

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790935

研究課題名（和文）膠原病の遺伝素因におけるIRFファミリー遺伝子群の包括的関連研究

研究課題名（英文）A comprehensive association study of IRF family genes in genetic predisposition to connective tissue diseases.

研究代表者

川崎 綾 (KAWASAKI AYA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・研究員

研究者番号：30532816

研究成果の概要（和文）：IRF および TLR 関連遺伝子の全身性エリテマトーデス (SLE) 疾患感受性への寄与を検討し、日本人集団において、SLE の病態に重要な I 型インターフェロンの誘導に深く関わる IRF7、TLR7 との関連を検出した。IRF7 遺伝子近傍に位置する一塩基多型 (SNP) は、抗 Sm 抗体陽性および腎症合併 SLE との関連が認められた。さらに、TLR7 遺伝子の 3' 非翻訳領域とイントロンに位置する SNP が、独立に SLE 発症に寄与することが見出された。また、TNFAIP3 および TNIP1 遺伝子と SLE の関連も認められた。

研究成果の概要（英文）：We examined whether IRF and TLR related genes contribute to the susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE). Association of *IRF7* and *TLR7* essential for the induction of type I interferon was detected in Japanese. A single nucleotide polymorphism (SNP) located closely to *IRF7* was associated with the presence of anti-Sm antibodies and renal disorder in SLE. In addition, SNPs in *TLR7*'s untranslated region and intron were associated with SLE independently. Association of *TNFAIP3* and *TNIP1* was also observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：膠原病学、遺伝医学

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：全身性エリテマトーデス、疾患感受性遺伝子、インターフェロン、IRF、SNP

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス (SLE)、強皮症 (SSc) をはじめとする膠原病や、関節リウマチ (RA) の発症機序は、いまだに十分解明されていないものの、多数の疾患感受性遺伝子の存在が示唆されている。われわれもこれまでに、日本人集団において *STAT4*、*APRIL* (*TNFSF13*)、*BLYS* (*TNFSF13B*)、*BCMA* (*TNFRSF17*) の一塩基

多型 (SNP) が SLE の発症や臨床症状と関連を示すことを報告してきた。現在、ヨーロッパ系集団や中国人集団を中心に、ゲノムワイド関連研究をはじめとする疾患感受性遺伝子研究が精力的に行われているが、関連には集団差も存在するため、日本人集団を対象とした詳細な関連研究が必須であると考えられる。膠原病、とくに SLE の病態において、I

型インターフェロン (IFN) の重要性が強く示唆されている。SLE 患者では、血清 IFN レベルの上昇や末梢血における IFN 関連遺伝子発現の増加が報告されており、現在 IFN を標的とした分子標的薬の治験も進行中である。これらの知見から、われわれは、IFN 関連遺伝子を疾患感受性遺伝子の候補と考えた。近年、I 型 IFN 誘導にかかわる *interferon regulatory factor 5 (IRF5)* 多型と、SLE、SSc、RA との関連が報告され、*IRF5* は膠原病に共通な疾患感受性遺伝子と考えられている。われわれも、日本人集団において、*IRF5* 多型が SLE および SSc の両方と関連を示すことを報告している。しかしながら、SLE においては、ヨーロッパ系集団におけるリスクハプロタイプは日本人には存在せず、逆にヨーロッパ系集団には存在しない疾患抵抗性 SNP の関連が見出され、集団による違いも認められた。*IRF* ファミリー遺伝子は、9 個の遺伝子から構成されているが、機能的に重要とされる *IRF3*、*IRF7* を含め、他のファミリーについては詳細な関連解析はほとんど行われていない。われわれは、*IRF* ファミリー遺伝子の膠原病疾患感受性への寄与を系統的に調べる必要があると考え、*IRF* ファミリー遺伝子を対象とした疾患関連研究を施行することとした。

2. 研究の目的

研究開始当初は、*IRF* ファミリー遺伝子のみを関連研究の対象としていたが、TLR が、I 型 IFN 産生や IRF 活性化などにも関わり、SLE 発症と関連することが示唆されることから、*IRF* ファミリー遺伝子に加え、*TLR* および *TLR* パスウェイ遺伝子についても、SLE 疾患感受性への寄与を検討した。

