

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293225

研究課題名(和文) 関節リウマチ関連遺伝子におけるrare variantの包括的解析

研究課題名(英文) Rare variant analysis of rheumatoid arthritis associated genes.

研究代表者

高地 雄太 (Kochi, Yuta)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：60415156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、関節リウマチ発症におけるrare variantの役割を明らかにすること目的とした。ゲノムワイド関連解析で同定された遺伝子およびNF- $\kappa$ Bシグナルにおける主要16遺伝子についてrare variantの同定を行ったところ、NF- $\kappa$ B関連遺伝子にrare variantが集積していることが明らかになった。特にRELA遺伝子に注目して、同定されたvariantの機能を解析したところ、患者群で特異的に認められたものの多くはNF- $\kappa$ B活性を上昇させるものであった。したがって、関節リウマチの病態には、少なからずrare variantが寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the role of rare variants in the onset of rheumatoid arthritis. To identify rare variants associated with the disease, we sequenced 16 genes in the NF- $\kappa$ B signal pathway. As a result, rare variants were significantly enriched in the NF- $\kappa$ B pathway genes in patients. Through the functional analysis of rare variants in RELA gene by in vitro assays, we demonstrated that most of these variants increased the NF- $\kappa$ B activity in cells. These findings suggested rare variants substantially contributed to the pathogenesis of rheumatoid arthritis.

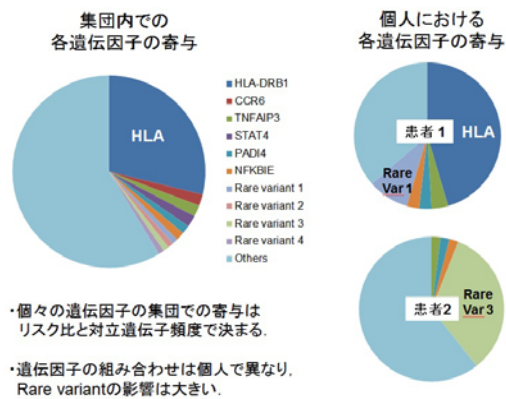
研究分野：遺伝学

キーワード：関節リウマチ rare variant ケースコントロール関連解析 次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (rheumatoid arthritis:RA)をはじめとする自己免疫疾患の多くは、複数の遺伝因子・環境因子が積み重なることによって発症する多因子疾患である。頻度の高い遺伝子多型が疾患発症に関わる、いわゆる common-disease common-variant モデルが考えられており、このモデルをもとにゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS)が行われ、100 以上の RA 感受性と関連する遺伝子領域が同定されてきた。しかし、GWAS で同定された common variant のみでは遺伝素因のすべてを説明できないことも明らかになりつつある。この“missing heritability”を説明する因子として、集団での頻度が低い(1%以下の)rare variant が少なからず関与していることが考えられている。rare variant は、common variant と比較して疾患へのリスク比も高いと考えられており、個人の病態に与える影響は大きいことが考えられる(図 1)。すなわち、遺伝因子から個人の病態を予測するためには、rare variant の同定も重要と考えられる。

図 1. rare variant の集団・個人における寄与



### 2. 研究の目的

本研究では、RA の GWAS で明らかにされた RTKN2 と、GWAS 遺伝子である NFKBIE を含む NF- $\kappa$ B パスウェイに関わる 16 遺伝子を候補遺伝子として、疾患に関わる rare variant の同定および機能解析を行い、疾患における rare variant の寄与の程度を明らかにすることを目的とした。これによって確立される遺伝統計学および分子生物学的アプローチは、今後の全ゲノムを対象とした網羅的な rare variant 解析に敷衍できるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

RA の GWAS 関連遺伝子である RTKN2 および NFKBIE, さらに NF- $\kappa$ B 関連遺伝子群を対象遺伝子として(表 1, 図 2), 次世代シーケンサー (Ion PGM)を用いて患者検体 1127 人およびコントロール検体 1128 人について

resequencing を行った。同定された rare variant の遺伝子機能に与える影響を in silico および in vitro のアッセイ系 (NF- $\kappa$ B リポーターアッセイ, 図 3)を用いて機能解析した。また、同定された rare variant が疾患発症に関与しているかについて、遺伝統計学的な評価(ケース・コントロール関連解析)を行った。関連解析は、これまで提案されているいくつかの手法の優劣を、実データを用いて、比較検討した。

表 1. NF- $\kappa$ B 関連遺伝子群

遺伝子	長さ (bp)	機能
<b>Ik-B kinase (IKK)</b>		
<i>IKBKA</i>	2238	Ik-Bのリン酸化
<i>IKBKB</i>	2271	
<i>IKBKE</i>	2151	
<i>IKBKG</i>	1464	
<i>IKBKAP</i>	3999	
<b>Ik-B</b>		
<i>NFKBIA</i>	954	NF-kBの抑制
<i>NFKBIB</i>	1071	
<i>NFKBID</i>	942	
<i>NFKBIE</i>	1503	
<i>NFKBIZ</i>	2157	
<i>BCL3</i>	1365	
<b>NF-kB</b>		
<i>REL</i>	1860	転写制御
<i>RELA</i>	1656	
<i>RELB</i>	1736	
<i>NFKB1</i>	2907	
<i>NFKB2</i>	2703	
合計	30977	

