

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26713036

研究課題名(和文) ベーチェット病新規感受性遺伝子ERAP1の機能解析を通じた脊椎関節炎治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of macrophages in Adult onset Still's disease

研究代表者

桐野 洋平 (KIRINO, Yohei)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：50468154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではベーチェット病のゲノムワイド関連解析(GWAS)で見いだされたERAP1、CCR1、IL10などの疾患感受性遺伝子の機能解析を行った。ERAP1のアロタイプ解析では、計10の独立したアロタイプを検出し、そのうちベーチェット病ではHap10がリスクであることが判明した。またERAP1 Hap10とHLA-B51間には有意な遺伝子相互作用を認めた。またベーチェット病マクロファージにおいてCCR1/IL10のeQTL効果を確認した。またベーチェット病患者皮膚組織ではM1マクロファージ優位な炎症を確認した。これらの結果から、GWASで見いだされた遺伝子は今後の治療標的となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we have evaluated the ERAP1 allotype in Turkish population. We identified 10 distinct ERAP1 allotypes. Among them, only hap10 conferred strong risk for BD. Hap 10 and HLA-B51 showed significant gene-gene interaction. Expression analysis of CCR1 and IL10 showed high expression of these molecules in M2 macrophages. Skin regions of BD patients showed M1-macrophage predominant inflammation. These results show promise for targeting GWAS-identified genes for treatment strategy for BD.

研究分野：リウマチ・膠原病

キーワード：ベーチェット病 マクロファージ ERAP1 CCR1 IL-10 ゲノムワイド関連解析

1. 研究開始当初の背景

ベーチェット病(BD)は再発性口腔内アフタ性潰瘍、ブドウ膜炎、結節性紅斑などの皮膚病変、外陰部潰瘍を主症状とする難治性疾患で、環境因子と遺伝素因の両方が発症に重要である。患者はアジアに多く、本邦では平成 23 年時点で 18,451 人が厚生労働省特定疾患の受給者である。環境因子としては、細菌やウイルスの関与が示唆されている。遺伝素因としては、HLA-B*51 が世界中で確認された最も強い BD の遺伝学的リスクで、特に本症の重症型のブドウ膜炎や神経病変のリスクでもある。現行治療のステロイド、シクロスポリン、抗 tumor necrosis factor (TNF)-α抗体は有効ではあるが、いずれも非特異的治療で、治療抵抗例、抗体製剤へのアレルギーや作用減弱、免疫抑制による感染などの副作用も少なくない。より有効かつ安全性の高い疾患特異的治療法を開発するには病因・病態の解明が必須である。

BD の新規遺伝素因を明らかにすべく、代表研究者は米国国立衛生研究所 NHGRI Dr. Daniel Kastner 研究室に所属し、日本人とトルコ人を中心としたゲノムワイド関連解析(GWAS)に携わってきた(Remmers, Kirino et al, Nat Genet, 2010, Kirino et al, Nat Genet, 2013)。既知の HLA-B*51 に加えて複数の新規感受性遺伝子が同定されたが、その中でも ERAP1 (Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1) は HLA-B*51 分子とともに直接、病因にかかわる可能性が高いと考えられる。

