

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

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

平成23年度～平成25年度 総合研究報告書

研究代表者 桃原 茂樹

平成26(2014)年 5月

目 次

I . 総合研究報告	
ゲノム網羅的関連解析の大規模メタ解析を基盤としたcommon diseaseのテーラーメイド医療 実用化に関する研究-----	3
桃原 茂樹 東京女子医科大学	
分担研究報告	
1 . 関節リウマチ発症に関わるNF- B関連遺伝子の多型・変異に関する研究-----	11
山本 一彦 理化学研究所ゲノム医科学研究センター	
2 . 次世代シーケンサーを用いた関節リウマチ関連rare variantの探索に関する研究---	17
松田 文彦 京都大学	
3 . 抗CCP抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索に関する研究-----	23
三森 経世 京都大学	
4 . 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-----	29
山田 亮 京都大学	
II . 研究成果の刊行に関する一覧表-----	33
III . 研究成果の刊行物・別刷-----	39

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	PPIL4	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	

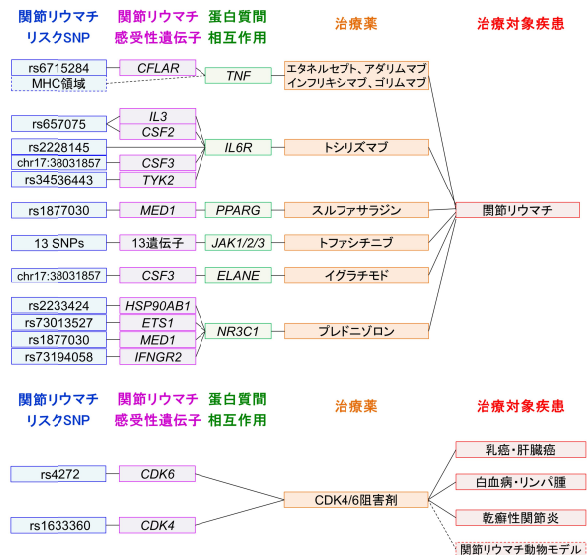
(赤字: 本研究で新規同定した 42 の感受性遺伝子領域)

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

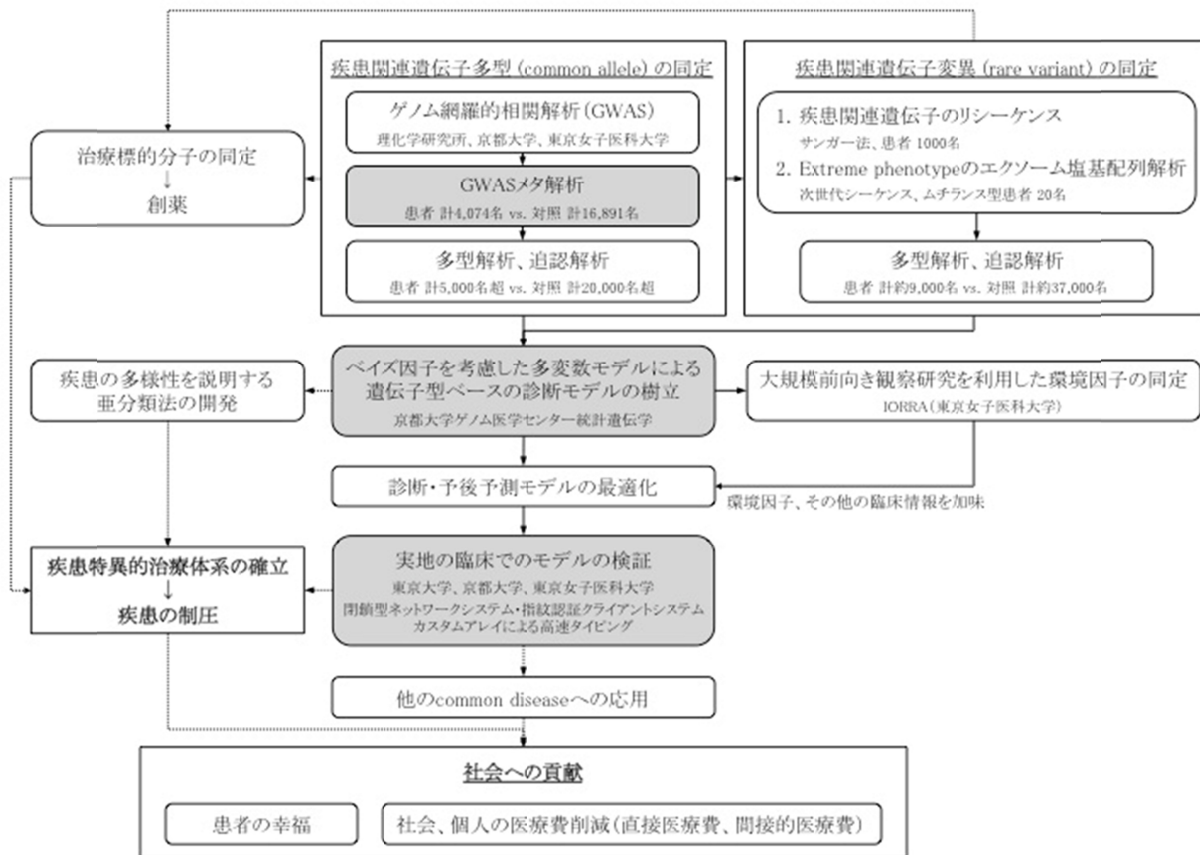
3. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Kaji K, Komura K, Hasegawa M, Koder M, Muroi E, Fujikawa K, Seshima M, Yamada H, Yamada R, Sato S, Takehara K, Kuwana M. Common and Distinct Clinical Features in Adult Patients with Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies: Heterogeneity within the Syndrome.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



厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

関節リウマチ発症に関わる NF- B 関連遺伝子の多型・変異に関する研究

研究分担者 山本一彦

理化学研究所統合生命医科学研究センター チームリーダー

研究協力者 同 高地雄太，明前敬子

研究要旨：我々は関節リウマチ（RA）のゲノムワイド関連解析によって、100以上の感受性遺伝子領域を明らかにしてきたが、その中には炎症において重要と考えられる NF- B シグナルパスウェイに関わる遺伝子が多く含まれる。このうち、*NFKB1E* および *RTKN2* 遺伝子領域に注目し、疾患の原因となっている機能性多型の探索同定を行った。その結果、*NFKB1E* には2つの非同義一塩基多型（nsSNP）と1つの制御性 SNP（rSNP）が存在し、遺伝子機能を質的・量的に変化させることが明らかになった。同様に、*RTKN2* 遺伝子領域には、2つの rSNP が遺伝子発現を調節していることが明らかになった。各遺伝子多型は、連鎖不平衡にあり、ハプロタイプで協調して疾患発症に寄与している可能性が考えられた。また、いずれの遺伝子においても、疾患の発症のリスクを有するハプロタイプにおいて、細胞内の NF- B 活性を高めることが明らかになった。次に、RA 発症に関わる稀な変異（rare variant）を明らかにするため、NF- B 遺伝子ファミリーに注目し、次世代シーケンサーによるターゲット・リシーケンシングを行った。ケース・コントロール関連解析の結果、NF- B 遺伝子群には疾患に関わる rare variants が集積していることが明らかになった（ $P=0.0037$ ）。特に *IKBKAP* および *RELA* 遺伝子において、ケース群において rare variants の数が有意に多くみとめられたため、これらの variant は疾患発症のリスク因子となっている可能性が考えられた。今後、これらの解析で明らかになった多型および変異を用いた個人の病態予測法の樹立、およびこれらの遺伝子を標的とした治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

