

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2017～2019  
 課題番号：17K09967  
 研究課題名(和文) HLA領域シーケンスによる膠原病共通抵抗性ハプロタイプ上の原因的多型部位の解明  
  
 研究課題名(英文) Identification of the functionally responsible allele for protection against multiple autoimmune rheumatic diseases using HLA region sequencing  
  
 研究代表者  
 土屋 尚之 (Tsuchiya, Naoyuki)  
  
 筑波大学・医学医療系・教授  
  
 研究者番号：60231437  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：日本人集団において、MPO-ANCA陽性血管炎をはじめとする複数の自己免疫疾患の疾患抵抗性に関連するHLA-DRB1\*13:02、疾患感受性に関連するHLA-DRB1\*09:01-DQB1\*03:03ハプロタイプについて、これらと連鎖不平衡にあるHLA-class II領域上の病因的バリエーションを探索した。疾患抵抗性についてはHLA-DRB1\*13:02自体の重要性が、疾患感受性については、HLA-DRA上流の遺伝子間領域に位置し、HLA-DQA1およびDQB1の発現に関連するバリエーションがHLA-DRB1\*09:01-DQB1\*03:03ハプロタイプと独立の寄与を有することが明らかになった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

HLAは多くの免疫関連疾患において重要な疾患感受性あるいは抵抗性遺伝子であるが、広範囲にわたる連鎖不平衡のために、病因的意義を有するバリエーションが特定されておらず、分子機構は未解明である。本研究では、日本人集団においてANCA関連血管炎をはじめとする複数の免疫疾患の疾患抵抗性、疾患感受性にそれぞれ関連するHLA-DRB1\*13:02、DRB1\*09:01-DQB1\*03:03ハプロタイプにおいて、病因的であるバリエーションを探索した。これは、学術的にはHLAと疾患の関連の分子機構の解明に、社会的には日本人集団において有用性の高い複数の免疫疾患に対する創薬の分子標的の同定につながる知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously identified association of HLA-DRB1\*13:02 with protection against, and that of HLA-DRB1\*09:01-DQB1\*03:03 haplotype with susceptibility to, multiple autoimmune diseases including MPO-ANCA positive vasculitis in the Japanese population. In this study, we made an attempt to identify the causal variants which can account for the genetic association of these haplotypes. As for the protective association, the role for HLA-DRB1\*13:02 itself was supported. With respect to the predispositional association, novel variants located in the upstream region of HLA-DRA and are in linkage disequilibrium with DRB1\*09:01 were suggested to play an independent role. These variants were shown to be associated with expression level of HLA-DQA1 and DQB1 by eQTL analysis. These results imply that multiple variants with an independent contribution are carried by the DRB1\*09:01 haplotype, some of which may be associated by a mechanism other than the antigenic peptide specificity.

研究分野：膠原病学、人類遺伝学

キーワード：HLA-class II 多型 疾患感受性 疾患抵抗性 ANCA関連血管炎

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、2016年度までに、日本人集団の各種膠原病における *HLA* 遺伝子について、アリルレベルでの関連研究を施行し、*HLA-DRB1\*13:02* が関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA)、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE)、ANCA 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis, AAV)、全身性強皮症 (systemic sclerosis, SSc) に共通の抵抗性アリルであることを報告してきた (Oka et al., 2014, Furukawa et al., 2014, Kawasaki et al., 2016, Furukawa et al., 2016)。一方、日本人集団における MPO-ANCA 陽性 AAV (MPO-AAV) において、*DRB1\*09:01-DQB1\*03:03* ハプロタイプが疾患感受性に関連することを報告した (Tsuchiya et al., 2003, Tsuchiya et al., 2006, Kawasaki et al., 2016) が、このハプロタイプは、日本人集団において、RA、SLE、1型糖尿病、若年型重症筋無力症など、複数の自己免疫疾患に関連することが知られている。これらのように、複数の自己免疫疾患に共通の関連を示す *HLA* ハプロタイプについては、特定の抗原ペプチドの提示以外の分子機構の寄与の可能性も考えられる。*HLA-class II* 領域全体に連鎖不平衡が見られるため、分子機構の解明には、これらのアリルと連鎖不平衡にあるバリエーションを特定し、独立の寄与を有するバリエーションを特定する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、次世代シーケンサーを用い、遺伝子発現制御領域を含めた *HLA-class II* 領域のシーケンス解析を施行し、膠原病抵抗性および感受性に独立の寄与を有する *DRB1\*13:02* ハプロタイプ、*DRB1\*09:01-DQB1\*03:03* ハプロタイプ上のバリエーションを同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

