

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20020

研究課題名(和文) 関節リウマチの脂質異常症に関連する遺伝子の同定

研究課題名(英文) Genetic association of Dyslipidemia in patients with rheumatoid arthritis

研究代表者

吉田 進二 (Yoshida, Shinji)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80464882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)： 関節リウマチの疾患感受性遺伝子と健常人における脂質データに関連する複数の遺伝子を対象とした統計学的解析を行ったところ、関節リウマチの疾患感受性遺伝子の内、rs3093024 (CCR6)、rs1160542 (AFF3)、rs10465436 (P2RY10) が血清LDLコレステロール濃度と関連していたが、Bonferroni補正後は有意水準には至らなかった。一方で脂質データに関連する遺伝子の内、rs7412 (APOE) が有意に関連していることが判明し、血清LDLコレステロール濃度に関わる遺伝要因であることを示した。

研究成果の概要(英文)： Susceptibility genes to rheumatoid arthritis (RA) and genes modulating lipid profiles validated in the Japanese general population were genotyped. We investigated genetic association between serum low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels in Japanese patients with RA and each single nucleotide polymorphism by multivariate linear regression analyses. The results revealed that the minor allele of rs3093024 (CCR6), rs1160542 (AFF3) and rs10465436 (P2RY10) in susceptibility genes to RA was associated with lower serum LDL-C levels. However, those associations were not significant after Bonferroni correction for multiple comparisons. Patients with minor alleles of rs7412 (APOE) in genes modulating lipid profiles had significantly higher serum LDL-C levels. An APOE polymorphism is a genetic risk factor for higher serum LDL-C levels in Japanese patients with RA.

研究分野：整形外科学

キーワード：関節リウマチ 脂質異常症 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) は有病率が約 0.5%と比較的頻度の高い、全身性の進行性多関節炎を伴う炎症性自己免疫疾患であるが、未だにその詳細な病態は解明されていない。RA における主な死因としては免疫抑制療法に起因すると思われる感染症に加えて、心筋梗塞や脳梗塞といった動脈硬化に起因する心血管系疾患が挙げられるが、RA における心血管系疾患の発症率は健常人と比較すると高いことが知られている。

脂質異常症は動脈硬化の明らかな危険因子であるが、RA 患者における脂質異常症の有病率は報告によって異なる。RA による関節炎に伴う日常生活動作の低下やステロイド製剤の使用が脂質異常症に関連しているという報告がある一方で、血清 LDL 値が健常人より低いにも関わらず心血管系疾患の発症率が高いとする報告もある。動脈硬化については RA における慢性的な炎症状態の持続がその一因の可能性があると考えられている。また近年では RA の疾患感受性遺伝子が脂質異常症と関連しているとする報告や脂質異常症が RA における骨関節破壊の進行と関連しているとする報告もあるが、いずれも海外における報告であるため、国内での RA と脂質異常症との関連について遺伝要因における evidence は乏しく、詳細な病態機序については十分に究明されていない。

RA に対する治療の主な目標は疾患の寛解とその維持であり、メトトレキサートを中心とした免疫抑制剤による薬物療法が主体である。難治例における生物学的製剤の導入について近年では増加傾向を認めており、以前と比較すると疾患活動性のコントロールは多くの症例で可能となってきた。しかしながら一部の治療抵抗性の重症例では日常生活動作が障害されて転倒や寝たきりといった問題につながり、RA 患者の生命予後は健常人と比較すると不良であると言われている。また生物学的製剤は従来の抗リウマチ薬と比較すると高額であり、間質性肺炎や重症感染症などの副作用も一定の割合で生じ得るため、RA における治療については医学的にも社会的にも大きな問題が残されていると考える。

RA の発症には遺伝要因と環境要因の両者が相互に関与していることが知られており、これまでに多くの研究によってその発症に関与するとされている疾患感受性遺伝子が同定されてきた。近年ではゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) が盛んに行われており、その報告数は飛躍的に増加している。当施設ではこれまでに理化学研究所と京都大学の国内施設だけではなく海外諸国の施設を含めた国際共同研究を行い、ヨーロッパおよびアジアを起源とする合計 100,000 人以上

