

## 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：82401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2011～2012

課題番号：23689051

研究課題名（和文）

Th1/Th17 細胞活性を軸とした関節リウマチの遺伝学的病態予測モデルの樹立

研究課題名（英文）

Genetic prediction of Th1 and Th17 cells activity in rheumatoid arthritis

研究代表者

高地 雄太 (KOCHI YUTA)

独立行政法人理化学研究所・自己免疫疾患研究チーム・上級研究員

研究者番号：60415156

研究成果の概要（和文）：

本研究では Th1 細胞および Th17 細胞の活動性を軸とした関節リウマチの病態の予測法の樹立を目的とした。患者 836 人における 血清中の IFN- $\gamma$  および IL-17A の濃度測定を行い、また HLA-DRB1 多型および Th17 細胞関連遺伝子の 38 SNP のジェノタイピングを行った。臨床情報および各多型を説明変数として、ロジステック回帰分析を行ったところ、ROC 曲線の AUC が 0.887 であり、高い精度で IFN- $\gamma$  高値群および IL-17A 高値群の予測が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to establish a model to predict sub-phenotypes in rheumatoid arthritis (RA) by using genetic polymorphisms, with a special focus on Th1- and Th17-cell activity. We quantified IFN- $\gamma$  and IL-17A levels in the sera of RA patients (n=836). In addition, we genotyped polymorphisms in HLA-DRB1 and Th1/Th17 related genes. By using the genotypes and clinical information, we successfully predicted the status of IFN- $\gamma$  and IL-17A with a logistic regression model (AUC in the ROC curve =0.887).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	9,400,000	2,820,000	12,220,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病内科学

キーワード：関節リウマチ，遺伝学，Th1 細胞，Th17 細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は、複数の遺伝・環境因子によって発症する多因子・自己免疫疾患である。これまで、①動物関節炎モデルの解析、②患者の臨床情報・検体を用いた解析、を主とする病因研究が行われてきた。特に動物関節炎モデルの解析から、TNF $\alpha$ や IL-6 などの炎症性サイトカインを標的とした生物学的製剤が開発され、RA の治療に劇的な変化をもたらした。しかし、これらの新規薬剤の治療効果は、モデル動物の解析で得られた知見とは対照的に、患者個人間での差が大きいことも明らかになりつつある。その背景には、関節炎モデル動物が、ほぼ均一な遺伝・環境因子によって疾患を発症するのに対して、ヒト RA では、その病因・病態に多様性があることが考えられる。したがって、個人の病因・病態に即した、より効率的な治療法を開発するためには、ヒト疾患を対象とした研究が重要である。

## 2. 研究の目的

RA の病態において司令塔の役割を果たしていると考えられているのが、ヘルパーT 細胞である。ヘルパーT 細胞は産生するサイトカインのパターンなどによってTh1細胞, Th2細胞, Th17細胞, 制御性T細胞などのサブセットに分かれるが、RA においては Th1 細胞や Th17 細胞の働きが重要であると考えられている。我々は CCR6 遺伝子の多型が Th17 細胞の役割に影響を与えている可能性を明らかにしたが (Kochi Y et al, *Nat Genet* 2010), 各ヘルパーT 細胞サブセットの働きは個人によって異なることが考えられている。本研究では RA 患者の血清・DNA を解析することによって、Th1 細胞および Th17 細胞の活動性における個人差を明らかにするとともに、その遺

伝学的背景の全貌を解明することを目的とした。また、関与が明らかになった複数の遺伝因子を用いて、個人における病態予測モデルの樹立を目指した。

## 3. 研究の方法

### 1) 患者血清中サイトカインの測定

RA 患者由来の血清 (836 検体) を用いて、Th1 細胞の活動性の指標として interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) および Th17 細胞の活動性の指標として、Interleukin-17A (IL-17A) を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法によって測定した。

### 2) SNP のジェノタイプピング

サイトカインを測定したと同じ患者の DNA を用いて、一塩基多型 (single-nucleotide polymorphisms; SNP) のジェノタイプピングを TaqMan 法によって行った。対象とした SNP は、これまでゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) で明らかになった RA 感受性遺伝子や、他の自己免疫疾患の GWAS で明らかになった感受性遺伝子多型とした。また、RA の遺伝因子の主要な部分を占めるとされる、HLA-DRB1 多型についても、ジェノタイプピングを行った。

