

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590304

研究課題名（和文） 尋常性乾癬感受性遺伝子および関連分子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis for psoriasis susceptibility gene

研究代表者

岡 晃 (OKA AKIRA)

東海大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：80384866

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、我々がこれまでに遺伝学的に見出した乾癬の感受性遺伝子の機能を解析することである。本研究により、日本人におけるその遺伝子のリスク要因が韓国人においても共有していることを明らかにした。さらにその遺伝子が産生するタンパクが、乾癬を特徴づける創傷治癒や皮膚炎症と関与する別のタンパクと相互作用することを突き止めることに成功した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to unravel the function of psoriasis-susceptibility gene we found in the previous our study. In this study, we could discover that the genetic risk factor of the gene in Japanese psoriasis was shared with Korean psoriasis. Moreover, the protein produced by the gene could interacted with another protein which was involved in wound healing and skin inflammation characterized as psoriasis-pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：尋常性乾癬、感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 乾癬とは：乾癬は炎症と表皮細胞増殖により特徴づけられ、炎症性角化症に分類される皮膚疾患である。また乾癬は慢性疾患であり完治することは極めて稀であることから、患者の QOL を著しく損なう結果となっている。乾癬は T 細胞を中心とした自己免疫疾患であり、近年、病態を免疫学的に説明し

うる総合的な理論が構築されつつあるが、発症に関与するトリガーを見出していないことが最大の課題となっている。疫学データなどにより乾癬の遺伝性は間違いなく存在するが、多因子疾患である。近年、乾癬においても複数の感受性遺伝子を捉えるべく、ゲノムワイド関連解析が実施され成果が上がりつつある。しかし、感受性アリルと遺伝子発

現、さらにそのタンパク質と乾癬病態まで、総合的に明らかにされた成果は未だに存在しない。

(2) これまでの研究成果：乾癬の感受性遺伝子を同定する目的で、当研究室において開発したゲノムワイドなマイクロサテライト (Hum. Mol. Genet. 14:2305-21, 2005) ならびに SNP 用い、日本人を対象とした関連解析を実施した。その結果、極めて有意な関連を示す感受性マイクロサテライトを見出すことに成功し (国際特許出願済)、さらにモンゴル人集団においてもその関連が支持された。

さて一般的に、多因子疾患のような形質は、各遺伝子座の有害変異の影響は少ないが、それらが複数重なることにより遺伝子間相互作用が現れやすいと考えられている (PNAS. 26:14402-5, 2006)。つまり、ゲノムワイド関連解析により見出された候補遺伝子座間において、この遺伝子間相互作用を見出すことは極めて重要であると同時に、常に問題となる偽陽性を排除できる可能性を秘めている。そこで、既知の感受性遺伝子 *HLA-C* 遺伝子およびこのマイクロサテライトの間に相互作用があるか否か調査した。その結果、*HLA-C* 遺伝子のリスクを持たない個体群での感受性マイクロサテライトのオッズ比が 1.19 であるのに対し、リスクアリルを有する個体群でのオッズ比は 5.75 と極めて高い値を示しており、遺伝子間相互作用が存在することが明らかとなった。さらにマイクロサテライトはある GPCR (G-Protein Coupled Receptor) 遺伝子の 663bp 上流に位置していることから、この遺伝子が乾癬感受性遺伝子として強く疑われた。

そしてこのマイクロサテライトがこの遺伝子の転写調節領域に含まれると予測されたため、レポーターアッセイにより調査した結果、転写活性が認められ、またマイクロサテライトのアリルの長さに依存して転写活性が異なることが明らかとなった。さらに末梢血リンパ球の RNA を用いて感受性 GPCR の遺伝子産物量を定量したところ、感受性アリル有する個体群 (52 個体) では、それ以外のアリルを持つ個体群 (95 個体) と比較し、有意にその発現量が上昇していた。

したがって、我々は現在までに、新たな乾癬感受性遺伝子を見出し、さらに遺伝子間相互作用の存在をも明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この感受性遺伝子の分子機能を総合的に解析することにより、乾癬発症機序の解明を推し進めようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 韓国人集団における乾癬感受性アリルの追試

