

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17406026
 研究課題名（和文） リウマチ性疾患の疾患感受性遺伝子の東アジアにおける民族差の研究
 研究課題名（英文） The genetic research for the ethnical differences of the susceptibility genes of rheumatic diseases in East Asia
 研究代表者
 竹内 二士夫 (TAKEUCHI FUJIO)
 東京大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：70154979

研究成果の概要：

リウマチ疾患の遺伝要因を東アジアで検討した。各遺伝子多型には民族差があった。RA はタイで印度の影響か DRB1*1001 が増加した。SLE では DRB5*0101 が遺伝因子と推定した。ETS1 との相関はみられない。SSc では DRB1*1502 が相関し CTGF は相関しない。ベーチェット病では HLA A*2601, B*39 が相関した。データシステム ASCA と処理時間で優れたハプロタイプ推定ソフトウェア R-SAT を作成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	5,600,000	0	5,600,000
2006年度	2,600,000	0	2,600,000
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	13,400,000	1,560,000	14,960,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：リウマチ疾患、疾患感受性遺伝子、HLA、ETS1、ハプロタイプ推定、東アジア、民族差、国際研究者交流

1. 研究開始当初の背景

慢性関節リウマチ（RA）や強皮症（SSc）、SLE、ベーチェット病（BD）などリウマチ性疾患の多くは原因不明であるが、その発症に遺伝因子の関与がある事が推定され、特に、HLAを中心とした遺伝マーカーとの相関が報告されている。しかし、白人とはその遺伝背景

が異なる我々東アジア民族の報告は非常に少ない。そして、日本と他のアジア民族間でも遺伝背景は差があると考えられる。HLA 遺伝子単独でこれらのリウマチ疾患の遺伝背景すべて解明されるとは考えられず、複数の遺伝子が発病や疾病に関与していると考え

られる。

我々はこれまでも韓国、台湾、タイと共同研究を行い、平成 14 -16 年度の科研費（基盤 B 海外）では本研究テーマについて調査研究を行い、共通の臨床データベースの作成、研究対象とする遺伝子等につき協議し、その成果は科研費成果報告書（課題番号 14406018）に報告している。その基盤 B(海外)研究を進展させたのが本研究である。

本研究では、ハプロタイプ推定プログラムの開発にも重点を置いた。ハプロタイプ推定には、最尤法を EM アルゴリズムで解く手法が最も多く用いられている。EM アルゴリズムは、得られる解は初期設定値の影響を大きく受け、局所的な最適解に収束しやすい。また、想定するモデルが大きくなるほど計算量が膨大になる。またベイズ理論を基にしたハプロタイプ推定法も有力な手法として用いられている。Stephens らによって提案された PHASE 法はより高い精度の推定結果を出すことが可能である。しかし、計算量が膨大になるため、解析にかかる時間が非常に長くなる。また、収束判定が難しいという問題点もある。

2. 研究の目的

本研究は、日本、韓国、台湾、タイのリウマチ性疾患(RA, SLE, SSc, BD)の HLA 及び、その他の遺伝要因の共通性とその差違を検討する事からこれらの疾患の遺伝背景、病因を解明する事と、サンプル資料の収集を目的とする。そして東アジア民族の共通性と差異から疾患の遺伝的背景を明らかにする事を目的とする。具体的には、遺伝因子として主に HLA A, B, DR, CTLA-4, CD14, TLR4, CTGF, ETS1 の解析を目的とした。臨床マーカーとして自己抗体との関連の検討も目的とした。さらに本研究はハプロタイプ推定プログラム

の開発も目的とする。これらを通じて将来の治療、検査、診断法の改良、開発に役立てようというのが大きな目的である。

研究の目的とする遺伝因子には以下のような臨床的意義があり、今回の対象とした。

HLA は抗原認識や免疫応答に関与する膜蛋白であり、CTLA-4 はリンパ球活性化、免疫制御に関与する蛋白である。これらについては前述の科研費報告書に参照されたい。

