

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390271
 研究課題名(和文) リウマチ膠原病のゲノム医療に向けての遺伝因子、環境因子、遺伝子環境相互作用の解析
 研究課題名(英文) Studies on the genetic factors, environmental factors and their interactions towards the establishment of genome medicine of rheumatic diseases.
 研究代表者
 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

研究成果の概要(和文)：

日本人集団において、*IRF5*, *STAT4*, *BLK*, *TNFAIP3*, *TNIP1* 遺伝子多型が全身性エリテマトーデスの疾患感受性と関連することを確認し、また、*BLK*, *STAT4*, *TNIP1* では、リスク遺伝子型頻度が日本人集団において高いことから、日本人において遺伝的寄与度の高い疾患感受性遺伝子であることを明らかにした。また、*IRF5*, *STAT4*, *BLK* は全身性強皮症とも関連することを見出し、これらが集団を超えて複数の膠原病に関連する遺伝子であることを確立した。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we confirmed association of *IRF5*, *STAT4*, *BLK*, *TNFAIP3* and *TNIP1* polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. In addition, we found that the genetic contribution of *BLK*, *STAT4* and *TNIP1* is greater in Japanese than in Caucasians because of higher risk genotype frequencies. Moreover, we found that *IRF5*, *STAT4* and *BLK* are also associated with systemic sclerosis, thereby establishing that these genes are shared susceptibility genes to multiple rheumatic diseases both in the Asian and Caucasian populations.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 4,300,000 | 1,290,000 | 5,590,000 |
| 2008年度 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |
| 2009年度 | 3,200,000 | 960,000 | 4,160,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 10,900,000 | 3,270,000 | 14,170,000 |

研究分野：膠原病学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー・感染症内科学

キーワード：全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、関節リウマチ、疾患感受性遺伝子、*BLK*, *STAT4*, *IRF5*, *TNFAIP3*, *TNIP1*

1. 研究開始当初の背景

研究開始(2007年)当時は、欧米にて大規模な関連研究による全身性エリテマトーデス

(systemic lupus erythematosus, SLE)の疾患感受性遺伝子解析が開始されつつあり、その最初の成果として、*IRF5* の関連が報告さ

れた。SLE を含む膠原病に対するゲノムワイド関連研究(genome-wide association study, GWAS)の最初の報告は2008年であるが、本研究期間中にヨーロッパ系集団からGWASが報告されることが予想される状況であった。疾患感受性遺伝子にはしばしば集団差が認められることから、ヨーロッパ系集団において見出される疾患感受性遺伝子の日本人集団における関連の検証、一義的関連多型の同定、臨床的意義の検討が必要になると考えられた。

また、GWASでは検出が困難な疾患感受性遺伝子の存在も徐々に明らかになり、候補遺伝子解析も平行して進めていく必要があると考えられた。

さらに、疾患感受性遺伝子情報を医療に連結するために、疾患感受性遺伝子多型の分子機構を明らかにすること、個別化医療に応用可能なバイオマーカーの開発が求められていた。

以上の背景から、本研究は、GWASおよび機能的候補パスウェイ解析の成果に基づき、日本人集団における、SLEをはじめとする膠原病の疾患感受性遺伝子を見出し、遺伝子間相互作用を考慮した上で、医療上有用なバイオマーカーの開発につなげることを目的とした。

また、今後の環境因子の同定と遺伝子環境相互作用の検討の基礎データとすべく、自然免疫系遺伝子を候補パスウェイとして、新規膠原病感受性遺伝子探索を施行した。

2. 研究の目的

(1) 日本人集団におけるリウマチ・膠原病の疾患感受性遺伝子、臨床経過関連遺伝子を検出する。また、集団間における疾患感受性遺伝子の比較により、集団特異的および集団を超えて共通の疾患感受性遺伝子を同定する。

(2) 実験的方法およびバイオインフォマティクスを用いた方法により、疾患関連遺伝子多型による機能的変化を解析する。

(3) 遺伝子環境相互作用の解明への応用を目的として、自然免疫系遺伝子多型とリウマチ・膠原病との関連を検討する。

(4) 複数の疾患感受性遺伝子における遺伝子型の組み合わせにより、膠原病発症リスク推定を試みる。

以上の検討により、リウマチ・膠原病の病因解明に貢献するとともに、日本人集団のリウマチ・膠原病において寄与度の高い遺伝因子を同定し、個別化医療に有用なバイオマーカーの検出を試みるとともに、環境因子探索、遺伝子環境相互作用の解析上有用な基礎デ

ータを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヨーロッパ系集団におけるSLEの大規模関連研究によって関連が検出された遺伝子を、日本人集団において、SLE、関節リウマチ(rheumatoid arthritis, RA)、全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)との関連を検討した。

