

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390199

研究課題名(和文)日本人集団における膠原病関連遺伝子の包括的同定とゲノム医療への展開

研究課題名(英文)Detection of susceptibility genes associated with autoimmune rheumatic diseases in the Japanese population and its translation into genome medicine.

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) 14,200,000円、(間接経費) 4,260,000円

研究成果の概要(和文)：日本人集団における全身性エリテマトーデスとTLR7, PHRF1-IRF7, IRF2多型との関連、HLA-DRB1*13:02, 14:03と疾患抵抗性との関連を見いだした。関節リウマチにおいては、疾患感受性とSPP1、薬剤性肺障害とHLA-A*31:01との関連を見いだした。全身性強皮症においてはUBE2L3の関連を、さらに、myeloperoxidase-ANCA陽性血管炎においては、IRF5低発現に関連するアリルが疾患感受性に関連することを見いだした。これらの結果は、日本におけるリウマチ性疾患のゲノム医療確立上、有用な情報を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at finding polymorphisms associated with susceptibility to autoimmune rheumatic diseases, as well as with clinical characteristics and adverse reaction to drugs, in the Japanese population. Association of TLR7 with systemic lupus erythematosus (SLE) and SPP1 with rheumatoid arthritis (RA) was identified through international multicenter collaboration. Association of IRF2, PHRF1-IRF7 with SLE, UBE2L3 with systemic sclerosis, and IRF5 with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis was detected through collaboration with national rheumatology centers. In addition, HLA-DRB1*13:02 and DRB1*14:03 were found to be protective against SLE. With respect to adverse reactions to drugs, HLA-A*31:01 was found to be associated with methotrexate associated interstitial lung disease in RA. These results will provide valuable information for the establishment of genome medicine for autoimmune rheumatic diseases in Japan.

研究分野：膠原病のゲノム解析

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：膠原病学 疾患感受性遺伝子 遺伝子多型 免疫遺伝 ゲノム薬理学 HLA

1. 研究開始当初の背景

(1) 過去の研究により、*PTPN22-R620W* など、ヨーロッパ系集団における確立した自己免疫疾患感受性アリルが日本人集団には存在しない、あるいは極めて稀少である一方、アジア系集団において頻度が高いものの、他集団には極めて稀である *HLA-DRB1*09:01* は、各種自己免疫疾患に関連することが明らかになっている。このように、アジア系集団において寄与度の高い疾患感受性遺伝子の存在が示唆されたものの、本研究の計画時点(2009年10月)において、アジア系集団におけるゲノムワイド関連研究(GWAS)が報告されている膠原病は関節リウマチ(RA)のみであり、全身性エリテマトーデス(SLE)、全身性強皮症(SSc)を始めとする RA 以外の膠原病において、日本人における疾患関連遺伝子を同定することが必要と考えられた。

(2) 疾患感受性に関連する遺伝子多型は、RA を筆頭に、研究が進んでいるものの、臨床経過や薬剤応答性に関連するバイオマーカーについては、RA も含め、ほとんど見出されていない。ゲノム解析研究を臨床現場に橋渡しするために、有用なバイオマーカーの検出が強く求められる状況であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、日本人集団における膠原病を対象に、以下の検討を行うことを目的とした。

(1) Type I インターフェロン(IFN)抑制系を対象とした候補遺伝子解析、ならびに、2009年11月以降に相次いで報告された東アジア集団 SLE を対象とした GWAS により見いだされた候補領域の解析により、日本人集団における膠原病感受性遺伝子を見出すとともに、高密度単一塩基多型(SNP)タイピング、リシーケンシングにより、原因的多型部位を特定し、分子機構を解明する。

(2) 日本人集団において膠原病の臨床経過や薬剤有害事象に関連するバイオマーカーを見出す。

3. 研究の方法

(1) 日本人集団における膠原病感受性遺伝子の探索

TLR7 を候補遺伝子とする東アジア集団多施設共同研究に参加し、2 箇所の候補 SNP を対象として、SLE の関連研究を施行した。これと平行して、日本人試料のみを対象に、独自に *TLR7* の 8 箇所の tag SNP を用いた関連研究を施行した。*PHRF1-IRF7* 領域については、国外に

