

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20976

研究課題名(和文) テーラーメイド医療の実現を目指した関節リウマチリスク遺伝子の病態への寄与の解明

研究課題名(英文) Pathological contribution of RA risk loci to the disease progression and the therapeutic response

研究代表者

細矢 匡 (Hosoya, Tadashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60737104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 遺伝学的に関節リウマチのリスクとなる遺伝子変異が果たす生物学的役割を検討した。細胞増殖に関連する遺伝子、CDK6上には2つのRA risk SNPが存在するが、両者が欧米人においてのみ連鎖不平衡の関係にあることを明らかにした。欧米人のB細胞におけるCDK6の発現に注目してQTL解析を行ったが、risk alleleとの関連は見られなかった。エピジェネティック制御は細胞腫ごとに異なるため、滑膜線維芽細胞を含む他の細胞腫での解析が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the genetic linkage of the SNPs on CDK6 gene, rs42041 and rs4271, using HaploReg and found that they are linkage disequilibrium only in European population but not in Asian population. Therefore, in European population, the allelic transcription of CDK6 from risk allele would be different from the non-risk allele. However, regarding the immortalized B cell analysis based on the data from 1000 genomes project, we could not find any association between the transcription level of CDK6 gene and the risk SNPs. There remains the possibility that our hypothesis would work in the other kinds of cell types, including synovial fibroblasts, because gene expressions are modulated by epigenetic regulations. We would plan to make further Quantitative trait locus analysis on the rheumatoid synovial fibroblasts derived from European patients with RA.

研究分野： 膠原病・リウマチ内科

キーワード： 関節リウマチ 疾患感受性遺伝子 SNP機能解析

1. 研究開始当初の背景

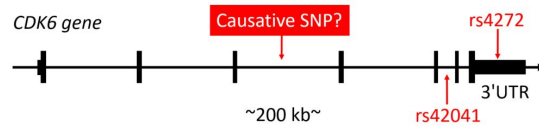
関節リウマチ(RA)は関節炎により不可逆的な関節破壊をもたらす患者の生活の質を大きく損なう疾患であるが、関節リウマチ患者は heterogenic な集団であり、個々の患者ごとの関節炎の自然経過は一樣ではなく、また治療に対する反応性も異なる。

疾患の発症や自然経過には遺伝子による先天的な要因と、環境による後天的な要因が関与する。RA では遺伝的な要因の関与は 30-50%と推測されているが、RA 患者を対象とした人種横断的な大規模ゲノム解析 (GWAS) によって約 100 個の RA 関連遺伝子が同定された。しかしリスク遺伝子毎の RA の発症や自然経過への寄与は不明のままである。RA 集団の不均一性を鑑みるに、いくつかのリスク遺伝子は関節破壊のスピードや全身性の炎症の程度に関与していると推測される。また、特定のリスク遺伝子と個々の薬剤に対する治療反応性の関連が証明できれば、より有効率の高い治療を優先的に選択する治療戦略の最適化が実現することとなる。これからの RA 治療は、個々の患者ごとに関節炎の自然経過を予測し、適切なタイミングで適切な強度の治療で介入する、治療戦略を最適化したテーラーメイド医療が望まれる。

報告者が所属する研究室では RA の病理学的特徴である滑膜線維芽細胞の過増殖に注目して、細胞周期を制御する Cyclin dependent kinase(CDK)阻害薬が細胞増殖の抑制を介して抗関節炎効果を発揮することをすでに明らかにしてきた(J Immunol. 2008)。この治療戦略は RA の臨床で広く応用されている抗サイトカイン療法と併用可能で、副作用として問題となる免疫抑制を増強することもなかった(Ann Rheum Dis.2014)ことから、将来的な新規抗リウマチ薬としての臨床応用を目指している。GWAS の解析から得られた RA 関連遺伝子には

CDKファミリーの2,4,6が含まれていたことから、CDK 遺伝子群のジェノタイプと RA の特徴的病態である滑膜増殖に関連があると推測された。

本研究では CDK6 の risk SNP に注目して、ジェノタイプと滑膜線維芽細胞の機能との関連、あるいはジェノタイプと RA の重症度や進行度・治療反応性を解析する。CDK6 上の SNP rs42041 のリスクアリル保有者は骨破壊の進行が速く、shared epitope 陰性かつ抗 CCP 抗体陽性 RA 患者に多いことが知られている。また、rs42041 は intron 領域の SNP であるが、新たに同定された rs4272 は CDK6 の 3' UTR 領域に存在し、両 SNP は 10kbp と近接しているため、連鎖不平衡の関係にあると推測された。



これまでのゲノム研究では個々の患者の臨床情報との対比は実施されていないか欧米人に限られた不十分なものであった。申請者らが所属する医療機関では、RA 患者の大規模な臨床コホートを実施した実績があり、すでに 500 人の日本人患者の臨床像を集積したデータベースを保有している。これらの患者のジェノタイプを検討し、従来より精度と質の高い臨床情報や治療反応性と組み合わせることで、RA の様々な側面における疾患関連遺伝子の関与を明らかにできると期待された。

