

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22021023

研究課題名（和文） 大規模リウマチ前向きコホートのゲノム解析によるリウマチのテーラード医療の試み

研究課題名（英文） Genome-wide association study for rheumatoid arthritis using a large prospective cohort: a pilot study for personalized medicine.

研究代表者：松田 文彦（MATSUDA FUMIHIKO）

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50212220

研究成果の概要（和文）：

関節リウマチ（RA）のゲノム解析コンソーシアムを構築し、10,000人以上の日本人 RA 患者の DNA を集積し、全ゲノム関連解析を実施した。そして、ミエリン塩基性蛋白（MBP）遺伝子を含む 12 個の新たな RA 疾患感受性遺伝子を同定した。さらに、MBP 蛋白に対する自己抗体が RA 患者血中で上昇していることを示し、マウスモデルを用いて自己抗体の機能的解析を進めた。HLA 領域と RA 自己抗体との関係性を明らかにした。IL-6 受容体を標的にした生物製剤であるトシリズマブ使用患者を 299 例集積し、120 例につきゲノムスキャンを完了し、反応性と関連する候補領域を同定した。

研究成果の概要（英文）：

We have established a national consortium for rheumatic disease study (GARNET Consortium) and accumulated more than 10,000 DNA samples of Japanese rheumatoid arthritis (RA) patients for genetic studies. We conducted a meta-analysis of genome-wide association (GWA) studies and newly identified 12 gene loci associated with RA in Japanese. We then investigated the biological role of myelin basic protein (MBP) gene, one of the above 12 genes, and found that autoantibodies against MBP were significantly increased in patients with RA beyond ethnicity, suggesting its usefulness as a diagnostic marker. We also found that multiple HLA-DRB1 alleles are associated with ACPA-negative rheumatoid arthritis in Japanese subjects. We have collected DNA samples of 299 RA patients treated with tocilizumab, biologic agent against interleukin 6 receptor, of which 120 DNA samples were subjected to the GWA study. Thirty-five candidate regions were identified, and the results are under confirmation with the other DNA samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	8,000,000	0	8,000,000
2011 年度	8,000,000	0	8,000,000
総計	16,000,000	0	16,000,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：関節リウマチ、生物学的製剤、一塩基多型、ゲノムワイド関連解析、薬剤感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) RA 疾患感受性遺伝子

RA に環境因子と遺伝因子が関連することは広く知られており、遺伝因子は発症の

50-70%を説明可能であると推定されている。HLA 領域が RA に関連することは古くから知られていたが、HLA 領域は RA の遺伝性の一部を説明できるに過ぎない。全ゲノムに密に

配置された一塩基多型をマーカーに用いたゲノムワイド関連解析 (GWAS) により、欧米から RA の関連遺伝子が報告されはじめたが、日本人 RA の GWAS の報告はなく、また関連遺伝子の RA 病態における機能的役割にまで踏み込んだ研究はほとんど見られなかった。

## (2) HLA 領域と自己抗体

HLA 領域は RA に関連しているが、RA の自己抗体である抗シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体) 陽性の RA との関連が強いことが明らかにされつつある。しかしながら抗 CCP 抗体陰性 RA での HLA 領域の関与の程度や、抗 CCP 抗体陽性群の抗 CCP 抗体力価と HLA 領域の関連は不明であった。

(3) 生物学的製剤と治療反応性関連遺伝子  
炎症性サイトカインを標的とした抗体製剤は、それまで関節破壊の速度を緩める治療しかなかった RA 治療に変革をもたらしたが、生物学的製剤不応例も少なからず存在する。TNF- $\alpha$  を標的とした生物学的製剤に対する反応性に影響を与える遺伝因子の探索は成功していない。また、日本で開発された IL-6 受容体を標的とした生物学的製剤であるトシリズマブの治療反応性研究は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

### (1) RA 疾患感受性遺伝子

日本人 RA の新規疾患関連遺伝子を同定し、疾患関連遺伝子と RA 病態との関わりを明らかにする。

### (2) HLA 領域と自己抗体

RA の自己抗体プロファイルにおける HLA 領域の役割を明らかにする。

### (3) 生物学的製剤と治療反応性関連遺伝子

IL-6 受容体抗体製剤であるトシリズマブの反応性に関連する遺伝因子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) RA 疾患感受性遺伝子

GWAS の手法を用い、RA 新規関連遺伝子の同定を試みた。また、他施設と GWAS のメタ解析を行い、検出力を高めることによってさらなる新規関連遺伝子の同定を試みた。新規関連遺伝子の中でミエリン塩基性タンパク (MBP) に着目し、ELISA 法、ウエスタンブロッティング法を用いて RA 患者血漿あるいは血清における抗 MBP 抗体の有無を検索した。また、コラーゲン誘発関節炎 (CIA) モデルを用いて、MBP や抗 MBP 抗体の病原性を検証した。