おける GWAS により SLE との関連が報告されていたものの、結果はさまざまであり、国内における研究も見られなかった。本研究では、機能的重要性が想定される *IRF7* 遺伝子のリシーケンシング解析により、日本人集団における多型部位を網羅的に検出し、SLE との関連を検討した。また、ヨーロッパ系集団における GWAS によって関連が検出されている、隣接する *PHRF1* の SNP の関連を検討した。

Type I IFN 抑制系を候補パスウェイとしたカスタム SNP アレイを用い、DigiTag2 法により、日本人 SLE と対照群との関連研究を施行した、有意な関連が検出された *IRF2* 遺伝子を対象に、次世代シーケンサーを用いたリシーケンシングにより一義的多型を探索し、バイオインフォマティクス解析およびリポーター・アッセイにより、疾患関連ハプロタイプの機能解析を施行した。

国立病院機構相模原病院等との共同研究により、SLE における *HLA-DRB1* の関連を詳細に検討した。

フランス、スペインのグループを中心とする国際共同研究により、RA と *SPP1* (osteopontin)多型との関連を検討した。ヨーロッパ系集団において SLE との関連が報告されている *UBE2L3* を候補遺伝子として、日本人集団における全身性 SSc との関連を検討した。

京都大学を中心とする多施設共同研究により、RA 感受性遺伝子である *PLD4* と SSc との関連を検討した。

日本人集団における myeloperoxidase (MPO)-ANCA 陽性血管炎と *IRF5* 多型との関連を検討した。

(2) 日本人集団における膠原病の臨床経過、薬剤応答性関連遺伝子の探索

国立病院機構相模原病院等との多施設共同研究により、RA における薬剤有害事象と *HLA* との関連を検討した。

国立病院機構相模原病院等との共同研究により、RA、SLE における抗 Ro 抗体、抗 La 抗体と関連する *HLA* の関連を検討した。

[倫理的配慮]

上記研究は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)に則り、筑波大学および共同研究施設、試料収集施設における倫理委員会の承認を受けた研究計画に基づいて施

行された。

4. 研究成果

(1) 日本人集団における膠原病感受性遺伝子の探索

東アジアにおける多施設共同研究により、*TLR7* の 3'非翻訳領域(UTR) に位置する SNP rs3853839G アリルが SLE に関連すること、このアリルは *TLR7* 発現増加に関連するものであることを報告した。また、申請者ら独自に、日本人 case-control 群を対象に、*TLR7* の 8 個所の tag SNP の関連を検討した。前述の rs3853839 に加え、互いに連鎖不平衡にある intron 2 の SNP rs179019 と rs179010 にも独立な関連が検出された。*IRF7* のリシークエンスにより、多数の多型部位を検出したものの、SLE との有意な関連は認められなかった。一方、隣接する *PHRF1* 遺伝子の SNP rs4963128 が、抗 Sm 抗体陽性 SLE、腎症合併 SLE において有意に関連することが検出された。

候補パスイ解析により、*IRF2* 遺伝子の tag SNP に SLE との有意な関連が検出された。この周辺のリシークエンス解析により見出された複数の SNP についても関連が検出された。レポーター解析により、これらの SNP が形成するリスクハプロタイプは、*IRF2* 転写亢進に関連することが示唆された。

日本人 SLE における *HLA-DRB1* の検討により、*DRB1*13:02*、*DRB1*14:03* が疾患抵抗性に関連することを見いだした。

国際共同研究により、*SPP1* 多型が RA に関連し、特に抗 CCP 抗体陰性群において関連が顕著であることを見出した。*UBE2L3* 多型が SSc に有意に関連すること、関連はびまん皮膚硬化型 SSc、抗 topoisomerase I 抗体陽性群において顕著であることを見いだした。