CTGF(Connective Tissue Growth Factor) は、繊維芽細胞の増殖や細胞外 matrix の産生に関与することが知られている。第 6 染色体 q23-27 に位置し、-945G/C の SNP が知られている。Fonseca 等は (NEJM 2007) -945GG 及び -945G アリルが強皮症で、特に抗 Scl-70 抗体や抗セントロメア抗体 (ACA) をもつ患者において優位に増加している事を報告している。

CD14 は単球、マクロファージ、好中球に発現している lipopolysaccharide とその結合蛋白の複合体や、細菌成分に対する受容体である。そのシグナルは Toll-like receptor 4 (TLR4) を介して細胞の活性化や、炎症性サイトカインの分泌を促す。CD14 及び TLR4 はリウマチ疾患の病因候補と考えられる。CD14 は第 5 染色体の q31.1 に位置し -159C/T SNP がある。

Sullivan et al. (2000) は、ETS1 遺伝子下流域に見られる CA 繰り返し配列多型を解析し、アリル 1 と discoid lesions, anti-cardiolipin antibodies, arthritis, hematuria との関連、アリル 7 と vasculitis, positive RPR, lymphopenia との関連を報告した。今回は日本人やアジア人について ETS1 と病気の関連を調べる事を目的とした。

さらに本研究はハプロタイプ推定プログラムの開発も目的とする。ハプロタイプを実験によって決定するには、多大なコストや

時間を要する。そのため近年では、実験から容易に得ることのできるジェノタイプを多数集め、ハプロタイプを統計的に推測する方法が用いられている。本研究では、選択する組み合わせを減らして、既存の手法と同程度の結果を出力できるアルゴリズムを開発する事を目的とした。また本提案手法と既存のアルゴリズムとの実行結果の比較を行うことにより提案アルゴリズムの評価を行った。

3. 研究の方法

(1) サンプルングと臨床データベース

本研究では、海外共同研究のための体制整備がその目的の一つである。サンプルは、各国で収集し、臨床所見も前述の報告書に順じて各国でまとめる事とした。自己抗体として抗核抗体等に加えて、抗 galactose 欠損 IgG 抗体 (CARF) も測定した。

(2) HLA 分析:

タイピングは、INNO LiPA™ HLA A 又は B Update、HLA DRB decoder (INNOGENETICS)、Micro SSP™ Allele Specific HLA class I 又は DNA Typing Tray (ONE LAMDA) を用いて行なった。

(3) その他の遺伝因子の分析

CTLA-4 +49A/G, -318C/T, -1661A/G, -1772T/C の各 dimorphism は Donner 等、Deichmann 等、Huson 等 (J Clin End Met 1997; BBRC 1996; Hum Gen 2002) の PCR-RFLP 法で検討した。

CTGF -945G/C dimorphism は、アリル特異的プライマーと、内部標準プライマーを用いて前述の Fonseca 等の方法で検討した。

CD14 -59C/T dimorphism は特異的プライマーと Avall を用いた Baldini 等の方法 (Am J Res Cell Mol Biol, 1999) を用いて検討した。

TLR4 +896A/G (+299Asp/Gly) は特異的

プライマーと NcoI を用いた Erridge 等の方法 (JEM, 2003) を用いて検討した。

ETS1 は Sullivan 等の方法に準じ、ETS1 遺伝子下流域多型領域のアリルの検出を試みた。PCR 法用いたプライマー配列は、6-FAM-GGTATTATTTTCAGCTGCAGTTTG (上流側) と CAGGGAGTGTGTTGGGTGG (下流側) である。PCR 産物は、ABI377DNA シークエンサーにて DNA 断片長を解析した。解析には Gene Scan を用いた。各アリルの塩基配列も検討した。

