管障害モデルマウスの血管障害に対するファスジルの影響

A. *Fli1*^{+/+}マウスおよび *Fli1* ECKO マウスに 4 週間 fasudil を投与し、Evans blue 色素を用いて血管透過性試験を行った。矢印は Evans blue 色素の漏出を示す。

B. A と同じ条件下で、FITC-dextran により皮膚血管網を可視化し、その形態を比較した。矢印は微小血管瘤、矢尻は狭窄を示す。

C. A と同じ条件下で、背部皮膚の微小血管におけるα-SMA、VE-Cadherin、PECAM-1 の発現量を免疫染色で検討した。

D. *Fli1*^{+/+}マウスから単離した皮膚微小血管内皮細胞を 10μM の fasudil 存在下で 24 時間培養し、*Cdh5*、*Pecam1*、*Slp1* 遺伝子の mRNA の発現量を定量的 real-time PCR で検討した(* p < 0.05)。

全身性強皮症感受性遺伝子の同定

研究分担者 岡 晃 東海大学総合医学研究所 講師

業務主任者 尹 浩信 熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授

研究要旨

本研究は、全身性強皮症の原因変異を直接同定する目的で、エクソン断片のキャプチャーならびに次世代シーケンサーを用いたリシーケンシングによるエクソーム解析を、厳選した7個体を対象に実施した。変異のフィルタリングは以下の3種を仮定した。まず優性モデルでは1個の遺伝子上に複数個体で新規変異がある遺伝子、劣性モデルではホモ接合頻度が一般集団中で0.0001以下の変異がある遺伝子、最後にコンパウンドモデルではその接合頻度が0.0001以下の変異がある遺伝子を候補対象とすることでフィルタリングを行った。その結果、優性、劣性、コンパウンドの各モデルにて、それぞれ、8、8、24個の候補遺伝子が見出された。またこれらの遺伝子上の変異はすべて、アミノ酸置換を伴うSNV (single nucleotide variant)であり、さらに遺伝子機能に影響を与えると推定された変異である。そしてこの合計40個の候補遺伝子にはコラーゲン、細胞外マトリックスならびに組織の繊維化に関与するタンパクをコードする遺伝子が含まれていた。今後は、すべての候補遺伝子の全エクソンを対象に、収集済みの全検体を用いてシーケンシングすることにより、原因遺伝子を同定する予定である。

A. 研究目的

強皮症の原因遺伝子を探索する目的で、種々の遺伝学的な解析が実施されており、近年では関連解析が行われているが、強皮症と関連があると報告された変異のオッズ比は、HLA遺伝子を除くと1.10-1.40程度とあまりにも低く[1]、それが真実であったとしても、おそらく遺伝要因の数パーセントしか説明できないと考えられる。基本的に関連解析はそのマーカーのアリル頻度がコモンであるゆえに、基本的に高頻度の変異しか検出できない。しかしながら、有害な変異は人類進化の過程で、強い選択圧にさらされ、淘汰されるため、コモンな頻度で維持されることは極めて考えにくい[2]。さらに強皮症はその発症頻度が1万人に1人前後と比較的稀な疾患である。したがって、強皮症の原

因変異はおそらく集団中で極めて稀な変異であると想定される。これを検出するには、遺伝的マーカーに依存するのではなく、直接ゲノム配列をリシーケンシングするしかない。

そこで本研究は、この強皮症原因変異を同定する目的で、エクソン断片のキャプチャーならびに次世代シーケンサーを用いたリシーケンシングによるエクソーム解析を行うものである。

B. 研究方法

2009年4月～2011年3月の間に、10施設にて(長崎大学医学部歯学部附属病院・熊本大学医学部附属病院・筑波大学附属病院・慶應義塾大学病院・群馬大学附属病院・札幌医大病院・福島県立医大・東京女子医科大学膠