ERAP1 は小胞体に存在するアミノペプチダーゼで、HLA-Class I に提示されるペプチドを適切な長さにトリミングする機能を持つ。ERAP1 は HLA-C*06、B*27 がそれぞれ疾患マーカーとなる乾癬、AS でも GWAS により新規感受性遺伝子であることが報告され、HLA-Class I と独立した遺伝子座でありながら、両者の間に遺伝子相互作用を認める(Strange et al, Nat Genet, 2010, Evans et al, Nat Genet, 2011, Kirino et al, Nat Genet, 2013)。さらに、ERAP2 はクローン病、若年性関節リウマチ、AS の感受性遺伝子であることから、ERAP がいかに炎症性疾患に重要かがわかる。BD においては HLA-B*51 陽性で ERAP1 p.Arg725Gln/p.Asp575Asn (p.Arg725Gln と p.Asp575Asn は同じハプロタイプブロックに存在する)をホモで保有すると、BD になるオッズ比が 7 以上となる。研究代表者は、ERAP1 のリスクアレルの存在により、HLA-B51 に病原ペプチドの結合が促進され、免疫応答を惹起し、BD の病態が構築されることを想定していた。実際、ERAP1 欠損マウスでは MHC に提示されるペプチドレパトアが質的に変化することから(Hammer et al, Nat Immunol, 2006)、ERAP1 p.Arg725Gln を介して HLA-B*51 に提示されるペプチドレパトアが修飾され、病原ペプチドの提示に有利に働く可能性は高いと考えられる。この過程の特異的阻害は、有効かつ安全な治療法につながる可能性が高く、ERAP が病態に関わる他の炎症性疾患にも応用できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は BD における ERAP1 の機能を明らかにすることで、BD のみならず、強直性脊椎炎や乾癬にも応用可能な HLA-ERAP1 経路を標的とする治療を見出すことである。

3. 研究の方法

ベーチェット病のリスクとなる ERAP1 のアロタイプ解析。

ベーチェット病の GWAS のデータ(Kirino et al, Nat Genet, 2013) を 1000 genomes のヒト全ゲノムデータを用いた imputation によって高密度の SNP 情報に置換した。そしてベーチェット病患者で認められる ERAP1 型を調べた。

ERAP1 R725Q 多型を含むマウスモデルの作成。

CRISPR-Cas9 法を用いてマウスの ERAP1 に相当する ERAAP1 欠損マウスを作成した。このマウスにベーチェット病のリスクとなるヒト ERAP1 Hap10 を組み込んだプラスミドを用いて、トランスジェニックマウスを作成した。

ベーチェット病の GWAS で見いだされた疾患感受性遺伝子の機能解析。

BD の GWAS で見いだされた ERAP1 以外の感受性遺伝子の機能解析も同時に行った。特にマクロファージに多く発現している CCR1 と IL-10 に着目した。BD 患者末梢血単核細胞より単球を単離した。これを M-CSF または GM-CSF を用いて 9 日間かけて M2、M1 マクロファージに分化させた。さらに患者 DNA の CCR1 および IL10 の SNP ゲノタイピングをおこなった。

これらの実験は横浜市立大学附属病院倫理委員会、ゲノム倫理委員会ならびに実験動物倫理委員会の承認を得たのち、患者からの文書による同意を得て施行された。

4. 研究成果

ベーチェット病のリスクとなる ERAP1 のアロタイプ解析

SNP 解析の結果、トルコ人においては下記表 1 のような 10 種類の ERAP1 アロタイプが存在していることが判明した。この中で、Hap10 のみがベーチェット病のリスクであることが判明した。さらに Hap10 ホモかつ HLA-B*51 を保有すると、BD 発症のリスクが約 12 倍に増加することが明らかとなった。

表 1 ベーチェット病における ERAP1 のアロタイプ解析

(Takeuchi et al, Ann Rheum Dis, 2016 より引用)

Coding haplo-type*	Amino acid position										Homozyg hap freq cases, n (%)	Homozyg hap freq ctrls, n (%)	Recessive model p Value	Homozyg hap OR (95% CI)
	12	56	127	276	346	349	528	575	725	730				
Hap1	Ile	Glu	Pro	Ile	Gly	Met	Lys	Asp	Arg	Gln	26 (1.4)	14 (0.8)	0.088	1.75 (0.91 to 3.37)
Hap2	Thr	Glu	Arg	Ile	Gly	Met	Lys	Asp	Arg	Gln	43 (2.3)	22 (1.3)	0.018	1.85 (1.10 to 3.11)
Hap3	Thr	Glu	Arg	Ile	Gly	Met	Lys	Asp	Arg	Glu	46 (2.5)	34 (1.9)	0.284	1.28 (0.81 to 2.00)
Hap5	Thr	Glu	Arg	Ile	Asp	Met	Arg	Asp	Arg	Glu	20 (1.1)	13 (0.7)	0.297	1.45 (0.72 to 2.92)
Hap6	Thr	Glu	Pro	Ile	Gly	Met	Arg	Asp	Arg	Glu	34 (1.8)	21 (1.2)	0.126	1.53 (0.88 to 2.65)
Hap7	Thr	Lys	Pro	Ile	Gly	Met	Arg	Asp	Arg	Glu	1 (0.05)	2 (0.11)	0.684	0.47 (0.04 to 5.18)
Hap8	Thr	Glu	Pro	Met	Gly	Met	Arg	Asp	Arg	Glu	98 (5.2)	94 (5.3)	0.888	0.98 (0.73 to 1.31)
Hap10	Thr	Glu	Pro	Ile	Gly	Val	Arg	Asn	Gln	Glu	87 (4.6)	33 (1.9)	3.12e-065	2.55 (1.70 to 3.82)

