

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659495

研究課題名（和文） 膠原病の遺伝素因における danger signal 応答遺伝子 NLRP3 の役割

研究課題名（英文） A role of danger signal response gene NLRP3 for the genetic predisposition to systemic rheumatic diseases.

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

研究成果の概要(和文) : *NLRP3* 遺伝子から 16 個所の tagSNP を選択し、日本人全身性エリテマトーデス(SLE) 741 例、健常対照群 916 例を対象とした関連研究を施行したところ、腎障害合併 SLE 群における rs1539019A/A 遺伝子型、rs4925650A アリルと A/A 遺伝子型、dsDNA 抗体陽性群における rs4925650A/A 遺伝子型の増加が検出された。eQTL 解析では、rs1539019A/A 遺伝子型と T 細胞における *NLRP3* mRNA の低下との関連が検出された。これらの SNP と全身性強皮症 420 例、ANCA 関連血管炎 218 例との関連を検討したが、有意な関連は検出されなかった。以上の結果から、*NLRP3* 遺伝子多型と SLE の臨床症状との関連が示唆された。

研究成果の概要(英文) : To examine whether the polymorphisms in *NLRP3* gene play a role in the genetic predisposition to autoimmune rheumatic diseases, association study was performed for 16 tagSNPs of *NLRP3* on 741 Japanese patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and 916 healthy controls. Increased frequency of rs1539019A/A genotype, rs4925650A allele and A/A genotype was detected in SLE with renal disorder. rs4925650A/A genotype was also associated with dsDNA antibody positive SLE. eQTL analysis indicated association between decreased *NLRP3* mRNA level in T cells and rs1539019A/A. Significant association of these SNPs with systemic sclerosis and ANCA associated vasculitis was not detected. These results suggested association of *NLRP3* polymorphisms with clinical phenotypes of SLE.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	860,000	3,660,000

研究分野：膠原病学

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

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)、全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)や ANCA 関連血管炎(anti-neutrophil cytoplasmic antibody-

associated vasculitis, AAV)に代表される膠原病は、病因未解明の難治性全身性自己免疫疾患である。

これらの疾患の発症においては、遺伝的背景の重要性が確立している一方、一卵性双生

児における発症一致率が 100%に遠くおよばないことから、環境因子をはじめとする後天的要因が重要であることも確実である。回避可能な環境因子の解明は、自己免疫疾患における予防医学の構築上、必須である。

これまでの研究により、微生物や環境物質、さらには、生体組織が障害を受けたときに放出される尿酸、ATP などの” danger signal” に応答する toll-like receptor (TLR)、NOD-like receptor (NLR)、RIG-I-like receptor (RLR)、interferon regulatory factor (IRF)ファミリーや I 型インターフェロン(type I IFN)経路に関連する遺伝子群が、多数、膠原病をはじめとする自己免疫疾患の疾患感受性候補遺伝子として検出されてきた。このことから、全身性自己免疫疾患の発症には、比較的ユビキタな環境刺激や danger signal に対する応答性の個体差が重要な役割をはたす可能性が強く示唆される。

全身性自己免疫疾患において確立した環境因子は少数であるが、ウイルス感染とシリカは、複数の自己免疫疾患に共通する環境因子として注目を集めている。シリカは上記いずれの疾患においても危険因子として報告されているが、特に AAV、SSc においてその重要性が認識されている。近年、NLR ファミリーに属する NLRP3(NALP3)が、ウイルス、シリカをはじめとする種々の環境刺激や danger signal に応答し、IL-1 β 産生を誘導する重要な因子であることが明らかにされた。

NLRP3 遺伝子の稀な変異は、単一遺伝子疾患である cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS) の原因となる。一方、NLRP3 多型は、Crohn 病、食物アナフィラキシー等との関連が報告されている。これらは、NLRP3 の変異や多型は、免疫疾患の原因になり得る機能的重要性を有することが示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、NLRP3 遺伝子多型の系統的な関連研究により、SLE、SSc、AAV の遺伝的素因との関連を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

NLRP3 遺伝子全長から、日本人集団における minor allele frequency (MAF) >0.05、 r^2 >0.8 の条件で 16 個所の tagSNP を選択し