(1) *IRF7*

IRF7 (interferon regulatory factor 7) は、I 型 IFN 産生に必須の転写因子として知られている。SLE の末梢血において、*IRF7* mRNA 発現の亢進も報告されている。近年のゲノムワイド関連研究において、*IRF7* 遺伝子近傍に位置する rs4963128 が、ヨーロッパ系集団において SLE と関連を示すことが報告された。rs4963128 は、*PHRF1* 遺伝子内にある SNP だが、*PHRF1* の機能が未知なこと、*IRF7* が SLE 病態において重要であることなどから、rs4963128 の関連は、*IRF7* 遺伝子 SNP との連鎖不平衡 (LD) によるものだと考えられてきた。中国人集団においては、*IRF7* の非同義置換 Gln412Arg (rs1131665) との関連が報告された。一方、ヨーロッパ系集団で報告された rs4963128 の関連は、中国人集団では認められていない。*IRF7* および近傍 SNP の関連が報告されたものの、*IRF7* 遺伝子と SLE の関連を詳細に検討した報告はまだない。また、デー

タベース上に登録されている *IRF7* SNP は、遺伝子型や LD 情報が乏しく、関連解析を行ううえで、リシークエンシングによる多型スクリーニングが必須であると考えられた。本研究では、*IRF7* 遺伝子の日本人集団における SLE への寄与を詳細に検討するために、多型スクリーニングおよび検出された多型についての関連解析を施行した。

(2) *TLR7*

TLR7 (Toll-like receptor 7) は、一本鎖 RNA を認識する受容体で、活性化により I 型 IFN の産生が誘導される。*TLR7* の SLE への関与は強く示唆されている。オスの BXSB マウスは SLE を発症するが、Y 染色体上の Y chromosome-linked autoimmune accelerator (yaa) が原因であると考えられている。yaa 変異は、X 染色体上の *TLR7* をはじめとする複数の遺伝子を含む領域が Y 染色体に転座することにより生ずる。近年、ヒトにおいても、*TLR7* 3' 非翻訳領域 (UTR) SNP rs3853839 と SLE の関連が中国人および韓国人を主とする東アジア集団において報告された。さらに、rs3853839 リスクアリルが、*TLR7* 発現上昇と関連することも示唆されている。本研究では、3' UTR SNP が日本人集団においても追認されるかを検討するとともに、*TLR7* 遺伝子と SLE の関連を系統的に調べるために、*TLR7* 遺伝子上のタグ SNP を用いた関連解析を行った。

(3) *TNFAIP3*、*TNIP1*

TNFAIP3 (tumor necrosis factor alpha-induced protein 3) は、ユビキチン化・脱ユビキチン化の両方に関わる酵素である A20 をコードする遺伝子で、6q23 に位置する。A20 は、NF- κ B 活性化の制御に関わり、TNF や TLR シグナルにおいて抑制的に働くことが示唆されている。また、*TNIP1* (*TNFAIP3* interacting protein 1) は、A20 のアダプター分子と考えられている。*TNFAIP3* と SLE の関連はゲノムワイド関連研究により報告された。Musone らは、ヨーロッパ系集団において、*TNFAIP3* 遺伝子および近傍に位置する 3 つの SNP、rs13192841、rs2230926、rs6922466 が独立に SLE と関連を示すことを報告した。rs2230926 は *TNFAIP3* の 127 番目のアミノ酸において、Phe から Cys へのアミノ酸置換を伴う。また、SLE リスクアリルである 127Cys が、127Phe に比べて、NF- κ B 活性化抑制が低いことが示唆された。*TNFAIP3* の関連は、様々な集団で追認されている。また、*TNFAIP3* は、SLE のみならず RA との関連も報告されており、*TNFAIP3* は、SLE、RA 共通の疾患関連遺伝子と考えられている。*TNIP1* においても、ヨーロッパ系集団および中国人集団において、SLE との関連が報告された。本研究では、*TNFAIP3* および *TNIP1* の日本人集団における