ERAP1 R725Q 多型を含むマウスモデルの作成

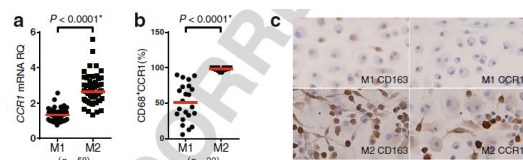
先述のように、ERAP1 には 10 種類のアロタイプが存在することが判明したことから、当初作成を予定していた ERAP1 R725Q/D575N 多型だけではなく、ERAP1 に存在する 5 つの SNP をすべてを組み込んだ Hap10 を用いてトランスジェニックマウスを作成する必要がでてきたことで、軌道修正を余儀なくされた。そこで Hap10 および強直性脊椎炎のリスクである Hap2 を組み込んだベクターを作成して、ES 細胞に組み込んだ。ERAAP1 欠損マウスは作成していることから、現在 ERAAP1 欠損 ERAP1 Hap10 トランスジェニックマウスを作成している。

ベーチェット病の GWAS で見いだされた疾患感受性遺伝子の機能解析

GWAS の結果からは IL-10 および CCR1 はいずれも低発現であることが BD のリスクであることがわかっていた。そこで健常人および BD 患者末梢血より M1/M2 マクロファージを作成し、それぞれの患者の SNP ゲノタイピングを同時おこない、CCR1 および IL-10 発現との eQTL 解析を行った。結果 IL-10、CCR1 とともに M2 マクロファージに多く発現していた(図 1)。

図 1 M1/M2 マクロファージにおける CCR1 の発現

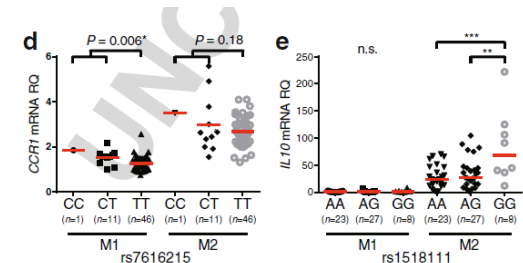
(Nakano et al, Arthritis Res Ther, 2018 より引用)



BD の疾患感受性遺伝子座 *IL10* rs1518111 は M2 マクロファージのみで eQTL 効果を発揮していた。CCR1 rs7616215 は M1/M2 両方で eQTL 効果を認めた(図 2)。

図 2 M1/M2 マクロファージにおける CCR1 の発現

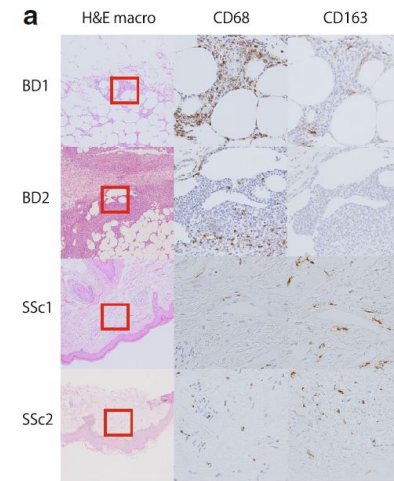
(Nakano et al, Arthritis Res Ther, 2018 より引用)