原病リウマチ痛風センター・東京大学医学部附属病院・金沢大学附属病院)325 検体の全身性強皮症患者(日本人)ゲノム DNA を収集した。この検体収集は各機関における倫理委員会の承認の元で実施されており、全検体のインフォームドコンセントが取得されている。この検体の中から、さらに高度の皮膚硬化と治療抵抗性の間質性肺疾患を有している重症例を 7 検体厳選した。続いて、SureSelect Human All Exon 50 Mb Kit (Agilent)によりエクソン断片を濃縮および増幅し、Genome Analyzer IIx (Illumina)によりリシークエンシングを行った。

膨大な数の変異から目的の変異を見出すフィルタリングは以下 3 種の遺伝様式を仮定して実施した。また今回対象とする変異は SNV (single nucleotide variant) のみで、挿入および欠失は除外した。さらに対象とする SNV はアミノ酸に変化を与えるものに限定し、加えて 6 種類(SIFT, PolyPhen2, PhyloP, MutationTaster, LRT, GERP++)の遺伝子機能有害度推定プログラムの内、少なくともいずれか 1 つが 'Damaging' とコールした変異のみを対象とした。

1) 優性モデル

一般健常者集団
(<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB>)において全く観察されない新規のヘテロ接合変異のみを抽出し、さらに複数個体で同じ遺伝子にその変異が存在する遺伝子を抽出した。

2) 劣性モデル

ホモ接合の変異で、その接合頻度が健常者集団中 0.0001 以下である変異が存在する遺伝子を抽出した。

3) コンパウンドモデル

コンパウンドとは父ならびに母方由来のある変異がそれぞれ同じ遺伝子上にトランスミットしている一方、それぞれ変異の座位が異なって存在した状態で、表現型に寄与する場合のことである。それぞれの変異はヘテロ接合ではあるが、遺伝様式としては基本的に劣性である。今回の実験では発端者の両親のゲノムがないため、この解析はできないが、同じ個体で同じ遺伝子上の異なる座位に存在するヘテロ接合で、その接合頻度が健常者集団中 0.0001 以下である遺伝子を抽出することで、コンパウンドモデルを仮定した。

C. 研究結果

臨床情報により厳選した 7 個体の全身性強皮症患者のエクソームシークエンシングにより見出された SNV は重複を除き合計 44,787 個存在した。この内、遺伝子機能に影響を与えうる変異は 19,268 個見出された。さらに優性モデルのフィルタリングで抽出された変異が存在する遺伝子は 8 個であった。また劣性モデルにおいて抽出された変異が存在する遺伝子は 8 個、さらにコンパウンドモデルでは 24 個の遺伝子が抽出された (図 1)。

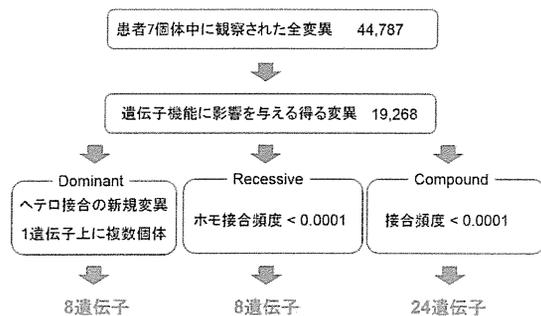


図 1. 変異のフィルタリング

D. 考案

エクソーム解析は遺伝的マーカーに依存せず、全エクソンをリシーケンシングするため、稀な変異であっても、網羅的に直接同定することが可能である。一方、見出された変異が疾患発症に寄与しているか否かを判断するには家族例を用いて、その変異と疾患の共伝達を追跡することが最も効率的な方法の一つである。しかしながら日本人における全身性強皮症の家族例の収集は極めて困難であることから、孤発症例と一般集団のデータを用いて、変異と疾患の関係を推定するしかない。そこで今回は、優性、劣性ならびにコンパウンドの遺伝モデルを設定して、原因変異の候補を絞り込む方法を採用した。これにより合計 40 個の遺伝子が候補遺伝子として同定された。これらの中にはコラーゲン、細胞外マトリックス、ならびに組織の繊維化に関与するタンパクをコードする遺伝子が含まれており、さらにこれらの遺伝子間で同じパスウェイ上に存在するものも認められたことから、今後の検証実験が期待される。