SLE への関連を検討した。

3. 研究の方法

(1) *IRF7*

SLE16 検体、健常者 16 検体を用いて、*IRF7* 遺伝子全長のリシーケンシングを行った。スクリーニング検体における LD とアレル頻度を考慮して選択した、3 つのタグ多型および 2 つの非同義置換 Lys179Glu (rs1061502)、Gln412Arg (rs1131665)、さらに、*IRF7* 近傍の rs4963128 について、SLE416 例、健常者 505 例を対象として、関連解析を行った。

(2) *TLR7*

HapMap データベースに登録されている、日本人集団における LD およびアレル頻度情報をもとに、7 つのタグ SNP を選択した。*TLR7* 遺伝子は X 染色体上に位置しているため、女性 SLE および女性健常者のみを解析対象とした。7 つのタグ SNP および 3' UTR SNP rs3853839 について、女性 SLE 患者 344 例、女性健常者 274 例を対象として、日本人 SLE との関連解析を施行した。

(3) *TNFAIP3*, *TNIP1*

TNFAIP3 については、SLE318 例、健常者 444 例を対象として rs13192841、rs2230926、rs6922466 と SLE の関連を調べた。さらに、*TNIP1* SNP rs7708392 の関連を、SLE 364 例、健常者 513 例について検討した。また、データベースより HapMap サンプルにおける発現プロファイルを入手し、SLE 関連 SNP について、遺伝子型と発現レベルの関連を解析した。

4. 研究成果

(1) *IRF7*

リシーケンシングにより、2 つの非同義置換 (Lys179Glu、Gln412Arg) を含め、20 個の多型が検出された。そのうち 2 つの多型は、新規の多型だった。LD およびアレル頻度を考慮し、3 つのタグ多型 (rs10902179、rs3832720、rs55917943) を選択し、タグ多型および非同義置換について、日本人 SLE を対象とした関連解析を施行した。中国人集団において、Gln412Arg と SLE の関連が報告されているが、日本人集団においては、関連は観察されなかった (412Arg 頻度、SLE: 1.9%、健常者: 1.7%、 $P=0.70$ 、オッズ比: 1.15)。他の *IRF7* 多型においても、有意な関連は検出されなかった。同様に、ヨーロッパ系集団で関連の報告された rs4963128 についても解析を行った。日本人集団における rs4963128T アレル頻度は、3.1%で、ヨーロッパ系集団 (33.7%) とは、大きな違いが見られた。rs4963128T と SLE 発症との関連は検出されなかったものの、抗 Sm 抗体陽性 SLE において、T アレルの有意な増加が認められた (抗 Sm 抗体陽性 SLE: 6.8%、

健常者: 3.1%、 $P=0.014$ 、オッズ比: 2.31)。また、腎症合併 SLE においても、T アレルの増加が見られた (腎症合併 SLE: 5.1%、腎症非合併 SLE: 2.4%、 $P=0.047$ 、オッズ比 2.17)。

(2) *TLR7*

東アジア人集団における *TLR7* 3' UTR rs3853839 と SLE の関連は、日本人でも認められ、G アレル頻度は、SLE において有意に増加していた。(SLE: 75.4%、健常者: 69.3%、 $P=0.017$ 、オッズ比: 1.36)。さらに、イントロンに位置する SNP、rs179019 および rs179010 においても、関連が検出された (rs179019A/A、SLE: 13.1%、健常者: 6.9%、 $P=0.016$ 、オッズ比: 2.02、rs179010T/T、SLE: 17.7%、健常者: 10.9%、 $P=0.18$ 、オッズ比: 1.75)。ロジスティック回帰分析により、各 SNP の SLE への寄与を検討したところ、3' UTR SNP の関連は、イントロン SNP で調整後も残り (rs3853839: 調整前 $P=0.021$ 、rs179019 調整後 $P=0.040$ 、rs179010 調整後 $P=0.047$)、イントロン SNP の関連は 3' UTR SNP 調整後も残った (rs179019: 調整前 $P=0.014$ 、rs3853839 調整後 $P=0.026$ 、rs179010: 調整前 $P=0.019$ 、rs3853839 調整後 $P=0.042$)。これらの知見より、3' UTR SNP とイントロン SNP が独立に SLE に寄与していることが示された。また、全てのリスクアレルを含むハプロタイプ (rs3853839G-rs179019A-rs179010T) は、劣性モデルにおいて、SLE との有意な関連が認められた。 $P=0.016$ 、オッズ比: 2.37)。SLE 臨床症状と *TLR7* SNP の関連を検討したところ、腎症合併群において、rs179019 とのより強い関連が見られた。 $(P=0.011)$ 、オッズ比: 2.25)。

