

## 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25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510213

研究課題名（和文） リシーケンシングによる関節リウマチ感受性稀少変異の探索

研究課題名（英文） Exome sequencing for disease gene discovery in rheumatoid arthritis

研究代表者

光永 滋樹 (MITSUNAGA SHIGEKI)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20510051

研究成果の概要（和文）：19例のRA患者のエクソーム解析を行い、非自己免疫疾患患者のエクソーム解析結果44例と比較した。RA感受性遺伝子の場合、アミノ酸変異をともなう low/rare variant の1遺伝子あたりの数は対象群よりも多いと考えられるので、その値を比較し、RA感受性候補遺伝子の絞り込みを行った。その後、患者群48例、対象群48例でSNVのvalidationと1次スクリーニングを行い、p値が0.1以下のものは患者群432例、対象群432例で関連解析を行った。絞り込んだ15遺伝子のなかで1次スクリーニングのp値が0.1以下のものはBTNL2, NOTCH4, MYPNの3遺伝子だけであった。これら3遺伝子の関連解析で得られた最も低いp値は、NOTCH4:  $p = 4.02E-12$ 、MYPN:  $p = 0.0047$ 、BTNL2:  $p = 4.55E-09$ であった。BTNL2はHLA-DRB1とNOTCH4の間に存在し、どちらからも170 kbの距離にあるが、それらの遺伝子のRA感受性アレルで補正を行っても完全連鎖にある3つのSNPはRAとの有意な関連を保持していた (DRB1\*04:05, \*04:01, \*10:01:  $p = 0.0156$ , rs2071282-T in NOTCH4:  $p = 0.00368$ )。これらの結果から、BTNL2はHLA-DRB1およびNOTCH4からは独立してRA感受性を付与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The butyrophilin-like protein 2 gene (*BTNL2*) within the class III region of the Major Histocompatibility Complex (MHC) genomic region was identified as a rheumatoid arthritis (RA) susceptibility gene by exome sequencing (19 RA cases) with stepwise filtering analysis and then validated by Sanger sequencing and association analysis using 432 cases and 432 controls. Logistic regression of the Sanger-sequenced single nucleotide variants (SNVs) in an association study of 432 cases and 432 controls showed that twelve non-synonymous SNPs in *BTNL2* were significantly associated with RA. The lowest  $p$  values were obtained from 3 SNPs, rs41521946, rs28362677, and rs28362678, which were in absolute linkage disequilibrium:  $p = 4.55E-09$ , OR = 1.88, 95% CI = 1.52 – 2.33. The *BTNL2* locates on chromosome 6 between *HLA-DRB1* and *NOTCH4* and is 170 kb apart from these two genes. Although *DRB1* and *NOTCH4* were reported to be RA-susceptible, the 3 *BTNL2* SNPs retained significant association with RA when evaluated by the logistic

regression with the adjustment for RA-susceptible *HLA-DRB1* alleles in Japanese or rs2071282-T in *NOTCH4*:  $p = 0.0156$  and  $p = 0.00368$ , respectively. These results suggest that the 3 non-synonymous SNPs in *BTNL2* confer RA-risk independently from *HLA-DRB1* and *NOTCH4*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：疾患関連遺伝子、稀少変異、関節リウマチ

### 1. 研究開始当初の背景

近年 DNA マイクロアレイを用いた Genome Wide Association Study (GWAS) により common disease を中心とした疾患感受性遺伝子が明らかにされてきた。しかし、DNA マイクロアレイに使用されている SNP は通常 minor allele frequency が 5% 以上のものであり、それよりも allele frequency が低いものは原理的に検出できない。そのため、例えば関節リウマチでは発症リスクの約 60% 程度が遺伝的要因であると考えられているが、現在までに見いだされている感受性遺伝子では遺伝的要因の 3.6% 程度しか説明できていない (*Nat Genet.* **40**, 1216, 2008)。

### 2. 研究の目的

関節リウマチ (RA) 発症には遺伝的要因の寄与が大きいとされているが、これまでに全ゲノム関連解析で見いだされた *HLA* 以外の感受性遺伝子のみでは遺伝的要因の数%程度しか説明できていない。この原因の一つとして、通常の全ゲノム関連解析 (GWAS) では検出が難しい感

受性遺伝子における low/rare variant の存在が考えられている。我々は関節リウマチ発症に關与する low/rare variant の探索を目的として、RA 患者におけるエクソーム解析を行った。