京都大を中心とする共同研究に参加し、*PLD4* と SSc との関連を報告した。

日本人における MPO-ANCA 陽性血管炎において、*IRF5* 低発現に関連する rs10954213G が有意に増加していることを見いだした。

(2) 日本人集団における膠原病の臨床経過、薬剤応答性関連遺伝子の探索

国立病院機構相模原病院との共同研究により、RA におけるメソトレキサート

関連間質性肺障害と *HLA* との関連を検討し、*HLA-A*31:01* がオッズ比 3.18(優性モデル)で関連することを見いだした。また、ブシラミン関連蛋白尿と *HLA-DRB1*08:02* との関連を見いだした。

日本人における RA、SLE において、抗 Ro 抗体、抗 La 抗体産生と *HLA-DPB1*05:01* との関連を見出した。

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 49 件)

Furukawa H, Oka S, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Miyashita T, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. *HLA-DRB1*08:02* is associated with bucillamine-induced proteinuria in Japanese rheumatoid arthritis patients. *Biomarker Insights* in press. 査読有

Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Ito I, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Amano H, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Katayama M, Migita K, Suda A, Ohno S, Hashimoto H, Takasaki Y, Sumida T, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. (equal senior authors) Human leukocyte antigens and systemic lupus erythematosus: A protective role for the *HLA-DR6* alleles *DRB1*13:02* and **14:03*. *PLoS One* 2014; 9: e87792. doi:10.1371/journal.pone.0087792 査読有

Gazal S, Sacre K, Allanore Y, Teruel M, Goodall AH (The CARDIOGENICS consortium), Tohma S, Alfredsson L, Okada Y, Xie G, Constantin A, Balsa A, Kawasaki A, Nlicaise P, Amos C, Rodriguez-Rodriguez L, Chiocchia G, Boileau C, Zhang J, Vittecoq O, Barnetche T, Gonzalez-Gay MA, Furukawa H, Cantagrel A, Le Loet X, Sumida T, Hurtado-Nedelec M, Richez C, Chollet-Martin S, Schaefferbeke T, Combe B, Khoriaty L, Coustet B, El-Benna J, Siminovitch K, Plenge R, Padyukov L, Martin J, Tsuchiya N, Dieude P. Identification of secreted phosphoprotein 1 gene as a new rheumatoid arthritis susceptibility gene. *Ann Rheum Dis*

Published Online First: 21st Jan 2014
doi:10.1136/annrheumdis-2013-204581 査読有

Kawasaki A, Inoue N, Ajimi C, Sada K, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Sumida T, Tohma S, Miyasaka N, Matsuo S, Ozaki S, Hashimoto H, Makino H, Harigai M, Tsuchiya N. Association of *IRF5* polymorphism with MPO-ANCA positive vasculitis in a Japanese population. *Genes Immun* 2013;14:527-529. doi: 10.1038/gene.2013.45. 査読有

Genin E, Coustet B, Allanore Y, Ito I, Teruel M, Constantin A, Schaeffer T, Ruysens-Witran A, Tohma S, Cantagrel A, Vittecoq O, Barnetche T, Le Loët X, Fardellone P, Furukawa H, Meyer O, Chiocchia G, Tsuchiya N, Martin J, Dieudé P. Epistatic interaction between *BANK1* and *BLK* in rheumatoid arthritis: results from a large trans-ethnic meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8: e61044. doi:10.1371/journal.pone.0061044. 査読有

Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Shimada K, Nakayama H, Matsui T, Ikenaka T, Hashimoto A, Okazaki Y, Takaoka H, Futami H, Komiya A, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Nagaoka S, Kono H, Okamoto A, Fukui N, Hashimoto H, Sumida T, Ono M*, Tsuchiya N*, Tohma S*. (*equal senior authors) Association of a single nucleotide polymorphism in the *SH2D1A* intronic region with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013; 22: 497-503. doi: 10.1177/0961203313479421 査読有

Terao C, Ohmura K, Kawaguchi Y, Nishimoto T, Kawasaki A, Takehara K, Furukawa H, Kochi Y, Ota Y, Ikari K, Sato S, Tohma S, Yamada R, Yamamoto K, Kubo M, Yamanaka H, Kuwana M, Tsuchiya N, Matsuda F, Mimori T. *PLD4* as a novel susceptibility gene for systemic sclerosis in a Japanese population. *Arthritis Rheum* 2013;65:472-480. doi: 10.1002/art.37777 査読有