(2) インターフェロン関連55遺伝子の384個のタグ単一塩基多型(single nucleotide polymorphism, SNP)を搭載したカスタムアレイを用いた候補パスウェイ解析により、新規疾患感受性遺伝子の探索を施行した。見出された候補遺伝子について、一義的疾患関連多型部位を同定するとともに、細胞生物学的な方法およびバイオインフォマティクスを用いて、多型により機能的変化を解析した。

(3) 日本人集団においてSLEとの関連が確立した7遺伝子(*HLA-DRB1*, *IRF5*, *STAT4*, *BLK*, *FCGR2B*, *TNFAIP3*, *TNIP1*)につき、遺伝子間相互作用を検討するとともに、個人がこれらの遺伝子に有するリスクアレル数の総数とSLE発症リスクとの関連を検討した。

4. 研究成果

(1) ヨーロッパ系集団において全身性エリテマトーデス(SLE)との関連が見出された*IRF5*, *STAT4*, *BLK*, *TNFAIP3*, *TNIP1*遺伝子が日本人集団においてもSLEと関連することを見出した(表1)。以上の結果から、これらの遺伝子は、ヨーロッパ系集団、アジア系集団に共通のSLE感受性遺伝子であることが明らかになった。

IRF5, *STAT4*からは炎症性サイトカインの、*TNFAIP3*, *TNIP1*からはNF- κ B制御系の、また、*BLK*からは、B細胞受容体シグナルの病因上の重要性がそれぞれ示唆された。

| 遺伝子 | アレル | モデル | オッズ比 |
|----------------|-------------|-----|------|
| <i>IRF5</i> | rs41298401C | 劣性 | 1.55 |
| <i>STAT4</i> | rs7574865T | 優性 | 2.19 |
| <i>BLK</i> | rs13277113A | 劣性 | 2.27 |
| <i>TNFAIP3</i> | rs2230926G | 劣性 | 2.97 |
| <i>TNIP1</i> | rs7708392C | 劣性 | 1.52 |

表1 本研究で検出された日本人SLE感受性遺伝子

(2) *BLK*, *TNIP1*, *STAT4*においては、一般集団におけるリスクアレル頻度が日本人集団においてヨーロッパ系集団よりも高く、日本人SLEにおける遺伝的寄与度が高いこと(表2)、*IRF5*

については、ヨーロッパ系集団におけるリスクハプロタイプが日本人集団には存在せず、逆にヨーロッパ系集団には存在しないSNPが日本人において有意な関連を示すことを見出した。

| 遺伝子 | 集団 | 集団中のリスク遺伝子型頻度 (%) | オッズ比 |
|-------|--------|-------------------|------|
| STAT4 | 日本人 | 56.5 | 2.19 |
| | ヨーロッパ系 | 41.2 | 1.59 |
| BLK | 日本人 | 43.2 | 2.27 |
| | ヨーロッパ系 | 5.1 | 1.62 |
| TNIP1 | 日本人 | 48.9 | 1.52 |
| | ヨーロッパ系 | 6.0 | 1.53 |

表2 日本人集団において集団中のリスク遺伝子型頻度が高く、遺伝的寄与度が高い遺伝子

これらの結果、集団を超えて共通の感受性遺伝子であっても、集団によって遺伝的寄与度がしばしば大きく異なることが明らかになり、日本人の医療には日本人のデータが必要であると考えられた。

(3) *BLK*が全身性強皮症(SSc)、関節リウマチ(RA)とも関連すること、*STAT4*、*IRF5*がSScとも関連することを見出した(表3)。ほぼ同時期に公表された国外の研究者らの結果とあわせ、これらの遺伝子が、人種を超えた、膠原病共通の疾患感受性遺伝子であることを明らかにした。

| 疾患 | 遺伝子 | モデル | オッズ比(95%信頼区間) |
|-----|--------------|-----|------------------|
| RA | <i>BLK</i> | 劣性 | 1.31 (1.03-1.67) |
| SSc | <i>BLK</i> | 劣性 | 1.61 (1.24-2.11) |
| SSc | <i>STAT4</i> | 劣性 | 1.88 (1.28-2.77) |
| SSc | <i>IRF5</i> | 優性 | 1.72 (1.18-2.50) |

表3 *BLK*rs13277113A、*STAT4*rs7574865T、*IRF5*rs2280714Aと日本人関節リウマチ、全身性強皮症との関連

(4) 新たな疾患感受性遺伝子として、*SPI1* 3'非翻訳領域SNPとSLEとの関連を見出すとともに、その多型に伴う機能的変化を実験的方法およびバイオインフォマティクスを用いた方法により解析し、いずれも、リスクアリルにおける*SPI1*発現亢進を見出した。また、*IL10*受容体とSScとの関連を見出した。

