

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461467

研究課題名(和文) ペア型受容体LILRおよびLAIR遺伝子群の膠原病疾患感受性への寄与の解明

研究課題名(英文) Investigation of a contribution of genes coding for paired receptors, LILR and LAIR families, to connective tissue diseases

研究代表者

川崎 綾 (KAWASAKI, Aya)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30532816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ペア型受容体のleukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor (LILR) ファミリーや、LILRのリガンドであるHLA-Gが全身性エリテマトーデス(SLE)などの膠原病の疾患感受性に寄与するか否かを検討するために、日本人膠原病患者を対象とした疾患関連研究を施行した。LILRA3では、全身性強皮症の解析において抗トポイソメラーゼ抗体とLILRA3欠失多型との関連が検出された。HLA-Gにおいては、3'非翻訳領域の14bp挿入多型が、SLE関連HLA-DRB1アリルとは独立に若年発症SLEと関連することが見出された。

研究成果の概要(英文)：To examine whether genes coding for paired receptors, leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptors (LILR), and one of their ligands, HLA-G, contribute to susceptibility to connective tissue diseases such as systemic lupus erythematosus (SLE), association study of LILR and HLA-G genes was conducted in a Japanese population. LILRA3 deletion allele was significantly increased in patients with systemic sclerosis with anti topoisomerase I antibodies. With respect to HLA-G, 14bp insertion allele in 3' untranslated region was associated with SLE with the age of onset <20 years independently of the SLE susceptible and protective HLA-DRB1 alleles.

研究分野：ゲノム医科学、膠原病学

キーワード：全身性エリテマトーデス 全身性強皮症 疾患感受性遺伝子 LILR HLA-G 多型

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムワイド関連研究により、全身性エリテマトーデス(SLE)をはじめとする膠原病の疾患感受性遺伝子が多数同定されたが、同定された遺伝子では、膠原病の遺伝要因の一部しか説明できない(missing heritability)。

免疫系多重遺伝子ファミリーの *leukocyte immunoglobulin (Ig)-like receptor (LILR)* 遺伝子は、ヒト染色体 19q13.4 の *leukocyte receptor complex (LRC)* 領域にクラスターを形成している。LILR は、活性化型、抑制型、分泌型からなり、免疫応答の制御において重要な役割を果たしている。また、一部の LILR 遺伝子は自己免疫疾患との関連も報告されている。われわれも、*LILRB1*、*LILRA2* 多型が、関節リウマチ、SLE、ANCA 関連血管炎と関連することを報告している(Kuroki et al, 2005, Mamegano et al, 2008)。しかしながら、ファミリー遺伝子間の相同性が非常に高く、マイクロアレイを用いた一塩基多型(SNP)タイピング法では、LILR 領域のすべての機能的な多型を正確に解析するのは困難と考えられ、LILR 遺伝子領域と膠原病の疾患感受性との関連は十分解明されていない。

そこで、本研究では LILR ファミリー遺伝子が膠原病における missing heritability に寄与しているという仮説をたて、この仮説を検証することとした。

## 2. 研究の目的

LILR 遺伝子、および、LILR 関連遺伝子を対象とした疾患関連研究を施行し、LILR 遺伝子群が膠原病の疾患感受性・抵抗性に寄与するか否かを明らかにすることを目的とする。

### (1) *LILRA4-LAIR1*

SLE の病態に I 型インターフェロン(IFN)が寄与することが知られている。SLE 患者の末梢血では、I 型 IFN 誘導遺伝子群の発現上昇が報告されている(IFN signature)。また、I 型 IFN パスウェイに関わる *IRF5*、*STAT4* は SLE の疾患感受性遺伝子として同定されている。われわれも、日本人集団を対象とした関連研究により *IRF5*、*STAT4*、*TLR7* 遺伝子が SLE と関連することを見出した(Kawasaki et al, 2008, Kawasaki et al, 2008, Kawasaki et al, 2011)。さらに *IRF5*、*STAT4* が全身性強皮症(SSc)とも関連することを報告している(Ito et al, 2009, Tsuchiya et al, 2009)。

LILRA4 は形質細胞様樹状細胞に発現しており、TLR7 シグナルからの I 型 IFN 産生に対して抑制的に働くことが知られている。LILRA4 遺伝子に隣接する *leukocyte-associated Ig-like receptor 1 (LAIR1)* も、LILRA4 と同様に形質細胞様樹状細胞に発現し、TLR シグナルを抑制するという報告がある。われわれは、*LILRA4-LAIR1* 遺伝子領域

