

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791101

研究課題名（和文） 膠原病における toll-like receptor シグナル抑制分子群の寄与の解明

研究課題名（英文） An investigation of a contribution of toll-like receptor signaling inhibitory molecules to connective tissue diseases

研究代表者

川崎 綾 (KAWASAKI AYA)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：30532816

研究成果の概要（和文）：TLR7、TLR9 シグナル系において抑制的に働く *LILRA4*、*LAIR1*、*IRF4* および *IRF4* 関連遺伝子の *PRDM1* の全身性エリテマトーデス (SLE) への寄与を検討し、*LILRA4-LAIR1* 領域に位置する 4SNP と SLE の関連を検出した。一方 *IRF4* との有意な関連は検出されなかった。*PRDM1* は、SLE 全群との有意な関連は検出されなかったものの、腎症合併 SLE 群との関連が見出された。

研究成果の概要（英文）：We examined whether genes encoding TLR7 and TLR9 signaling inhibitory molecules and related molecule, *LILRA4*, *LAIR1* and *IRF4* and *PRDM1* are involved in the susceptibility to systemic lupus erythematosus (SLE). We detected the association of 4 SNPs in *LILRA4-LAIR1*. On the other hand, no evidence for association of *IRF4* was observed. We also detected an association of *PRDM1* with SLE with nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：膠原病学、遺伝医学

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：全身性エリテマトーデス、疾患感受性遺伝子、TLR、LILR、LAIR、PRDM1、多型

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチをはじめとするリウマチ膠原病の発症には複数の遺伝要因と環境要因が寄与している。現在までに、さまざまな集団により多数の疾患感受性遺伝子が報告されているが、これらの遺伝子では膠原病の遺伝要因の一部しか説明することができない。われわれは、日本人集団における膠原病の遺伝素因の解明を目的とした疾患関連研究により、*IRF5*、*TLR7*、*STAT4* など複数の遺伝子が SLE の発症や臨床症状と関連を示すことを報告してきた。

近年、自然免疫系が膠原病の発症や病態に深く関与することが明らかになってきた。なか

でも、膠原病の病態上重要な I 型インターフェロン (IFN) の強力な誘導因子である toll-like receptor (TLR) 7、TLR9 の関与が強く示唆されている。TLR7 や TLR9 は形質細胞様樹状細胞 (pDC) に発現し、細菌、ウイルス由来核酸のみならず、自己核酸をも認識し IFN や炎症性サイトカインの産生を誘導する。

TLR パスウェイ遺伝子の膠原病遺伝要因への関与も示されている。TLR シグナルからの I 型 IFN や炎症性サイトカインの産生にかかわる *Interferon regulatory factor (IRF) 5* は、膠原病共通の疾患感受性遺伝子として同定されている。さらに *TLR7* や *TLR7/9* 刺激による I 型 IFN 産生に必須な *IRF7* も SLE と

の関連が報告されている。われわれも日本人集団における検討により、*IRF5*が *SLE* および全身性強皮症と、*TLR7*が *SLE* と関連することを報告した。

TLR7 および *TLR9* シグナルに対して抑制的に働く遺伝子群の発現低下や機能不全が膠原病の発症や病態に関与する可能性が考えられることから、本研究では、日本人集団における *TLR* シグナル抑制遺伝子群の膠原病の疾患感受性への寄与を検討することとした。

2. 研究の目的

TLR シグナル抑制に関わる *LILRA4*, *LAIR1*, *IRF4* 遺伝子および、*IRF4* の機能に関わる *PRDM1* 遺伝子の日本人集団における膠原病の疾患感受性への関与を調べることを目的として、関連研究を施行する。

(1) *LILRA4*, *LAIR1*

ペア型受容体である *LILR*(leukocyte immunoglobulin-like receptor)ファミリーは、11種類からなり、活性化型、抑制型、分泌型が存在する。*LILR* ファミリー遺伝子はヒト染色体19q13.4上にクラスターを形成しており、ファミリー遺伝子間の相同性は非常に高い。所属研究室において、*LILRB1*、*LILRA2* 遺伝子多型が関節リウマチ、*SLE*、顕微鏡的多発血管炎と関連することを報告している。本研究で解析対象とした *LILRA4* は *pDC* に特異的に発現しており、*TLR7* および *TLR9* を介した I 型 IFN 産生を抑制する。*LILRA4* に隣接する *LAIR1* 遺伝子も *pDC* に発現しており、I 型 IFN 産生を抑制する。また、*SLE* 患者の *pDC* における *LAIR1* 発現の低下も報告されている。本研究では、*LILRA4*, *LAIR1* 多型が I 型 IFN 産生の異常をきたし、*SLE* をはじめとする膠原病の発症に至るとする仮説のもとに、*LILRA4*, *LAIR1* を対象とした疾患関連研究を施行する。