我々はこれまでに、関節リウマチ（RA）のゲノムワイド関連解析（GWAS）およびそのメタ解析によって、100を超える遺伝子領域が疾患発症に関与していることを明らかにしてきた。なかでも、*NFKB1E*、*RTKN2*、*TNFAIP3*、*REL*、*TRAF1*、*CD40* といった NF- B シグナルに関与する遺伝子を多く含むことが RA の遺伝因子の特徴と考えられる。NF- B は免疫・炎症反応における多くの遺伝子の発現制御に関与する転写因子であり、RA においても重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、同定された NF- B 関連遺伝子領域の多くでは、原因となっている遺伝子多

型が明らかでなく、疾患発症に関与する機序は不明である。本研究ではこれらの遺伝子のうち、日本人で特に寄与の高い *NFKB1E* (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon) および *RTKN2* (Rhotekin 2) 遺伝子領域に注目して、疾患の原因となりうる多型の探索およびその機能解析を行った。また、両遺伝子の多型が NF- B 活性に与える影響も評価した。

RA の発症には、GWAS で明らかになった集団での頻度の高い多型以外にも、集団での頻度の低い変異（rare variant）の関与についても示唆されている。このこ

とを明らかにするため、NF- κ B シグナル伝達経路における主要 16 遺伝子 (NF- κ B ファミリー、I κ B ファミリー、IKK ファミリー) について、ターゲット・リシークエンシングによる rare variants の同定を行い、疾患発症との関連解析を行った。

B. 研究方法

1) *NFKB1E* と *RTKN2* 遺伝子領域の多型解析

原因となっている多型の探索・同定のために、in silico および in vitro の方法を組み合わせた多型の評価を行った。まず、各種ゲノムデータベース (HapMap プロジェクト、1000 ゲノムプロジェクト) より、*NFKB1E* および *RTKN2* 周辺領域の一塩基多型 (SNP) を抽出した。これらのうち、翻訳領域にあるものについては、アミノ酸配列の置換をもたらすかどうか評価した。非翻訳領域にあるものについては、転写活性に影響を与える可能性が考えられたため、SNP 周辺配列について、配列の保存性や homology から算出される Regulatory Potential (RP) score、および各種エピゲノムデータベース (ChIP-seq や DNase-seq) のデータを用いて、遺伝子発現制御に与える影響を in silico に評価した。次に、遺伝子発現に影響を与えている可能性の高い多型周辺配列については、ゲルシフトアッセイによる核内タンパクの結合の評価、およびルシフェラーゼアッセイによる転写増強・抑制活性の評価を in vitro に評価を行った。

2) NF- κ B 関連遺伝子のターゲット・リシークエンシング

RA 患者群 563 検体および健常人群 564 検体について、次世代シーケンサー (Ion PGM) を用いて NF- κ B 関連遺伝子のコーディング領域をターゲットとしたシーケンスを行った (表 1)。ライブラリ調整には Haloplex Target Enrichment (Agilent) を用い、read の trimming、

mapping、および variant の検出には CLC genomics workbench (CLC bio) を用いた。検出した variants から 1000 Genome project のアジア人集団 (日本人+中国人、計 287 人) においてマイナーアレルの頻度が 0.01 以下の variant およびデータベース上に登録されていない variant (unique variant) を解析に用いた。さらに、variant が遺伝子機能に与える影響を in silico で評価するソフトである SIFT を用いて、遺伝子機能にダメージを与えると予測された variant を関連解析の対象とした。関連解析にはロジスティック関連解析および Sequence Kernel Association Tests (SKAT) を用いた。

表 1. NF- κ B 遺伝子ファミリー

遺伝子	長さ (bp)	機能
Iκ-B kinase (IKK)		
<i>IKBKA</i>	2238	I κ -B のリン酸化
<i>IKBKB</i>	2271	
<i>IKBKE</i>	2151	
<i>IKBKG</i>	1464	
<i>IKBKAP</i>	3999	
Iκ-B		
<i>NFKBIA</i>	954	NF- κ B の抑制
<i>NFKBIB</i>	1071	
<i>NFKBID</i>	942	
<i>NFKB1E</i>	1503	
<i>NFKBIZ</i>	2157	
<i>BCL3</i>	1365	
NF-κB		
<i>REL</i>	1860	転写制御
<i>RELA</i>	1656	
<i>RELB</i>	1736	
<i>NFKB1</i>	2907	
<i>NFKB2</i>	2703	
合計	30977	

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

1) *NFKB1E* と *RTKN2* 遺伝子領域の多型解析

NFKB1E、*RTKN2*の各遺伝子翻訳領域には、アミノ酸置換を伴う非同義 SNP (non-synonymous SNP ; nsSNP) が、各 2 個ずつ存在し、これらの組み合わせで、それぞれ二つのハプロタイプを構成していた。

これらの nsSNP が遺伝子機能に与える影響を、NF- κ B リポーターアッセイで評価したところ、*NFKB1E* のリスクハプロタイプで、NF- κ B 活性が上昇することが明らかになった (図 1)。

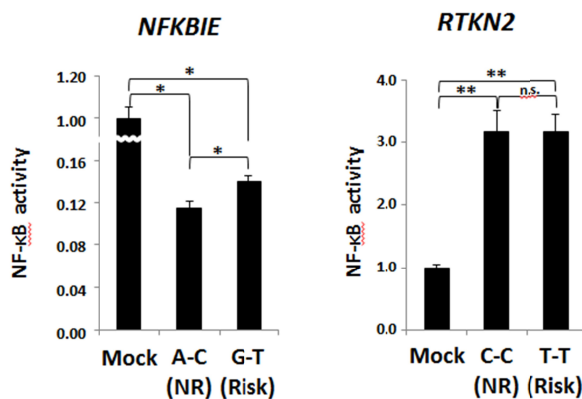


図 1. 各遺伝子が NF- κ B 活性に与える影響

NFKB1E は NF- κ B 活性を抑制するタンパクである I κ B をコードするため、リスクハプロタイプではこれらのアミノ酸置換 (P175L および V194A) で、I κ B の抑制能が低下することが示唆された。一方で、*RTKN2* 遺伝子では、リスクハプロタイプと非リスクハプロタイプでは、NF- κ B 活性へ与える影響の差は認められなかったため、これらのアミノ酸置換がタンパク機能に与える影響は小さいと考えられた。

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

Step	解析領域の定義	<i>NFKB1E</i> 6p21.1 44,336,140 - 44,394,125	<i>RTKN2</i> 10q21.2 61,610,652 - 63,739,041
Step 1	疾患と強い関連を認めた SNP を含む LD ブロック $P < 1.0 \times 10^{-2}$ in the GWAS		
Step 2	パブリックデータベースから SNP の抽出		
	A) 1000G (JPT+CHB+CHS: 177 検体) B) HapMap (JPT: 90 検体)	111 SNPs	207 SNPs
Step 3	発現制御への in silico での評価		
	3a) Regulatory Potential (RP) score	53 SNPs	97 SNPs
	3b) ChIP-seq and DNase-seq data A) Transcription factor binding B) Histone modification C) DNase hypersensitivity	21 SNPs	10 SNPs
Step 4	疾患との関連の評価 Imputation-based GWAS data $P < 0.05$	14 SNPs	10 SNPs
Step 5	in vitro の系を用いた評価		
	5a) Electrophoretic mobility shift assay 5b) Luciferase assay	3 SNPs 1 SNPs	6 SNPs 2 SNPs

図 2. 各遺伝子領域の制御性多型の同定

その結果、*NFKB1E* 領域に 1 SNP、*RTKN2* 遺伝子領域に 2 SNP の遺伝子発現を制御する候補多型が明らかになった。これらの多型は転写因子の結合を量的に変化させることによって転写活性に影響を与えているものと考えられた。*NFKB1E* 遺伝子の多型 (rs22332424) では、リスクアレルで転写活性が下がり (図 3)、一方で、*RTKN2* 遺伝子の候補多型 (rs61852964、rs12248974) は、いずれもリスクアレルで遺伝子発現量を増加させた (図 4)。*NFKB1E* が NF- κ B 活性を負に制御し、*RTKN2* が正に制御することを考慮すると、いずれの多型もリスクアレルで NF- κ B 活性を量的に高めることが考えられた。