E. 結論

全身性強皮症患者 7 個体のエクソーム解析により、合計 40 個の候補遺伝子を見出すことに成功した。この解析は 20,000 個以上の遺伝子を対象としているため、フィルタリングの結果が単なる偶然である可能性が残されている。今後は見出した候補遺伝子の全エクソン対象にカスタムキャプチャーキットを合成し、全個体を対象に更なるシーケンシングすることで遺伝子変異の患者集積性を検討し、全身性強皮症の原因遺伝子を特定していく予定である。

F. 文献

1. Bossini-Castillo L, Martin JE, Broen J, et al.: A GWAS follow-up study reveals the association of the IL12RB2 gene with systemic sclerosis in Caucasian populations. *Hum Mol Genet.* 2012 15;21(4):926-33.
2. Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H.: Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *J Dermatol.* 2012;39(3):231-41.

G. 研究発表

1. 論文発表
 - Mabuchi T1, Ota T, Manabe Y, Ikoma N, Ozawa A, Terui T, Ikeda S, Inoko H, Oka A. HLA-C*12:02 is a susceptibility factor in late-onset type of psoriasis in Japanese. *J Dermatol.* 2014 41(8):697-704.
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

日本人・ヨーロッパ人における強皮症 GWAS 国際メタ解析

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 特定助教
担当責任者	川口鎮司	東京女子医科大学リウマチ科 臨床教授
担当責任者	桑名正隆	日本医科大学大学院医学研究科アレルギー膠原病内科 教授
担当責任者	岡 晃	東海大学総合医学研究所 講師
担当責任者	長谷川稔	福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学 教授
担当責任者	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
担当責任者	石川 治	群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 教授
担当責任者	山本俊幸	福島県立医科大学医学部皮膚科 教授
担当責任者	後藤大輔	筑波大学医学医療系内科 准教授
担当責任者	浅野善英	東京大学医学部附属病院皮膚科 講師
担当責任者	神人正寿	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 准教授
担当責任者	佐藤伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
担当責任者	竹原和彦	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授
研究協力者	高橋裕樹	札幌医科大学医学部消化器・免疫・リウマチ内科学講座 准教授
研究協力者	土屋 尚之	筑波大学医学医療系生命医科学域分子遺伝疫学 教授
協力者	川崎 綾	筑波大医学医療系分子遺伝疫学 助教
協力者	古川 宏	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長
協力者	當間重人	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 部長
協力者	遠藤平仁	東邦大医療センター大森病院膠原病科 准教授
協力者	柳田英寿	国立病院機構宇多野病院 医長
協力者	鮎澤菜穂	国立病院機構宇多野病院 医師
協力者	堀田哲也	北海道大学大学院医学研究科 免疫・代謝内科学分野 講師
協力者	大村浩一郎	京都大学大学院医学研究科臨床免疫学講座 准教授
協力者	吉藤 元	京都大学大学院医学研究科臨床免疫学講座 院内講師
協力者	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
協力者	三森経世	京都大学大学院医学研究科臨床免疫学講座 教授
協力者	Yannick Allanore	Cochin Hospital 教授
業務主任者	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授

研究要旨

強皮症の全ゲノム関連解析(GWAS)は主にヨーロッパ人で行われているが、他人種での報告はほと

んどない。ヨーロッパ人で関連を示した領域の一部はアジア人でも関連を示すことが分かっている。我々は、新規強皮症疾患感受性遺伝子を同定することを目的に、日本人初の強皮症 GWAS を行うと共に、ヨーロッパ人の結果とのメタ解析を行った。その結果、有意水準に達した新規領域を一つ同定した。

