

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08435

研究課題名(和文) ANCA関連血管炎発症・間質性肺炎合併関連遺伝子の包括的同定とポストGWAS研究

研究課題名(英文) GWAS and post-GWAS on genes associated with occurrence of ANCA-associated vasculitis and comorbidity of interstitial lung diseases.

研究代表者

土屋 尚之(Tsuchiya, Naoyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60231437

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)：日本人におけるANCA関連血管炎(AAV)発症と再燃、間質性肺疾患(ILD)合併に関連する遺伝子バリエーションを解析した。ゲノムワイド関連研究によりILD合併に $P < 1E-04$ の関連を示す22バリエーションを検出した。HLA-DRB1*09:01-DQA1*03:02-DQB1*03:03がMPO-ANCA陽性AAVの発症、再燃リスクに、HLA-DR鎖 position 13Serが再燃抵抗性に関連すること、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症にHLA-DRB1*07:01、*09:01が関連すること、PR3-ANCA陽性AAVにおいてヨーロッパ系集団と異なるSERPINA1アリルが関連することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東アジア集団におけるAAVの疫学はヨーロッパ系集団と大きく異なる。本研究から、日本人AAVの大部分を占めるMPO-ANCA陽性血管炎の再燃リスクに関連するHLAハプロタイプが明らかになったことは、寛解後の維持療法の個別化に応用しうる知見である。また、これまで日本人集団では疾患感受性に関連しないと考えられてきたSERPINA1に、ヨーロッパ系集団とは異なるリスクアリルが検出されたことは、学術的意義の高い新知見である。さらに、ILD合併関連遺伝子のゲノムワイド関連研究により候補領域が多数見出されたことは、難治性病態であるILDに対する分子標的の発見に結びつくこと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated genetic variants associated with susceptibility and risk of relapse of ANCA-associated vasculitis (AAV) in the Japanese population, as well as those associated with development of interstitial lung disease (AAV-ILD). Using a genomewide association study, 22 variants associated with AAV-ILD were detected. HLA-DRB1*09:01-DQA1*03:02-DQB1*03:03 haplotype was associated with both susceptibility and risk of relapse of MPO-ANCA positive AAV, and HLA-DRB1 position 13Ser was associated with lower risk of relapse. Eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (EGPA) was associated with HLA-DRB1*07:01 and *09:01. Finally, although SERPINA1 Z and S alleles, associated with granulomatosis with polyangiitis (GPA) and PR3-ANCA positive AAV in the populations of European ancestry, were not detected in the Japanese subjects, SERPINA1 alleles previously unreported to be associated with AAV were found to be associated with GPA/PR3-AAV in the Japanese population.

研究分野：膠原病学、ゲノム医科学

キーワード：ANCA関連血管炎 疾患感受性遺伝子 再燃 HLA 間質性肺疾患 ゲノムワイド関連研究 SERPINA1

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ANCA 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis, AAV) は、抗好中球細胞質抗体 (antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 産生を特徴とする病因不明の全身性小型血管炎である。近年増加傾向にあり、重要なアンメット・メディカル・ニーズとなっている。

AAV は臨床所見により顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis, MPA)、多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis, GPA)、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 (eosinophilic granulomatosis with polyangiitis, EGPA) に、また、ANCA の抗原特異性により myeloperoxidase (MPO)-ANCA 陽性群 (MPO-AAV)、proteinase 3 (PR3)-ANCA 陽性群 (PR3-AAV) に分類され、ヨーロッパ系集団では GPA、PR3-AAV が、東アジア集団では MPA、MPO-AAV が大部分を占める。また、MPA/MPO-AAV は高率に間質性肺疾患 (interstitial lung disease, ILD) を合併し、予後に大きく影響するが、ILD 合併率は、欧米と比較して日本において高い。集団による疫学的特徴の違いを説明しうる環境要因の違いは見出されておらず、遺伝学的背景の違いが原因である可能性が高いと考えられている。しかし、稀少疾患である AAV のゲノム解析は十分進展しておらず、ゲノムワイド関連研究 (genomewide association study, GWAS) についても、欧米から 4 報が報告されているのみで、アジアからは論文がなく、東アジア集団に多い MPA、MPO-AAV のゲノム解析は国内外を通じて遅れている。アジア系集団における解析は、アジア系集団に最適化した分子標的やバイオマーカーを確立する上で必須であるのみならず、両集団における比較により、AAV の病因・病態解明上、貴重な情報を与えると期待される。