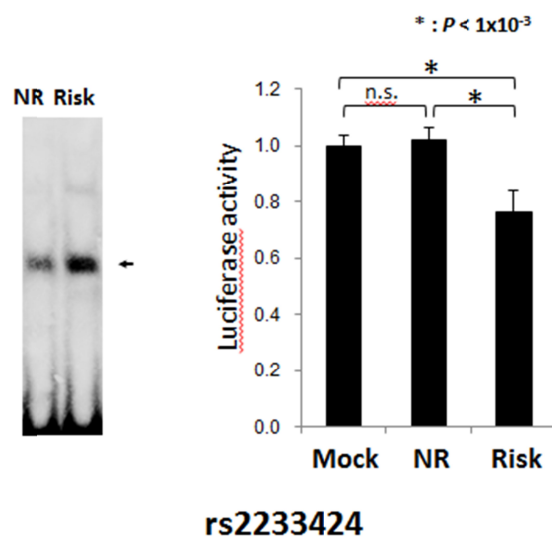


図 3. *NFKB1E* の発現制御多型

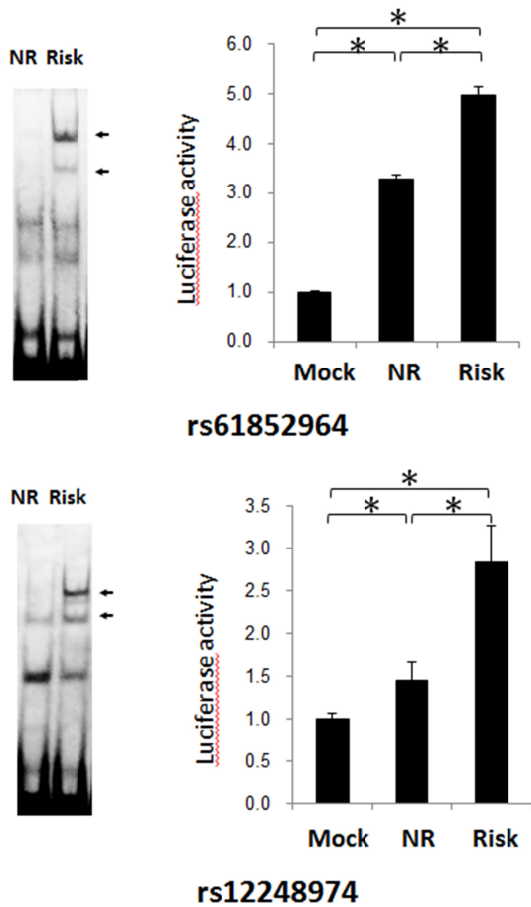


図4. *RTKN2* の発現制御多型

2) NF- B 関連遺伝子のターゲット・リシーケンシング

NF- B 関連 16 遺伝子のうち、15 遺伝子において遺伝子機能に影響を与えると予測される rare variant が同定された。コントロールでの各遺伝子の rare variant の数を比較すると、0~13 個と遺伝子間で差を認めた。まず、これらの variant の数を全遺伝子まとめたうえでケース・コントロール関連解析を行ったところ、有意な関連を認めた ($P < 0.05$)。次に、遺伝子ごとに関連解析を行ったところ、*IKBKAP*、*RELA*、*RELB* 遺伝子において、ロジスティック回帰分析もしくは SKAT において有意な関連を認めた (次頁・表 2、 $P < 0.05$)。*RELB* 遺伝子においては、コントロールでの variant の頻度が高かったため、これらの variant は疾患に対して防御的に働いている可能性が考えられた。一方で、*IKBKAP*、*RELA* では

ケースにおいて、variant の数が多く、疾患発症に対してリスク因子となっていると考えられた。特に、*RELA* 遺伝子においては、ケースのみに rare variant が集積しており、一部の variant は rel homology domain (RHD) と呼ばれる遺伝子機能に重要と考えられるドメインに存在していた (表 3)。

表 2. 関連解析結果

遺伝子	SNV の数	変異アレルの数		関連解析	
		ケース	コントロール	ロジスティック回帰分析	SKAT
<i>IKBKA</i>	2	1	1	0.25	0.67
<i>IKBKB</i>	4	4	3	0.14	0.24
<i>IKBKE</i>	5	18	13	0.32	0.45
<i>IKBKG</i>	1	1	0	0.24	0.48
<i>IKBKAP</i>	13	20	10	0.024	0.082
<i>NFKBIA</i>	0	0	0	-	-
<i>NFKBIB</i>	4	6	1	0.26	0.073
<i>NFKBID</i>	1	0	1	0.24	0.51
<i>NFKBIE</i>	1	1	0	0.24	0.48
<i>NFKBIZ</i>	5	5	2	0.32	0.43
<i>BCL3</i>	3	11	8	0.51	0.68
<i>REL</i>	4	4	4	0.43	0.77
<i>RELA</i>	4	5	0	0.14	0.015
<i>RELB</i>	3	5	9	0.012	0.030
<i>NFKB1</i>	4	2	3	0.14	0.21
<i>NFKB2</i>	3	2	2	0.43	0.93
全遺伝子	57	85	57	0.0037	0.027

表 3. *RELA* 遺伝子の rare variant

染色体	染色体位置	レファレンスアレル	変異アレル	変異アレルの数		アミノ酸変化
				ケース	コントロール	
11	65425877	C	T	1	0	Arg253Gln
11	65425839	C	G	1	0	Val266Leu
11	65422363	G	A	1	0	Pro381Leu
11	65421986	C	T	2	0	Ala507Thr

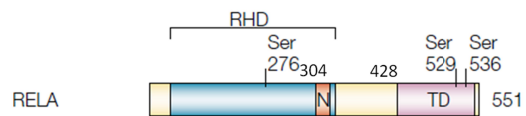


図 5. *RELA* の遺伝子構造

D. 考察

NFKBIE、*RTKN2* 遺伝子領域において、疾患原因となりうる機能性多型の探索を行ったが、両領域ともに複数の候補多型が明らかになった (*NFKBIE*、2 nsSNPs、1 rSNP; *RTKN2*、2 rSNP、図 5)。*NFKBIE*

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

同様に、*RTKN2* の2つのrSNP (rs61852964 および rs12248974) は、強い連鎖不平衡にあり、いずれもリスクアレルで発現が増加する。*RTKN2* は主にCD4陽性T細胞に発現し、Rho binding domainを持つことからRho-effectorタンパクであることが示唆されている。強制発現株の解析では、NF B 活性を増強することが知られているが、リスクアレルで*RTKN2*の発現量が高くなることは、T細胞におけるNF- B 活性の増強が疾患発症に関与していることを示唆するものである。

一方で、RA患者検体を用いたNF- B 遺伝子ファミリー遺伝子のターゲット・リシークエンシングおよび関連解析を行うことによって、これらの遺伝子群に疾患発症に関わるrare variantが集簇していることが明らかになった。特に、*IKAP* および *RELA* 遺伝子においては、ケースにおいてvariantの数が多いため疾患へのリスク因子になっていると考えられる。GWASで明らかにされた疾患感受性多型は集団での頻度の高いcommon variantであり、遺伝子の機能へ与える機能は小さいものが多いと考えられている。一方で頻度の低いrare variantについては十分な自然選択を経ていないものも多く、遺伝子機能に与えるインパクトの大きいもの

