

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09583

研究課題名(和文) 関節リウマチにおける関節破壊進行の遺伝学的機構の解明

研究課題名(英文) Radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis

研究代表者

猪狩 勝則 (Ikari, Katsunori)

東京女子医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：80343557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：関節リウマチは関節の骨や軟骨が破壊されてしまう疾患であり、近年関節リウマチに対する治療成績は急速に向上したものの、一部に関節破壊が高度に進行してしまう患者がいる。今回の研究によりポリジェニックリスクスコアが、関節リウマチの関節破壊と関連することを世界で初めて示すことが出来た。特に若年発症の方の重症化を予測する場合には、過去に報告されたリスク因子より優れており、関節破壊リスクの高い患者群では治療強度を高めることで、関節破壊の進行をより効果的に抑えられると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究はポリジェニックスコアが関節リウマチの骨破壊の進行と関連することを示した初めての研究である。その識別力は特に若年発症者の場合に今まで報告されていたリスク因子よりも優れていた。疾患との関わりが強い遺伝子のみで構築したスコアを使った過去の研究では、関節破壊との関わりを示すことはできなかったことから、疾患との関わりが小～中程度の遺伝子もスコアに取り入れることが重要であることを示した。今回の研究は、関節リウマチにおけるゲノム情報を用いたオーダーメイド医療の第一歩となる。

研究成果の概要(英文)：We constructed polygenic risk scores using GWAS summary data on associations of single-nucleotide polymorphisms with RA susceptibility. Patients with polygenic risk scores in the top quintile had a higher risk of severe progression compared to those with polygenic risk scores in the bottom quintile, and the risk of severe radiographic progression was even higher when restricted to patients who were younger at disease onset. A polygenic risk score that is derived from GWAS data on RA susceptibility is associated with the level of severity of radiographic progression in patients with RA.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節リウマチ

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は患者数が全国で約 80 万人と推定されており、自己免疫疾患の中で最も患者数が多い疾患である。慢性の多関節炎により関節破壊を生じることによって機能障害が進行し、QOL (quality of life) を著しく低下させ、生命予後にも少なからぬ影響を与えることが知られている。RA の発症には遺伝要因と環境要因が関与しているとされ、遺伝性については双生児研究などで確認されており、遺伝要因の影響は約 50%と見られている。喫煙や歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis*、腸内細菌叢などが環境要因としてあげられ、遺伝要因として HLA-DR 遺伝子をはじめとする HLA 領域、シトルリン化酵素関連遺伝子、T 細胞活性化関連遺伝子など多くの領域が同定されており、特定の遺伝背景を持った人に環境要因が加わることにより、免疫寛容が破綻して自己免疫が成立し発症すると考えられている。

近年、分子標的薬をはじめとする新たな抗リウマチ薬の登場と治療アルゴリズムの整備により RA の治療成績は著しく向上し、臨床的寛解に達する患者がかなりの割合を占めるようになってきた。一方で程度に差はあるものの、分子標的薬を使用しても少なからぬ数の患者で関節破壊を食い止めることが出来ていないことも明らかとなっている。RA における関節破壊の病態はある程度明らかにされているが、関節破壊の程度には大きな個人差があり、その原因の解明はまだまだ不十分である。これまでに関節破壊の危険因子として喫煙や自己抗体陽性、積算 CRP などが同定されており、遺伝要因として HLA が指摘されているが、それ以外の関節破壊進行における遺伝要因の解明は進んでいない。