連携研究者である細道 (金沢大) らが確立した sequence capture 法を用い、日本人 ANCA 関連血管炎 (AAV) 患者、健常対照者各 192 例のゲノム DNA を対象に、*MHC-class II* から *class III* 境界領域に至る約 400kb の領域のシーケンス解析を、ショートリード型次世代シーケンサー (MiSeq) を用いて施行し、バリエーションの検出と関連解析を行った。

これと平行して、申請者らが別の研究課題において進めている日本人集団における AAV のゲノムワイド関連研究 (GWAS) において見いだされた *MHC-class II* 領域のバリエーション、およびヨーロッパ系集団における GWAS から報告された *HLA-DQ* 近傍の MPO-AAV 関連バリエーション (Lyons et al., 2012) をあわせて候補バリエーションとした。

研究期間中に、さらなる試料収集を進め、最終的に MPO-AAV 433 例、健常対照群 784 例を対象として、候補バリエーションの関連解析を行い、ロジスティック回帰分析を用いて、独立の寄与を有するバリエーションを特定した。

## 4. 研究成果

*DRB1\*13:02* ハプロタイプ上の疾患抵抗性バリエーション探索においては、MPO-AAV の次世代シーケンス解析により、*DRB1\*13:02* のイントロンに位置する複数のバリエーションが、*DRB1\*13:02* 同様、疾患抵抗性に関連することが新たに検出された。これらのバリエーションは *DRB1\*12:01*、*DRB1\*12:02* アリルにも検出され、MPO-AAV 抵抗性においては、*DRB1\*13:02* とこれらのバリエーションのいずれが一義的であるかは決定できなかった。しか

し、SLEやRAにおいては、*DRB1\*13:02*は疾患抵抗性であるが、*DRB1\*12:01*、*DRB1\*12:02*には疾患抵抗性の傾向は検出されなかった。また、*DRB1\*13:02*は日本人集団において*DQB1\*06:04*および*DQB1\*06:09*とハプロタイプを形成するが、申請者らの先行研究により、これらのなかでは*DRB1\*13:02*に一義的な関連があることが示唆されている(Furukawa et al., 2017)。以上により、少なくともこれらの疾患においては、イントロン配列も含め、*DRB1\*13:02*自体が一義的な疾患抵抗性アリルである可能性が高いと考えられた。

*HLA-class II*領域におけるMPO-AAVの疾患感受性バリエーションに関しては、ヨーロッパ系集団および日本人集団のMPO-AAVのGWASにおいて、それぞれ異なる*HLA-DQ*近傍の一塩基バリエーション(SNV)の関連が検出された。ヨーロッパ系集団において関連が検出されたSNVには、日本人では、*HLA-DRB1*による調整後、独立の関連は見いだされず、*HLA*自体が一義的と考えられたが、日本人集団におけるGWASによって検出されたSNVには、*HLA-DRB1*とは独立の関連が確認された。

一方、次世代シーケンス解析においては、*BTNL2*と*HLA-DRA*の遺伝子間領域に位置するSNV 2箇所において有意な関連が検出された。さらに、日本人集団におけるGWASにおいて、*BTNL2-DRA*領域に位置する別の2箇所のSNVに関連が検出された。これら4箇所の新規関連候補SNVおよび*DRB1\*09:01*は、いずれも互いに連鎖不平衡にあったものの、ロジスティック回帰分析により関連の独立性を検討したところ、*DRB1\*09:01*による調整後も、2箇所のSNVに有意な関連が残存したことから、*DRB1\*09:01*とは独立の寄与を有すると考えられた。これらは*HLA-DRA*の上流に位置していることから、*HLA-DRA*の発現調節への関与が予想されたものの、eQTL解析では、いずれのSNVにおいても、*HLA-DRA*よりも*HLA-DQA1*、*HLA-DQA2*、*HLA-DQB1*の発現レベルとの関連が強い傾向が観察された。