応募者らは、先行研究において、日本人 AAV 374 例 (うち MPO-AAV が 300 例)、健常対照者 2994 例を対象にアジア集団初の GWAS を施行し、MPO-AAV において、HLA 領域にゲノムワイド有意水準 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) に到達する関連を確認するとともに、 $P < 1 \times 10^{-4}$ の関連傾向を示す多数の候補バリエーションを検出した (Harigai, Kawasaki, et al., 2019 ACR/ARP Annual Meeting)。しかし、稀少疾患のためサンプルサイズが小さく、今後、独立の患者対照群を対象に second GWAS を施行し、見いだされた関連傾向を確認するとともに、メタアナリシスにより、ゲノムワイド有意水準を満たす疾患感受性領域を特定することが必要と考えられた。

さらに、ヨーロッパ系集団において報告された GPA や EGPA 関連バリエーションに関して、日本人集団ではほとんど報告が見られない。このように、日本人 AAV における臨床病型や臨床経過との関連を検討することが課題として残されている。

2. 研究の目的

本研究では、日本人集団において、さらに AAV 患者の試料と臨床情報を収集して second GWAS を施行し、将来的にメタアナリシスにより高い検出力を確保し、AAV の発症や ILD 合併の有無に関連するバリエーションをゲノムワイドに検出しうる基礎データを得ることを一つの目的とした。あわせて、それらの試料と臨床情報を用いて、日本ではほとんど研究されていない、EGPA や GPA 関連候補遺伝子の検討や、MPO-AAV の再燃との関連について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 多数の研究協力施設との連携により日本人 AAV のゲノム DNA、血漿、臨床情報の収集を行った。健常対照群としては、本研究により収集された試料に合わせて、日本人多層オミックス参照パネル (jMorp) から公開されている、日本人約 54,000 人 (54KJPN) の公開データを利用した。

本研究計画は、筑波大学医学医療系医の倫理委員会をはじめ、すべての研究協力機関の倫理審査委員会における承認を受け、研究対象者のインフォームド・コンセントを得て実施した。

(2) 新たに収集された AAV 患者試料について、ジャポニカアレイ v2(株式会社 東芝)を用い、日本人集団に最適化した約 66 万個所の一塩基バリエーション(SNV)タイピングを、東芝ライフサイエンス解析センターへの委託解析により施行し、Axiom Analysis Suite (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) を用いて遺伝型を決定した。関連解析は、PLINK ソフトウェアを用い、ロジスティック関連解析により additive model で評価した。

(3) MP0-AAV において、中国人集団において発症との関連が報告された *HLA-DQA1*03:02* との関連を日本人集団において解析するとともに、すでに当研究室から報告した *DRB1*09:01-DQB1*03:03* ハプロタイプとの関係性について解析した。

(4) 日本人集団における MP0-AAV の寛解後の再燃リスクと *HLA-class II* との関連を、Kaplan-Meier 法を用いて検討した。

(5) ヨーロッパ系集団における好酸球性多発血管炎性肉芽腫症(EGPA)の GWAS によって報告された候補領域を、日本人 EGPA において検討した。

(6) ヨーロッパ系集団における確立した GPA/PR3-AAV 関連遺伝子であり、1-antitrypsin (A1AT)をコードする *SERPINA1* 遺伝子において、ヨーロッパ系集団における主要な感受性アリルである Z アリル、S アリルは、日本人集団にはほとんど存在しないとされている。そこで、日本人集団において、*SERPINA1* 翻訳領域のシーケンスを行い、他の関連アリルが存在する可能性を検討した。

4. 研究成果

(1) 日本人 AAV 患者試料と臨床情報の収集を継続し、解析可能な日本人 AAV 試料は、先行研究によるものも含め、合計で約 800 例に到達した。

(2) 先行研究とは独立の AAV 患者 229 例、健常対照群 158 例において、約 66 万個所の一塩基バリエーション(single nucleotide variant, SNV)の遺伝型情報を取得した。AAV 患者のうち ILD の臨床情報が得られている 214 例を対象に、ILD-GWAS (ILD 合併 AAV91 例と ILD 非合併 AAV123 例の比較)を行った。サンプルサイズが小さく、ゲノムワイド有意水準(5×10^{-8})を満たす関連は検出されなかったが、関連傾向($P < 1 \times 10^{-4}$)を示す SNV22 個所が検出された。表 1 に上位 5 領域を示す。今後、AAV の疾患感受性についての遺伝統計学的解析も進める予定である。