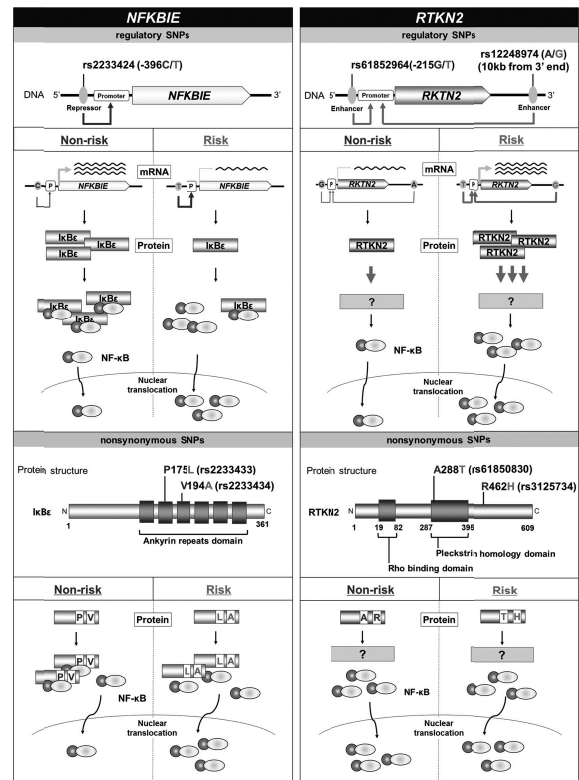


図6. *NFKBIE* および *RTKN2* 遺伝子の候補原因多型

も存在すると考えられている。したがって、rare variantが個人の病態に与える影響も大きいことが考えられる。関連解析の結果からは *IKBKAP* および *RELA* の rare variantが疾患発症に関与していることが示唆されたが、個々のvariantが実際に病態に関与しているかについては、in vitroの解析系などを用いてvariantの遺伝子機能へ与える影響を評価する必要がある。また、各遺伝子の関連は多重検定の補正を行うと有意性が消失するため、別セットを用いた追認解析が必須である。

E. 結論

RAのGWAS候補2遺伝子 *NFKBIE*、*RTKN2* の多型機能解析によって候補原因多型の同定を行った。これらの多型はリスクアレルを有することによりNF- Bの活性化が亢進し、関節リウマチの感受性を高めていると考えられる。また、NF- Bファミリーに遺伝子におけるrare variants解析では、NF- Bファミリー遺

伝子群に疾患と関わる rare variant が集簇していることが明らかになった。これらのことから、NF- B パスウェイ遺伝子は、RA における有力な治療標的であると考えられ、これらの多型・変異を用いた個人の病態予測モデルの開発につながることを期待される。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1). Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, et al. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. Nat Genet, 2012. 44(5): 511-6.

2). Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, et al. 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(9): e1002949.

3). 高地 雄太 関節リウマチのゲノム解析でわかったこと. Medical Practice, 2013. 30(4): 552-6.

4). 高地 雄太 日本人の関節リウマチ疾患感受性遺伝子. 炎症と免疫, 2013, 21(2): 72-6.

5). Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. Nature, 2014. 506(7488):376-81.

2. 学会発表

1). Myouzen K et al. Functional variants of NFKBIE and RTKN2 genes are associated with rheumatoid arthritis susceptibility in Japanese

The American Society of Human Genetics 2012 Annual Meeting in San Francisco.

2). 高地 雄太 関節リウマチ感受性遺伝子の同定および機能解析 人類遺伝学会, 2013

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得

本研究と関連するものはなし。

2. 実用新案登録

本研究と関連するものはなし。

3. その他

本研究と関連するものはなし。

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

次世代シーケンサーを用いた関節リウマチ関連 rare variant の探索に関する研究

研究分担者 松田 文彦 京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター 教授
研究協力者 寺尾 知可史 同 特定助教

研究要旨:関節リウマチ(RA)において、これまで SNP アレイに基づいた全ゲノム関連解析がその遺伝的背景の解明に大きな役割を果たしてきたが、これまでの解析で見出せなかった頻度が稀な疾患感受性遺伝子多型が RA 病態に関わっている可能性がある。それら稀な変異を同定するために、RA 家系例および非家系例の DNA を用いて次世代シーケンサーにて全エクソン領域塩基配列決定を行った。非家系例では 69 例の RA 患者群の結果を基に、関節破壊の重篤な 68 例を用いて追認解析を施行し、有意水準に到達した 1 領域を含む合計 8 領域の候補を同定した。家系例については、SNP アレイも併用した。その結果、染色体 3 番上の領域の関与が強く示唆された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センターを受診した RA 患者のうち、濃厚な家系例を示す一家系 8 名(患者を含めた同胞の 8 名のうち 4 名罹患)および、関節破壊の進行の早い RA 患者 69 名の合計 77 名を対象とした。末梢血白血球から DNA を抽出し、理化学研究所にてアジレント社の sureselect を用いてエクソーム濃縮を行い、イルミナ社の次世代シーケンサーである HiSeq を用いて全エクソームシーケンスを行った。それらデータを元に理化学研究所の統計解析チームにより既に確立された塩基配列決定法により、RA 患者の各塩基配列を決定した。京都大学医学研究科附属ゲノムセンターにて収集された健常者 302 例の末梢血白血球から DNA を抽出し、そのうち、99 名の DNA を用いてライフテクノロジーズ社の

kit にてエクソーム濃縮を行い、同社の次世代シーケンサーである SOLID を用いて全エクソームシーケンスを行った。それらデータを元にゲノム医学センターにて確立された塩基配列決定法により、対照群の各塩基配列を決定し、公開データベース(DBSNP, 1000 人ゲノム, EDP)および理研の in-house データベースのデータを基に de novo mutation(新規遺伝子変異)の決定を行い、RA に認められる de novo mutation の検索を行った。さらに、de novo mutation に限らず、稀な exon 上の変異の分布の偏りを遺伝子ごとに評価を行った(C-alpha テスト)。また、次世代シーケンサーの異なるプラットフォームによる結果の乖離を避けるため、別の対照群として、Case と同じ手法によってタイピングされた理化学研究所の他疾患のデータを用い、de novo mutation の確定を行った(第一セット)。遺伝子ごとに de novo mutation に着目して変異を持つ個体が RA 群に集積されているかを Fisher の正確確率検定で評価した。その結果を、東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センターおよび京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センターにて収

集された関節破壊の重篤な 68 例と健常者 178 例の DNA を用いて追認解析を行った(第二セット)。追認解析では、第一セットと同様に sureselect にてエクソーム濃縮及び HiSeq による全エクソームシーケンスを行い、RA 群・対照群の各塩基配列を決定し、第一セットと同様に RA 群に de novo mutation 保有個体が集積していないかを検定し、第一および第二セットの結果を統合した。

家族例については疾患群 4 例と非疾患群 4 例の比較を行い、疾患の遺伝型を常染色体優性あるいは常染色体劣性と推定し、分布の不均衡を示す de novo mutation および遺伝子領域、染色体領域の解析を行った。また、Illumina 社 Infinium Human Core Exome アレイを用いて SNP genotyping を行い、近縁関係の評価と染色体領域の絞り込みを行った。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

主に平成 23 年度は検体の集積とシーケンスに注力した。平成 24 年度より本格的な解析を開始した。家系例・非家系例ともに 10 回以上読まれた変異のみ解析に採用した。サンプルは call 成功率 80% のサンプルを採用した。非家系例では遺伝的に近縁関係にあると推定されたサンプルおよびコンタミネーションが疑われたサンプルは除外した。変異ではサンプルの Call 成功率が低いものは除外した。

非家系例について
対照群として SOLID にてシーケンスされたデータを用いた解析では、全遺伝子変異は 86941 個であり、疾患群の変異平均 Call 成功率は 91.4%、対照群は 69.6%であった。

非家系例について de novo mutation に着目した解析を行い、12552 の de novo mutation を同定した。4 名に変異を認めるものを 4 つ、3 名に変異を認めるものを 17 同定した。複数人に認める de novo mutation を複数持つ遺伝子は 8 つであった。C-alpha テストでは対照群でアレル頻度 2.5% 以下の変異で Call 成功率 90% 以上の多型を対象に解析を行った結果、3203 遺伝子が少なくとも一つの変異を含んでおり、p 値 0.0005 以下を示す領域を 12 同定した。一方で、第二セットでは 17 の de novo mutation の中で 5 つの SNV について RA に同一の変異を同定したが、いずれも対照群にも存在するか、RA1 例のみであった。第二セットを対象とした C-alpha テストでは、染色体 12 の遺伝子一つが p 値 0.00036 を示した。