## 2. 研究の目的

関節破壊進行における遺伝要因の解明が進まない原因として、HLA 以外は個々の遺伝要因が関節破壊に与える影響が大きくなり、これまで十分な検定力が得られなかったことが考えられている。その解決のためにはこれまで以上に解析サンプル数を収集する必要がある。しかし患者から DNA を収集するとともに関節破壊を評価するための良質な画像データを得ることは容易ではなく、さらに関節破壊進行に影響を与える可能性のある臨床データの収集も不可欠であることがこの困難さに拍車をかけている。研究代表者が所属する東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターは国内最大の RA 診療施設であり、2000 年に RA に関する大規模観察研究 IORRA (Institute of Rheumatology, Rheumatoid Arthritis Cohort) を開始し、これまでに 10000 名を超える RA 患者を登録して、疾患活動性や投薬状況をはじめとした膨大な臨床データの収集を 18 年間にわたって続けている。しかもコホート登録患者のうち、約 3100 名の患者からの DNA 試料の収集に成功し、そのほとんどについて全ゲノム領域の遺伝子多型を同定しており、これまでに数多くの RA 関連遺伝子解析の結果を報告している。長期にわたる豊富な臨床データに加え、良質な画像データが付随していることは本研究課題において大きな強みとなる。

関節破壊進行における遺伝要因の解明のためのもう一つのアプローチはこれまでと異なる解析手法を取ることである。疾患感受性遺伝子多型の多くは遺伝子発現量の調節異常によって疾患発症リスクを上げているが、その調節異常は組織特異的である。そこで疾患発症に影響し得る遺伝子発現を組織ごとに明らかにし、さらにパスウェイに集約することで遺伝学的機構の解明につなげる手法を開発した。関節破壊進行機序においても同様の手法を適用することで遺伝学的機構の解明が可能と考えられる。すでに構築済みの複数の免疫細胞を対象とした eQTL カタログに加え、滑膜および軟骨における eQTL カタログを構築し、関節破壊に関連する複数の遺伝子多型が複数の遺伝子に与える発現調節異常を統合的に評価することで、未だ十分には明らかにされていない RA における関節破壊進行の遺伝学的機構を明らかにし、治療標的となる遺伝子経路を同定することが本研究の目的である。これは遺伝子情報のみから関節破壊進行のリスク評価が可能となることを意味し、将来的には得られた知見を元に precision medicine (精密医療) の構築や創薬につなげることが期待できる。

## 3. 研究の方法

### サンプル収集)

当施設で実施中の IORRA コホート登録患者のうち、DNA の提供に関して書面で同意を得た約 3100 名の患者を対象とする。このうち 3008 名の遺伝子多型同定を終えている。またこのうち 600 名を超える患者からは手術時に滑膜組織と軟骨組織の収集を行っており、eQTL 解析に使用する。喫煙歴、自己抗体価、積算 CRP、投薬歴など必要に応じて調整因子として使用する臨床データは IORRA コホートより入手する。関節破壊の評価には熟練した単独の読影者による Sharp/van der Heijde score (SHS) を使用し (観察者内一致率 0.95)、5 年間の関節破壊の近似値として発症 5 年目の SHS を使用する (n = 1544)。さらに新たに 1000 名を目標に画像データを取得し、バリデーションに使用する。

全ゲノム領域の遺伝子多型同定と関節破壊関連候補遺伝子多型の抽出)

全ゲノム領域の遺伝子多型同定 (GWAS) には Infinium OmniExpress (イルミナ社) を用いる。Quality control (QC) には PLINK 1.9、構造化解析には EIGENSTRAT を使用する。1000 ゲノムデータ (release v3) を参照データとし、IMPUTE2 により遺伝子多型データの推測による補完 (インピュテーション) を行う。なお遺伝子多型同定については他のプロジェクトで得た遺伝子多型情報の二次利用を前提としているため研究費を必要としないことはこの研究計画の利点となる。PLINK 1.9 を用いて、正規化のために対数化した SHS ( $n = 1544$ ) を従属変数とし、全ゲノム領域の遺伝子多型を独立変数とした関連解析を行い、関節破壊関連候補遺伝子多型を抽出する。抽出に際しては感度を優先し、いわゆるゲノムワイド水準 ( $P \leq 5 \times 10^{-8}$ ) ではなく、False discovery rate  $< 0.01$  を基準に用いる。

eQTL 効果を統合した組織特異的なパスウェイ解析)