た。まず、first set として、日本人非血縁 SLE 505 例、健常対照群 515 例の関連研究を、16 個所の tagSNP に対して施行し、 P <0.05 の関連が検出された SNP に対しては、second set として、独立の SLE 236 例、健常対照群 401 例の解析を施行した。

また、過去に当研究室において SLE との関連を報告した IRF5(rs41298401)、FCGR2B(rs1050501)、BLK(rs13277113)、STAT4(rs7574865)、TNIP1(rs7708392)、DRB1*15:01 と NLRP3 多型との遺伝子間相互作用を、ロジスティック回帰分析により検討した。

また、SLE において関連もしくはその傾向が検出された SNP に対して、SSc 420 例、AAV 218 例の関連研究を施行した。

関連が検出された SNP に対しては、GeneVar を用いた eQTL 解析を施行し、mRNA レベルに及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

SLE に関する first set の解析結果では、rs1539019、rs4925650、rs3806266 の関連が検出された。これらに関して、second set を用いた replication study を施行したところ、second set 単独では、SLE との関連は検出されなかった。

First set と second set の間には、有意な異質性は検出されなかったため、両者を統合して解析したところ、腎障害合併 SLE 群における rs1539019A/A 遺伝子型、腎障害合併 SLE 群における rs4925650A アリルと A/A 遺伝子型、dsDNA 抗体陽性群における rs4925650A/A 遺伝子型の増加が検出された(表 1)。ロジスティック回帰分析により、これら 2 個所の SNP は、独立に寄与することが示唆された。

	モデル	P	オッズ比
rs1539019A			
腎障害+	劣性	0.011	1.32
rs4925650A			
腎障害+	アリル	0.018	1.26
腎障害+	劣性	0.011	1.46
dsDNA 抗体+	劣性	0.048	1.30

表 1 SLE と NLRP3 多型との関連
いずれも健常対照群との比較

これらの SNP に関して、eQTL 解析を施

行したところ、rs1539019A/A 遺伝子型と T 細胞における NLRP3 mRNA 低下の関連が検出された (図 1)。

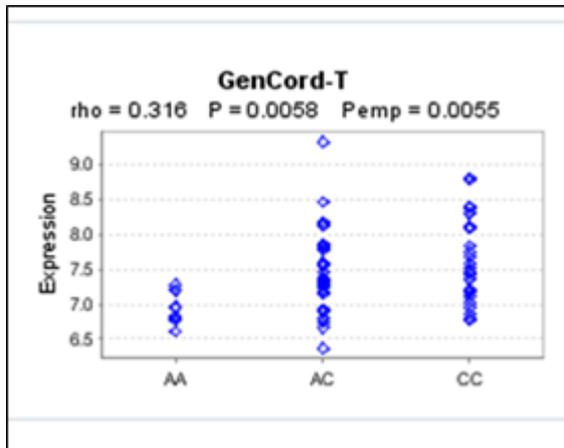


図 1. rs1539019 の eQTL 解析

GeneVar(<http://www.sanger.ac.uk/resources/software/genevar/>)を利用した、臍帯血 T 細胞における eQTL 解析

また、過去に報告した SLE 関連遺伝子との相互作用の検討により、*BLK* rs13277113A と *NLRP3* rs1539019A の間に、有意な遺伝子間相互作用が検出された ($P=0.014$)。

次に、上記 3 個所の SNP、および関連の傾向が検出された rs4612666、rs10754558 の計 5 個所を対象として、シリカが環境因子として確立している SSc、AAV との関連を検討した。関連の傾向は観察されたものの、統計学的有意差には到達しなかった。

以上の結果により、SLE の臨床的サブセットと *NLRP3* 多型の関連が初めて示唆された。rs1539019 あるいはそれと強い連鎖不平衡にある SNP は、これまで、血清 CRP レベル、血漿 fibrinogen レベル、食物アナフィラキシー等との関連の報告があることから、機能的意義が示唆され、今後、関連の確認や分子機構の解明を進める必要があると考えられた。また、SSc や AAV については、さらにサンプルサイズを増やして検討を進める必要あると考えられた。

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 5 件)

