

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591164
 研究課題名（和文） 最重症型関節リウマチ（ムチランス型）の発症および進展に関わる遺伝子の検索
 研究課題名（英文） Search for genes associated with the severest form of rheumatoid arthritis.
 研究代表者
 大村 浩一郎（OHMURA KOICHIRO）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：40432372

研究成果の概要：

関節リウマチ（RA）の重症化に関連する遺伝子を検索するために、最重症 RA と最軽症 RA 患者の遺伝子を比較した。候補遺伝子は絞らずすべての遺伝子を対象とした全ゲノム解析とし、DNA チップを用いた解析を行った。3病院から計 78 例の最重症型、計 64 例の最軽症型 RA 検体が収集され SNP タイピングおよび解析を行ったが、症例数が十分でなく有意差を認める遺伝子発見には至らなかった。そこで、収集した全 RA 患者（3195 例）と健常人（3044 例）の DNA を用いて RA の発症に関わる遺伝子を同様に全ゲノム関連解析にて検索したところ、これまで既報の HLA, PADI4 遺伝子のほかに第 15, 18, 21 染色体に関連部位を発見した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
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：関節リウマチ、SNP、ムチランス、疾患関連遺伝子、重症化、全ゲノム関連解析

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初の平成 19 年度の関節リウマチ（RA）関連遺伝子の研究状況は報告は多数見られるも、十分な数のサンプルを使ったスタディが少なく、信頼性の欠けるデータが多かった。平成 19 年度には候補遺伝子を絞って関連を検索するのではなく、未知の遺伝子も含めてすべて関連を検索する全ゲノム SNP 関連解析が全世界的に行われ始め、重要な報告が出始めた年である。そうした中で

我々は多くの RA 患者を診療している 3 病院（京都大学、国立病院機構相模原病院、道後温泉病院）の RA 患者から倫理委員会承認のもと、ゲノム DNA 採取を開始し、2000 例を越す DNA を収集した。また、RA 発症に関わる遺伝子の検索は行われていた一方、RA の重症化に関わる遺伝子の検索はほとんど行われていなかったため、我々は最重症型と考えられるムチランス型 RA 患者と 10 年以上 RA に罹患していても関節破壊が進行しない軽症型の RA 患者を抽出し、ゲノムを比較し、重症

化に関連する遺伝子検索を行うことを計画した。

2. 研究の目的

本研究はムチランス型を中心とする重症関節リウマチと通常の DMARDs 療法で長期間骨破壊の進行が見られない軽症型 RA のゲノムを比較することで RA の重症化に関わる遺伝子を発見し、治療法の開発や選択に役立てることを第1の目的とするが、RA 発症に関連する新規遺伝子を同定することを第2の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 重症型 (ムチランス型) RA 患者 (大関節を含む 3 箇所以上の関節に Larsen 分類 grade V の骨融解像を認める患者) および、軽症型 RA 患者 (RA 発症後 10 年以上経ても生物学的製剤を除く通常量の DMARDs で寛解を保っている患者) より文書による同意を得たのち、血液を採取し DNA を抽出した。重症型関連遺伝子検索に用いた検体は京都大学附属病院、国立病院機構相模原病院、道後温泉病院から収集した。Illumina 社の DNA チップ (HumanHap300) を用いて全ゲノムにわたる SNP typing を行った。不良サンプルと不良 SNP (call rate 95%以下) および minor allele frequency が 5%以下の SNP をデータから削除した上で、関連解析を行った。関連解析は 2x3 Fisher's exact test を用いた。

(2) HLA-DRB1 が RA の重症化と関連するかどうかを検討するために、血清と DNA の両方が入手可能であった重症型 RA 患者 34 例、軽症 RA 患者 34 例を抽出し HLA-DRB1 のタイピングを WAKFlow[®]キットと Luminex システムで行った。抗 CCP 抗体の有無を MESACUP CCP ELISA kit にて判定した (> 4.5 U/ml を陽性)。