(5) これまでに複数の研究者による独立な確認が得られているSLE感受性遺伝子として、*HLA-DRB1*、*IRF5*、*STAT4*、*BLK*、*FCGR2B*、*TNFAIP3*、*TNIP1*の7遺伝子を選び、これらの遺伝子に個人が保有するリスクアリルの総数と

SLE発症との関連を検討した。

健常対照群の中央値である6アリル保有者を標準とした場合、リスクアリルを9個保有しているとリスクが3.41倍、10個以上保有していると9.80倍上昇し、逆に4個の時は0.49倍、3個以下の場合は0.19倍に低下することを見出した。また、これらの遺伝子間に、明らかな遺伝子間相互作用は検出されなかった。

(6) HapMapドナーより樹立されたB細胞株のトランスクリプトームのデータベース(GENEVAR)を利用して、任意のSNPと任意の遺伝子のmRNAレベルとの関連を解析する方法を確立した。今後の疾患関連多型の機能解析上、有用な方法である。

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)

[雑誌論文] (計 30 件)

- ① 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* 2010; doi:10.1155/2010/207578 (査読あり)
- ② Ito I, Kawaguchi K, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N. Association of the *FAM167A-BLK* region with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2010;62:890-895. (査読あり)
- ③ Ito I, Kawasaki A, Ito S, Kondo Y, Sugihara M, Horikoshi M, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Takasaki Y, Hashimoto H, Matsuta K, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of association between *FAM167A (C8orf13)-BLK* region and rheumatoid arthritis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2010;69:936-937. (査読あり)
- ④ Tsuchiya N, Kawasaki A, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kawaguchi Y, Kawamoto M, Hara M, Sato S. Association of *STAT4* polymorphism with systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1375-1376. (査読あり)
- ⑤ Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Hikami K, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N.

- Association of a functional polymorphism in the *IRF5* region with systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009;60:1845-1850. (査読あり)
- ⑥ Kawaguchi Y, Ota Y, Kawamoto M, Ito I, Tsuchiya N, Sugiura T, Katsumata Y, Soejima M, Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Kuwana M, Yamanaka H, Hara M. Association study of a polymorphism of the CTGF gene and susceptibility to systemic sclerosis in the Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2009;68:1921-1924. (査読あり)
- ⑦ Ichikawa N, Kotake S, Hakoda M, Higami K, Kawasaki A, Furuya T, Nanke Y, Tsuchiya N, Tokunaga K, Kamatani N. Combining effects of polymorphism of tumor necrosis factor α 5'-flanking region and HLA-DRB1 on radiological progression in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* 2009;19:134-139. (査読あり)
- ⑧ Ito I, Kawasaki A, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Hom G, Graham RR, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J, Behrens TW, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of the association between *C8orf13-BLK* region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2009;60:553-558. (査読あり)
- ⑨ Tsuchiya N, Kawasaki A, Ito I. Role of *IRF5*, *STAT4* and *BLK* polymorphisms for the genetic predisposition to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Inflammation Regenerat* 2009;29:190-197. (査読なし)
- ⑩ Furuya T, Matsumoto I, Tsuchiya N, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Sumida T, Kamatani N, Kotake S. Anti-glucose-6-phosphate isomerase, anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and HLA-DRB1 genotypes in Japanese patients with early rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2008;26:918-921. (査読あり)
- ⑪ Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Ohashi J, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Koga M, Arinami T, Graham RR, Hom G, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Sumida T, Tsuchiya N. Role of *STAT4* polymorphisms in systemic lupus erythematosus in a Japanese population: a case-control association study of the *STAT1-STAT4* region. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R113. (査読あり)
- ⑫ Hikami K, Ehara Y, Hasegawa M, Fujimoto M, Matsushita M, Oka T, Takehara K, Sato S, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of IL-10 receptor 2 (*IL10RB*) SNP with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;373: 403-407. (査読あり)
- ⑬ Mamegano K, Kuroki K, Miyashita R, Kusaoi M, Kobayashi S, Matsuta K, Maenaka K, Colonna M, Ozaki S, Hashimoto H, Takasaki Y, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of *LILRA2* (*ILTI, LIR7*) splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. *Genes Immun* 2008;9: 214-223. (査読あり)
- ⑭ Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Miyashita R, Hikami K, Kusaoi M, Tokunaga K, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Tsuchiya N. Association of *IRF5* polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. Support for a crucial role of intron 1 polymorphisms *Arthritis Rheum* 2008;58: 826-834. (査読あり)
- ⑮ Furuya T, Hakoda M, Ichikawa N, Higami K, Nanke Y, Yago T, Kobashigawa T, Tokunaga K, Tsuchiya N, Kamatani N, Kotake S. Differential association of HLA-DRB1 alleles in Japanese patients with early rheumatoid arthritis in relationship to autoantibodies to cyclic citrullinated peptide. *Clin Exp Rheumatol* 2007;25:219-224. (査読あり)
- ⑯ Hitomi Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, Sato S. Association of human *CD22* gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens* 2007;69:242-249. (査読あり)
- ⑰ Kawasaki A, Tsuchiya N, Ohashi J, Murakami Y, Fukazawa T, Kusaoi M, Matsuta K, Hashimoto H, Tokunaga K. Role of *APRIL* (*TNFSF13*) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology* 2007;46: 776-782. (査読あり)
- ⑱ Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: Genetic studies on type I interferon pathway. *Genes Immun* 2007;8:445-455. (査読あり)