Furukawa H, Oka S, Matsui T, Hashimoto A, Arinuma Y, Komiya A, Fukui N, Tsuchiya N, Tohma S. Genome, epigenome and transcriptome analyses of a pair of monozygotic twins discordant for systemic

lupus erythematosus. *Hum Immunol* 2013; 74:170-175. doi:

10.1016/j.humimm.2012.11.007 査読有
Furukawa H, Oka S, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Miyashita T, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Association of increased frequencies of *HLA-DPB1*05:01* with the presence of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies in Japanese rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *PLoS One* 2013; 8: e53910. doi:10.1371/journal.pone.0053910 査読有

Furukawa H, Oka S, Shimada K, Rheumatoid Arthritis associated Interstitial Lung Disease (RA-ILD) Study Consortium, Tsuchiya N, Tohma S. *HLA-A*31:01* and methotrexate-induced interstitial lung disease in Japanese rheumatoid arthritis patients: a multi-drug hypersensitivity marker? *Ann Rheum Dis* 2013;72:153-155. doi:

10.1136/annrheumdis-2012-201944 査読有
Tsuchiya N. Genetics of ANCA-associated vasculitis in Japan - a role for *HLA-DRB1*09:01* haplotype. *Clin Exp Nephrol* 2013; 17:628-630. doi: 10.1007/s10157-012-0691-6 査読有

Kawasaki A, Furukawa H, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Kusaoi M, Matsumoto I, Tohma S, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. Association of *PHRF1-IRF7* region polymorphism with clinical phenotypes of systemic lupus erythematosus: an association study in a Japanese population. *Lupus* 2012;21: 890-895. doi: 10.1177/0961203312439333 査読有

Furukawa H, Oka S, Shimada K, Sugii S, Ohashi J, Matsui T, Ikenaka T, Nakayama H, Hashimoto A, Takaoka H, Arinuma Y, Okazaki Y, Futami H, Komiya A, Fukui N, Nakamura T, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N*, Tohma S* (*equal senior authors). Association of human leukocyte antigen with interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: A protective role for shared epitope. *PLoS One* 2012; 7: e33133. doi:10.1371/journal.pone.0033133 査読有

Hasebe N, Kawasaki A, Ito I, Kawamoto M, Hasegawa M, Fujimoto M, Furukawa H, Tohma S, Sumida T, Takehara K, Sato S,

Kawaguchi Y, Tsuchiya N. Association of *UBE2L3* polymorphisms with diffuse cutaneous systemic sclerosis in a Japanese population. *Ann Rheum Dis* 2012;71, 1259-1260. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-201091 査読有

Furuya T, Koga M, Hikami K, Kawasaki A, Tsuchiya N. Effects of *APRIL (TNFSF13)* polymorphisms and splicing isoforms on the secretion of soluble APRIL. *Mod Rheumatol* 2012; 22:541-549. doi: 10.1007/s10165-011-0539-z 査読有

Koga M, Kawasaki A, Ito I, Furuya T, Ohashi J, Kyogoku C, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Sumida T, Tsuchiya N. Cumulative association of eight susceptibility genes with systemic lupus erythematosus in a Japanese female population. *J Hum Genet* 2011;56:503-507. doi: 10.1038/jhg.2011.49 査読有

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* 2011;13:R41. doi: 10.1186/ar3277 査読有

Hikami K, Kawasaki A, Ito I, Koga M, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Tsutsumi A, Kusaoi M, Takasaki Y, Hashimoto H, Arinami T, Sumida T, Tsuchiya N. Association of a functional polymorphism in the 3' untranslated region of *SPI1* with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2011;63:755-763 doi: 10.1002/art.30188 査読有

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* 2010;12:R174 doi:10.1186/ar3134 査読有