(RA 患者群 29,880 名、対照群 73,758 名) について約 1,000 万の SNPs を評価することによってワールドワイドに GWAS のメタ解析を行った。その結果、42 個の新規遺伝子領域を含めた合計で 101 個の疾患感受性遺伝子を同定することに成功した (Okada Y, et al. Nature 2014)。

2. 研究の目的

当施設では、約 6,000 名の RA 患者を対象として IORRA コホート (Institute of Rheumatology, Rheumatoid Arthritis cohort) を 2000 年に開始しており、これまで 14 年に及ぶ詳細な臨床データを集積し、膨大なデータベースを構築している。また現在登録患者の内より 2,400 名を超える患者から DNA 試料を採取し、連結可能匿名化の上で IORRA データベースと連動させている。患者基本情報や臨床検査値に加えてほとんどの患者から骨関節破壊の指標となる X 線スコアを含む詳細なデータを得ており、遺伝統計学的解析を行う上で DNA 試料を有する患者群としては非常に優れたデータベースとなっている。

本研究代表者が所属する東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センターでは、これまでに日本人 RA 患者におけるオーダーメイド医療実現化プロジェクトの他、GWAS および GWAS のメタ解析による疾患感受性遺伝子の同定、遺伝子の相互作用、遺伝要因と環境要因との相互作用、生物学的製剤を含む抗リウマチ薬に対する薬物反応関連遺伝子の同定、RA の重症化として骨関節破壊進行に関連する遺伝子の同定、RA の合併症として大腿骨近位部骨折の発生に関連する遺伝子の同定などの研究を行い、日本人 RA 患者における遺伝要因の解明に大きく貢献してきた。

脂質異常症については近年健常人においては関連する遺伝子の同定が進められてきたが、RA 患者においてはどのように関連しているのかは未だに結論が出ていないのが現状である。本研究によって日本人 RA 患者において脂質異常症がどのように関連しているのかを明らかにし、遺伝要因について検討を行うことは RA 患者における病態解明につながると考える。

3. 研究の方法

患者選択

当施設で実施中の IORRA コホートに登録されている RA 患者は 1 万名超であり、その内 DNA データを保有する 2,444 名の患者を遺伝子解析の対象とする。必要に応じて DNA 試料の追加採取を行うことが可能であり、その場合にはインフォームドコンセントを取得した上で登録を行う。

遺伝子解析の前段階として遺伝要因以外に脂質に関連する因子を探索し、遺伝子解析の際の調整因子とする。これについては

IORRA コホートに登録されている患者の内、解析に必要なデータを備えた患者群を対象とする。

調整因子解析

IORRA データベースには年齢・性別・RA 罹病期間・BMI などの基本情報に加えて血清 CRP 値・赤沈値・自己抗体価などの各種臨床検査値、メトトレキサート・生物学的製剤・降圧剤・脂質降下剤などの各種薬剤の投与状況ならびに DAS28・SDAI などの疾患活動性指標、間質性肺炎・重症感染症・心血管系疾患などの合併症の発生状況も含まれている。本研究では脂質の指標として血清 LDL、HDL、TG 値を使用する。

ゲノムワイド関連解析：GWAS

当施設の他のプロジェクトで実施した GWAS における遺伝子多型情報を二次利用して、GWAS による一次スクリーニングを行い、脂質データに関連する遺伝子を網羅的に探索する。GWAS のプラットフォームには約 260 万多型を収載した HumanOmni2.5Exome-8 (イルミナ社)を使用した。

IORRA データベースからの臨床情報は情報管理担当者による匿名化の上で、DNA データと直結して大容量記録装置を備えた解析用ワークステーションに格納する。解析プログラムにはフリーソフトウェアである PLINK2 を使用して Quality control (QC) および遺伝統計学的解析を行う。QC 後に脂質データを従属変数とし、各 SNP を説明変数とした回帰分析を行う。その際には調整因子解析で有意となった調整因子を加えた重回帰分析とする。