### (2) HLA 領域と自己抗体

RA 患者及び健常人の HLA-DRB1 アレルをタイピングし、抗 CCP 抗体陰性群と健常人群における HLA-DRB1 アレルの頻度を比較した。また、抗 CCP 抗体陽性 RA において、抗 CCP

抗体力価と HLA-DRB1 アレルの関係性を評価した。

### (3) 生物学的製剤と治療反応性関連遺伝子

治療反応性データのあるトシリズマブ使用 RA 患者検体を用い、遺伝子のエクソン領域の一塩基多型を網羅したアレイでタイピングし、治療反応性の有無やその反応性の程度に関連する遺伝子多型の同定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) RA 疾患感受性遺伝子

MBP、AIRE が日本人 RA の疾患感受性遺伝子であること (発表論文 5-3、4)、CCR6 が日本人、ヨーロッパ人共通の RA 感受性遺伝子であることを同定した (発表論文 5-6)。また、GWAS のメタ解析及び追認解析により、9,351 人の RA 患者と 38,575 人の対照群との比較を行い、新規に 9 つの RA 疾患感受性遺伝子を同定した (発表論文 5-1)。さらに、日本人とヨーロッパ人との間に疾患感受性遺伝子の大きな重複があることを明らかにした。これらの成果はいずれも国際一流誌に掲載され、高く評価された。

疾患感受性遺伝子の中から MBP に着目し、血中抗 MBP 抗体が日本人 RA 患者だけでなく、ドイツ人 RA 患者においても健常人より上昇していることを示した。また、MBP をシトルリン化することにより、RA 患者血中で確認された抗 MBP 抗体の多くが抗シトルリン化 MBP 抗体であることを明らかにした。市販の抗 CCP 抗体検出キットを用いた実験との相関から、現行の抗 CCP 抗体検出キットでは完全には抗シトルリン化 MBP 抗体を検出できないことを示した。早期 RA27 例を用いたヒトでの検討では、抗 MBP 抗体の上昇は認められたが、強い上昇はなく、早期発見の有用性は示されなかった。また CIA モデルマウスにおいて、タイプ II コラーゲンの代わりに MBP あるいは抗 MBP 抗体を尾部より静脈注射した。8 例中 1 例の関節が腫脹したが、その後の再検では関節炎誘発効果は明らかでなかった。

さらに、新規関連遺伝子の中の一つである NFKBIE に着目し、NFKBIE 欠損マウスに CIA に準じた手法で関節炎が惹起できないかを調べた。結果、野生型のマウスとの関節症状における違いは肉眼的にも病理学的にも明らかではなかった。

### (2) HLA 領域と自己抗体

185 例の抗 CCP 抗体陰性 RA と 571 例の抗 CCP 抗体陽性 RA、1,508 例の健常人の HLA-DRB1 アレルをタイピングした。3 群間の比較によって、抗 CCP 抗体陰性 RA と抗 CCP 抗体陽性 RA は HLA-DRB1 アレルの関連という点において異なるということが示された (発表論文 5-7)。さらに、関節破壊を伴った抗 CCP 抗体陰性群においてもやはり同

じ傾向を認めた。

次に抗 CCP 抗体陰性 RA 感受性 *HLA-DRB1* アレル同定のため、合計 869 例の抗 CCP 抗体陰性 RA と 2,008 例の健常人 *HLA-DRB1* タイピングデータを用い、関連解析を行った。その結果、抗 CCP 陽性 RA と大きく異なり、*HLA-DRB1*\*12:01、15:02、13:02、*HLA-DR8* ホモ接合体が抗 CCP 陰性 RA と関連していることが明らかになった（発表論文 5-5）。抗 CCP 抗体陽性で極めて強い関連を示す *HLA-DRB1*\*04:05 は弱く関連しているに過ぎなかった。

また、抗 CCP 抗体陽性 2,457 例の *HLA-DRB1* タイピングを行い、抗 CCP 抗体力価と *HLA-DRB1* アレルとの関連を検討した。その結果、*HLA-DRB1*\*09:01 アレルは強く抗 CCP 抗体価を下げる事が分かった。さらに、抗 CCP 抗体陽性群と強くかかわる *HLA-DRB1*\*04:05 をはじめとした一群の shared epitope と呼ばれる *HLA-DRB1* アレル群は、抗 CCP 抗体価を上昇させると考えられていたが、その上昇は *HLA-DRB1*\*09:01 による抗 CCP 抗体価の低下の結果を見ているにすぎないことが判明した（発表論文 5-2）。