韓国人乾癬患者 138 個体、ならびに韓国人健康者コントロール 291 個体のゲノム DNA を用いて、HLA-A, B, C の 3 遺伝子座、ならびに乾癬感受性マイクロサテライトを含む 10 遺伝子座のマイクロサテライトの遺伝子型タイプピングを行い、関連解析、ハプロタイプ解析、ならびに Extended Haplotype Homozygosity (EHH) 解析を行った。

(2) Yeast Two-Hybrid 法による乾癬感受性 GPCR のリガンドの網羅的探索

標的蛋白として、複数組織由来の cDNA ライブラリーから合成したタンパク質を調整し、これと GPCR タンパクを混合し、相互作用をもつタンパク質を有した酵母だけを、転写促進をおこすことで選択的に増殖し、陽性コロニーとして検出し、シークエンシングを行った。

4. 研究成果

(1) 韓国人集団における乾癬感受性アリルの追試

乾癬感受性遺伝子領域において、我々の従来の研究をさらに進めた遺伝学的解析を実施した。これまでの解析に用いてきた試料は日本人検体であったが、より多角的に検討するために、他の人種における追試験を実施することとした。このために、解析対象として韓国人乾癬 (138 個体) ならびに健康者検体 (291 個体) を用いた。日本人集団において強い関連を認めたマイクロサテライトについて、この検体を用い解析したところ、日本人集団 (OR=2.3, P value: 3.2E-10) よりもはるかに強い関連を見出した (OR=19.9, P value: 3.5E-17)。これまでに報告されている GWAS のオッズ比の中央値が 1.33 であることを考慮すると、極めて強い関連である。すなわち、人種を超えて関連を示している事実は、日本人集団を用いたマイクロサテライトの GWAS の結果を強く支持する一方、遺伝学

的には日本人と韓国人は極めて近い人種と考えられているが、これほどまでに相違が存在することは進化的にも非常に興味深い。さて、有害なアリルは進化の過程でかならず排除されたため、疾患に寄与するアリルも同様のはずである。しかし、何かしらの選択圧により保存されることがあるならば、それらのアリルで構成されるハプロタイプは比較的近年発生し、集団中で保存されていると考えられることから、その領域には極めて長いハプロタイプ観察されるはずである。そこで、この領域の前後 5Mb について、マイクロサテライトにて、日本人ならびに韓国人集団を用いて解析を行った。そしてその長いハプロタイプが存在するか否か、EHH により評価した。この結果、乾癬と関連を示したハプロタイプにおいて、日本人集団で少なくとも 2.5Mb 以上、さらに韓国人集団では 4Mb 以上に渡って長いハプロタイプが存在することが明らかとなった。すなわち、今回見出した乾癬と強い関連を示すアリルは、まだ理由は明らかではないか、何か他の要因と協調して集団中で保存されていると考えられた。

(2) 乾癬感受性 GPCR のリガンドの網羅的探索

乾癬感受性 GPCR は内因性のリガンドならびにその生理的機能が不明のいわゆるオーファン受容体である。一方、特異性の高い良質な抗乾癬感受性 GPCR 抗体はまだ得られていない。そこで、直接タンパク質の精製などを必要とせず、網羅的にタンパク質間相互作用が検出できる Yeast Two-Hybrid 法を用いて GPCR 遺伝子がコードする蛋白と相互作用をする蛋白の網羅的な検出を試みた。

その結果、143 個の陽性クローンを獲得した。次に、これらをすべてシーケンシングし、57 個の遺伝子由来の蛋白を同定した。次に、これらの情報と公共データベース上にある蛋白間相互作用情報を用いてネットワーク解析を実施した。その結果、興味深い一つの相互作用群が見出され、これには CCL2 (chemokine ligand 2)、ARL6IP5 (ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 5)、CCR5 (chemokine receptor 5) の各タンパク質が含まれていた。CCL2 は、乾癬皮膚部に顕著にその発現が上昇していることが確認されているケモカインである。また、マクロファージに対して走化性を有し、創傷治癒や皮膚炎症の重要な因子