- ⑱ Tsuchiya N, Kyogoku C, Miyashita R, Kuroki K. Diversity of human immune system multigene families and its implication in the genetic background of rheumatic diseases. *Curr Med Chem* 2007;14:421-439. (査読あり)

[学会発表] (計 35 件)

- ① 土屋尚之: 日本人における全身性エリテマトーデス感受性遺伝子。第 37 回日本臨床免疫学会、平成 21 年 11 月 13 日～15 日、東京。
- ② Hikami K, Kawasaki A, Ito I, Koga M, Ito S, Hayashi T, Goto D, Matsumoto I, Tsutsumi A, Takasaki Y, Hashimoto H, Arinami T, Sumida T, Tsuchiya N. Association of *SPI1* 3-untranslated region polymorphism with systemic lupus erythematosus. The American Society of Human Genetics 59th Annual Meeting, Oct 20-24, 2009 Honolulu(USA).
- ③ Ito I, Kawaguchi Y, Kawasaki A, Hasegawa M, Ohashi J, Kawamoto M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Hara M, Tsuchiya N. Association of *FAM167A* (*C8orf13*)-*BLK* region with systemic sclerosis. 2009 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 17-22, 2009, Philadelphia(USA).
- ④ 土屋尚之: リウマチ性疾患の遺伝的背景-共通性と異質性。第 53 回日本リウマチ学会総会シンポジウム、2009 年 4 月 24 日、東京。
- ⑤ Ito I, Kawasaki A, Hikami K, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Sato S, Tsuchiya N. A single nucleotide polymorphism associated with expression of interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) is a genetic risk factor for systemic sclerosis. 2008 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 27, 2008, San Francisco(USA).
- ⑥ Ito I, Kawasaki A, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Ohashi J, Hom G, Graham RR, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Sumida T, Tsuchiya N. Replication of the association between *C8orf13-BLK* region and systemic lupus erythematosus in a Japanese population. 2008 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 26, 2008, San

Francisco(USA).

- ⑦ Kawasaki A, Ito I, Hikami K, Hayashi T, Matsumoto I, Ito S, Tsutsumi A, Koga M, Arinami T, Graham RR, Hom G, Ohashi J, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Sumida T, Tsuchiya N. Association of *STAT4* polymorphisms with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. 2008 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, October 26, 2008, San Francisco(USA).
- ⑧ 土屋尚之: 全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子解析。第 29 回日本炎症・再生医学会、東京、2008 年 7 月 10 日。
- ⑨ 土屋尚之、川崎綾: 全身性エリテマトーデスの遺伝素因における I 型インターフェロン関連遺伝子の役割。第 52 回日本リウマチ学会総会・学術集会、札幌、2008 年 4 月 20 日-23 日。
- ⑩ Kawasaki A, Kyogoku C, Miyashita R, Ohashi J, Tokunaga K, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Tsuchiya N. A SNP in *IRF5* intron 1 defines a protective haplotype against SLE in Japanese. 2007 American College of Rheumatology Annual scientific Meeting, Boston, November 6-11, 2007 Boston(USA).
- ⑪ Tsuchiya N, Kawasaki A, Takasaki Y, Hashimoto H, Ohashi J. Total number of risk alleles in four susceptibility genes as a marker for genetic risk to SLE. 2007 American College of Rheumatology Annual scientific Meeting, Boston, November 6-11, 2007 Boston(USA).

[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

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

(2) 研究分担者

徳永 勝士 (TOKUNAGA KATSUSHI)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40163977

(H20→H21：連携研究者)

堤 明人(TSUTSUMI AKITO)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准
教授
研究者番号：60250453
(H19年9月まで)

(3)連携研究者
なし