が疾患感受性遺伝子の候補になると考え、*LILRA4-LAIR1* 領域に位置する tag SNP を対象とした関連研究を施行し、この領域が SLE の疾患感受性に寄与する可能性を示唆する結果を得た。本研究では、独立のサンプルセットを用いて、tag SNP 解析により検出された関連の検証を行う。

### (2) *LILRA3*

唯一の分泌型である LILRA3 には、遺伝子の大部分(6.7kb)を欠失する多型が存在する。欠失アリル頻度は、日本人集団で顕著に高いことが報告されている。LILRA3 は、LILRB1、B2、A1 との相同性が高く、これらの LILR の働きを競合的に阻害していると考えられているが、機能はまだ明らかになっていない。しかしながら、LILRA3 欠失アリルが東アジア集団において正の自然選択を受けていることが報告されており、機能的な重要性が示唆される(Hirayasu et al, 2006)。LILRA3 欠失多型は、ヨーロッパ系集団や中国人集団において、多発性硬化症、シェーグレン症候群、関節リウマチ、SLE との関連が報告されているが、日本人集団における報告はない。SSc においては、他集団においても関連は検討されていない。本研究では、日本人集団における LILRA3 欠失多型と SLE、SSc との関連を検討した。

### (3) *HLA-G*

非古典的 HLA クラス I 抗原の HLA-G は、胎盤に発現し、母体 - 胎児間の免疫寛容に寄与している。HLA-G は免疫系細胞にも発現が認められ、免疫抑制作用を有している。HLA-G の受容体としては、LILRB1、B2、A3、KIR2DL4 が報告されている。

HLA-G 遺伝子の 3'非翻訳領域(UTR)には、機能的な多型が報告されている。1つは 14bp の挿入欠失多型で、スプライシングや発現と関連している。もう1つは、miRNA の結合部位にある SNP (rs1063320)で、この SNP も発現との関連が報告されている。これらの多型は、ヨーロッパ系集団や中国人集団で SLE との関連研究が行われているものの、報告により結果が異なっている。同じ MHC 領域に位置する *HLA-DRB1* 遺伝子は、SLE の疾患感受性・抵抗性遺伝子として同定されている。*HLA-G* とは約 2.8Mb 離れて位置しているが、一部の *DRB1* アリルは *HLA-G* との連鎖不平衡が報告されている。*HLA-G* の関連研究において、*DRB1* アリルとの連鎖不平衡の影響を考慮したものは少なく、*HLA-G* と SLE の関連が、*DRB1* アリルに起因する二次的なものである可能性は否定できない。

本研究では、日本人集団における *HLA-G* 多型の関連を検討するとともに、*HLA-G* の関連が、SLE 感受性・抵抗性 *DRB1* アリルとは独立であるかを明らかにするために、*HLA-G* の 3'UTR 多型について疾患関連研究を施行した。

### 3. 研究の方法

#### (1) LILRA4-LAIR1

tag SNP 解析において関連が検出された SNP の関連を検討するために、独立のサンプルセット(SLE 338 例、健常対照者 265 例)を用いて疾患関連研究を行った。遺伝子型は、TaqMan 法により決定した。tag SNP 解析におけるデータ(1<sup>st</sup> セット)と本研究におけるデータ(2<sup>nd</sup> セット)を用いてメタアナリシスを行い、関連の検討を行った。

#### (2) LILRA3

SSc 患者 429 例、SLE 患者 843 例、健常対照者 873 例を対象とした疾患関連を施行した。LILRA3 挿入欠失多型の遺伝子型タイプピングは、PCR-SSP 法により行った。

#### (3) HLA-G

HLA-G 3'UTR 多型について、SLE 患者 843 例、健常対照者 778 例を対象とした疾患関連を施行した。HLA-G 14bp 挿入欠失多型は PCR 法により、rs1063320 は TaqMan 法により遺伝子型を決定した。SLE 疾患感受性アリル DRB1\*15:01、抵抗性アリル DRB1\*13:02 との独立性の解析は、コンディショナルロジスティック回帰分析を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) LILRA4-LAIR1

図 1 に LILRA4 rs7259036 の関連研究の結果を示す。独立のサンプルセット(2<sup>nd</sup> セット)の解析において有意な関連は検出されなかったものの、メタアナリシスにより 1<sup>st</sup> セットと 2<sup>nd</sup> セットのデータを統合すると、 $P=0.0030$ 、オッズ比 1.38 の関連が認められた。