さらに患者皮膚病変では M1 マクロファージ有意な炎症を認めた。これらの結果を総合すると、CCR1 が多く発現してる抗炎症性 M2 マクロファージが、疾患感受性 SNP の影響によ

って病変局所に遊走しづらくなり、さらに IL-10 の産生も SNP の影響によって低くなることから、炎症が促進されることが予想された。

図 3 BD における M1 優位な炎症(Nakano et al, Arthritis Res Ther, 2018 より引用)。BD 患者結節性紅斑病変部の M1 マクロファージ数 (CD163 陽性・CD68 陽性細胞) が強皮症皮膚組織(SSc)と比して低い。



これらの成果を総合すると、BD において GWAS で見いだされた疾患感受性遺伝子が実際に BD 患者の炎症に密接に関与しており、ERAP1 や CCR1 などを標的とした治療法開発の意義があると考えられる。今後さらに詳細な解析を進めて、BD 患者への治療法開発を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kirino Yohei, Kawaguchi Yasushi, Tada Yoshifumi, Tsukamoto Hiroshi, Ota Toshiyuki, Iwamoto Masahiro, Takahashi Hiroki, Nagasawa Kohei, Takei Shuji, Horiuchi Takahiko, Ichida Hisae, Minota Seiji, Ueda Atsuhisa, Ohta Akihide, Ishigatsubo Yoshiaki. Beneficial use of serum ferritin and heme oxygenase-1 as biomarkers in adult-onset Still's disease: A multicenter retrospective study. Modern Rheumatology, 2017. (査読あり)

Kishimoto Daiga, Kirino Yohei, Tamura Maasa, Takeno Mitsuhiro, Kunishita Yosuke, Takase-Minegishi Kaoru, Nakano Hiroto, Kato Ikuma, Nagahama Kiyotaka, Yoshimi Ryusuke, Igarashi Kazuhiko, Aoki Ichiro, Nakajima Hideaki. Dysregulated heme oxygenase-1low M2-like macrophages augment lupus nephritis via Bach1 induced by type I interferons. Arthritis Res Ther, 20(1):64, 2018. (査読あり)

Nakano Hiroto, Kirino Yohei et al. GWAS-identified CCR1 and IL10 loci contribute to M1-macrophage predominant inflammation in Behcet's disease. *Arthritis Res Ther*, 20(1):24, 2018. (査読あり)

Takauchi Masaki, Mizuku Nobuhisa, Meguro Akira, Ombrello J Mike, Kirino Yohei, et al, Dense genotyping of immune-related loci implicates host responses to microbial exposure in Behçet's disease susceptibility, *Nat Genet*. 2017 Mar;49(3):438-443. (査読あり)

桐野洋平. ERAP1. 炎症と免疫, 2016, 24. (査読なし)

桐野洋平. リウマチ性疾患のゲノム&エピゲノム解析-GWAS から次世代シーケンサーの時代へ- 希少疾患の原因遺伝子は明らかになったのか? Behçet 病. 分子リウマチ治療, 2015, 8: 121-5. (査読なし)

Kirino Yohei, Remmers EF. Genetic architectures of seropositive and seronegative rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11:401-14. (査読あり)

Kirino Yohei, Ideguchi H, Takeno M, Suda A, Higashitani K, Kunishita Y, Takase-Minegishi K, Tamura M, Watanabe T, Asami Y, Uehara T, Yoshimi R, Yamazaki T, Sekiguchi A, Ihata A, Ohno S, Ueda A, Igarashi T, Nagaoka S, Ishigatsubo Y, Nakajima H. Continuous evolution of clinical phenotype in 578 Japanese patients with Behçet's disease: a retrospective observational study. *Arthritis Res Ther*, 2016, 18(1):217. (査読あり)

Takeuchi M, Ombrello MJ, Kirino Yohei, Erer B, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, Özyazgan Y, Watts NR, Gül A, Kastner DL, Remmers EF. A single endoplasmic reticulum aminopeptidase-1 protein allotype is a strong risk factor for Behçet's disease in HLA-B*51 carriers. *Ann Rheum Dis*. 2016, 75:2208-11. (査読あり)

[学会発表](計 11 件)

桐野洋平, 成人ステイル病. 第 62 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2018 年 4 月.