2,423 名の患者によるディスカバリーフェーズでゲノムワイド有意水準 ($P = 5 \times 10^{-8}$) を超える SNP が得られる可能性も充分にありえるが、得られなかった場合には、 $P < 1 \times 10^{-5}$ をクリアした SNP までを追認解析の対象とする。バリデーションフェーズは GWAS を行った患者群とは別に DNA を追加収集する患者群を対象とし、ゲノタイピングには多検体同時タイピングに適した TaqMan 法を使用する。一次スクリーニング同様に各調整因子で調整を行った上で、重回帰分析を行う。解析プログラムにはフリーソフトウェアである R を使用する。Coefficient (β) を用いて一次スクリーニングの結果とあわせてメタ解析を行い、ゲノムワイド有意水準をクリアした SNP を関連ありと判断する。平成 27 年度中に十分な数の DNA が収集が出来なかった場合、バリデーションフェーズは平成 28 年度に行う。

候補遺伝子解析

欧米人での研究において RA の疾患感受性遺伝子の内のいくつかが脂質データと関連があることが報告されているが、日本人でも同様の関連があるかどうかは定かではない。脂質データに関連する遺伝子については健康人において欧米人だけではなく日

本人でも報告されている。これまでに報告されている日本人における RA の疾患感受性遺伝子と健康人における脂質データに関連する複数の遺伝子を対象とする。ゲノタイピングには追認解析と同様に TaqMan 法を使用するが、当施設で収集された DNA 試料の大部分は大規模疾患感受性遺伝子解析プロジェクトで利用されており、既にある程度の疾患感受性遺伝子領域については遺伝子多型の同定を終えているため、新たな遺伝子解析の費用は最小限に抑えられることは利点である。解析は追認解析と同様に各調整因子で調整を行った上で、重回帰分析を行う。その際の有意水準は Bonferroni 補正を行って決定する。

機能解析

有意な結果が得られた SNP については周辺のゲノム構造解析を行い、有意な関連を認めるハプロタイプブロックを決定する。決定されたハプロタイプブロック内のエクソン領域およびプロモーター領域についてはリシーケンスを行い、より関連の強い SNP や機能的 SNP の探索を行う。機能的 SNP については機能解析による評価を行う。解析手法としては得られた SNP の予想機能にもよるが、発現解析やルシフェラーゼアッセイによるプロモーター活性評価、ゲルシフトアッセイによる転写因子の DNA 結合能評価を行う。当施設は国内最大の RA 手術件数を誇り、これまでに 800 名以上の患者の手術時摘出組織由来の軟骨と滑膜の RNA をライブラリー化しており、また培養細胞としても保存している。これらを利用して当該遺伝子の発現解析を行う。また細胞への当該遺伝子導入や遺伝子発現抑制実験によってその機能解析を行うことも可能である。

重症化との関連解析、重症化進行の予測アルゴリズムの作成

IORRA データベースには心血管系疾患などの合併症の有無や骨関節破壊の指標である X 線スコアといった RA 重症化に関連するデータも記録されている。本研究によって同定された SNP がこれらと関連しているかどうか重回帰分析によって解析を行う。最終的に有意な結果が得られた SNP を遺伝子マーカーとし、各種の臨床指標と組み合わせるための予測アルゴリズムを作成する。本研究計画自体にはオーダーメイド医療への臨床応用を含まないが、本研究で得られた結果は直ちに臨床応用可能である。将来的には医療側と患者側ならびに社会のいずれもが満足できる極めて効果的な RA における包括的なオーダーメイド医療の実現につながるかと考えている。