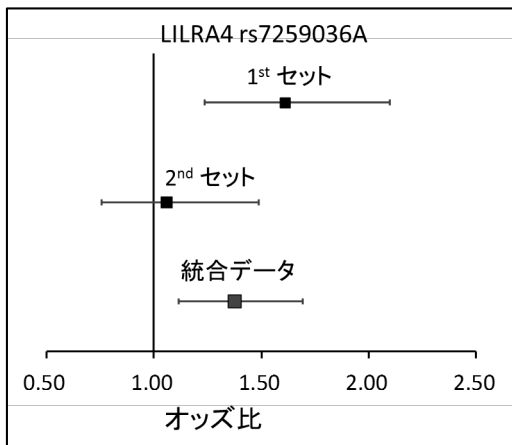


図 1 LILRA4 多型と SLE の関連 (メタアナリシス)

SLE の臨床症状との解析を行ったところ、健常群との比較において、腎障害合併 SLE 群( $P=0.0016$ 、オッズ比 1.49)、抗 dsDNA 抗体陽性 SLE 群( $P=0.0023$ 、オッズ比 1.41)との関連が認められた。しかしながら、SLE 群内での比較では有意差には至らなかった。

LAIR1 遺伝子領域の SNP の関連について

は現在解析を進めている。

#### (2) LILRA3

LILRA3 挿入欠失多型と SLE の有意な関連は検出されなかった。SLE の臨床症状との関連についても検討したが、関連は認められなかった。SSc の解析では、全 SSc 群において、欠失アリルの増加傾向が観察された(劣性モデル、 $P=0.052$ 、オッズ比 1.33)。自己抗体との関連を調べたところ、抗トポイソメラーゼ抗体陽性 SSc 群において、欠失アリルの増加が観察された(加法モデル、 $P=0.0084$ 、オッズ比 1.62)。さらに、SSc 群内の比較においても有意な関連が認められた(抗トポイソメラーゼ抗体陽性群 vs. 陰性群、劣性モデル、 $P=0.042$ 、オッズ比 1.63)。

#### (3) HLA-G

HLA-G 3'UTR の 14bp 挿入アリルは SLE 群で増加しており(優性モデル、 $P=0.022$ 、オッズ比 1.26)、既報の関連と一致していた。この関連は、若年発症 SLE 群において顕著であった(発症年齢 <20 歳 SLE vs. 健常群、加法モデル、 $P=0.0067$ 、オッズ比 1.44)。また、SLE 群内の比較においても有意な関連が検出された(発症年齢 <20 歳 vs.  $\geq 20$  歳、劣性モデル、 $P=0.016$ 、オッズ比 2.09)。SLE の発症年齢と HLA-G 14bp 挿入欠失多型との関連を回帰分析により解析したところ、14bp 挿入アリルホモ接合体の患者において、発症年齢が低い傾向が確認された( $P=0.027$ )。rs1063320 においては、全 SLE 群との比較では有意な関連は検出されなかったものの、自己抗体陽性 SLE 群と健常群との比較で抗 Sm 抗体( $P=0.0062$ 、オッズ比 1.87)および抗 RNP 抗体( $P=0.012$ 、オッズ比 1.79)との関連が検出された。しかしながら、SLE 群内での比較では有意差には至らなかった。

HLA-DRB1 遺伝子の SLE 感受性アリルである DRB1\*15:01、抵抗性アリルの\*13:02 と HLA-G 3'UTR 多型との連鎖不平衡を調べたところ、DRB1\*13:02 との間連鎖不平衡が認められた(連鎖不平衡係数  $D'$ 、14bp 挿入欠失多型: 0.62, rs1063320: 0.86)。HLA-G 多型と DRB1 アリルの独立性をロジスティック回帰分析により解析したところ、HLA-G 14bp 挿入アリルと若年発症 SLE 群との関連は、DRB1\*13:02 で調整後も残った(発症年齢 <20 SLE vs. 健常群、調整後  $P=0.044$ 、オッズ比 1.33、発症年齢 <20 vs.  $\geq 20$ 、調整後  $P=0.049$ 、オッズ比 1.33)。DRB1\*15:01 においても、調整後に HLA-G の関連が残ったことから(発症年齢 <20 SLE vs. 健常群、調整後  $P=0.032$ 、オッズ比 1.36、発症年齢 <20 vs.  $\geq 20$ 、調整後  $P=0.046$ 、オッズ比 1.34)、HLA-G 多型と若年発症 SLE との関連は、SLE 関連 DRB1 アリルの関連とは独立であることが示唆された。