桐野洋平, 遺伝学を用いたベーチェット病の最適化医療の確立. 第 62 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2018 年 4 月.

桐野洋平, 関節リウマチ患者の QOL 向上を目指した当院における内科・整形外科の連携. 第 62 回日本リウマチ学会総会, 東京, 2018 年 4 月.

Kirino Y, Kawaguchi Y, Tada Y, Tsukamoto H, Ota T, Iwamoto M, Takahashi H, Nagasawa K, Takei S, Horiuchi T, Ichida H, Minota S, Ueda A, Ohta A, Ishigatsubo Y. Use of Including serum ferritin and heme oxygenase 1 in the Yamaguchi's classification for adult-onset Still's disease: A Multicenter retrospective study. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, San Diego, USA, 2017, 11.

桐野洋平, 特殊型ベーチェット病の現状と新しい治療戦略. 第 61 回日本リウマチ学会総会, 博多, 2017 年 4 月.

Kirino Yohei, Ideguchi H, Takeno M, Suda A, Higashitani K, Kunishita Y, Takase-Minegishi K, Tamura M, Watanabe T, Asami Y, Uehara T, Yoshimi R, Yamazaki T, Sekiguchi A, Ihata A, Ohno S, Ueda A, Igarashi T, Nagaoka S, Ishigatsubo Y, Nakajima H. Transition of clinical manifestation in Japanese Behçet's disease: a retrospective study of 578 patients. International Conference on Behçet's Disease, Matera, Italy, 2016, 9.

桐野洋平, 川口鎮司, 多田芳史, 塚本浩, 岩本雅弘, 大田俊行, 長澤浩平, 塚本浩, 武井修治, 堀内孝彦, 市田久恵, 高橋裕樹, 上田敦久, 大田明英, 石ヶ坪良明. 成人ステイル病における血清フェリチン, ヘムオキシゲナーゼ 1 の診断への有用性: 多施設共同研究の第 2 報. 第 60 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2016 年 4 月.

Kirino Yohei, Remmers EF, Takeuchi M, Ombrello MJ, Erer B, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, Ozyazgan Y, Gül A, Kastner DL. 単一の ERAP1 アロタイプが HLA-B*51 を保有したベーチェット病患者のリスクとなる. 第 60 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2016 年 4 月.

桐野洋平, 岳野光洋, 出口治子, 須田昭, 杉山裕美子, 土田奈緒美, 國下洋輔, 神山玲光, 渡邊俊幸, 上原武晃, 峯岸薫, 浜真麻, 吉見竜介, 山崎哲, 浅見由希子, 関口章子, 井畑淳, 大野滋, 五十嵐俊久, 長岡章平, 上田敦久, 石ヶ坪良明. ベーチェット病特殊病型の診断の問題点: 590 例の解析. 第 60 回日本リウマチ学会総会, 横浜, 2016 年 4 月.

Kirino Yohei, Kawaguchi Y, Tada Y, Minota S, Ota T, Nagasawa K, Tsukamoto H, Takei S, Horiuchi T, Takahashi H, Ichida H, Iwamoto M, Ueda A, Ohta A, Ishigatsubo Y. Use of Serum Ferritin and Heme Oxygenase 1 for the Diagnosis of Adult-Onset Still's Disease: A Preliminary Report of

Multicenter Study. American College of Rheumatology Annual Scientific Meeting, San Francisco, USA, 2015, 11.

Nakano H, Kirino Yohei, Higashitani K, Takeno M, Ueda A, Ishigatsubo Y. Functional analysis of macrophages in Behçet's disease. Autoinflammation 2015, Dresden, Germany, 2015, 9.

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者 桐野洋平(KIRINO, Yohei)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：50468154