### 3) INF- $\gamma$ 高値群と IL-17A 高値群の予測

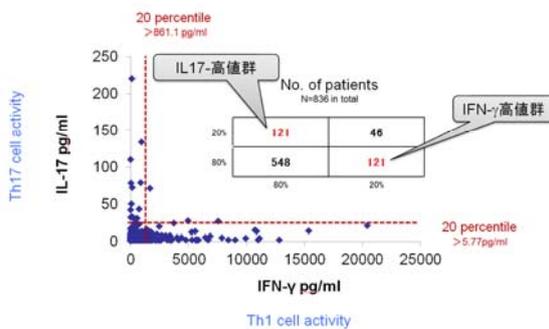
サイトカイン濃度と各多型の遺伝子型との相関を回帰分析した。また INF- $\gamma$  高値群と IL-17A 高値群を目的変数として(それぞれ 0, 1 とする), これらの病態を規定している多型の同定をロジスティック回帰分析によって行った。さらに、遺伝子多型と臨床情報を用いたロジスティック回帰モデルによって、Th1/Th17 の活動性を軸とした病態予測モデルを樹立し、その精度について評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) RA 患者血清中サイトカインの測定

患者血清中のサイトカインを測定した結果、IFN- $\gamma$  高値群と IL-17A 高値群が存在することが明らかになった。またこれらの患者群はお互いに排他的であり、両サイトカイン共に高値を示す患者は少なかった (図 1)。このことは、Th1 細胞が高い活動性を示す患者においては、Th17 細胞の活動性が低い可能性を示すものであった。同様に Th17 細胞の活動性が高い群は、Th1 細胞の活動性が低い可能性が考えられた。実際に、*in vitro* の解析では Th1 細胞と Th17 細胞が産生するサイトカインは互いの機能を抑制することが知られているため、患者においても同様のメカニズムが働いている可能性がある。

図1. RA患者血清におけるIFN- $\gamma$ およびIL-17A



##### 2) 遺伝子多型と Th1/Th17 細胞の活動性

HLA-DRB1 多型と 38 SNP のジェノタイプングを行い、ロジスティック回帰分析により IFN- $\gamma$  高値群および IL-17A 高値群との関連解析を行った。

$$\log(p/(1-p)) = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + \dots + B_iX_i$$

p: probability of IL17高値群

X<sub>i</sub>: independent variables (SNP genotype, etc)

