

## 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 6 月 17 日現在

機関番号：82710  
 研究種目：基盤研究 C  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22591090  
 研究課題名（和文）全身性エリテマトーデスにおける S A P 関連遺伝子発現制御の解析  
 研究課題名（英文）The regulation of the expression of *SH2D1A* gene in systemic lupus erythematosus.  
 研究代表者  
 古川 宏（FURUKAWA HIROSHI）  
 独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）  
 遺伝子診断・治療研究室・室長  
 研究者番号：00372293

## 研究成果の概要（和文）：

全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウス MRL/lpr に起きた突然変異種 MRL/lpr/rpl マウスを用いた研究より、Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) ファミリー受容体から SLAM-associated protein (SAP) 分子を経た SAP シグナルが SLE の発症に必要であることが明らかになった。ヒトリンパ球における SAP 遺伝子の発現量とそれを制御する遺伝子多型がヒト SLE の発症原因として寄与しているかを検証した。SLE30 例のゲノム DNA からシーケンス法により新規 SNP を探索し、ハプロタイプ・連鎖不均衡ブロック・タグ SNP を決定した。相模原病院・筑波大にて SLE506 例健常人 330 例の遺伝子型を決定した。*SH2D1A* 遺伝子 intron 2 の SNP rs2049995 が SLE と関連することが明らかになり ( $P=0.0110$ , odds ratio [OR] 1.97, 95% confidence interval [CI] 1.16-3.34)、rs2049995 は 20 歳以下発症 SLE 例でより強い関連を示した ( $P=0.0067$ , OR 2.65, 95%CI 1.28-5.46)。ルシフェラーゼアッセイで疾患感受性アレルは 1.9 倍の発現を示した。

## 研究成果の概要（英文）：

SH2D1A, also known as SLAM-associated protein (SAP), is an adaptor protein. Recently, it was reported that SAP deficient mice were protected from systemic lupus erythematosus (SLE). In this study, we postulated *SH2D1A* gene to be a candidate susceptibility gene for SLE and analyzed its association with SLE. A case-control association study was conducted on 5 tag single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *SH2D1A* region in 506 Japanese female SLE patients and 330 healthy female controls. The luciferase assay was performed to determine the functional role of the SNP associated with SLE. One SNP in the intron 2, rs2049995, showed association with SLE ( $P=0.0110$ , odds ratio [OR] 1.97, 95% confidence interval [CI] 1.16-3.34, under the dominant model). The association of rs2049995 seemed to be stronger in the subset with the age of onset less than 20 years ( $P=0.0067$ , OR 2.65, 95%CI 1.28-5.46). Functional evaluation of rs2049995 showed that reporter gene activity was increased 1.9-fold for the susceptible allele compared with the resistant allele.

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	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・アレルギー内科学

キーワード：膠原病学、疾患関連遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

Fas 遺伝子を欠損する全身性エリテマトーデス(SLE)モデルマウス MRL/lpr では脾腫・リンパ節腫脹・糸球体腎炎・血管炎・自己抗体産生などの SLE 所見を示すことが知られている。この MRL/lpr に起きた突然変異種 MRL/lpr/rpl マウスではこれらの SLE 所見が著明に改善しており、これは Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP)の欠損に由来していることを我々は明らかにした (*J Immunol* 2006; 176: 395)。SAP 分子は SLAM ファミリー受容体と結合して細胞活性化シグナルを伝達するアダプター分子であり、SLAM ファミリー受容体から SAP 分子を経た SAP シグナルが SLE の発症に必要であると考えられる。そこで、ヒトリンパ球における SAP 遺伝子の発現量とそれを制御する遺伝子多型がヒト SLE の発症原因として寄与しているかを検証する。ヒトにおける膠原病と SAP の発現や遺伝子多型との関連は報告されておらず、本研究が初めてとなる。

## 2. 研究の目的

これまでに SAP をシグナル伝達に用いる SLAM ファミリー受容体とヒト SLE との関連は報告されているが、ヒトにおける膠原病と SAP の発現や遺伝子多型との関連は報告されておらず、本研究が初めてとなる。また、SAP 遺伝子は X 染色体上に位置することから、SAP 遺伝子の発現制御機構を明らかにすることは SLE の男女比の偏り(1:9 程度)を遺伝学的に説明する一助になりうる。