これらの成果はいずれも国際一流誌に掲載され、高い評価を受けた。

(3) 生物学的製剤と治療反応性関連遺伝子共同研究施設と合わせ、299 例のトシリズマブ治療 RA 患者の検体を集積した。抗 TNF- $\alpha$  製剤の患者検体も収集したが、ヨーロッパ系人種で結果が出ておらず、その原因として、複数の抗 TNF- $\alpha$  抗体製剤ごとに同じ患者でも反応性が異なることが考えられたため、IL-6 を標的とした製剤は一種類のみであり、日本で開発されたため症例の集積が比較的スムーズに進んだトシリズマブに注力することとした。120 例のゲノムスキャンを行い、ヨーロッパリウマチ学会の分類に用いられる活動性指標を個人でスコア化した各 SNP の回帰分析をおこなった。その結果、35 領域の 41 個の SNP が有意水準に達していた。それらのアレル頻度はほとんどが 5% 以下であり、結果の解釈は慎重になされる必要があるため、現在、症例数を増やして同一のアレイを用いた解析を行ない、再現性を検証中である。反応性の有無での二群間の比較では有意なマーカーは同定できなかった。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 7 件）

1. Okada, Y., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Kawaguchi, T., Stahl, E.A., Kurreeman, F.A., 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, P.K., Padyukov, L., Worthington, J., Siminovitch, K.A., Lathrop, M., Taniguchi, A., Takahashi, A., Tokunaga, K., Kubo, M., Nakamura, Y., Kamatani, N., Mimori, T., Plenge, R.M., Yamanaka, H., Momohara, S., Yamada, R., Matsuda, F., and Yamamoto, K. (2012) Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nat. Genet.* 44, 511-516. (査読有)

2. Terao, C., Ikari, K., Ohmura, K., Suzuki, T., Iwamoto, T., Takasugi, K., Saji, H., Taniguchi, A., Momohara, S., Yamanaka, H., Matsuda, F., and Mimori, T. (2012) 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, 1095-1097. (査読有)

3. Terao, C., Yamada, R., Ohmura, K., Takahashi, M., Kawaguchi, T., Kochi, Y.; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Okada, Y., Nakamura, Y., Yamamoto, K., Melchers, I., Lathrop, M., Mimori, T., and Matsuda, F. (2011) The human AIRE gene at chromosome 21q22 is a genetic determinant for the predisposition to rheumatoid arthritis in Japanese population. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2680-2685. (査読有)

4. Terao, C., Ohmura, K., Katayama, M., Takahashi, M., Kokubo, M., Diop, G., Toda, Y., Yamamoto, N.; Human Disease Genomics Working Group; Rheumatoid Arthritis (RA) Clinical and Genetic Study Consortium, Shinkura, R., Shimizu, M., Gut, I., Heath, S., Melchers, I., Manabe, T., Lathrop, M., Mimori, T., Yamada, R. and Matsuda, F. (2011) Myelin basic protein as a novel genetic risk factor in rheumatoid arthritis—a genome-wide study combined with immunological analyses. *PLoS One.* 6, e20457. (査読有)

5. 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. and Mimori, T. (2011) 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.

(査読有)

6. Kochi, Y., Okada, Y., Suzuki, A., Ikari, K., Terao, C., Takahashi, A., Yamazaki, K., Hosono, N., Myouzen, K., Tsunoda, T., Kamatani, N., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ohmura, K., Mimori, T., Matsuda, F., Iwamoto, T., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Kubo, M., Nakamura, Y., and Yamamoto, K. (2010) A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat. Genet.* 42, 515-519. (査読有)
7. Ohmura, K., Terao, C., Maruya, E., Katayama, M., Matoba, K., Shimada, K., Murasawa, A., Honjo, S., Takasugi, K., Tohma, S., Matsuo, K., Tajima, K., Yukawa, N., Kawabata, D., Nojima, T., Fujii, T., Yamada, R., Saji, H., Matsuda, F., and Mimori, T. (2010) Anti-citrullinated peptide antibody-negative RA is a genetically distinct subset: a definitive study using only bone-erosive ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Rheumatol. (Oxford)*. 49, 2298-2304. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Terao Chikashi *et al.* A haplotype of the human AIRE gene is associated with the risk for rheumatoid arthritis in Japanese population. EULAR Congress 2011 (London, UK), May 27, 2011.
2. Terao Chikashi *et al.* A large-scale association study identified multiple HLA-DRB1 alleles associated with anti-citrullinated peptide antibody negative rheumatoid arthritis in Japanese. Annual Congress of American College of Rheumatology (Chicago, USA), Nov 6, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：関節リウマチの新規遺伝因子としての  
ミエリン塩基性蛋白の利用  
発明者：松田文彦 三森経世 大村浩一郎  
寺尾知可史  
権利者：京都大学  
種類：特許  
番号：P09-046  
出願年月日：2011年4月1日  
国内外の別：国内・外国

[その他]

ホームページ等

<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 文彦 (MATSUDA FUMIHIKO)  
京都大学大学院医学研究科 教授  
研究者番号：50212220

(3) 連携研究者

山中 寿 (YAMANAKA HISASHI)  
東京女子医科大学医学部 教授  
研究者番号：10166754