2. 研究の目的

大規模ゲノム解析によって同定された RA リスク遺伝子群の臨床的な意義を検討する。

3. 研究の方法

Rs42041 の RA 患者の病態との関連は、欧米人の RA 患者コホートにおいて示されたも

のであるため、欧米人・アジア人における rs42041 と rs4272 の頻度と連鎖解析を行う。

滑膜線維芽細胞を対象として、risk allele 由来の CDK6 遺伝子の転写量を allele specific PCR にて定量的に解析する。また CDK6 の細胞機能への影響を評価するために in vitro の増殖アッセイを行い、細胞増殖能や CDK4/6 阻害薬への反応性をジェノタイプごとに検討する。

報告者の施設が保有する臨床コホートデータベースの参加者からデータベースの二次利用とゲノム情報の取得の同意を得て、関節破壊や治療反応性などを指標に、rs4272, rs42041 の Quantitative trait locus(QTL) 解析を実施する。

4 . 研究成果

HaploReg(<http://archive.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) を用いてハプロタイプ解析を行った。表のとおり、欧米人において、rs42041 は rs4202 を含む複数の 3' UTR 上の SNP と連鎖不平衡の関係にあった。両 SNP もしくはその近傍に真の causative SNP が存在し、CDK6 の発現量の変化に寄与して RA の臨床表現型の違いをもたらしていると推測された。一方、アジア人においては両 SNP とモリスクアリルの頻度が低く、ハプロタイプ解析でも両 SNP が連鎖不平衡の関係にないことが明らかになった。しかし、rs42039,rs42040 はアジア人でも rs42041 と連鎖不平衡の関係にあり、3' UTR 上に存在することから、CDK6 の発現量に影響する可能性が残された。

次に、1000genome project のデータベースを用いて欧米人の B 細胞における CDK6 の発現に注目して QTL 解析を行った。しかし、表に記載した SNP と CDK6 の転写量との間に関連は見いだせなかった。

表 : rs42041 と連鎖不平衡になる SNP の人種間の比較

variant	LD(r ²)			Allel frequency			functional annotation
	EUR	AMR	ASN	EUR	AMR	ASN	
rs4272	0.77	0.53	<0.2	0.23	0.24	0.11	3'-UTR
rs42031	0.75	0.75	<0.2	0.22	0.18	0.07	3'-UTR
rs42033	0.77	0.75	0.62	0.22	0.18	0.02	3'-UTR
rs42034	0.97	0.70	<0.2	0.27	0.25	0.10	3'-UTR
rs42035	0.97	0.70	<0.2	0.26	0.25	0.10	3'-UTR
rs42036	0.99	0.70	<0.2	0.27	0.25	0.10	3'-UTR
rs42377	0.76	0.62	<0.2	0.32	0.29	0.10	3'-UTR
rs42038	0.76	0.80	0.57	0.32	0.24	0.02	3'-UTR
rs42039	0.98	0.97	0.68	0.27	0.21	0.02	3'-UTR
rs42040	0.98	0.97	0.74	0.27	0.21	0.02	intronic
rs42041	1.00	1.00	1.00	0.27	0.22	0.03	intronic
rs42043	1.00	0.76	0.25	0.27	0.27	0.10	intronic
rs42235	0.76	0.72	0.81	0.32	0.23	0.03	intronic
rs42044	0.82	0.38	<0.2	0.31	0.38	0.10	intronic
rs42046	0.82	0.68	0.87	0.31	0.25	0.02	intronic
rs10269774	0.66	0.33	<0.2	0.36	0.41	0.10	intronic
rs10953072	0.82	0.35	<0.2	0.31	0.38	0.10	intronic
rs11767704	0.81	0.62	0.81	0.30	0.25	0.02	intronic

European population において rs42041 との LD が>0.6 となる SNP を抜粋した。LD 解析にもゲノムデータは 1000 genome project に由来する。EUR(Europe), AMR(America), ASN(Asia)。

なお、細胞腫ごとに異なるエピジェネティック修飾を受けているため、遺伝子発現パターンが異なっている。そのためか、遺伝子発現に対する SNP の QTL 効果が、疾患の関連の深い、特定の組織のみで観察されることが近年報告された (Raj T. Science 2014)。よって、CDK6 は細胞増殖との関連が深いと推測されるため、今後は欧米人の滑膜線維芽細胞をサンプルとして CDK6 発現の QTL 解析を行うことを検討している。

なお、当初の計画では臨床コホートデータベースを用いて risk SNP の QTL 解析を実施する予定であったが、前述のとおりアジア人においては CDK6 の risk SNP のアリル頻度が低く、rs42041 と rs4272 間の連鎖不平衡も見られなかったことから本研究での実施を断念した。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細矢 匡 (HOSOYA Tadashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号： 6 0 7 3 7 1 0 4