本研究の結果から、SLAM ファミリー受容体から SAP 分子を経て伝えられる SAP シグナルに関わる分子や SAP の発現を制御する分子の阻害剤などのより特異的な分子標的薬を開発し、より特異的で副作用の少ない治療法を生み出すことは次世代の治療戦略の指針にもなりうる。

SLE モデルマウス MRL/lpr に起きた突然変異種 MRL/lpr/rpl マウスを用いた研究より、SLAM ファミリー受容体から SAP 分子を経た SAP シグナルが SLE の発症に必要であることが明らかになった。ヒトリンパ球における SAP 遺伝子の発現量とそれを制御する遺伝子多型がヒト SLE の発症原因として寄与しているかを検証する。

## 3. 研究の方法

本研究への協力に同意した SLE 患者より採取した血液から Ficoll を用いて末梢血単核球(PBMC)を分離する。これよりゲノム DNA と total RNA を Trizol により抽出する。相模原病院・都立駒込病院・北里大学・横浜南共済病院・帝京大学・国立病院機構九州医療センター・国立病院機構姫路医療センタ

ー・国立病院機構盛岡病院・都立多摩総合医療センター・横浜市立大学付属市民総合医療センターで検体採集を行った。国立病院機構相模原病院職員の成人健常人ボランティアまたはヒューマンサイエンス研究資源バンク(組織培養研究 2004, Vol.23: 71)より分譲される検体を健常人対照とした。

## 4. 研究成果

抽出されたゲノム DNA から SAP 遺伝子の一塩基多型(SNP)のタイピングを行った。30 例のゲノム DNA からダイレクトシーケンス法により新規 SNP を探索し、ハプロタイプ・連鎖不均衡ブロック・タグ SNP を決定した。相模原病院および筑波大にて SLE506 例健常人 330 例の遺伝子型を決定した。この結果より、SH2D1A 遺伝子 intron 2 の SNP rs2049995 が SLE と関連することが明らかになり ( $P=0.0110$ , odds ratio [OR] 1.97, 95% confidence interval [CI] 1.16-3.34)、rs2049995 は 20 歳以下発症 SLE 例でより強い関連を示した ( $P=0.0067$ , OR 2.65, 95%CI 1.28-5.46)。ルシフェラーゼアッセイでは疾患感受性アレルで 1.9 倍の発現を示した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Oka S, Furukawa H, Kashiwase K, Tsuchiya N, Tohma S. A novel HLA-DQB1\*04 allele, DQB1\*04:10, identified in a Japanese individual. *Tissue Antigens*. 2013 in press
2. Genin E, Coustet B, Allanore Y, Ito I, Teruel M, Constantin A, Schaefferbeke T, Ruysens-Witran A, Tohma S, Cantagrel A, Vittecoq O, Barnetche T, Le Loët X, Fardellone P, Furukawa H, Meyer O, Chiocchia G, Tsuchiya N, Martin J, Dieudé P. Epistatic interaction between BANK1 and BLK in rheumatoid arthritis: results from a large trans-ethnic meta-analysis. *PLoS One*. 2013;8(4):e61044
3. Oka S, Furukawa H, Shimada K, Hayakawa H, Fukui N, Tsuchiya N, Tohma S. Serum biomarker analysis of collagen disease patients with acute-onset diffuse interstitial lung disease. *BMC Immunology* 2013 Feb 14;14(1):9.
4. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Shimada K, Matsui T, Ikenaka T, Hashimoto A, Okazaki Y, Takaoka H, Futami H, Komiya A, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Suda A, Nagaoka S, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Fukui N, Hashimoto H,