A. 研究目的

アジア人・ヨーロッパ人共通の新規強皮症疾患感受性遺伝子を同定する。

B. 研究方法

京都大学ゲノム医学センターを中心に収集した強皮症患者 700 例と健常人 1797 例を対照に、一塩基多型 (SNP) に着目したイルミナ社のインフィニウムアレイを用いた全ゲノム関連解析 (GWAS) を施行した。この強皮症患者の多くは以前に日本人特異的な強皮症疾患感受性遺伝子同定の際に用いたサンプルである (文献 1)。結果のクオリティコントロールは SNP, サンプルにおけるコール成功率 95% 以上、ハーディワインバーク平衡における p 値 1.0×10^{-5} 以下、マイナーアレル頻度 5% 以上の SNP を採用した。タイピングをした SNP を用いて、1000 人ゲノムプロジェクトの遺伝子型 (文献 2) を鋳型に imputation を施行した。主成分分析における上位 3 主成分を共変量に、SNP の dosage を説明変数に用いてロジスティック回帰分析を施行した。関連解析は強皮症そのものの罹患および、限局性あるいはび慢性強皮症の罹患、さらに抗セントロメア抗体陽性、抗 Scl-70 抗体陽性強皮症についても解析を行った。日本人における解析結果に加えて、既報のフランスグループの GWAS 結果 (文献

3) を用いて同様の imputation を行い、日本人とフランス人の結果を統合した。 P 値の統合には inverse-variance 法を採用した。日本人の結果あるいはメタ解析結果を基に上位の p 値を示す SNP および、Pubmed の抄録からテキストベースに疾患との関連を推定するプログラム (GRAIL, 文献 4) を用いて強皮症との関連を推定された領域における SNP を選定し、日本人において 654 例の強皮症患者と健常人 1900 例の DNA を用い、ヨーロッパ人においては 1613 例の強皮症患者と 5958 例の健常人の DNA を用いて追認解析を行った。

(倫理面への配慮)

全ての研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に則って実施した。対象者には研究の主旨について十分に説明し、書面にて同意を得た。収集した検体は二重に匿名化するとともに、個人情報やゲノム情報、臨床情報が漏洩することが決してないように十分配慮した上で研究に使用した。共同研究者からは、匿名化された状態で検体提供を受けた。

C. 研究結果

日本人の GWAS では、HLA 領域が有意水準に達していた。また、既報の STAT4 が強い関連を示した。メタ解析にて STAT4 は有意

水準に達した。TNFAIP3 は有意水準に達しなかったものの、強い関連を示した。一方で、いずれの人種とも関連がある HLA 領域は、メタ解析にても p 値の改善は大きくは認められず有意水準に到達しなかった。これは、強皮症の疾患感受性において、HLA 領域に人種間の違いが大きいことを示唆する。

強皮症における病型の感受性や自己抗体の感受性についても、それぞれの人種において HLA 領域が強く関連していた一方で、メタ解析では HLA 領域の関連は強調されず、人種間の違いが示唆された。

メタ解析の結果および GRAIL を基に 33 個の SNP を選定した。また、日本人 GWAS の結果および GRAIL を基に 13 個の SNP を選定した。追認解析を行い、GWAS 結果との統合を行ったところ、国際メタ解析において染色体 17 番の領域が有意水準に到達した ($p=1.9 \times 10^{-9}$)。この SNP は遺伝子のエクソン上にあり、アミノ酸置換を伴っていた。この遺伝子は上皮系に発現しており、アレルギーや自己免疫性疾患との関連が報告されている遺伝子であった。また、染色体 1 番及び 6 番の二領域が有意水準には到達しなかったものの、示唆的な関連を示した ($p=2.2 \times 10^{-7}$, 1.3×10^{-7})。6 番の領域は非 HLA 領域であった。この二つの SNP はいずれも免疫関連の遺伝子の近傍に存在していた。形質ごとに関連解析結果では、国際メタ解析でも有意水準に到達した領域は見られなかった。日本人 GWAS および追認解析では、日本人特異的な関連領域は認められなかった。