4. 研究成果

本研究前の予備実験として IORRA コホートに登録されている RA 患者の内、7,378 名を対象とした調整因子解析を施行した。IORRA 登

録時における血清 LDL、HDL、TG 値を従属変数とし、各種パラメーターを説明変数とした重回帰分析を行った結果、BMI や DAS28 などのいくつかの臨床指標において有意な関連が認められた。

当施設で実施中の IORRA コホートに登録されている DNA データを保有する患者の内、1 千名超を対象として、RA の疾患感受性遺伝子と健常人における脂質データに関連する複数の遺伝子を対象とした候補遺伝子解析を行った。ゲノタイピングには多検体同時タイピングに適した TaqMan 法を使用し、当施設の他のプロジェクトで得られた遺伝子多型情報の二次利用を行った。

解析は予備実験として行った調整因子解析で同定したいくつかの臨床指標を用いて調整を行った上で、重回帰分析を行った。

その結果、RA の疾患感受性遺伝子の内、rs3093024 (CCR6)、rs1160542 (AFF3)、rs10465436 (P2RY10) が血清 LDL コレステロール濃度と関連していたが、Bonferroni 補正後は有意水準に至らなかった。脂質データ関連の遺伝子としては rs7412 (APOE) が有意に関連していた。

その他に脂質データに関連する遺伝子と RA における骨関節破壊進行との関連について解析を行ったところ rs662799 (BUD13-APOA1-APOA5) との関連を認めただが、Bonferroni 補正後は有意水準に達しなかった。

GWAS による一次スクリーニングを予定していたが、当施設の他のプロジェクトで既に実施した GWAS における遺伝子多型情報の二次利用が脂質データのクリーンアップ不備によって順調に進まなかった。それによって研究年度内にプロジェクトを完遂することは叶わなかったが、未だに詳細が解明されていない RA の病態の中でも国内で evidence が乏しい分野において新たな知見を提供できたと考える。

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)

[学会発表](計 6 件)

Shinji Yoshida, Katsunori Ikari, Koichiro Yano, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, Atsuo Taniguchi, Hisashi Yamanaka, Shigeki Momohara. A TRAF1 gene polymorphism is a genetic risk for radiographic progression of joint destruction in anti-citrullinated peptide antibody-negative rheumatoid arthritis. 18th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress. Sep. 26-29, 2016. Shanghai, China

吉田 進二, 猪狩 勝則, 矢野 紘一

郎, 松本 守雄, 中村 雅也, 谷口 敦夫, 山中 寿, 桃原 茂樹. 抗 CCP 抗体陰性の関節リウマチ患者における C5-TRAF1 遺伝子多型の骨関節破壊への影響. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015 年 10 月 22-23 日. 富山国際会議場 (富山県富山市)

吉田 進二. 病態解明に向けた RA 遺伝子解析. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015 年 10 月 22-23 日. 富山国際会議場 (富山県富山市)

Shinji Yoshida, Katsunori Ikari, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, Atsuo Taniguchi, Hisashi Yamanaka, Shigeki Momohara. Impact of disease susceptibility genes on serum low density lipoprotein cholesterol levels in Japanese patients with rheumatoid arthritis. 17th Asia Pacific League of Associations for Rheumatology Congress. Sep. 6-9, 2015. Chennai, India

Shinji Yoshida, Katsunori Ikari, Takefumi Furuya, Atsuo Taniguchi, Hisashi Yamanaka, Shigeki Momohara. The C677T polymorphism in the MTHFR gene contributes to an increased risk of hip fracture in Japanese patients with rheumatoid arthritis. 16th Annual European Congress of Rheumatology. Jun. 10-13, 2015. Rome, Italy

Shinji Yoshida, Katsunori Ikari, Atsuo Taniguchi, Hisashi Yamanaka, Shigeki Momohara. Association of serum low-density lipoprotein cholesterol levels with disease activity and genetic factors in Japanese patients with rheumatoid arthritis: results from the IORRA cohort study. 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2015 年 4 月 23-25 日. 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/IOR/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 進二 (YOSHIDA, Shinji)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80464882