- Sumida T, Ono M, Tsuchiya N, Tohma S. Association of a single nucleotide polymorphism in the *SH2D1A* intronic region with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013 Apr;22(5):497-503.
5. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Miyashita T, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Association of increased frequencies of *HLA-DPB1\*05:01* with the presence of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies in Japanese rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *PLoS One*. 2013;8(1):e53910.
  6. Furukawa H, Oka S, Matsui T, Hashimoto A, Arinuma Y, Komiya A, Fukui N, Tsuchiya N, Tohma S. Genome, epigenome and transcriptome analyses of a pair of monozygotic twins discordant for systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol*. 2013 Feb;74(2):170-5.
  7. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Rheumatoid Arthritis associated Interstitial Lung Disease (RA-ILD) Study Consortium, Tsuchiya N, Tohma S. *HLA-A\*31:01* and methotrexate-induced interstitial lung disease in Japanese rheumatoid arthritis patients: A multi-drug hypersensitivity marker? *Ann Rheum Dis*. 2013 Jan;72(1):153-5.
  8. Oka S, Furukawa H, Kashiwase K, Tsuchiya N, Tohma S. Identification of a novel HLA allele, *HLA-DQB1\*06:51*, in a Japanese rheumatoid arthritis patient. *Tissue Antigens*. 2012 Oct;80(4):386-7.
  9. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Sugii S, Ohashi J, Matsui T, Ikenaka T, Nakayama H, Hashimoto A, Takaoka H, Arinuma Y, Okazaki Y, Futami H, Komiya A, Fukui N, Nakamura T, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Association of human leukocyte antigen with interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: A protective role for shared epitope. *PLoS One*. 2012;7(5):e33133.
  10. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. Association of *PHRF1-IRF7* region polymorphism with clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Lupus*. 2012 Jul;21(8):890-5.
  11. Hasebe N, Kawasaki A, Ito I, Kawamoto M, Hasegawa M, Fujimoto M, Furukawa H, Tohma S, Sumida T, Takehara K, Sato S, Kawaguchi Y, Tsuchiya N. Association of *UBE2L3* polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jul;71(7):1259-60.
  12. Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. *TLR7* single nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region and intron independently contribute to systemic lupus erythematosus in Japanese women: a case-control association study. *Arthritis Res Ther*. 2011 Mar 11;13(2):R41.
  13. Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Kusaoi M, Ohashi J, Graham RR, Matsuta K, Behrens TW, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. Association of TNFAIP3 interacting protein 1, *TNIP1* with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study. *Arthritis Res Ther*. 2010 Sep 17;12(5):R174.
- [学会発表](計4件)
1. Kawasaki A, Inoue N, Ajimi C, Ito I, Sada K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Tomita M, Sumida T, Tohma S, Miyasaka N, Ozaki S, Hashimoto H, Makino H, Harigai M and Tsuchiya N. Genetic Background of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis in a Japanese Population: Association of *STAT4* with Myeloperoxidase Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Positive Vasculitis. Sixty-ninth Annual Scientific Meeting of American College of Rheumatology (Washington D.C., Nov.9-14 2012).
  2. Tsuchiya N, Kawasaki A, Ito I, Ajimi C, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Tohma S, Tomita M, Sumida T, Tokunaga K, Miyasaka N, Hashimoto H, Ozaki S, Makino H, Harigai M. Genetic background of ANCA-associated vasculitis in a Japanese population: a candidate gene study. The Asia

- Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop 2012 (Tokyo, Japan, March 28-31, 2012)
3. Ito I, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Takasaki Y, Hashimoto H, Tohma S, Sumida T, Tsuchiya N. An association study of 8p23.1 region encoding *BLK*, *FAM167A*, *C8orf12* and *XKR6* with systemic lupus erythematosus in Japanese. Ninth International Congress on Systemic Lupus Erythematosus (Vancouver, British Columbia, Canada, June 23-27, 2010)
  4. Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Graham RR, Behrens TW, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. Association of *TNFAIP3* and *TNIP1* SNPs with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Ninth International Congress on Systemic Lupus Erythematosus (Vancouver, British Columbia, Canada, June 23-27, 2010)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古川 宏 (FURUKAWA HIROSHI)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨

床研究センター) 遺伝子診断・治療研究  
室・室長

研究者番号：00372293

### (2) 研究分担者

當間 重人 (TOUMA SHIGETO)

独立行政法人国立病院機構(相模原病院臨  
床研究センター) リウマチ性疾患研究部・部  
長

研究者番号：50207528

### (3) 連携研究者

土屋 尚之 (TSUCHIYA NAOYUKI)

筑波大学医学医療系・教授

研究者番号：60231437