(3) RA 発症に関わる遺伝子検索に用いる検体は京都大学附属病院、国立病院機構相模原病院、道後温泉病院の患者検体に加えて、東京大学、東京女子医科大学からの検体も使用した。また健常人コントロール検体は JSNP web site (http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html) 上に公開されている日本人の SNP の allele frequency data および健常人ドナーからのサンプルを用いた。

スタディデザインは staged strategy を用い、1, 2 次スクリーニングで RA に関連の可能性のある SNP を絞り込み、それらの候補 SNP を 3 次コホートを用いて validation する方法をとった。1 次スクリーニングで 669 例の RA を Illumina 社の DNA chip HumanHap300Duo[®] (30 万 SNP) で typing し、JSNP web site で入手可能な 934 人の日本人健常人 SNP 情報をコントロールとした。また 2 次スクリーニ

ングでは 332 例の RA と 307 例の健常人を Illumina 社 Human610Quad[®] (61 万 SNP) で typing した。Typing data の quality control (SNP の call rate >0.95, minor allele frequency >0.05, 検体の missing genotype <10%) を行った結果、最終的に 1 次スクリーニングは 656 RA vs 934 健常人、2 次スクリーニングは 330 RA vs 298 健常人となり、SNP の数は 1 次スクリーニングで 232, 109 SNPs、2 次スクリーニングで 241, 560 SNPs となった。関連解析 (Trend test) を行い、1 次スクリーニング、2 次スクリーニングともに $p < 0.01$ でかつ meta-analysis で $p < 0.0001$ となる SNP を抽出し validation で候補遺伝子解析を行った。validation では Affymetrix 社の TaqMan 法を用いて 930 例の RA と 855 例の健常人の SNP タイピングを行った。統計解析は χ^2 検定、トレンド検定、Mantel-Haenszel 検定を用いた。

4. 研究成果

(1) DNA 採取を京都大学医学部附属病院、および協力病院 (道後温泉病院リウマチセンター、国立病院機構相模原病院) にて行った。重症化解析を行った平成 19 年度の時点で計 1897 例の RA 検体を収集し、そのうちムチランス型 78 例、軽症型 64 例を認めた。各病型群の患者背景は年齢がそれぞれ 63.5 ± 10.7 才、 64.4 ± 10.0 才、男女比が 67:2、44:14、罹患期間は 29.4 ± 11.1 年、 17.6 ± 9.1 年、stage は 3.9 ± 0.3 、 1.9 ± 1.0 、class は 2.7 ± 0.7 、 1.7 ± 0.7 であった。ムチランス型 78 例と軽症型 64 例を含む計 400 例の RA 検体から DNA を抽出し、30 万 SNP を網羅した DNA チップ (Illumina 社 HumanHap300) を用いて全ゲノムにわたる SNP のタイピングを行った。関連解析にて p 値の低いものから上位 20 SNPs を表 1 に示した。関連の示唆された領域は染色体 1, 2, 3, 4, 8, 9, 12, 13, 19 に限られており、HLA を含む 6 番染色体は上位 20 位には入っていなかった。ただし、最も低い p 値でも 1.09×10^{-5} と 30 万 SNP を対象にすると偶然の確率で出現する程度であった。今後、どの遺伝子 (領域) が本当に重症度と関連があるのかを示すためには別のコホートを用いての Validation が必要であるが、現時点では十分な数が用意できないため、現在さらに RA 検体の収集を進めている。

(2) HLA-DRB1 は RA の発症と関連することが人種を超えて示されているが、関節炎の重症度と関連するかどうかに関してはまだ定説がない。上述の通り、我々のコホートを用いた検討では HLA は重症度と関連がなさそうであるが、最近重症度と関連が示されてきている抗 CCP 抗体が修飾している可能性があるため、重症度、HLA-DRB1、抗 CCP 抗体の関連を