(4) ハプロタイプ推定法の開発

本研究では、あたらしいハプロタイプ推定手法 (R-SAT法) を提案する。R-SAT 法においては、まず、適当な頻度を N 個生成し、それらをそれぞれ解候補とし、全解候補における尤度の最大値が収束するまで以下のステップを繰り返し、そのときの頻度を推定値とする。全解候補において、それぞれ尤度を計算する。候補尤度のなかで最も高い尤度を持つ解候補をもとに、新たな解候補を生成する。開発した R-SAT法を、既存のソフトウェア PHASE, EHPLUS と比較した。

4. 研究成果

(1) サンプルングと臨床データベース

前述の報告書に準じて臨床症状を各国で管理した。臨床データベースシステム ASCA を作成した。CARF は、従来の RF より診断に優れているが抗 CCP 抗体がより優れていた。

(2) HLA の分析

HLA のアリル分布には民族差が顕著に見られた。疾患関連は前述の報告書も参照されたい。RA との相関では、日韓と同様、DR*0405 が台湾やタイ RA でも phenotype 頻度 (PF) で各 40.6%、30.0% と有意に増加していた。また、タイ RA では *1001 が 6% にみられ、おそらく印度からの影響ではないかと推定した。

SLE では、日韓で DRB1*1501 増加が認めら

れている。タイではその PF は 21%と対照 17% に比しわずかな増加にとどまった。しかし、DRB5*0101が対照 29%に比し 44%と有意に増加していた。これはタイでは DRB1 と DRB5 の連鎖がみだれているためであった。DRB5*0101 はタイ対照群では 34.5%が、SLE では 44.4% が DRB1*1602 と連鎖していると思われる。タイの結果は、SLE では DRB5*0101 が疾患感受性遺伝子である可能性を強く示唆している。

SS c では抗 Scl-70+ 群で日韓で DRB1*1502-DRB5*0102 との相関が認められている。台湾では*1502 頻度は民族的に低いようである。タイでは*1502 が Scl-70+群で PF が 59%と対照 19%に比し有意に増加していた。台湾では DRB5*0102 と同じ V-FLEDR エピトープをもつ DRB1*1101 が、タイでは*1106 が各々 21%、8%とやや増加していた。DRB1*1502-DRB5*0102 がアジアの SSC の疾患感受性遺伝子である事がタイでも証明された。

日、韓、台の BD で認めた B*5101 の増加に関しては前述の報告書を参照されたい。さらに日本 BD (眼症状有) では A*2601 が対照群 14.4%(PF)に比し 36.7%と非常に強い相関があった($p < 0.001$)。B*5101 と A2601 のどちらかをもつ割合は BD の 74.7%にも及んだ。いずれも持たない群で B*39 が 30%と増加傾向があった($P < 0.005$)。B*5101 と A2601 は連鎖不平衡にはなく、A*2601 は独立した疾患感受性遺伝子と考えられる。臨床症状との関連に関しては現在検討中である。

(3) その他の遺伝因子の分析

日本人正常群の CTLA-4 の SNP 頻度及び西欧との民族差に関しては前述の報告書を参照されたい。日韓とタイでは民族差があった。日本 RA では有意な相関はみられなかったが、タイ RA では +49AA が 26.0%(対照 13.1%)と有意に増加していた。日本人 SLE と CTLA4 との相関も認めなかった。韓国 SLE では

-1772T アリルとの強い相関が認められてた (Song 等)。日本人 SS c と CTLA4 との相関も認めなかった。タイでも日本と同様に差を認めなかった。日本人 BD の検討では有意な差を認めていない。台湾 RA, BD, SS c の検討結果でも群間に有意な差は認めなかった。CTLA-4 はこれらの疾患の主たる原因遺伝子ではないだろうと推定される。