D. 考案

HLA 領域は兩人種に関連していることが既報で明らかであるにもかかわらず、メタ解析にても p 値の改善はあまり見られず、感受性遺伝子に人種間の違いが存在する可能性がある。一方で、真の感受性多型に対する人種間の連鎖不平衡の違いにより、異なる結果のように見えているだけである可能性もあり、さらなる詳細な imputation を行う予定である。また、新規領域をさらに同定するために、さらに検体数を増やすことを目的に、ヨーロッパ人の強皮症コホートを有するグループに共同研究の交渉を行っている。また、17 番染色体の SNP および遺伝子に関して、機能解析を行う予定である。

E. 結論

日本人、ヨーロッパ人を対象にした強皮症 GWAS メタ解析にて、新規疾患感受性領域を一つ、候補を二つ同定した。

F. 文献

1. 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 Feb;65(2):472-80.
2. 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale

sequencing. *Nature* 2010;467:1061-1073.

3. Allanore Y, Saad M, Dieudé P, Avouac J, Distler JH, Amouyel P, Matucci-Cerinic M, Riemekasten G, Airo P, Melchers I, Hachulla E, Cusi D, Wichmann HE, Wipff J, Lambert JC, Hunzelmann N, Tiev K, Caramaschi P, Diot E, Kowal-Bielecka O, Valentini G, Mouthon L, Czirják L, Damjanov N, Salvi E, Conti C, Müller M, Müller-Ladner U, Riccieri V, Ruiz B, Cracowski JL, Letenneur L, Dupuy AM, Meyer O, Kahan A, Munnich A, Boileau C, Martinez M. Genome-wide scan identifies TNIP1, PSORS1C1, and RHOB as novel risk loci for systemic sclerosis. *PLoS Genet.* 2011 Jul;7(7):e1002091.

4. Raychaudhuri S, Plenge RM, Rossin EJ, Ng AC; International Schizophrenia Consortium, Purcell SM, Sklar P, Scolnick EM, Xavier RJ, Altshuler D, Daly MJ. Identifying relationships among genomic disease regions: predicting genes at pathogenic SNP associations and rare deletions. *PLoS genetics* 2009;5:e1000534.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

日本人集団における全身性強皮症と 免疫グロブリン様受容体 *LILRA3* 欠失多型の関連研究

研究協力者	土屋尚之	筑波大学医学医療系生命医科学域分子遺伝疫学 教授
担当責任者	長谷川稔	福井大学医学部感覚運動医学講座皮膚科学 教授
担当責任者	藤本 学	筑波大学医学医療系皮膚科 教授
担当責任者	佐藤伸一	東京大学医学部附属病院皮膚科 教授
担当責任者	竹原和彦	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 教授
協力者	八谷有紀	筑波大学大学院フロンティア医科学専攻 大学院生
協力者	川崎 綾	筑波大学医学医療系分子遺伝疫学 助教
協力者	松下貴史	金沢大学医薬保健研究域医学系皮膚科学 講師
協力者	住田孝之	筑波大学医学医療系内科 (膠原病・リウマチ・アレルギー) 教授
協力者	當間重人	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 部長
協力者	古川 宏	国立病院機構相模原病院臨床研究センター 室長
業務主任者	尹 浩信	熊本大学大学院生命科学研究部皮膚病態治療再建学 教授

研究要旨

免疫グロブリン様受容体ファミリーである leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR) 分子群のうち、可溶性分子をコードする *LILRA3* には欠失多型が存在する。欠失アリル頻度には顕著な集団差が存在し、東アジア集団では欠失アリル頻度が 70%以上にも達する。これまで、ドイツ人集団において多発性硬化症、シェーグレン症候群と *LILRA3* 欠失アリルとの関連が報告されているが、最近、中国人集団において、非欠失アリルと関節リウマチや全身性エリテマトーデスとの関連が報告された。今回われわれは、全身性強皮症と *LILRA3* 欠失多型との関連を検討し、抗 topoisomerase I 抗体陽性群における *LILRA3* 欠失アリルの有意な増加を検出した。