検討した。RA 発症との関連が明らかな *HLA-DRB1* allele のうち CDR3 領域に共通のアミノ酸配列をもつものを *HLA-DRB1* shared epitope (SE) というが、その陽性率は重症型、軽症型でそれぞれ 24/34 (71%)、21/34 (62%) で有意差は認められなかった ($p=0.44$)。表 2 に示したように抗 CCP 抗体の有無で階層化し SE の頻度を検討したところ、抗 CCP 抗体陰性群では軽症群に SE (-) が多い傾向が見られたが、症例数が少なく有意差は認められなかった。抗 CCP 抗体陽性群では SE (+) 群、SE (-) 群に差はみられなかった。以上から我々のコホートをを用いた比較的小数例の検討では、最重症型 RA と最軽症型 RA との間に *HLA-DRB1* shared epitope の保有率に差は認められず、抗 CCP 抗体で階層化しても、基本的には同様の傾向が認められた。

(3) Case-control 関連解析では 1 次スクリーニング、2 次スクリーニングともに $p<0.01$ でかつ meta-analysis で $p<0.0001$ となる SNP を図 1 に四角で囲って示している。表 3 に示すように既報の *HLA* 領域 (chr6) と *PADI4* 領域 (chr1) に有意な関連がみられた (それぞれ $p=1.34\times 10^{-30}$, $p=5.27\times 10^{-6}$)。それらを除いた上位 11 領域 (11 SNPs) を選択し、別コホート (930 RA vs 855 ctr) を用いて TaqMan 法による SNP typing の後、関連解析 (validation) を行った。この validation で $p<0.05$ を示した SNP は染色体 15, 18, 21 に 1 つずつ認められそれぞれ $p=2.9\times 10^{-6}$, 4.2×10^{-6} , 4.6×10^{-5} であった。オッズ比 (95% CI) はそれぞれ 1.24 (1.13-1.37), 1.24 (1.13-1.35), 1.21 (1.10-1.32) であった (表 4)。いずれの領域もこれまでに報告がなく、うち 2 つの SNP が存在する遺伝子がコードする蛋白は自己免疫との関連が示唆されている。ただし、全ゲノム関連解析に求められる有意な p 値 (10^{-7} から 10^{-8} レベル) にはまだ到達していないため、さらに別のコホート (ケースコントロールサンプル) での確認を進めている。また変異による遺伝子や蛋白発現の変化などの機能解析を今後進めていきたい。

以上本研究の成果をまとめると、まず第一に計 3000 例を超える RA 患者からの DNA 検体を収集したことがあげられる。これは世界的に見ても最大級の検体数であり、RA のような多因子疾患で比較的ひとつひとつの遺伝子の寄与度が低い遺伝子の関連解析を行うためには必須の要件である。次に RA の重症度と関連する遺伝子検索に関しては、遺伝子を絞り込むことは出来なかったが、一次スクリーニングを行うことができたため、検体が増えたときに validation を行うことで今後関連遺伝子を絞り込むことが可能である。最後

に RA の発症に関わる関連遺伝子を多数の検体を用いて行い、新規の関連遺伝子領域を同定したことは本研究の最大の成果である。更なる確認と機能解析は必要であるが、非常に有望な結果である。

(表 1) 重症 RA との関連が示唆される SNP

SNP #	p	chr
1	1.09E-05	8
2	2.56E-05	1
3	3.02E-05	8
4	3.26E-05	4
5	3.79E-05	19
6	4.68E-05	2
7	5.41E-05	9
8	5.47E-05	3
9	5.51E-05	4
10	5.52E-05	1
11	5.62E-05	8
12	6.95E-05	8
13	7.26E-05	12
14	7.31E-05	12
15	7.98E-05	12
16	8.01E-05	13
17	8.38E-05	4
18	8.53E-05	4
19	9.21E-05	12
20	9.41E-05	8