以上の結果から、日本人集団におけるMPO-AAVにおいては、*HLA-class II*領域に、複数の独立な感受性バリエーションが存在することが強く示唆され、一部はHLA結合抗原ペプチド特異性以外の機序を介すると考えられた。ごく最近、中国人集団において*DQA1\*03:02-DQB1\*03:03*ハプロタイプの関連が報告されたが(Wang et al., 2019)、今後、これらのSNVと*HLA-DRB1*、*DQA1*、*DQB1*の関係について、さらに検討を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>土屋尚之                                |
| 2. 発表標題<br>日本人集団におけるANCA関連血管炎およびSLEの疾患感受性遺伝子解析 |
| 3. 学会等名<br>第50回日本腎臓学会東部学術大会（招待講演）              |
| 4. 発表年<br>2020年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>土屋尚之                                |
| 2. 発表標題<br>日本人集団におけるANCA関連血管炎およびSLEの疾患感受性遺伝子解析 |
| 3. 学会等名<br>第50回日本腎臓学会東部学術大会（招待講演）              |
| 4. 発表年<br>2020年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川崎綾, 佐田憲映, 平野史生, 小林茂人, 長坂憲治, 杉原毅彦, 小野伸之, 藤本隆, 草生真規雄, 田村直人, 山縣邦弘, 住田孝之, 尾崎承一, 橋本博史, 榎野博史, 有村義宏, 針谷正祥, 土屋尚之 |
| 2. 発表標題<br>HLA-DRA上流領域バリエーションとMPO-ANCA陽性血管炎の関連   |
| 3. 学会等名<br>第64回日本リウマチ学会総会・学術集会   |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>土屋尚之                                     |
| 2. 発表標題<br>日本人集団におけるANCA関連血管炎および全身性エリテマトーデス関連遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名<br>第63回日本腎臓学会学術総会（招待講演）                     |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川崎綾, 平野史生, 佐田憲映, 小林茂人, 山田秀裕, 古川宏, 長坂憲治, 杉原毅彦, 山縣邦弘, 住田孝之, 當間重人, 尾崎承一, 橋本博史, 横野博史, 有村義宏, 針谷正祥, 土屋尚之. |
| 2. 発表標題<br>日本人ANCA関連血管炎のHLA-class II: ヨーロッパ系集団との比較.  |
| 3. 学会等名<br>第62回日本リウマチ学会総会・学術集会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>川崎綾, 平野史生, 佐田憲映, 小林茂人, 山田秀裕, 古川宏, 長坂憲治, 杉原毅彦, 山縣邦弘, 住田孝之, 當間重人, 尾崎承一, 橋本博史, 横野博史, 有村義宏, 針谷正祥, 土屋尚之. |
| 2. 発表標題<br>ANCA関連血管炎における間質性肺疾患とHLA Class II アリルの関連.  |
| 3. 学会等名<br>第63回日本人類遺伝学会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kawasaki A, Sada K-e, Hirano F, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Nagaksaka K, Sugihara T, Yamagata K, Sumida T, Tohma S, Ozaki S, Hshimoto H, Makino H, Arimura Y, Harigai M, Tsuchiya N. |
| 2. 発表標題<br>Association of HLA class II alleles with relapse and interstitial lung disease in myeloperoxidase (MPO)-ANCA positive vasculitis in a Japanese population.                                  |
| 3. 学会等名<br>2018 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Kawasaki A, Hirano F, Sada K-e, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Nagasaka K, Sugihara T, Yamagta K, Sumida T, Tohma S, Ozaki S, Matsuo S, Hashimoto H, Makino H, Arimura Y, Harigai M, Tsuchiya N. |
| 2. 発表標題<br>HLA-class II Associations with ANCA-associated vasculitis in the Japanese population: Different features from European populations.  |
| 3. 学会等名<br>2017 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting. (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子遺伝疫学研究室ホームページ  
<http://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/publicmd/GE/>

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)          | 備考 |
|-------|--|--------------------------------|----|
| 研究分担者 | 針谷 正祥<br>(Harigai Masayoshi)<br>(20238207)   | 東京女子医科大学・医学部・教授<br><br>(32653) |    |
| 研究協力者 | 荻原 真帆<br>(Ogiwara Maho)                      | 筑波大学・医学群医療科学類・学生               |    |
| 研究協力者 | 野呂 邦彦<br>(Noro Kunihiko)                     | 筑波大学・医学群医学類・学生                 |    |
| 連携研究者 | 細道 一善<br>(Hosomochi Kazuyoshi)<br>(50420948) | 金沢大学・医学系・准教授<br><br>(13301)    |    |
| 連携研究者 | 川崎 綾<br>(Kawasaki Aya)<br>(30532816)         | 筑波大学・医学医療系・助教<br><br>(12102)   |    |