図 2. NF- $\kappa$ B シグナルパスウェイ

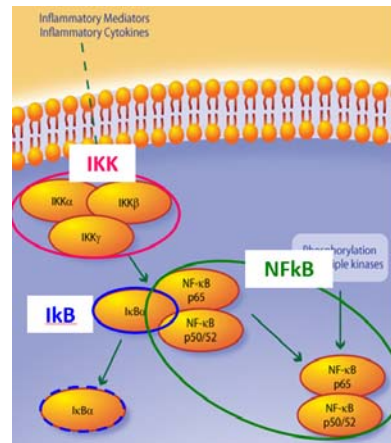
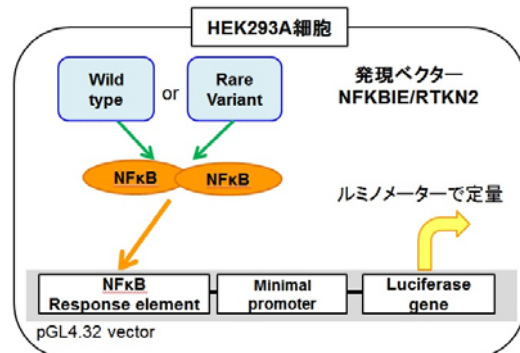


図 3 .NF- $\kappa$ B リポーターアッセイの原理

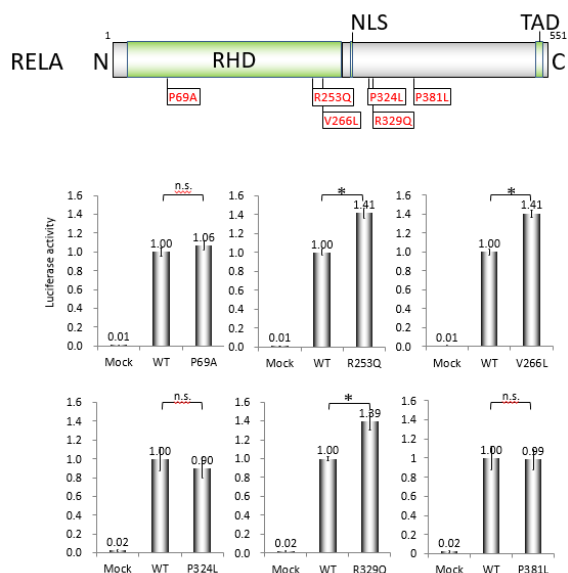


#### 4. 研究成果

患者およびコントロール検体を用いて行った Resequencing の結果、NF- $\kappa$ B 関連 16 遺伝子のうち、11 遺伝子において遺伝子機能に影響を与えると予測される rare variants が同定された。これらの rare variant の頻度を患者・コントロール間で比較検定(関連解析)を行ったが、関連解析の統計的手法の比較においては Optimal Sequence Kernel Association Tests (SKAT-O) が最も検出感度が高く、2 遺伝子 (RELA, RELB) において関連を認めた ( $P < 0.05$ )。

これらの rare variant が、遺伝子機能に与える機能を評価するため、特に NF- $\kappa$ B のヘテロダイマーを形成する p65 をコードする RELA 遺伝子に注目して、発現ベクターにクローニングを行った。ルシフェラーゼアッセイの系を応用した NF- $\kappa$ B リポーターアッセイによってこれらの rare variant を評価したところ、患者群で特異的に同定されたもの多くは NF- $\kappa$ B 活性を上昇させるものであった(図 4)。

図 4. RELA 遺伝子における rare variants



さらに、NFKBIE 遺伝子のプロモーター領域の rare variant 解析を行ったところ、関節リウマチにおいて rare variant の集積を認めた。これらの rare variant が転写活性に与える影響を luciferase assay で評価したところ、一部の rare variant は転写活性を低下させることが明らかになった。

これらの結果は、関節リウマチの病態に少なからず rare variant が寄与している可能性を示唆するものであった。多因子疾患における rare variant 解析のために、様々な疾患において全エクソンをターゲットとする Exome 解析が行われてきたが、一度に検定する遺伝子数が多いため (~20,000 遺伝子)、多重検定の補正が必要と

なり検出力の低下の問題が指摘されている。本研究のように、疾患において重要と考えられるパスウェイを標的として、そのパスウェイを構成する遺伝子に絞った解析を行うことによって、より効率的な rare variant 解析が可能になることが考えられた。

#### 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 4 件)

1. Ishigaki K, Kochi Y, Suzuki A, Tsuchida Y, Tsuchiya H, Sumitomo S, Yamaguchi K, Nagafuchi Y, Nakachi S, Kato R, Sakurai K, Shoda H, Ikari K, Taniguchi A, Yamanaka H, Miya F, Tsunoda T, Okada Y, Momozawa Y, Kamatani Y, Yamada R, Kubo M, Fujio K, Yamamoto K, Nat Genet, 査読あり, 2017 advanced online publication (doi: 10.1038/ng.3885).
2. 高地雄太. 関節リウマチ. Clinical Calcium, 査読無し 26:561-6, 2016
3. Yamamoto K, Okada Y, Suzuki A, Kochi Y. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia—present and future. Nat Rev Rheumatol, 査読あり, 11:375-379, 2015
4. Kochi Y, Suzuki A, Yamamoto K. Genetic basis of rheumatoid arthritis: A current review. Biochem Biophys Res Commun, 査読あり, 452:254-262, 2014

[学会発表] (計 2 件)

1. Yuta Kochi. GWAS and functional genomics of autoimmune diseases. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016  
京都国際会館(京都市左京区)
2. Yuta Kochi. Genetics of rheumatoid arthritis: insights from GWAS. 日本リウマチ学会学術集会, 国際シンポジウム, 2014  
グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都港区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.riken.jp/research/labs/ims/autoimmun\\_dis/](http://www.riken.jp/research/labs/ims/autoimmun_dis/)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高地 雄太(KOCHI, Yuta)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命  
医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号:60415156

### (2)連携研究者

明前 敬子(MYOUZEN, Keiko)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命  
医科学研究センター・リサーチアソシエイ

研究者番号: 80462737