平成 25 年度は対照群も HiSeq のデータを用いた解析を行った。第一セットで p 値が 0.05 以下と RA に de novo mutation の濃縮を認めたものは 216 遺伝子であった。これらの内、7 遺伝子が追認解析にても 0.1 以下の p 値を示した。また、メタ解析では、合計 8 遺伝子が合計 p 値 <0.001 を示した。もっとも強い関連を示した遺伝子は染色体 21 番上にある遺伝子で、 $p=2.1 \times 10^{-6}$ であった。一方で、過去の論文ではこの遺伝子について免疫学的な機能は報告されていなかった。現在、de novo mutation について、日本人難病データベースを参照して定義しなおした場合のより厳密な mutation について再計算を行っている。

家系例について

家系例については 8 名共に塩基配列が決定された遺伝子多型は 75395 個であり、内 19455 個が少なくとも一つの変異を家系内で認めた。常染色体優性遺伝を想定し、解析を行った。1000 個の変異が患者群にのみ変異を認めた。113 個が罹患患者 4 名のみに変異を認めた。罹患患者 4

名にのみ変異を認める de novo mutation は3つのみであり、その全てが3番染色体上にあり、アミノ酸変異をもたらすものであった。また、他の variant の分布の評価から、染色体3番の多くの領域が罹患患者4名で共有されている可能性が示された。また、常染色体劣性遺伝を想定し、common variant に着目したイルミナ社のインフィニウムアレイを用い、8名の genotyping を行った。このタイピング結果から、8名の遺伝学的な関係の強さを通して家族関係を確認した。また、Case と Control の比較から、染色体3番の約 1.1Mbp の領域を Case が共有していることを確認した。その領域上に Case が4人とも variant のホモを持ち、Control が全員 hetero の遺伝子型である rare variant は同定されなかった。

D. 考察

平成24年度の解析における Case と Control の Call 成功率の差は、エクソーム濃縮の手法およびシーケンサーの違いと塩基配列決定アルゴリズムの相違によるものと考えられた。Call 成功率の問題や機械間の違いを避けるためには、平成25年度からデータが揃った、CaseControl 共に同手法を用いた解析がより信頼を置けるものと考えた。

非家系例については最も強い p 値は 2.1×10^{-6} に達し、これは解析対象とした遺伝子全体の数で多重検定の影響を補正しても有意な水準であったが、この遺伝子に免疫学的な機能の報告がないこと、200 kb 以上とかなり長い遺伝子であることから、結果的に濃縮して見えている可能性も含め、慎重な検討が必要であると考えられた。RA に集積する特定の de novo mutation は明らかでなかった。C-alpha テストでは前回の報告と同じ遺伝子が低い p 値を示したが、今回の解析では特定の 1SNV が RA 群に集積していたためであり、慎重な評価が必要であると思われた。SNV の機能解析や遺伝子その

ものの機能解析によって RA の病態解明につながるものと考えられる。

家系例については祖先由来の3番染色体が強い浸透率を持って RA 発症にかかわっている可能性があると考えられた。3番染色体は、これまでの全ゲノム関連解析において RA 発症との関連を示した領域は欧州人、アジア人共にごくわずかであり、それら遺伝子には疾患群のみに認める de novo mutation は認めず、他の遺伝子領域の関与が疑われた。この領域の機能解析により新規の RA 発症機能の解明につながる可能性がある。家系例について疾患群4例のみに認められた de novo mutation は非家系例については第一・第二セットともに一例も認めず、同じ遺伝子領域の de novo mutation の疾患群の集積は明らかでなく、原因領域同定の手掛かりは得られなかった。SNP アレイにて情報を補完したが、領域を一つに決定するには至らなかった。また、罹患同胞の子供の世代は発症していないが、候補領域の機能解析に加えて今後のフォローアップによって、有益な情報が得られる可能性がある。

E. 結論

非家系例では、合計8領域の RA 発症関連領域候補が選定された。最も強い関連を示した染色体21番の領域は有意水準に到達していた。家系例では染色体3番の疾患への関与が強く示唆された。遺伝的多型や遺伝子そのものの機能解析によって領域の絞り込みや多型の決定、引いては RA の疾患発症機序の解明につながるものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

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(12):2134-9. (査読有)

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(6):1095-7 (査読有)

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, Sumida T, Yamanaka H, Takasaki Y, 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. 2012;8(1):e1002455 (査読有)

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(5):511-6. (査読有)

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. (査読有)

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(7):e40067 (査読有)

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- B Pathway Are Associated with Rheumatoid Arthritis in Japanese. PLoS Genet. 2012 Sep;8(9):e1002949. (査読有)

Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, Kochi Y, Ohmura K, Suzuki A, Yoshida S, Graham R, Manoharan A, Ortmann W, Bhangale T, Denny J, Carroll R, Eyler A, Greenberg J, Kremer J, Pappas D, Jiang L, Yin J, Ye L, Su D, Yang J, Xie G, Keystone E, Westra H, Esko T, Metspalu A, Zhou X, Gupta N, Mirel D, Stahl E, Diogo D, Cui J, Liao K, Guo M, Myouzen K, Kawaguchi T, Coenen M, van Riel P, van de Laar M, Guchelaar H, Huizinga T, Dieude P, Mariette X, Bridges SL, Zhernakova A, Toes R, Tak P, Miceli-Richard C, Bang SY, Lee HS, Martin J, Gonzalez-Gay M, Rodriguez-Rodriguez L, Rantapaa-Dahlqvist S, Arlestig L, Choi H, Kamatani Y, Galan P, Lathrop M, the RACI Consortium, the GARNET consortium, Steve Eyre S, Bowes J, Barton A, de Vries N, Moreland L, Criswell L, Karlson E, Taniguchi A, Yamada R, Kubo M, Liu J, Bae S, Worthington J, Padyukov L, Klareskog L, Gregersen P, Raychaudhuri S, Stranger B, De Jager P, Franke L, Visscher P, Brown M, Yamanaka H, Mimori T, Takahashi A, Xu H, Behrens T, Siminovitch K, Momohara S, Matsuda F, Yamamoto K, Plenge RM
Genetics of rheumatoid arthritis

contributes to biology and drug discovery Nature 2014 (in press) (査読有)

2. 学会発表

2011年5月

2011年ヨーロッパリウマチ学会 ロンドン

‘ A HAPLOTYPE OF THE HUMAN AIRE GENE IS ASSOCIATED WITH THE RISK FOR RHEUMATOID ARTHRITIS IN JAPANESE POPULATION ’

2011年11月

2011年アメリカリウマチ学会 シカゴ

‘ A Large-Scale Association Study Identified Multiple HLA-DRB1 Alleles Associated with Anti-Citrullinated Peptide Antibody Negative Rheumatoid Arthritis in Japanese ’

2012年6月

2012年ヨーロッパリウマチ学会 ベルリン

‘ ACPA-NEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS CONSISTS OF TWO GENETICALLY DISTINCT SUBSETS BASED ON RF POSITIVITY ’

2012年12月

2012年免疫学会 千葉

‘ Three groups of joint synovitis in rheumatoid arthritis -analysis in KRAMA database- ’

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

抗 CCP 抗体陰性関節リウマチの原因遺伝子検索に関する研究

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 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 講師
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