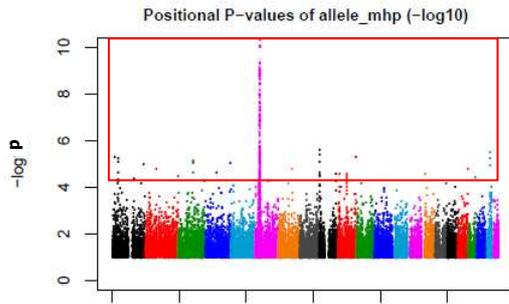
(表 2) *HLA-DRB1* の重症度との関連

	Ctr	CCP (+) RA		CCP (-) RA	
		重症	軽症	重症	軽症
SE (+)	190	23	21	1	0
SE (-)	380	9	9	1	4

Shared epitope (SE): *HLA-DRB1* *0101, *0102, *0401, *0404, *0405, *0408, *0410, *1001, *1402

血清と DNA がともに保存されている最重症型 RA 患者と最軽症 RA 患者の血清中抗 CCP 抗体の有無と *HLA-DRB1* typing による SE の有無で階層化し、健常人 (Ctr) の SE の保有頻度と比較した。

(図1) 1,2次スクリーニングでの全ゲノム関連解析の結果



986人のRA患者と1232人の健常人(1次、2次スクリーニングを集計)での全ゲノム関連解析をMantel-Haenszel検定を用いて行った際のp値から $-\log P$ を縦軸にし、すべてのマーカー(SNP)を染色体ごとにplotした。 $P < 0.0001$ となるSNPを四角で囲って示している。

(表3) 関連が確認された既報遺伝子

SNP	遺伝子	P値	オッズ比
rs2516049	HLA-DRB1	1.3×10^{-30}	2.16
rs2240335	PADI4	5.3×10^{-6}	1.32

(表4) 関連候補領域のP値とオッズ比

SNP位置	P値	オッズ比
Chr. 15	2.9×10^{-6}	1.24
Chr. 18	4.2×10^{-6}	1.24
Chr. 21	4.6×10^{-5}	1.21

1次、2次スクリーニングともに $p < 0.01$ で3次スクリーニングで $p < 0.05$ となったSNP(の存在する染色体)のp値とodds ratio。

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 6 件)

- ① 大村浩一郎、三森経世、抗CCP抗体の臨床的意義、炎症と免疫、16巻、215-222、2008、査読無
- ② 大村浩一郎、関節リウマチの2つのサブセット、リウマチ科、40巻、309-315、2008、査読無
- ③ Yamada R. Primer: SNP-associated studies and what they can teach us. **Nature clinical practice.** 2008 Apr;4(4):210-7. 査読無

- ④ Suzuki A, Yamada R. Kochi Y, Sawada T, Okada Y, Matsuda K, et al. Functional SNPs in CD244 increase the risk of rheumatoid arthritis in a Japanese population. **Nat Genet.** 2008 Oct;40(10):1224-9. 査読有
- ⑤ Yamamoto K, Yamada R. Lessons from a Genomewide Association Study of Rheumatoid Arthritis. **N Engl J Med.** 2007 September 20, 2007;357(12):1250-1 査読無
- ⑥ Yamada R. Yamamoto K. Mechanisms of disease: genetics of rheumatoid arthritis--ethnic differences in disease-associated genes. **Nature clinical practice.** 2007 Nov;3(11):644-50. 査読無

[学会発表] (計 2 件)

- ① 寺尾知可史、大村浩一郎 他、日本人RA患者を用いたTRAF1/C5遺伝子の多型と疾患感受性の検討、第52回日本リウマチ学会総会、2008年4月20日、札幌
- ② 寺尾知可史、大村浩一郎 他、日本人、白人のリウマチ検体を用いたゲノムワイド相関解析、「テーラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」第4回公開シンポジウム、2008年8月1日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大村 浩一郎 (OHMURA KOICHIRO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：40432372

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

山田 亮 (YAMADA RYO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：50301106

島田 浩太 (SHIMADA KOHTA)

独立行政法人国立病院機構・相模原病院・流動研究員
研究者番号：10392995