Shen N, Fu Q, Deng Y, Qian X, Zhao J, Kaufman KM, Wu YL, Yu CY, Tang Y, Chen J-Y, Yang W, Wong M, Kawasaki A, Tsuchiya N, Sumida T, Kawaguchi Y, Howe HS, Mok MY, Bang S-Y, Liu F-L, Chang D-M, Takasaki Y, Hashimoto H, Harley JB, Guthridge JM, Grossman JM, Cantor RM, Song YW, Bae S-C, Chen S, Hahn BH, Lau YL, Tsao BP. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (*TLR7*) with male systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:15838-15843. doi: 10.1073/pnas.1001337107 査読有

21 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 査読有

22 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. doi: 10.1002/art.27303 査読有

他 27 件

[学会発表] (計 50 件)

Kawasaki A, et al. Association of functional polymorphisms in *IRF2* with systemic lupus erythematosus (SLE) in a Japanese Population. 2013 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Oct 26-30, 2013, San Diego, USA.

Furukawa H et al. HLA-DRB1*08:02 is associated with bucillamine-induced proteinuria in Japanese rheumatoid arthritis patients: A case-control study. 2013 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Oct 26-30, 2013, San Diego, USA.

Kawasaki A et al. Genetic background of antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis in a Japanese Population: association of STAT4 with myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-positive vasculitis. 2012 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Oct 10, 2012, Washington DC, USA.

Genin E, et al. Epistatic interaction

between BANK1 and BLK in rheumatoid arthritis: Results from a large trans-ethnic meta-analysis. 2012 American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, Oct 10, 2012, Washington DC, USA.

土屋尚之: リウマチ・膠原病のゲノム解析。都立駒込病院総合カンファランス(特別講演)、平成 24 年 8 月 29 日、東京。

土屋尚之: 膠原病のゲノム解析研究。第 53 回湘南免疫疾患カンファランス(特別講演)、平成 24 年 6 月 23 日、横浜。

土屋尚之: 膠原病のゲノム解析から明らかになったことと今後の課題。第 7 回長崎皮膚・膠原病フォーラム(特別講演)、平成 24 年 6 月 14 日、長崎

土屋尚之: 膠原病の候補遺伝子解析(シンポジウム指定演者)。第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会。平成 24 年 4 月 27 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京。

Tsuchiya N, et al. Genetic background of ANCA-associated vasculitis in a Japanese population: a candidate gene study. (シンポジウム指定演者) The Asia and Pacific Meeting of Vasculitis and ANCA Workshop. 平成 24 年 3 月 28 日～31 日、東京。

Kawasaki A et al. Association of TNFAIP3 and TNIP1 SNPs with systemic lupus erythematosus in a Japanese population. 9th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus, Vancouver, Canada June 24-27, 2010.

Ito I, et al. An association study of 8p23.1 region encoding BLK, FAM167A, C8orf12 and XKR6 with systemic lupus erythematosus in Japanese. 9th International Congress on Systemic Lupus Erythematosus, Vancouver, Canada June 24-27, 2010.

他 39 件

[図書](計 5 件)

土屋尚之: 環境因子と遺伝因子。ANCA 関連血管炎の診療ガイドライン(2014 年改訂版)(厚生労働省 難治性疾患克服研究事業 榎野博史、松尾清一編,2014, pp10-12

土屋尚之: 全身性強皮症の疾患感受性遺伝子にはどのようなものがあるか。皮膚科臨床アセット 7「皮膚科膠原病のすべて」(古江増隆、佐藤伸一編)中山書店、東京、2011, pp.161-165

土屋尚之: 全身性エリテマトーデスの疾患感受性遺伝子にはどのようなものがあるか。皮膚科臨床アセット 7「皮膚科膠原病のす

べて」(古江増隆、佐藤伸一編)中山書店、東京、2011, pp.63-67

土屋尚之: 病因。最新医学別冊「新しい診断と治療の ABC 67 全身性エリテマトーデス」(竹内勤編)最新医学社 2010, pp.58-71
他 1 件

[その他]

ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/publicmd/GE/>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

古川 宏(FURUKAWA, Hiroshi)

国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・室長

研究者番号:00372293