表 1 AAV における ILD 合併の有無に関連する候補領域 (上位 5 領域)

染色体	P値	オッズ比(95%信頼区間)
13	1.9×10^{-5}	2.66 (1.70-4.16)
14	2.1×10^{-5}	2.54 (1.65-3.89)
8	2.6×10^{-5}	2.69 (1.70-4.26)
22	3.5×10^{-5}	0.37 (0.23-0.59)
4	4.0×10^{-5}	0.41 (0.26-0.62)

(3) 中国人集団において MP0-AAV 発症との関連が報告された *HLA-DQA1*03:02* が日本人集団においても有意に関連することが検出されたが、すでに報告した *DRB1*09:01-DQB1*03:03* ハプロタイプと強い連鎖不平衡にあり、いずれが一義的な発症関連アリルであるかの決定は困難であった。現時点では、*DRB1*09:01-DQA1*03:02-DQB1*03:03* を発症リスクハプロタイプと考えるのが妥当で

あると結論した。

(4) MPO-AAV 寛解後の再燃リスクの解析では、発症リスク同様、*DRB1*09:01-DQA1*03:02-DQB1*03:03* が関連する傾向が見出された。一方、HLA-DR 分子の鎖 position 13 に Ser を有するアリル(*DR 1_13S*)を保有すると再燃に抵抗性であることが見出された。そこで、再燃リスクに関連する *DQA1*03:02* と再燃抵抗性に関連する *DR 1_13S* の有無によって患者群を 4 群に分けて生存曲線解析を行ったところ、*DQA1*03:02* 陽性かつ *DR 1_13S* 陰性群では、*DQA1*03:02* 陰性かつ *DR 1_13S* 陽性群と比較して、ハザード比 4.02 (95% 信頼区間 1.39-11.6) で有意に再燃リスクが高いことが明らかになった (図 1)。

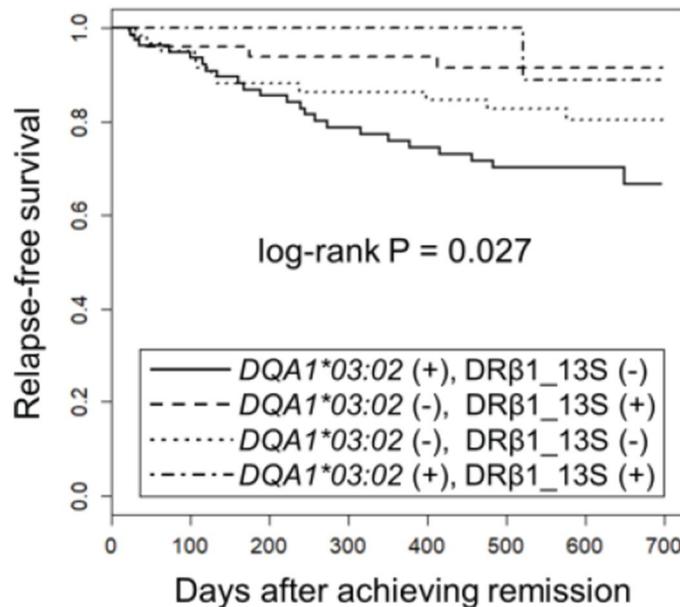


図1 MPO-AAVのrelapse-free survivalとHLA-class IIとの関連(Kawasaki A., et al. Front. Immunol. 14:1119064. doi: 10.3389/fimmu.2023.1119064)

(5)日本人 EGPA において、HLA 領域 では、ヨーロッパ系集団同様、*HLA-DRB1*07:01* の関連が検出されたのに加え、東アジア系集団においてアリル頻度が高い *HLA-DRB1*09:01* の関連が検出された。また、*TSLP* 遺伝子の関連が、日本人集団 EGPA においても確認された。*HLA* の関連は主として MPO-ANCA 陽性 EGPA 群において検出されたのに対し、*TSLP* の関連は EGPA 全体で観察された。