日本人正常群での CTGF-945C/G 多型の頻度は、Fonseca 等の論文にある英国対照群における頻度と差はなかった。タイ正常人では G が C より多かった。タイ SS c 群では対照群と差がなく、抗 Scl-70 群でも差がなかった。SSA+群で 945C が 50.0%と、SSA 群の 30.3%と比し多い傾向があったが、有意ではなかった。この結果、頻度には民族差があり、アジアでは SS c との相関はないと考えられる。タイ SLE の検討でも頻度に差はなく、その関与はないと考えられる。

CD14-159C/T については、日本 RA 群と対照群に有意な差はなかった。女性患者、RF 陽性患者群、DRB1*0405 陽性群でも優位な差はなかった。この結果は Fontaine 等 (Scan J Rheum, 2006) の結果を支持し、更に RF 群、DR*0405 群でも相関しない事を示唆している。尚、ドイツと日本人の間に有意な頻度の差が見られた。タイでも対照群と RA の間に差は無かった。SLE、SSc についてもタイの患者群で検討したが対照群との間に有意な差を認めず、自己抗体との関連もなかった。日本人 BD 群も対照群と差はなかった。台湾でも RA と BD では有意な差はなかった。

TLR4 +896A/G の dimorphism は、日本ではすべて A であり、多型性を認めなかった。台湾サンプルでも同様であった。TLR4 の疾患への関与は今後の検討課題である。

ETS1 について、全ての集団で最も頻度が高かったアリルは、185bp で、遺伝子頻度

は日本人、タイ健常者、タイ SLE 患者で各々 0.456、0.415、0.428 である。次いで頻度が高いのは、195bp アリルである。日本人だけで認められたアリルは 186bp、194bp、196bp であったが、いずれも頻度は高くない。タイ人だけのアリルは、190bp が 1 名にのみヘテロ接合で観察された。稀なアリルを持つ個体については、塩基配列を検討中である。5 つのアリルが Sullivan と共通していたが、その分布は大きく異なっていた。

日本人とタイ人との間で頻度の差について検定したところ、183bp と 193bp はタイ人で頻度が高く(各 $t=5.67$, $p<0.0001$; $t=3.31$, $p=0.002$)、187bp と 197bp は、日本人で頻度が高かった(各 $t=2.93$, $p=0.03$; $t=3.04$, $p=0.002$)。分布を比較したところ、二乗値は 73.9, $p<0.00001$ となって、両者の分布には顕著な差があった。タイ人健常人集団とタイ人 SLE 患者集団のアリル頻度の差に違いはない。その分布にも有意な差は見られなかった($\chi^2=4.71$, $p=0.79$)。

(4) ハプロタイプ推定法の開発

各手法で既報の199人のデータのアリル頻度推定を行い結果を比較した。遺伝子座の数は3 (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1)、対立遺伝子の数はそれぞれ12, 27, 26 である。

アルゴリズムごとにハプロタイプを推定した結果を以下に示す(試行回数50回の平均: カッコ内は、R-SAT法, PHASE, EHPLUSの順)。ハプロタイプ頻度の差異の絶対値の和(0.50、0.53、0.52)、および、AER(推定に失敗したハプロタイプの数の割合を百分率で表したもの)(28.2%, 27.7%, -)については、3手法とも大きな差はないが、正解の推定では R-SAT、EHPLUSの精度がややよかった。アルゴリズムにおける試行ごとの標準偏差(SE)は、R-SAT法がややばらつきが大きかった(0.16、0.10、0)。尤度の対数をとったもの(logL)は

(-791, -813, -792)であった。実行時間(runtime)は(66, 195, 101 sec)であった(ただし、R-SATはMathematica上で、PHASEとEHPLUSはCコンパイラで実装)。サンプルデータの解析結果から、本実験で用いた実データの推定においては、R-SAT, PHASE, EHPLUSがほぼ同等の結果を与える知見を得た。また、サンプル数が十分でない場合においては、必ずしも尤度の高い解が良い解ではないことを確認した。実行時間の比較から、R-SATが最も実行時間が短いことがわかった。この結果から、サンプル数や遺伝子座数の多いデータの推定を行う際に、R-SAT法を適用することが期待できる。