(2) *IRF4*

IRF4 は、*TLR* シグナルのアダプター分子である *MyD88* と *IRF5* の結合を阻害することで、*TLR* シグナルを抑制することが知られている。*IRF4* 遺伝子は、ヒト染色体6p25-p23に位置する。先行研究において、HapMap データベースに登録されている日本人集団における *IRF4* 遺伝子の一塩基多型(SNP)のアリル頻度、および各 SNP 間の連鎖不平衡をもとにタグ SNP を選択し、*SLE* 102 例、対照健常者 102 例を対象とした疾患関連研究を施行し、*IRF4* のイントロンに位置する 3SNP(rs9405643, rs1877179, rs2001508) と *SLE* の有意な関連を検出した。本研究では、先行研究で検出された関連を確認するために、多数検体を用いた関連解析を行う。

(3) *PRDM1*

PRDM1 は B 細胞の形質細胞分化に必須の分子である。*IRF4* が *PRDM1* による形質細胞分化誘導にも関わることが報告されている。近年、ゲノムワイド関連研究により、ヨーロッパ系集団や中国人集団において *PRDM1* および隣接する *ATG5* 遺伝子領域と *SLE* の関連が報告された。*PRDM1* 欠損マウスが *SLE* 様の症状を示すことから、*PRDM1* の *SLE* への寄与が強く示唆される。一方 *ATG5* は、オートファジーに必須な分子で、*SLE* における *ATG5* 発現の増加が報告されている。*PRDM1*, *ATG5* 遺伝子が *SLE* において重要な遺伝子であるにもかかわらず、日本人集団において *PRDM1*, *ATG5* 遺伝子領域を詳細に解析した報告はまだない。中国人集団において関連の報告された *PRDM1* 遺伝子近傍に位置する rs548234 とヨーロッパ系集団で報告された *ATG5* 遺伝子上の rs573775、rs2245214 と *SLE* の関連を日本人集団において検討するとともに、*PRDM1*, *ATG5* 遺伝子上のタグ SNP の関連解析を行い、*PRDM1* および *ATG5* 遺伝子と日本人 *SLE* の関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) *LILRA4-LAIR1*

HapMap データベースに登録されている日本人集団における *LILRA4-LAIR1* 領域 SNP のアリル頻度および連鎖不平衡を考慮して、*LILRA4-LAIR1* 遺伝子領域をカバーする 30 個のタグ SNP を選択した。DigiTag2 法を用いて、30 個のタグ SNP の遺伝子型を決定し、日本人 *SLE* 502 例、健常対照群 550 例を対象とした関連研究を施行した。

(2) *IRF4*

先行研究において関連の検出された *IRF4* SNP rs9405643, rs1877179, rs2001508 について、日本人 *SLE* 289 例、対照健常群 475 例について関連研究を行った。遺伝子型は TaqMan 法により決定した。

(3) *PRDM1*

HapMap データベースを利用して、*PRDM1* および隣接する *ATG5* 遺伝子領域をカバーする 15 個のタグ SNP を選択した。15 個のタグ SNP およびヨーロッパ系集団や中国人集団で *SLE* との関連が報告されている 3 SNP (rs548234, rs573775, rs2245214) について、日本人 *SLE* 502 例、対照健常群 451 例を対象とした関連研究を行った。タグ SNP は DigiTag2 法、そのほかの 3 SNP は TaqMan 法によりタイピングを行った。

4. 研究成果

(1) *LILRA4-LAIR1*

タグ SNP を対象とした関連解析により、*LILRA4-LAIR1* 領域の 4 つの SNP と SLE との有意な関連を検出した。4 つの SNP 間には、連鎖不平衡は見られず(ペアワイズ r^2 : 0.01-0.15)、ロジスティック回帰分析を用いて互いの関連を調整した後も有意な関連が残ることから、それぞれの SNP が独立に SLE に寄与することが示唆された。*LILRA4* および *LAIR1* は、いずれも SLE の発症において重要な役割を果たす I 型 IFN 産生を抑制する遺伝子であり、*LILRA4* および *LAIR1* の発現や機能低下による I 型 IFN 系の亢進が SLE 発症に関連する可能性が考えられる。今後、本研究により検出された関連を説明し得る機能的 SNP の同定と関連 SNP の機能的影響の検討が必須である。