- (1) 土屋尚之: ANCA 関連血管炎疾患感受性遺伝子. 日本臨床 71(suppl 1), 2013, 208-213. 査読無
- (2) 土屋尚之: 全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子. 腎と透析 74, 2013, 15-20. 査読無
- (3) 土屋尚之: ANCA 関連血管炎の遺伝因子. 感染・炎症・免疫 42, 2012, 345-348. 査読無
- (4) 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 phenotypes of systemic lupus erythematosus: an association study in a Japanese population. *Lupus* 21, 2012, 890-895. 査読有 DOI: 10.1177/0961203312439333
- (5) 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* 71, 2012, 1259-1260. 査読有 DOI: 10.1136/annrheumdis-2011-201091

[学会発表] (計 10 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, Tsuchiya N. Genetic background of antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis in a Japanese population: association of *STAT4* with myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis. 2012 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Oct 9-14, 2012,

Washington DC, USA.

- (2) 土屋尚之、川崎綾、長谷部成美、井上尚哉、伊東郁恵、安心院千裕、住田孝之、古川宏、當間重人、小林茂人、橋本博史、山田秀裕、尾崎承一、佐田憲映、榎野博史、富田誠、宮坂信之、針谷正祥: 日本人集団における ANCA 関連血管炎の遺伝的背景。第 21 回日本組織適合性学会、2012 年 09 月 15 日～2012 年 09 月 17 日、明治大学駿河台キャンパス、東京
- (3) 土屋尚之: 膠原病のゲノム解析研究。第 53 回湘南免疫疾患カンファレンス(特別講演)、2012 年 6 月 23 日、崎陽軒本店、横浜
- (4) 土屋尚之: 膠原病のゲノム解析から明らかになったことと今後の課題。第 7 回長崎皮膚・膠原病フォーラム(特別講演)、2012 年 6 月 14 日、ANA クラウンプラザホテルグラバーヒル、長崎
- (5) 土屋尚之: 膠原病の候補遺伝子解析(シンポジウム指定演者)。第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012 年 4 月 27 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京
- (6) 青木真志、川崎綾、古川宏、近藤裕也、伊藤聡、林太智、草生真規雄、瀬戸口京吾、永井立夫、河野肇、松本功、廣畑俊成、當間重人、高崎芳成、橋本博史、住田孝之、土屋尚之: *NLRP3* 多型と全身性エリテマトーデスとの関連。第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012 年 4 月 27 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京
- (7) 井上尚哉、川崎綾、小林茂人、佐田憲映、山田秀裕、古川宏、當間重人、住田孝之、宮坂信之、尾崎承一、橋本博史、榎野博史、針谷正祥、土屋尚之: ANCA 関連血管炎における *STAT4*、*IRF5* 遺伝子多型の関連研究。第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012 年 04 月 18 日～2012 年 04 月 20 日、京都国際会館、京都
- (8) 長谷部成美、川崎綾、小林茂人、佐田憲映、山田秀裕、古川宏、當間重人、住田孝之、宮坂信之、尾崎承一、橋本博史、榎野博史、針谷正祥、土屋尚之: ANCA 関連血管炎と

UBE2L3、*TNIP1* 遺伝子多型の関連研究。第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012 年 04 月 18 日～2012 年 04 月 20 日、京都国際会館、京都

- (9) 川崎綾、長谷部成美、古川宏、近藤裕也、伊藤聡、林太智、松本功、草生真規雄、當間重人、高崎芳成、橋本博史、住田孝之、土屋尚之: 日本人集団における *UBE2L3* 遺伝子と全身性エリテマトーデスの関連。第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012 年 04 月 18 日～2012 年 04 月 20 日、京都国際会館、京都

- (10) 土屋尚之、青木真志、川崎綾、長谷川稔、藤本学、古川宏、當間重人、住田孝之、佐藤伸一、川口鎮司、竹原和彦: *NLRP3* (*NALP3*) 多型と全身性強皮症の関連研究。第 16 回強皮症研究会議。2012 年 1 月 19 日、大正製薬本社、東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/publicmd/GE/CCP004.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

河野 肇 (KONO HAJIME)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号: 60585074

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・室長
研究者番号: 00372293