その結果、いくつかの遺伝子多型において有意な関連を認めた (P<0.05, 表 1)。なかで

も、HLA-DRB1 多型との関連は強く、遺伝因子の占める割合と同様に、Th1・Th17 細胞の活性化に与える影響は大きいものが考えられた。

表1. IFN- $\gamma$ /IL-17A高値群と遺伝子多型の関連

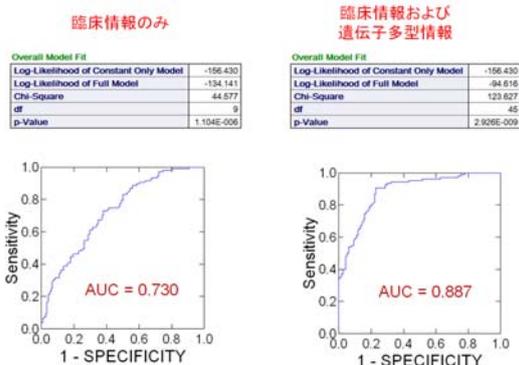
Parameter	SNP ID	p-Value	Odds ratio	95%CI
SEX		0.027	0.27	0.085 0.86
AGE		0.084	1.029	0.996 1.062
HLA-DR SE		0.004	2.518	1.335 4.747
RTK2	rs125734	0.081	0.485	0.197 1.098
NFKBIE	rs223434	0.049	0.552	0.306 0.998
TRAF1	rs17021206	0.045	0.599	0.363 0.989
TNFAIP3	rs2230926	0.05	2.258	1.002 5.091
IL1B	rs1143627	0.446	1.218	0.733 2.023
IL2	rs2310173	0.369	0.708	0.429 1.137
IL2RA	rs118470	0.017	0.53	0.315 0.895
IL2RB	rs1743777	0.85	1.107	0.385 3.184
IL4R	rs1805010	0.079	0.629	0.375 1.054
IL5	rs2706399	0.779	1.083	0.619 1.896
IL6	rs2097677	0.059	1.767	0.979 3.191
IL8R	rs8192284	0.216	0.715	0.421 1.216
IL10	rs1800071	0.188	1.424	0.841 2.411
IL12A	rs9811792	0.495	0.831	0.489 1.414
IL12B	rs3212227	0.231	1.337	0.831 2.151
IL13	rs20541	0.717	1.108	0.636 1.929
IL18	rs5744247	0.277	0.754	0.453 1.254
IL18RAP	rs917997	0.776	1.079	0.639 1.82
IL23A	rs2066808	0.248	0.345	0.057 2.096
IL23R	rs1495965	0.158	0.688	0.41 1.156
IL26	rs1558744	0.488	0.718	0.281 1.832
IL27	rs4788084	0.771	0.915	0.503 1.665
TGFB1	rs3745286	0.68	1.12	0.654 1.918
TSLP	rs300933	0.12	1.225	0.683 2.279
TNFSF15	rs4263839	0.55	0.839	0.473 1.49
TRAF3IP2	rs33980500	0.263	0.388	0.074 2.032
JAK2	rs10758669	0.274	1.318	0.804 2.16
STAT3	rs1744166	0.641	0.875	0.499 1.533
STAT4	rs10168206	0.034	1.789	1.044 3.066
IRF4	rs872071	0.013	0.482	0.271 0.855
IRF5	rs729302	0.265	0.716	0.398 1.288
TB21	rs4794067	0.745	1.156	0.483 2.769
ETS1	rs12223943	0.214	0.627	0.3 1.31
IKZF1	rs4917014	0.651	0.89	0.537 1.475
CCR6_ETC	rs6441961	0.008	2.209	1.228 3.974
CCR6	rs3994024	0.021	1.764	1.088 2.858
CTLA4	rs3087243	0.274	1.417	0.759 2.644

##### 3) Th1/Th17 細胞活性の予測モデルの樹立

この、RA 患者におけるサイトカイン・ステータスを目的変数とした (IFN- $\gamma$  高値群および IL-17A 高値群をそれぞれ 0, 1 とする) ロジスティック回帰モデルに、抗 CCP 抗体などの臨床情報を説明変数として加え、Th1/Th17 細胞活性の予測モデルを樹立した。ROC 曲線 (receiver operating characteristic curve) による評価では、臨床情報のみの予測では ROC 曲線下の面積 (Area under the curve, AUC) = 0.730 であったのに対し、遺伝多型情報を説明変数に加えると、AUC=0.887 と高い精度で予測可能であることが明らかになった (次頁, 図 2)。

今後、このモデルの検証を、別患者検体を用いて行うとともに、さらに予測精度を高くしていくために、遺伝子機能へのインパクトの大きい rare variant の探索も行っていく予定である。

図2. ROC曲線による予測モデルの評価



## 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 7 件)

- 1) Okada Y, Terao C, Ikari K, Kochi Y, et al, Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. Nat Genet, 査読有, 2012, 44(5),511-6
- 2) Myouzen K, Kochi Y, Okada Y, Terao C, Suzuki A, Ikari K, Tsunoda T, Takahashi et al, Functional Variants in NFKBIE and RTKN2 Involved in Activation of the NF-kappaB Pathway Are Associated with Rheumatoid Arthritis in Japanese. PLoS Genet, 査読有, 2012. 8(9): e1002949.
- 3) 高地雄太. ゲノムと免疫疾患. 最新医学, 査読無, 2012, 68(3), 638-647.
- 4) 高地雄太. 自己免疫疾患のゲノム解析. Pharma Medica, 査読無, 2013, 31(1), 9-12.
- 5) 高地雄太. 膠原病の疾患感受性遺伝子. 内科, 査読無, 2011. 107(4): 641-644.
- 6) 高地雄太. CCR6 遺伝子と関節リウマチ. リウマチ科, 査読無, 2011. 45(5): 526-530.
- 7) 高地雄太. 疾患感受性遺伝子とは. 臨床検査, 査読無, 2011. 55(11): 1074-1080.

〔学会発表〕(計 1 件)

高地雄太. 関節リウマチにおけるゲノムワイド関連解析. 阿蘇シンポジウム 2011 年 7 月 29 日, 阿蘇市

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.src.riken.jp/group/auto/index.html>

<http://www.twmu.ac.jp/IOR/garnet/home.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高地 雄太 (KOCHI YUTA)

独立行政法人理化学研究所・自己免疫疾患研究チーム・上級研究員

研究者番号: 60415156