(6) 日本人 GPA/PR3-AAV 患者 203 例を対象に、*SERPINA1* 翻訳領域のリシークエンシングを施行した。ヨーロッパ系集団において多発血管炎性肉芽腫症(GPA)および PR3-ANCA 陽性血管炎(PR3-AAV)に強く関連する *SERPINA1* 遺伝子の機能減弱型 Z アリルや S アリル、さらに、日本人集団における機能減弱型アリルとして報告されていた Siiyama アリルは今回の対象者には検出されなかった。一方、同義置換をコードする rs1049800 において、GPA ($P=9.0 \times 10^{-6}$) および PR3-AAV ($P=8.8 \times 10^{-4}$)との有意な関連が検出された。以上により、リスクアリルは異なるものの、日本人においても、過去に AAV との関連の報告のない *SERPINA1* バリエントが GPA、PR3-AAV の疾患感受性に関連し、*SERPINA1* は集団を超えて共通の GPA/PR3-AAV 感受性遺伝子である可能性が示唆された。今後、機能的意義の解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kawasaki A, Sada K-e, Kusumawati PA, Hirano F, Kobayashi S, Nagasaka K, Sugihara T, Ono N, Fujimoto T, Kusaoi M, Tamura N, Kusanagi Y, Itoh K, Sumida T, Yamagata K, Hashimoto H, Makino H, Arimura Y, Harigai M, Tsuchiya N	4. 巻 14
2. 論文標題 Association of HLA class II alleles with risk of relapse in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody positive vasculitis in the Japanese population.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1119064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1119064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kawasaki A, Sada K-e, Kusumawati PA, Hirano F, Kobayashi S, Nagasaka K, Sugihara T, Ono N, Fujimoto T, Kusaoi M, Tamura N, Kusanagi Y, Itoh K, Sumida T, Yamagata K, Hashimoto H, Makino H, Arimura Y, Harigai M, Tsuchiya N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Association of HLA class II alleles with risk of relapse in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody positive vasculitis in the Japanese population. [PREPRINT]	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 medRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.12.28.22283983	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 土屋尚之、川崎 綾	4. 巻 80
2. 論文標題 ANCA関連血管炎の遺伝要因	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 1196-2002
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川崎綾, 佐田憲映, 草薙恭圭, 伊藤健司, 小野伸之, 平野史生, 樋口智昭, 小林茂人, 長坂憲治, 杉原毅彦, 藤本隆, 草生真規雄, 山下計太, 山縣邦弘, 住田孝之, 田村直人, 橋本博史, 榎野博史, 有村義宏, 針谷正祥, 土屋尚之.
2. 発表標題 日本人集団におけるSERPINA1 遺伝子と多発血管炎性肉芽腫症およびPR3-ANCA陽性血管炎の関連
3. 学会等名 第68回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 川崎綾, 佐田憲映, 草薙恭圭, 伊藤健司, 小野伸之, 平野史生, 小林茂人, 長坂憲治, 杉原毅彦, 藤本隆, 草生真規雄, 田村直人, 山縣邦弘, 住田孝之, 尾崎承一, 橋本博史, 槇野博史, 有村義宏, 針谷正祥, 土屋尚之.
2. 発表標題 好酸球性多発血管炎性肉芽腫症とHLA-DRB1およびTSLPパリアントの関連.
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋尚之
2. 発表標題 HLA多様性とリウマチ性疾患の関連
3. 学会等名 第29回日本組織適合性学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎綾, 土屋尚之
2. 発表標題 ANCA関連血管炎の遺伝的背景
3. 学会等名 第51回日本腎臓学会東部学術大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 土屋尚之	4. 発行年 2023年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 6
3. 書名 病因 1. 遺伝的素因. (厚生労働科学研究費補助金難治性疾患政策研究事業 針谷正祥, 成田一衛, 須田隆文編集『ANCA関連血管炎診療ガイドライン2023』)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>難治性血管炎の再燃リスクに関するバイオマーカーを特定 https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20230310141500.html 筑波大学医学医療系分子遺伝疫学研究室 https://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/publicmd/GE/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	針谷 正祥 (Harigai Masayoshi) (20238207)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	川崎 綾 (Kawasaki Aya) (30532816)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------