研究要旨: 抗 CCP 抗体陰性は関節リウマチ (RA) の特異抗体であり、RA の約 20% を占める。RA 全体もしくは抗 CCP 抗体陽性 RA の感受性 (原因) 遺伝子は HLA をはじめ多くの遺伝子が同定されているが、抗 CCP 抗体陰性 (RA) の感受性遺伝子は HLA を含めてほとんど同定されていない。その原因はまず比較的希少疾患であるため十分な検体数が得られないためであるが、本研究では 1572 例の抗 CCP 抗体陰性 RA 検体を収集し、全ゲノム関連解析 (GWAS) および上位遺伝子の追認解析を行った。ゲノムワイドの有意差に至る遺伝子多型は同定されなかったが、suggestive な遺伝子多型 3 つを同定した。また、抗 CCP 抗体陽性 RA の感受性遺伝子の odds ratio を抗 CCP 抗体陰性 RA のそれと比較するとよい相関がみられ、HLA 以外の多くの関連遺伝子は抗 CCP 抗体陽性 RA と陰性 RA で共有されていることが示唆された。

A. 研究目的

抗 CCP 抗体陰性 RA の原因遺伝子を探索し、その診断・治療・病態解明に役立つ分子を同定する。

B. 研究方法

本研究班班員はもとより、全国の関連病院から抗 CCP 抗体陰性 RA の DNA 検体を収集した。

まず、Biobank, 京都コホート、東京女子医科大学 IORRA コホートからの RA GWAS data から抗 CCP 抗体陰性症例のみを抽出。Inverse-variance 法を用いてメタ解析を行った。P 値の上位から 35 領域の Tag-SNP を選択、916 例の抗 CCP 抗体陰性 RA と 3764 例の健常人コントロールを用いて TaqMan 法でタイピング、追認解析を行った。GWAS データと追認解析データを Inverse-variance 法を用いてメタ解析を行った。

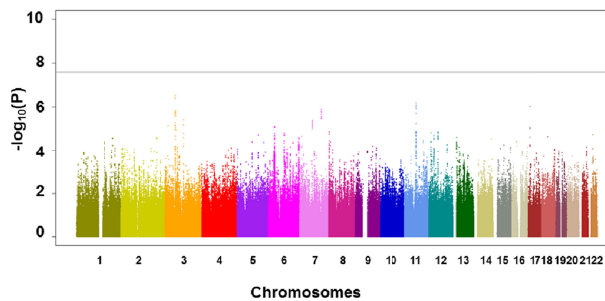
(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子情報を扱う臨床研究であることから「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」「臨床研究に関する倫理指針」およびヘルシンキ宣言 (2004 年改訂) を遵守する。本研究は京都大学医学部医の倫理委員会および各研究機関においても倫理委員会で協議、承認されている。

C. 研究結果

RA 670 例 vs control 16891 例の GWAS 結果を図 1 に示す。

図 1 . 抗 CCP 抗体 (-) RA の 3 つの GWAS をメタ解析したマンハッタンプロット (患者 670 例 対 対照 16891 例)



$P < 5 \times 10^{-8}$ の GWAS 有意水準の有意差を示す多型は見つからず、上位 35 個の遺伝子領域の Tag-SNP を選択し、916 例の抗 CCP 抗体陰性 RA と 3764 例の健常人コントロールを用いて追認解析を行った。GWAS とのメタ解析を行った上位 3 遺伝子の結果を表 1 に示す。

表 1 . 抗 CCP 抗体(-)RA の関連解析上位遺伝子

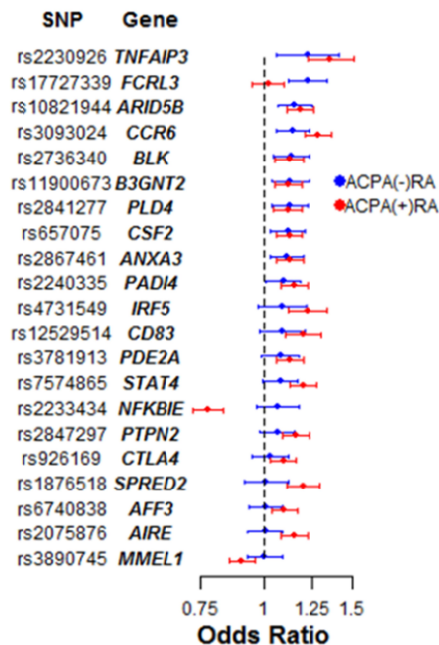
染色体	遺伝子	p	Odds比
6	LEMD2	5.7×10^{-8}	0.77
8	CSMD1	2.4×10^{-6}	0.83
1	FCRL3	1.4×10^{-5}	0.82

抗 CCP 抗体(-)RA の GWAS および上位遺伝子の追認解析をメタ解析し、 p 値の上位 3 遺伝子領域を示した。

以上から GWAS 有意水準を満たす遺伝子領域は同定されなかったが、いずれも suggestive な関連を示している。

次に、通常の RA (80%は抗 CCP 抗体陽性) と関連が過去に示された遺伝子が抗 CCP 抗体陰性 RA と関連をしめすかどうかを検討した。これまでに日本人で RA との関連が示された 21 遺伝子領域につき、GWAS メタ解析のデータから抗 CCP 抗体 (+)RA と抗 CCP 抗体 (-)RA のデータを抽出し effect size (odds ratio) を比較した (図 2)。

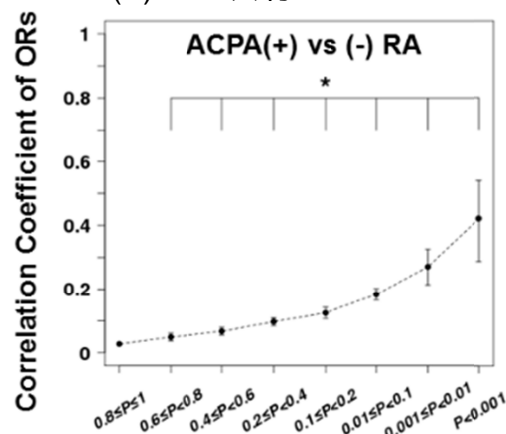
図 2 抗 CCP 抗体 (+)RA 関連遺伝子の odds ratio と抗 CCP 抗体 (-)RA における odds ratio の比較



日本人 RA の関連遺伝子 21 個につき、抗 CCP 抗体 (+)RA での Odds ratio (OR) と抗 CCP 抗体 (-)RA の OR を並べて表示した。

また、GWAS メタ解析データにおいて抗 CCP 抗体 (+)RA での p 値を階層化し、各階層にある SNP の OR を抗 CCP 抗体 (+)RA と抗 CCP 抗体 (-)RA とで比較した場合の相関係数を図 3 に示した。

図 3 関連の弱い遺伝子多型も ACPA(-)RA と ACPA(+)RA で共有されている



抗 CCP 抗体 (+)RA との関連を示した各遺伝子多型の p 値で階層化し、各階層の中で SNP の抗 CCP 抗体 (+)RA と抗 CCP 抗体 (-)RA の OR の相関係数をプロットした。

D. 考察

これまでに抗 CCP 抗体陰性 RA と関連する遺伝子多型の報告は数報あるが、GWAS レベルで確認されたものはまだない。今回我々も抗 CCP 抗体 (-)RA 1586 例 vs コントロール 20655 例を用いた GWAS と追認解析を行ったが、GWAS レベルの有意差を示す遺伝子多型は見つからなかった。しかしながら、既報の RA 関連遺伝子多型の視点でみると、抗 CCP 抗体 (-)RA ともある程度の関連がみられ、ACPA (-)RA と ACPA (+)RA の OR の相関では有意な相関がみられた ($r=0.65$, $p=0.0014$)。このことから、抗 CCP 抗体 (-)RA と抗 CCP 抗体 (+)RA は多くの関連遺伝子を共有することが示唆された。これまでに、有意な関連の報告がみられない理由はおそらく検体数が少ないことと抗 CCP 抗体 (-)RA が heterogeneous な集団であり、関連が出にくいことが原因と考えられる。一方、HLA に関しては抗 CCP 抗体 (+)RA は shared epitope (SE) との関連が明らかで、抗 CCP 抗体 (-)RA は SE との関連は非常に弱く、他の HLA allele との関連がみられていたことから、抗 CCP 抗体 (+)RA と抗 CCP 抗体 (-)RA とは自己抗原が異なるが、基本の病態は類似しているのではないかと推定される。いずれにせよ、抗 CCP 抗体 (+)RA の関連遺伝子が抗 CCP 抗体 (-)RA の関連遺伝子と共有されているということは、今後ゲノム情報から創薬を考える上で、抗 CCP 抗体 (+)RA に有効な薬剤は抗 CCP 抗体 (-)RA にも有効である可能性が高く、重要な知見であると考えられる。