ハプロタイプ解析では、HLA-G 欠失アリルと rs1063320G アリルから形成されるハプ

ロタイプが SLE 群において有意に減少していた(ハプロタイプ頻度, SLE: 41.9%, 健常群: 47.3%, P=0.0059)。しかしながら、このハプロタイプには、SLE 抵抗性アリルである *DRB1\*13:02* が含まれており、*HLA-G* ハプロタイプと SLE の関連は *DRB1\*13:02* に起因するものであると示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- (1) Aya Kawasaki, Hiroshi Furukawa, Nao Nishida, Eiji Warabi, Yuya Kondo, Satoshi Ito, Isao Matsumoto, Makio Kusaoi, Hirofumi Amano, Akiko Suda, Shouhei Nagaoka, Keigo Setoguchi, Tatsuo Nagai, Shunsei Hirohata, Kota Shimada, Shoji Sugii, Akira Okamoto, Noriyuki Chiba, Eiichi Suematsu, Shigeru Ohno, Masao Katayama, Akiko Okamoto, Hajime Kono, Katsushi Tokunaga, Yoshinari Takasaki, Hiroshi Hashimoto, Takayuki Sumida, Shigeto Tohma, Naoyuki Tsuchiya, Association of Functional Polymorphisms in Interferon Regulatory Factor 2 (IRF2) with Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: A Case-Control Association Study, PLoS One, Vol.9, e109764, 2014, 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0109764
- (2) Aya Kawasaki, Naoya Inoue, Chihiro Ajimi, Ken-ei Sada, Shigeto Kobayashi, Hidehiro Yamada, Hiroshi Furukawa, Takayuki Sumida, Shigeto Tohma, Nobuyuki Miyasaka, Seiichi Matsuo, Shoichi Ozaki, Hiroshi Hashimoto, Hirofumi Makino, Masayoshi Harigai, Naoyuki Tsuchiya, Association of IRF5 polymorphism with MPO-ANCA-positive vasculitis in a Japanese population, Genes Immun, Vol.14, p527-529, 2013, 査読有, doi: 10.1038/gene.2013.45

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 川崎 綾 他、日本人全身性エリテマトーデスと *HLA-G* 多型の関連、第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2016 年 4 月 22 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- (2) Yuki Hachiya, Aya Kawasaki et al, Association of *HLA-G* and Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor A3 Polymorphisms with the Susceptibility to Pulmonary Hypertension in Systemic Sclerosis, the 2015 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, November 8, 2015, Moscone

Center (San Francisco, USA)

- (3) 川崎 綾 他、*LILRA4* 遺伝子多型と全身性エリテマトーデスの関連の検討、日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015 年 10 月 16 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)
- (4) Aya Kawasaki et al, Association study of *LILRA4* with systemic lupus erythematosus, 11<sup>th</sup> International Congress on Systemic Lupus Erythematosus, September 4, 2015, HOFBURG Vienna Congress Center (Vienna, Austria)
- (5) 八谷 有紀、川崎 綾 他、免疫グロブリン様受容体 *LILRA3* 欠失多型と全身性強皮症の関連、日本人類遺伝学会第 59 回大会、2014 年 11 月 21 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)
- (6) Yuki Hachiya, Aya Kawasaki et al, Association of Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor A3 (*LILRA3*) Deletion Polymorphism with Systemic Sclerosis, the 2014 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, November 16, 2014, Boston Convention and Exhibit Center (Boston, USA)
- (7) 八谷 有紀、川崎 綾 他、免疫グロブリン様受容体 *LILRA3* の構造的・機能的欠失多型と全身性エリテマトーデスの関連研究、第 58 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2014 年 4 月 24 日、グランドプリンスホテル新高輪(東京都港区)
- (8) Aya Kawasaki et al, Association of functional polymorphisms in *IRF2* with systemic lupus erythematosus in a Japanese population, the 2013 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 27, 2013, San Diego Convention Center (San Diego, USA)
- (9) 川崎 綾 他、*IRF2* 機能的多型と全身性エリテマトーデスの関連、日本人類遺伝学会第 58 回大会、2013 年 11 月 21 日、江陽グランドホテル(宮城県仙台市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/publiccmd/GE/>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

川崎 綾 (KAWASAKI Aya)  
筑波大学・医学医療系・助教  
研究者番号：30532816

(2)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