A. 研究目的

免疫グロブリン様受容体に属する leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptors (LILR、ILT や LIR と呼ばれる) は、killer-cell Ig-like receptor (KIR) などとともに染色体 19q13.4 の leukocyte receptor complex (LRC) 領域にコードされる多重遺伝子ファミリーで、2 個の偽遺伝

子を含む 13 個の遺伝子によってコードされる。LILR は主として骨髄系細胞に、一部はリンパ球にも発現する膜結合型の活性化型あるいは抑制型受容体であるが、*LILRA3* (ILT6, LIR-4) のみは膜貫通領域を持たない可溶性分子である。*LILRA3* のリガンドには HLA-A, C, G や β_2 microglobulin を結合しない free HLA-class I heavy chain な

どが知られているが、未知のリガンドの存在も想定される。

*LILRA3*には7個の exon のうちの6個を含む6.7kbの領域を欠失した欠失多型が存在し、興味深いことに、欠失アリル頻度は、日本を含む東アジア集団において顕著に高く(日本人:71.0%、ドイツ人:18.5%) [1, 2]、東アジア集団における正の自然選択が想定されているが[3]、その選択圧は明らかでない。

LILR ファミリー遺伝子多型と自己免疫疾患との関連はしばしば報告されているが、*LILRA3*についても、ドイツ人集団において、欠失アリルと多発性硬化症 (MS) [2]、Sjögren 症候群 (SS) との関連が報告されている [4]。一方、近年、中国人集団における研究で、関節リウマチ (RA) [5] および全身性エリテマトーデス (SLE) [6] において、逆に非欠失アリルが関連すると報告されている。

国内外を通じて、これまで、全身性強皮症 (SSc) と *LILRA3* 欠失多型との関連を検討した報告はない。われわれは今回、日本人集団における SSc およびそのサブセットと *LILRA3* 欠失多型との関連研究を行った。

B. 研究方法

日本人 SSc 378 例、健常対照群 867 例のゲノム DNA を用いて関連研究を施行した。SSc 群のうち、127 例は dcSSc、231 例は lcSSc と分類された。88 例は抗 topoisomerase I 抗体陽性 (ATA+)、172 例は抗 centromere 抗体陽性 (ACA+)、8 例は両方の抗体が陽性であった。また、151 例が間質性肺障害 (ILD) を

合併していた。

LILRA3 欠失多型の遺伝子型解析は、欠失領域内部に primer を置いた PCR (非欠失アリルのみを増幅) と、欠失領域をはさんで両側に primer を置いた PCR (欠失アリルのみを増幅) を用いた multiplex PCR により施行した [1]。

(倫理面への配慮)

本研究は、筑波大学、金沢大学、国立病院機構相模原病院およびその他の試料収集施設における倫理委員会において審議され、承認を受けた研究計画に従い、遺伝子解析に関するインフォームドコンセントを得、匿名化した試料を用いて施行されたため、研究の施行に倫理面の問題はないと判断された。

C. 研究結果

対照群および患者群の遺伝子型頻度に、Hardy-Weinberg 平衡からの有意な逸脱は見られなかった。

SSc 全例と健常対照群との比較では、*LILRA3* 欠失との有意な関連は検出されなかった。しかし、SSc の各サブセットと健常対照群とを比較したところ、ATA+SSc 群において、欠失アリルが有意に増加していた (アリルモデル: $P=0.012$, オッズ比 [OR] 1.68, 95% confidence interval [CI] 1.12–2.52, 劣性モデル: $P=0.013$, OR 1.81, 95% CI 1.14–2.89)。

一方、ACA+SSc と健常対照群の比較では、有意な関連が検出されなかった。

ATA+ACA-SSc 群と ATA-ACA+SSc 群の比較に