E. 結論

RA の感受性遺伝子は抗 CCP 抗体 (+)RA と抗 CCP 抗体 (-)RA でかなりが共有されていることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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, Tanii 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(5): 511-6
2. 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(7): e40067
3. Ohmura K, Terao C, Mimori T. Recent advances on the genetics of rheumatoid arthritis: current topics and the future. *Inflamm Regen* 2012, 32 (3): 90- 98.
4. 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- B Pathway Are Associated with Rheumatoid Arthritis in Japanese. **PLoS Genet**. 2012 Sep;8(9):e1002949
5. 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**. 2012 Nov 1. doi: 10.1002/art.37777. [Epub ahead of print]
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. 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

2. 学会発表

1. 大村浩一郎：抗CCP抗体陰性関節リウマチに関連する遺伝因子。第56回日本リウマチ学会総会・学術集会2012年東京（品川）シンポジウム（oral presentation）
2. Terao C, Ohmura K, Mimori T, et al: ACPA-NEGATIVE RHEUMATOID ARTHRITIS

CONSISTS OF TWO GENETICALLY DISTINCT SUBSETS BASED ON RF POSITIVITY. European League Against Rheumatism 2012, Berlin, June. 2012. (poster presentation)

3. Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Only rheumatoid factor-positive subset of anti-citrullinated peptide/protein antibody-negative rheumatoid arthritis seroconverts to anti-citrullinated peptide/protein antibody positive. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting 2013, San Diego, Oct 29, 2013 (poster presentation).
4. Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Clinical characteristics of rheumatoid factor-positive or -negative subsets of anti-citrullinated peptide/protein antibody-negative rheumatoid arthritis. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting 2013, San Diego, Oct 29, 2013 (poster presentation).
5. Hiwa R, Ohmura K, Mimori T, et al: Does anti-cyclic citrullinated peptide (CCP) antibody-negative rheumatoid arthritis (RA) become anti-CCP positive RA? 第57回日本リウマチ学会総会・学術集会 2013年(京都) 国際ワークショップ (oral presentation)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. **特許取得**
なし
2. **実用新案登録**
なし
3. **その他**
なし

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

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

研究分担者 山田 亮 京都大学大学院 教授

研究要旨：本研究では、大きく2つの研究を行った。1つ目は、次世代シーケンサーデータを用いた疾患関連遺伝子探索のための統計学的検討であり、もう一つは、疾患関連遺伝子情報の臨床活用に関する統計学的研究である。

1つ目はさらに2つに分けられる。その第1は、次世代シーケンサーを用いたレアバリエーション探索に関する研究である。少サンプルを用いた予備的レアバリエーション探索データに基づき、多サンプル化した場合のレアバリエーション検出遺伝子を尤度モデルによって予測する手法の実行可能性が明らかになった。その第2はレアバリエーションによるケース・コントロール関連解析手法に関する研究である。遺伝子バリエーションをグラフ理論を用いて最小全域木表現し、同木に計量値を定義し疾患関連の強さとの間に関連を見出すことを目指す手法である。同法に特定の疾患関連レアバリエーション分布を想定し、その想定の下での実行可能性が明らかになった。

大区分の2つ目では、疾患関連遺伝子に関する知見を臨床活用するにあたり、医療上の決断という視点に立った情報活用の統計学的・決断理論的位置づけを明確にし、多彩な遺伝的多様性情報の個別性と、情報の活用方法の個別性という2重の個別性を考慮した個別化医療に向けた理論的基礎が明らかにした。

A. 研究目的

関節リウマチをはじめとする複合遺伝性疾患では、疾患感受性遺伝子バリエーションを用いた個別化医療の実用化が求められている。また、疾患遺伝子研究領域では次世代シーケンサー技術の進歩によりレアバリエーション情報が得られるようになってきているが、それを活用するためのデータ解析手法は揺籃期にある。本研究では、特に需要が大きいレアバリエーションデータ解析手法に関する検討を進めることとした。

また、疾患感受性遺伝子や予後・亜型関連遺伝子の情報を臨床展開するにあたり、比較的低い総体危険度を有する座位から臨床的に意味のある情報を作成し、臨床現場に提供するために解決すべき課題を明らかにし、その課題解決のための方法論について考案することを目的とした。

B. 研究方法

1つ目の研究においては、既報の生物学的知見・既発表のレアバリエーションデータ・本研究の本体研究にて得られたレアバリエーションデータを参考にコンピュータシミュレーションにてデータを作成した。また、レアバリエーション探索に関する研究ならびにレアバリエーションに関するケース・コントロール解析手法に関する研究では、それぞれ、モデルを設定し、その下での、手法のパフォーマンスをモンテカルロ法によって評価した。

2つ目の研究においては、次のような理論的考察を中心に実施した。疾患感受性遺伝子のジェノタイプ情報を活用した個別化医療の実践は、遺伝性の高いコモンディジーズ亜型(高遺伝性のある種の癌)と薬剤使い分けにおいて成功をおさめているが、それ以外の場合には困難な課題となっている。個別化医療展開に向けては、より曖昧なままの情報を臨床活

用できるようにするといった、抜本的な方針展開が有用な可能性がある。その点に鑑み、統計学的検定によって支持されない情報を臨床活用するための確率・尤度的な基礎と決定理論的課題について、数理モデルを作成しシミュレーションを実施した。

(倫理面への配慮)

一般的な生殖細胞系列変異研究に活用される解析手法であることから、同研究にて用いられることを前提とした独立したアプリケーションとなるように配慮した。

C. 研究結果

(1) 次世代シーケンサー技術を用いた関連探索のための研究

(1-1) レアバリエーションスクリーニング

少サンプルにて、ディープシーケンシングを行うことを仮定した。そのデータから、コーディング遺伝子ごとに全塩基対について2値的バリエーションの観測染色体本数分布を基礎データとした。マイナーアレルの発生にポアソン過程を想定しその母数の尤度を求め、その尤度分布に従って、多サンプルに展開した場合のレアバリエーション観測数の予測を実施し、その分布をスカラー値スコア化し、多サンプルディープシーケンシングの候補領域の選定を行うことを想定した。データシミュレーションの実装を終了し、尤度分布の式表現を定め、それを簡易計算機演算する部分を実装した。現在は、多サンプル展開予測のためのスコア化について検討を行うとともに、モデル逸脱が及ぼす影響の評価方法の検討、並びに、バリエーション座位への重みづけ項の取り込み方法に関する検討を実施している。

(1-2) レアバリエーションに関するケース・コントロール関連検出方法

遺伝子ごとに(もしくは任意の座位集合ごとに)ディプロタイプまたはハプロ

タイプをそのハミング距離による木グラフ化した。レアバリエーションの頻度と機能強度の平均値との間に単調な関係を想定して確率分布を与えた。バリエーションの機能性が疾患感受性と関連する場合と関連しない場合とで、木グラフのパターンに異同が生じる条件の検討をし、それに基づく木グラフの計量値の最適化を進めた。比較的、一般性のある特定のモデルの下で、木グラフに一定のパターンが生じることが予備的に確認されたが、その正当性を評価することが必要であると考え、検証のための条件設定を続けている。