遺伝子発現予測モデルを最良線形不偏予測法により構築する。凍結保存しておいた約 100 名分の滑膜および軟骨の全 RNA (eQTL 解析と関節破壊関連候補遺伝子多型の抽出に使用していない独立したサンプル、遺伝子多型同定済) を使用し、構築したカタログに含まれる eQTL が発現量を変化させる遺伝子群について発現解析を行うとともに、遺伝子発現予測モデルを用いてこれらの遺伝子群の発現予測を行い、両者の違いをピアソン積率相関係数により評価する (polygenic score)。eQTL 効果を元にした遺伝子レベルでの関節破壊関連因子解析を行い、この結果については新たに収集したバリデーショナルセットを用いて評価する。さらに各 eQTL の効果を polygenic score で重み付けをした上でパスウェイ解析を行う (functional class scoring approach)。パスウェイデータベースには Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) を用いる。これにより個々の関節破壊に関連した eQTL の効果は小さくとも、多数の効果を統合することで関節破壊進行につながるパスウェイ活性を示す遺伝子経路を探索できる。さらに構築済みの複数の免疫細胞を対象とした eQTL カタログを用いて統合解析を行うことで、そのパスウェイ活性が組織特異的な効果なのか否かの評価も行う。以上により関節破壊進行の遺伝学的機構の解明と治療標的となる遺伝子経路の同定を試みる。

#### 4. 研究成果

当初の計画を一部変更し、疾患感受性をターゲットとした GWAS の要約データを元にポリジェニックリスクスコア (PRS) を構築することで関節破壊予測に用いる事が可能かを検討した。まず関節破壊が進行した群としていない群の PRS を比較したところ、この2つの群のもつスコアに明らかな差を認められた。この傾向は患者を発症年齢に応じて3つのグループ(若年発症; 40歳, 中年発症; >40歳, 60歳, 高齢発症; >60歳)に分け、若年発症群のみで解析すると顕著になった。さらにこのスコアが関節破壊を分類する能力 ROC 曲線を用いて数値化したところ、特に若年発症群で関節破壊を分類する能力が高いことがわかった。次に PRS に応じて患者を5群に分け、重度進行群に分類されるリスクを比較したところ、PRS が最も高い群は最も低い群と比べて、進行群に分類されるリスクが約2倍であった。若年発症に限定して解析を行ったところ、PRS が最も高い群は最も低い群と比べて、進行群に分類されるリスクが約5倍となった。さらに既知の関節破壊進行関連因子である ACPA および HLA 領域と PRS を比較したところ、全患者での解析では、PRS は ACPA と同等の識別力があり、若年発症群に限定した場合は ACPA や HLA 領域よりも優れた識別力を示した。最後にロジスティック回帰モデルで多変量解析を行い、PRS と他の因子(発症年齢、性別、喫煙歴、ACPA、リウマチ因子、BMI、歯周病、関節リウマチの薬、HLA 領域 (Ser11)) を組み合わせることで、識別力が向上するかを調べた結果、PRS が関節破壊の進行に関連する独立した危険因子であること、他の因子と組み合わせると識別力が向上することを示すことができた。

本研究は PRS が RA の骨破壊の進行と関連することを示した初めての研究である。その識別力は特に若年発症者の場合に過去に報告されている危険因子よりも優れていることがわかった。さらに、PRS と他の臨床情報を組み合わせたモデルでは、PRS が独立した関節破壊のリスク因子であることがわかり、識別力は向上した。疾患との関わりが強い遺伝子のみで構築したスコアを使った過去の研究では、関節破壊との関わりを示すことはできなかったことから、疾患との関わりが小~中程度の遺伝子もスコアに取り入れることが重要であることを示した。本研究は RA におけるゲノム情報を用いたオーダーメイド医療の第一歩であり、今後の研究では、さらに精度を向上させる方法を模索していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda Suguru, Ikari Katsunori, Yano Koichiro, Terao Chikashi, Tanaka Eiichi, Harigai Masayoshi, Kochi Yuta	4. 巻 74
2. 論文標題 Association of Polygenic Risk Scores With Radiographic Progression in Patients With Rheumatoid Arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 791 ~ 800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.42051	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------