尚、研究結果は順次論文にて発表予定である。本研究は、研究組織欄の先生方に加えて、村山隆司、矢吹太郎、川島秀俊、谷本潔昭、松多邦雄、森正樹、川杉要、安原美季、中上尚子、小林奈津子、大野木由加、関雅巳、Lee EB、Hong GH、Wu CS、Chou CT、Liu HW、Kasitanon 他の国内外の諸先生や研究補助員のご協力をいただいで遂行した研究である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Takeuchi F, Kuwata S (他 6 名, 1, 4 番目): Genetic contribution of the CD14 -159C/T dimorphism in the promoter region in Japanese RA. Clin Exp Rheumatol 26: 337-339, 2008, 査読あり.

Yuasa I, Harihara S (他 12 名, 4 番目): Molecular basis of complement factor I (CFI) polymorphism: one of two polymorphic suballeles responsible for CFI A is Japanese -specific. J Hum Genet 53: 1016-1021, 2008, 査読あり.

Takeuchi F, Kuwata S (他 5 名, 1, 4 番目): The CTLA-4 -1661A/G and -1772T/C dimorphisms in Japanese with systemic

sclerosis. Rheumatol Int 27: 785-787, 2007, 査読あり.

Yabuki T, Sakuta H: Development of Collaboration Environments for Web-Based Learning. J Computers 2: 1-6, 2007, 査読あり.

Takeuchi F, Kuwata S (他 6 名、1,6 番目): The genetic contribution of the CTLA 4 dimorphisms in promoter and exon 1 regions in Japanese RA. Scan J Rheumatol 35: 154-155, 2006, 査読あり.

Takeuchi F, Kuwata S, Mori M: The CTLA 4 -1661A/G & -1772T/C dimorphism in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. J Rheumatol 32:2062-2063, 2005, 査読あり.

[学会発表](計 3 件)

Louthrenoo W, Kuwata S, Takeuchi F (他 5 名、7,8 番目): Association of HLA-DRB1*1502 allele with the susceptibility to systemic sclerosis in Thai patients. 2008 Annual European Congress of Rheumatology, Paris (France), 2008 年 6 月 14 日.

Yabuki T, Sakuta H, Takeuchi F, Kuwata S (他 2 名、3,4,5 番目): Empirical Examination of the best method in haplotype inference of HLA gene. 71th Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology, Boston (USA), 2007 年 11 月 6 日.

Takeuchi F, Kuwata S (他 7 名、1,7 番目): The possible genetic contribution of the TNFB+252*2 allele and the TNFa11 micrisatellite allele to pathogenesis and therapeutic effect with infliximab in Japanese RA. The 12th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress,

Kuala Lumpur (Malaysia), 2006 年 8 月 3 日.
[図書](計 1 件)

矢吹太朗, 佐久田博司: 初級プログラマのための Web アプリケーション構築入門, 森北出版, pp.1-224, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 二士夫 (TAKEUCHI FUJIO)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70154979

(2) 研究分担者

蕪城 俊克 (KABURAGI TOSHIKATSU)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 70343126

針原 伸二 (HARIHARA SHINNJI)
東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号: 40198932

桑田 昇治 (KUWATA SHOUJI)
帝京大学・ちば総合医療センター・准教授
研究者番号: 00241993

佐久田 博司 (SAKUTA HIROSHI)
青山学院大学・理工学部・教授
研究者番号: 10170630

(3) 連携研究者

(4) 海外研究協力者

Park Myoung Hee (韓国ソウル大学・医学部・教授)

Song Yeong Wook (韓国ソウル大学・医学部・教授)

Yu Chia-Li (台湾台湾大学・医学部・教授)

Worawit Louthrenoo (タイチェンマイ大学・医学部・教授)

Sa nga Pattanakitsul (タイマヒドン大学・医学部・准教授)