(2) 遺伝因子情報の臨床応用のための決定理論的研究

統計学的検定によって支持されない情報の典型例であり、また、遺伝情報活用以外にも応用の可能性の大きい例として、2値型情報が少数標本に関して得られた場合をひな形とし、そのような情報を用いた判断戦略として、混合分布モデルとモンテカルロ推定とを基礎とする手法を考案し、そのパフォーマンス評価を実施し、戦略として成立する可能性があることを示した。

D. 考察

(1-1) レアバリエーションスクリーニング

この検討はディープシーケンシング技術とコストとが過渡的であるために必要となる研究デザイン支援のための検討である。方法としての精緻化よりは目安を短期間で提示することを主眼として進めることが適当であると考えられる。

(1-2) レアバリエーションに関するケース・コントロール関連検出方法

レアバリエーションに関するケース・コントロール関連検出方法にはいまだ定見がなく、暗中模索の観が強い。このことがレアバリエーションデータ活用に関して懐疑的にさせる要因ともなっている。本研究で試みたものは、その暗中模索の中の1試行であり、今後もこのテーマの研究の

進展に注目を続け、柔軟に軌道修正を続けることを念頭におくことが適当であると考えられる。

(2) 遺伝因子情報の臨床応用のための決定理論的研究

示した情報活用戦略を遺伝情報に基づいた個別化医療に展開するには、少なくとも2つの課題が残されていることが明らかである。1つは、単純化した決定過程での手法の構築にとどまっており、複雑な遺伝的多様性情報のモデル化に対応する必要がある。もう1つは戦略が臨床コミュニティにて受容されるかという点である。医療現場においては、0/1型の情報による判断分岐が主流であり、確率・尤度の考え方をうまく持ち込めるかどうかは、依然として不透明である。しかしながら、この点は、遺伝情報活用にとどまる課題ではなく、多方面からの要請となっていることに鑑み、本研究において解決すべき主たる課題ではないと考えられる。

E. 結論

本研究が属する本体研究のデータ解析を推進するための支援的手法の検討に一定の成果が得られた。また、疾患遺伝子情報の個別化医療展開のために、従来とは異なる情報利用手法の可能性を模索し、その道筋を明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hamaguchi Y, Fujimoto M, Yamada R, et al. (2013) Common and Distinct Clinical Features in Adult Patients with Anti-Aminoacyl-tRNA Synthetase Antibodies: Heterogeneity within the Syndrome. PLoS One, 8, 4, e60442
2. Terao C, Hashimoto M, Yamada R, et al. (2013) Three Groups in the 28

Joins for Rheumatoid Arthritis Synovitis - Analysis Using More than 17,000 Assessments in the KURAMA Database. PLoS One, 8, 3, e59341

3. Terao C, Yoshifuji H, Yamada R et al. (2013) 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 93(2) 289-97

4. 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 65(2) 472-480 (2013)

5. 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(9):e1002949. doi: 10.1371/journal.pgen.1002949;

6. 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(1):55-67. doi: 10.1089/cmb.2010.0227.

7. 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(7):e40067. doi: 10.1371/journal.pone.0040067.

2. 学会発表

1. Narahara M, Matsuda F, Yamada R, et al. Establishing an eQTL map of the Japanese population. Narahara M, Matsuda F, Yamada R, et al. American Society of Human Genetic Annual Meeting Oct 22-26, 2013 Boston (USA)
2. Narahara M, Matsuda F, Yamada R, et al. (2013) 日本人における eQTL マップの構築.第 58 回日本人類遺伝学会 11 月 20 日-23 日仙台
3. Invited Session 3 : Statistical Challenges in the Analysis of Rare Genetic Variants in Association Studies, Discussing comment. The 26- th International Biometrics Conference 2012/08/26-31

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

II．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, 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, Zhernakova 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, <u>Yamada R</u> , 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, <u>Yamanaka H</u> , <u>Mimori T</u> , Takahashi A, Xu H, Behrens TW, Siminovitch KA, <u>Momohara S</u> , <u>Matsuda F</u> , <u>Yamamoto K</u> , Plenge RM.	Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery.	Nature	506	376-81	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida S, Ikari K, Furuya T, Toyama Y, Taniguchi A, <u>Yamanaka H</u> , 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	16	R75	2014
Hamaguchi Y, Fujimoto M, Matsushita T, Kaji K, Komura K, Hasegawa M, Kodera M, Muroi E, Fujikawa K, Seshima M, Yamada H, <u>Yamada R</u> , 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	8	e60442	2013
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, <u>Yamanaka H</u> , <u>Momohara S</u> , Taniguchi A, Ohmura K, <u>Matsuda F</u> , <u>Mimori T</u> , 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	9	e1003394	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	8	e59341	2013
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	65	472-80	2013
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	9	e85376	2014
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	93	289-97.	2013
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	8	e61045	2013
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	8	e62231	2013

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, 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, Tanii 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, <u>Mimori T</u> , <u>Plenge RM</u> , <u>Yamanaka H</u> , <u>Momohara S</u> , <u>Yamada R</u> , <u>Matsuda F</u> , <u>Yamamoto K</u> .	Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population.	Nat Genet	44	511-6	2012
Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, Tsunoda T, Takahashi A, Kubo M, Taniguchi A, <u>Matsuda F</u> , Ohmura K, <u>Momohara S</u> , <u>Mimori T</u> , <u>Yamanaka H</u> , Kamatani N, <u>Yamada R</u> , Nakamura Y, <u>Yamamoto K</u> .	Functional variants in NFKBIE and RTKN2 involved in activation of the NF-kappaB pathway are associated with rheumatoid arthritis in Japanese.	PLoS Genet	8	e1002949	2012
Onuki R, <u>Yamada R</u> , Yamaguchi R, Kanehisa M, Shibuya T.	Population model-based inter-diplotype similarity measure for accurate diplotype clustering.	J Comput Biol	19	55-67	2012
Ohmura K, Terao C, <u>Mimori T</u> .	Recent advances on the genetics of rheumatoid arthritis: current topics and the future.	Inflamm Regen	32	90-98	2012
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, <u>Yamamoto K</u> , <u>Momohara S</u> , <u>Yamanaka H</u> , <u>Yamada R</u> , <u>Saji H</u> , <u>Matsuda F</u> , <u>Mimori T</u> .	ACPA-negative RA consists of two genetically distinct subsets based on RF positivity in Japanese.	PLoS One	7	e40067	2012

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Terao C, Ikari K, Ohmura K, Suzuki T, Iwamoto T, Takasugi K, Saji H, Taniguchi A, <u>Momohara S</u> , <u>Yamanaka H</u> , <u>Matsuda F</u> , <u>Mimori T</u> .	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	71	1095-7	2012
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, <u>Yamamoto K</u> , <u>Momohara S</u> , <u>Yamanaka H</u> , <u>Yamada R</u> , <u>Saji H</u> , <u>Matsuda F</u> , <u>Mimori T</u> .	A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects.	Ann Rheum Dis	70	2134-9	2011
Suzuki T, Ikari K, Kawaguchi Y, Yano K, Iwamoto T, Kawamoto M, Toyama Y, Taniguchi A, <u>Yamanaka H</u> , <u>Momohara S</u> .	Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility in Japanese rheumatoid arthritis patients.	Mod Rheumatol		e-pub	2012
Shidara K, Inoue E, Hoshi D, Tanaka E, Seto Y, Nakajima A, <u>Momohara S</u> , Taniguchi A, <u>Yamanaka H</u> .	The influence of individual joint impairment on functional disability in rheumatoid arthritis using a large observational database of Japanese patients.	J Rheumatol	39	476-80	2012
Nakajima A, Inoue E, Shidara K, Hoshi D, Sato E, Seto Y, Tanaka E, Taniguchi A, <u>Momohara S</u> , <u>Yamanaka H</u> .	Standard treatment in daily clinical practice for early rheumatoid arthritis improved disease activity from 2001 to 2006.	Mod Rheumatol	21	594-7	2011