であると考えられ、乾癬との関連が疑われるケモカインである。ARL6IP5 は、細胞の分化に関与すると考えられているが、その機能の詳細は不明である。しかしこの蛋白は、グルタミン酸輸送体である EAAC1 と結合して、その機能を阻害することが分かっており、EAAC1 を介して創傷治癒に機能していると考えられる。乾癬との関わりに関しては現在のところ不明である。CCR5 は、主に T 細胞やマクロファージで発現しているケモカインレセプターであるが、皮膚の修復のピークにおいて発現の停止が見られるとの報告があり、創傷治癒に何かしら関連があると考えられる。以上のように、今回の実験結果において、皮膚での創傷治癒、炎症に関与する分子群と相互作用を示す可能性が示唆され、乾癬との関連が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Single nucleotide polymorphisms and outcome risk in unrelated mismatched hematopoietic stem cell transplantation: an exploration study. Harkensee C, Oka A (12 人 2 番目), Japan Marrow Donor Program. *Blood*. (査読有) 119, 6365-72, 2012. doi: 10.1182/blood-2012-01-406785.
- ② Common variants in the COL4A4 gene confer susceptibility to lattice degeneration of the retina. Meguro A, Oka A (17 人 15 番目), Inoko H. *PLoS One*. (査読有) 7, e39300, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0039300.
- ③ Super high resolution for single molecule-sequence-based typing of classical HLA loci at the 8-digit level using next generation sequencers. Shiina T, Oka A (17 人 7 番目), Inoko H. *Tissue Antigens*. (査読有) 80, 305-16, 2012. doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01941.x.
- ④ Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Inoko H. *J Dermatol*. (査読有) 39, 231-41, 2012. doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01504.x.
- ⑤ A novel splicing variant of CADM2 as

a protective transcript of psoriasis. Hiruma A, Ikeda S, Terui T, Mabuchi T, Ozawa A, Oka A(20 番目). *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 412, 626-32, 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.013.

- ⑥ Exact break point of a 50 kb deletion 8 kb centromeric of the HLA-A locus with HLA-A*24:02: the same deletion observed in other A*24 alleles and A*23:01 allele. Mitsunaga S, Oka A(11 人 6 番目), Inoko H. *Immunogenetics.* (査読有) 63, 2011. doi: 10.1007/s00251-011-0521-0.
- ⑦ Meta-analysis confirms the LCE3C_LCE3B deletion as a risk factor for psoriasis in several ethnic groups and finds interaction with HLA-Cw6. Riveira-Munoz E, Oka A, Mabuchi T, Ozawa A, Estivill X. *J Invest Dermatol.* (査読有) 131, 1105-9, 2011. doi: 10.1038/jid.2010.350.
- ⑧ A systems genetics approach provides a bridge from discovered genetic variants to biological pathways in rheumatoid arthritis. Nakaoka H, Oka A(11 人 4 番目). *PLoS One.* (査読有) 6, e25389, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0025389.
- ⑨ Genome wide screen identifies microsatellite markers associated with acute adverse effects following radiotherapy in cancer patients. Michikawa Y, Oka A(8 人 5 番目), Imai T. *BMC Med Genet.* (査読有) 11, 123, 2010.
- ⑩ Individuals susceptible to lung adenocarcinoma defined by combined HLA-DQA1 and TERT genotypes. Kohno T, Oka A(16 人 12 番目), Yokota J. *Carcinogenesis*(査読有). 31, 834-41, 2010. doi: 10.1186/1471-2350-11-123.
- ⑪ Genetics of Behcet's disease inside and outside the MHC. Meguro A, Oka A(12 人 5 番目), Mizuki N. *Ann Rheum Dis.* (査読有) 69, 747-54, 2010. doi: 10.1136/ard.2009.108571.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 岡晃、日本人および韓国人集団における尋常性乾癬の遺伝学的関連解析、第 27

回日本乾癬学会、2012 年 9 月 7-8 日、新潟

- ② Akira Oka, Genome-wide association study using microsatellites identifies a new psoriasis susceptibility locus on chromosome 6. 14th Human Genome Meeting 20102, 2010 年 5 月 18-21 日、モンペリエ・フランス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 晃 (OKA AKIRA)

東海大学・総合医学研究所・講師

研究者番号：80384866