(2) *IRF4*

SLE 102 例、対照健常群 102 例を対象とした先行研究により *IRF4* 遺伝子のイントロンに位置する 3 SNP と SLE の有意な関連を検出した(rs9405643: $P=0.027$, オッズ比 3.99, rs1877179: $P=0.048$, オッズ比 1.76, rs2001508, $P=0.028$, オッズ比 1.95)。本研究においてこれらの関連を確認したところ、いずれの SNP についても有意な関連は消失した(rs9405643: $P=0.20$, オッズ比 1.48, rs1877179: $P=0.29$, オッズ比 1.20, rs2001508, $P=0.16$, オッズ比 1.28)。本研究では有意な関連は検出されなかったものの、SLE をはじめとする自己免疫疾患に共通の疾患感受性遺伝子である *IRF5* に拮抗する遺伝子であり、SLE への機能的関与が予想されることから、今後、多数検体を用いた関連研究により疾患感受性への寄与を再検討する必要がある。

(3) *PRDM1*

過去に SLE との関連が報告されている *PRDM1*, *ATG5* 遺伝子領域に位置する 3 つの SNP(rs548234, rs573775, rs2245214) について、SLE 群と対照健常群を対象とした関連研究を行ったところ、有意な関連は認められなかった(rs548234: $P=0.094$, オッズ比 1.39, rs2245214: $P=0.18$, オッズ比 0.82, rs573775: $P=0.28$, オッズ比 0.87)。さらに *PRDM1*, *ATG5* 遺伝子の 15 個のタグ SNP について同様の関連解析を行ったが、有意な関連は検出されなかった。SLE 臨床症状との関連を検討するために、腎症合併 SLE 群と対照健常群の比較を行ったところ、図 1 に示すように、中国人集団を対象としたゲノムワイド関連研究で SLE との関連が報告された、*PRDM1* 近傍に位置する rs548234 と腎症合併 SLE の有意な関連が検出された(rs548234C/C 頻度: 腎症合併群 19.1%、健常者 11.1%、 $P=0.0028$, オッズ比 1.89)。さら

に、腎症合併群と腎症非合併群の比較を行った場合にも、有意な関連が認められた(rs548234C/C 頻度: 腎症合併群 19.1%、非合併群 9.4%、 $P=0.0024$, オッズ比 2.28)。これらの結果から、*PRDM1* 近傍の rs548234 が SLE における腎症発症に寄与する可能性が示唆された。*PRDM1* 欠損による自己抗体の出現が報告されており、SLE リスクアレルの rs548234C が *PRDM1* の機能を抑制することが予想される。今後、rs548234 の関連を説明しうる、機能的多型の同定、さらに関連多型の機能的影響の検討が必要である。本研究では、ヨーロッパ系集団において報告された *ATG5* 遺伝子上の 2SNP (rs2245214, rs573775) と SLE の関連は検出されなかった。*ATG5* の関連がヨーロッパ系集団特異的である可能性も考えられが、日本人集団における SLE への寄与をさらに検討する必要がある。

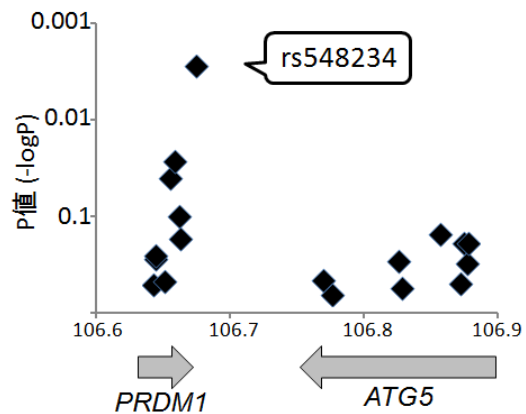


図 1 *PRDM1* SNP と腎症合併 SLE の関連

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) [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 manifestations of systemic lupus erythematosus in a Japanese population. *Lupus*, Vol. 21, 2012, 890-895, 査読有
DOI: 10.1177/0961203312439333

[学会発表] (計 3 件)

(1) [Kawasaki A](#), Genetic Background of Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis in a Japanese Population: Association of *STAT4* with Myeloperoxidase Antineutrophil Cytoplasmic Antibody-Positive Vasculitis. 2012 ACR/ARHP Annual Meeting, November 11, 2012, Walter E. Washington Convention Center, Washington (USA)

- (2)川崎 綾、*PRDM1-ATG5* 領域と全身性エリテマトーデス臨床症状との関連、第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2012 年 4 月 27 日、グランドプリンスホテル新高輪、東京都
- (3)Kawasaki A, An association study of *IRF7* polymorphisms with systemic lupus erythematosus. 第 55 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2011 年 7 月 18 日、神戸ポートピアホテル、兵庫県

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/publicmd/GE/CCP004.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 綾 (KAWASAKI AYA)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：30532816

(2) 研究協力者

土屋 尚之 (TSUCHIYA NAOYUKI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60231437