### 3. 研究の方法

「ゲノム支援」の支援を受け、19 例の RA 患者の exome sequencing を行った。共同研究者から提供された非自己免疫疾患患者のエクソーム解析結果 44 例と比較し、RA 感受性候補遺伝子を探索した。RA 感受性遺伝子の場合、アミノ酸変異をともなう low/rare variant の 1 遺伝子あたりの数は対象群よりも多いと考えられるので、その値を比較し、RA 感受性候補遺伝子の絞り込みを行った。その後、1,000 人ゲノムプロジェクトの日本人集団のデータ 36 例と比較してさらに絞り込んだ後、患者群 48 例、対象群 48 例で SNV の validation と 1 次スクリーニングを行った。1 次スクリーニングで  $p$  値が 0.1 以下のものは患者群 432 例、対象群 432 例で関連解析を

行った

#### 4. 研究成果

非自己免疫疾患の対象群 44 例との比較において差が大きかったものから *HLA* 以外の 30 遺伝子を選抜し、さらに 1,000 人ゲノムプロジェクトの 36 例との比較により 15 遺伝子に絞り込んだ。15 遺伝子のなかで 1 次スクリーニングの  $p$  値が 0.1 以下のものは *BTNL2*, *NOTCH4*, *MYPN* の 3 遺伝子だけであった。*NOTCH4* では既報の rs2071282 が最も低い  $p$  値を示した ( $p = 4.02E-12$ , OR = 3.14, 95% CI = 2.27 – 4.33.)。 *MYPN* の rs10997975 と RA との関連は弱いものであった ( $p = 0.0047$ , OR = 1.33, 95%CI = 1.09 – 1.62.)。しかし、*BTNL2* 中の非同義置換 SNP12 種類は、low/rare variant では無かったが、全て RA と強い関連を示し、完全連鎖にある 3 つの SNP, rs41521946, rs28362677, rs28362678 が最も強い関連を示した ( $p = 4.55E-09$ , OR = 1.88, 95% CI = 1.52 – 2.33.)。 *BTNL2* は *HLA-DRB1* と *NOTCH4* の間に存在し、どちらからも 170 kb の距離にあるが、それらの遺伝子の RA 感受性アレルで conditional logistic regression を行っても完全連鎖にある 3 つの SNP は RA との有意な関連を保持していた (*DRB1\*04:05*, *DRB1\*04:01*, *DRB1\*10:01*:  $p = 0.0156$ , rs2071282-T in *NOTCH4*:  $p = 0.00368$ )。これらの結果から、*BTNL2* は *HLA-DRB1* および *NOTCH4* からは独立して RA 感受性を付与すると考えられた。

#### 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 8 件)

- ① Nakaoka H, Mitsunaga S, Hosomichi K, Shyh-Yuh L,

Sawamoto T, Fujiwara T, Tsutsui N, Suematsu K, Shinagawa A, Inoko H, Inoue I. Detection of Ancestry Informative HLA Alleles Confirms the Admixed Origins of Japanese Population. *PLoS One*. **8**(4): e60793, 2013. (査読有り)

- ② Mitsunaga S, Shimizu S, Okudaira Y, Oka A, Tanaka M, Kimura M, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Improved loop-mediated isothermal amplification for HLA-DRB1 genotyping using RecA and a restriction enzyme for enhanced amplification specificity. *Immunogenetics*. 2013 Mar 9. [Epub ahead of print] (査読有り)

- ③ Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Kunii N, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Kashiwase K, Azuma F, Kulski JK, Inoue I, Inoko H. Exome sequencing identifies novel rheumatoid arthritis-susceptible variants in the *BTNL2*. *J Hum Genet*. **58**(4): 210-5, 2013. (査読有り)

- ④ Shiina T, Suzuki S, Ozaki Y, Taira H, Kikkawa E, Shigenari A, Oka A, Umemura T, Joshita S, Takahashi O, Hayashi Y, Paumen M, Katsuyama Y, Mitsunaga S, Ota M, Kulski JK, Inoko H. Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. *Tissue Antigens*. **80**(4):