(3) *TNFAIP3*, *TNIP1*

TNFAIP3 領域 SNP においては、非同義置換 rs2230926G (127Cys) と SLE の有意な関連が認められた (G/G 遺伝子型頻度、SLE: 1.9%、健常者: 0.2%、 $P=0.023$ 、オッズ比: 8.52)。他の 2 か所の SNP においては、日本人集団においては有意な関連は検出されなかった。さらに、rs2230926 の機能的影響を検討するために、データベースを用いて rs2230926 と *TNFAIP3* mRNA 発現の関連を調べたところ、SLE リスクアレルである rs2230926G 陽性群において mRNA レベルの低下が観察された。SLE リスクアレルが、アミノ酸置換による NF- κ B 抑制の低下のみならず、*TNFAIP3* 発現低下にも影響することが示唆された。

TNIP1 については、ヨーロッパ系集団において関連の報告された *TNIP1* イントロン SNP、rs7708392 について関連を検討した。ヨーロッパ系集団における SLE リスクアレル rs7708392C の頻度は、24.3%で、日本人集団 (69.9%) と大きく異なっていた。ヨーロッパ系集団と同様に、日本人集団においても、

rs7708392CアリルがSLEで有意に増加していた(SLE:76.5%、健常者:69.9%, P=0.0022, オッズ比:1.40)。日本人集団におけるSLEリスクアリル頻度は、ヨーロッパ系集団と比較して高く、疾患感受性への寄与度は、日本人集団の方が高いことが推測された。また、rs7708392Cの関連は、腎症合併SLEで、より顕著に認められた(P=0.00065、オッズ比:1.60)。データベースを利用して、rs7708392の発現への影響を調べたが、有意な関連は観察されなかった。

NF-κB制御に関わる*TNFAIP3*および*TNIP1*遺伝子とSLEの関連により、NF-κB系のSLE発症における重要性が強く示唆された。

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6件)

- ① Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N、*TLR7* single-nucleotide polymorphisms in the 3' untranslated region and intron 2 independently contribute to systemic lupus erythematosus in Japanese women: a case-control association study、*Arthritis Res Ther*、査読有、Vol.13、2011、R41
- ② 川崎綾、全身性エリテマトーデスと*TNFAIP3*、*TNIP1*多型の関連、医学のあゆみ、査読無、236巻、2011、286-287
- ③ Kawasaki A, Ito S, Furukawa H, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Kusaoi M, Ohashi J, Graham RR, Matsuta K, Behrens TW, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N、Association of *TNFAIP3* interacting protein 1, *TNIP1* with systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study、*Arthritis Res Ther*、査読有、Vol.12、2010、R174
- ④ 川崎綾、*IRF5*遺伝子多型と膠原病の関連、リウマチ科、査読無、43巻、2010、526-531
- ⑤ Kawasaki A, Ito I, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N、Association of *TNFAIP3* polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in a Japanese population、*J Biomed Biotechnol*、査読有、Vol. 2010、2010、207578
- ⑥ 川崎綾、リウマチ性疾患とI型インターフェロン関連遺伝子、炎症と免疫、査読無、18巻、2010、44-48

[学会発表] (計3件)

- ① Kawasaki A、Association of *TNFAIP3* and *TNIP1* SNPs with systemic lupus erythematosus in a Japanese population、The 9th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus、2010年6月25日、バンクーバー(カナダ)
- ② 川崎綾、日本人集団におけるTLR7多型と全身性エリテマトーデスの関連、第54回日本リウマチ学会学術集会、2010年4月22日、神戸ポートピアホテル(兵庫県)
- ③ 川崎綾、*TNFAIP3* 遺伝子多型と全身性エリテマトーデスの関連、第40回日本免疫学会学術集会、2009年12月4日、大阪国際会議場(大阪府)

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 綾 (KAWASAKI AYA)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
研究員

研究者番号: 30532816

(2) 研究協力者

土屋 尚之 (TSUCHIYA NAOYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授

研究者番号: 60231437