- 305-16, 2012. (査読有り)
- ⑤ Mitsunaga S, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Inoue I, Kulski JK, Inoko H. Associations between six classical HLA loci and rheumatoid arthritis: a comprehensive analysis. *Tissue Antigens*. **80**(1): 16-25, 2012. (査読有り)
- ⑥ Nakaoka H, Cui T, Tajima A, Oka A, Mitsunaga S, Kashiwase K, Homma Y, Sato S, Suzuki Y, Inoko H, Inoue I. A systems genetics approach provides a bridge from discovered genetic variants to biological pathways in rheumatoid arthritis. *PLoS One*. **6**(9): e25389, 2011. (査読有り)
- ⑦ Mitsunaga S, Okudaira Y, Kunii N, Cui T, Hosomichi K, Oka A, Suzuki Y, Homma Y, Sato S, Inoue I, Inoko H. Exact break point of a 50 kb deletion 8 kb centromeric of the HLA-A locus with HLA-A\*24:02: the same deletion observed in other A\*24 alleles and A\*23:01 allele. *Immunogenetics*. **63**(8): 467-74, 2011. (査読有り)
- ⑧ Mitsunaga S, Homma Y, Narita A, Kashiwase K, Okudaira Y, Shiina Y, Inoue I, Inoko H. Particular human leukocyte antigen alleles are associated with biochemical traits in the Japanese population. *Hum Immunol*. **72**(7): 566-70, 2011. (査読有り)
- ① Hirofumi Nakaoka, Shigeki Mitsunaga, Hidetoshi Inoko, Ituro Inoue: Integrative analysis of whole-gene co-expression network and exome sequence data to characterize pathways relevant to rheumatoid arthritis. 62nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Francisco, CA, Nov 6 - 10, 2012.
- ② 奥平裕子、光永滋樹、鈴木康夫、桑名正隆、佐藤慎二、金子祐子、本間康彦、成田暁、柏瀬貢一、井ノ上逸朗、猪子英俊: 関節リウマチとHLA 6座との関連解析. 第21回日本組織適合性学会大会 東京 明治大学駿河台キャンパス 2012年9月15日~17日.
- ③ 奥平裕子、光永滋樹、國井七絵、細道一善、田中政之、林英樹、河田寿子、鈴木康夫、佐藤慎二、本間康彦、井ノ上逸朗、猪子英俊: エクソーム解析による関節リウマチ感受性遺伝子の探索. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜 パシフィコ横浜, 2011年12月13日~16日.
- ④ 中岡 博史, 崔 泰林, 田嶋 敦, 光永滋樹, 猪子 英俊, 井ノ上 逸朗: 関節リウマチにおけるシステムズ・ジェネティクス・アプローチ~感受性遺伝子座から生物学的経路の推定. 日本人類遺伝学会第56回大会, 千葉 幕張メッセ, 2011年11月9日~12日.
- ⑤ 奥平裕子、光永滋樹、崔 泰林、河田寿子、細道一善、山口香織、岡 晃、井ノ上逸朗、猪子英俊: A\*24:02 を有するHLA-A遺伝子近傍の欠失領域の解析. 第19回日本組織適合性学会大会, 東京 東京大学本郷キャンパス, 2010年9月17日~19日.

⑥ 國井七絵、光永滋樹、奥平裕子、成田 暁、鈴木康夫、本間康彦、桑名正隆、柏瀬貢一、井ノ上逸朗、猪子英俊：関節リウマチの病型とHLAとの関連解析. 第 19 回日本組織適合性学会大会, 東京 東京大学本郷キャンパス, 2010 年 9 月 17 日～19 日.

⑦ 勝山喜彦、太田雅穂、吉川枝里、光永滋樹、益尾清恵、猪子英俊：HLA-DRB1\*14:54 の分布. 第 19 回日本組織適合性学会大会, 東京 東京大学本郷キャンパス, 2010 年 9 月 17 日～19 日.

⑧ 國井七絵、光永滋樹、細道一善、奥平裕子、鈴木康夫、本間康彦、井ノ上逸朗、猪子英俊：関節リウマチ感受性遺伝子における希少多型・変異の探索. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 神戸 ポートアイランド, 2010 年 12 月 7 日～10 日.

⑨ 中岡 博史, 崔 泰林, 田嶋 敦, 光永滋樹, 井ノ上 逸朗 : A systematic approach to constructing genomic risk prediction model of common disease and assessing its clinical validity: A case study of rheumatoid arthritis. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 ポートアイランド, 2010 年 12 月 7 日～10 日.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

光永 滋樹 (MITSUNAGA SHIGEKI)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：20510051

##### (2) 研究分担者

猪子 英俊 (INOKO HIDETOSHI)

東海大学・医学部・教授  
研究者番号：10101932  
(H22)

井ノ上 逸朗 (INOUE ITURO)  
東海大学・医学部・教授  
研究者番号：00192500  
(H22)

椎名 隆 (SHIINA TAKASHI)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：00317744  
(H22)