

## リウマチ・膠原病発症関連遺伝子

●徳永 勝士 ◆土屋 尚之

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野

### 〈研究の目的と進め方〉

関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) や全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus, SLE) に代表される膠原病は、長年の研究にもかかわらず、今なお病因や本質的病態が不明であり、根本的治療法が未確立である。本研究は、ゲノム解析のアプローチを利用して、リウマチ・膠原病の病因・病態解明につながる知見を得ることを目的とする。

具体的には、機能的な重要性、染色体上の位置、動物モデルにおける重要性などをもとにして多数の候補遺伝子を設定し、系統的な多型スクリーニング、関連解析を施行する。日本人集団において関連が見出された多型については、中国人、タイ人、ヨーロッパ系アメリカ人集団における関連も検討する。疾患の発症や免疫学的パラメータとの関連が見出された多型については、関連の機序を分子、細胞レベルで解析する (図1)。

また、病変部の遺伝子発現解析から得られた情報をもとにした、病態関連遺伝子の検出とその機能解析も施行する。

### 〈研究開始時の研究計画〉

1) 疾患感受性遺伝子の探索と、発症や病態形成における役割の検討

機能的な重要性、染色体上の位置、動物モデルにおける重要性などをもとにして多数の候補遺伝子を設定し、系統的な多型スクリーニングを施行する。検出された多型につき、日本人SLE, RAその他のリウマチ・膠原病につき、関連解析を行う。

SLEとの関連が見出された多型については、中国、タイ、ヨーロッパ系アメリカ人集団における関連解析を行う。

機能的に関連する遺伝子間における遺伝子多型間相互作用と疾患との関連を検討する。

疾患感受性あるいは免疫学的パラメータとの関連が見出された多型については、アレル特異的組換え型蛋白を用いた構造解析、蛋白間相互作用の解析、遺伝子導入細胞を用いた細胞生物学的解析などにより、関連の分子機構を検討する。

2) 遺伝子発現解析に基づく、病態関連遺伝子の探索

炎症性疾患の病変局所において過剰発現する遺伝子を探索し、細胞生物学的的方法により、病態における意義と、創薬における分子標的となる可能性を検討する。

### 〈研究期間の成果〉

1) 疾患感受性遺伝子の探索と、発症や病態形成における役割の検討

検討した候補遺伝子ごとに記載する。対応する成果公表リスト番号を括弧内に示す。

#### Fc $\gamma$ 受容体遺伝子群、特にFCGR2B

Fc $\gamma$  受容体 (Fc $\gamma$ R) のうち、Fc $\gamma$ RIIa, IIIa, IIIbは、モノマーIgGよりも免疫複合体に親和性が高く、感染抵抗

性におけるエフェクター機能を司るとともに、免疫複合体クリアランスの主要な担い手である。これらおよびFc $\gamma$ RIIb, IIcをコードする遺伝子群は、FCGR2A, 3A, 2C, 3B, 2Bの順に、染色体領域1q23の約200kbの領域に縦列にコードされている。Fc $\gamma$ RIIa, IIIa, IIIbには、細胞外領域の数アミノ酸置換により、IgG親和性あるいは貪食能に違いを有する多型が存在し、感染症との関連で注目されてきた。ヒトSLEにおいて免疫複合体クリアランスの低下が示されていることから、SLEとの関連研究も国外で活発に施行され、いずれの遺伝子においても、関連ありとするもの、なしとするものが相半ばする状況であるが、関連ありとする論文のほとんどでは、それぞれの遺伝子座において、IgGとの親和性の弱いアレル (2A-131Arg, 3A-176Phe, 3B-NA2) のSLEにおける増加が報告され、免疫複合体クリアランスの低下との仮説に合致する。これらの遺伝子のうちで、FCGR2Bのみは、B細胞や単球に発現する抑制型受容体をコードし、欠損マウスは自己免疫疾患感受性となる。また、自己免疫疾患好発系マウス (NZB, MRL, NOD) において、Fcgr2b遺伝子の制御領域や翻訳領域に共通のアレルが存在する。

このような背景をもとに、われわれはFCGR2Bを有力な候補遺伝子と考え、解析を加えた。ヒトFCGR遺伝子群は、不等交差による遺伝子重複により形成された多重遺伝子ファミリーであり、FCGR2Bの上流側は、イントロンやプロモーター領域を含めて、FCGR2Cとほぼ100%相同であり、解析は困難を極めたが、試行錯誤の末、FCGR2B特異的解析系を確立し、膜貫通領域に位置する232番目のアミノ酸をIleからThrに置換するSNP Ile232Thrを見出すとともに、日本人SLEにおいて、232Thr/Thrのホモ接合とSLEの間に、232Ile/Ileと比較して、オッズ比 (OR) 2.3 (95%信頼区間 [CI] 1.1-4.5, P=0.018) の有意な関連を見出した (14)。

FCGR2B-232Thr/ThrとSLEとの関連は、タイ集団 (23)、中国集団 (26) においても検出され、これら三集団をメタアナリシスにより統合すると、OR 2.45 (1.49-4.02), P=0.0004に到達した (表1)。

次に、FCGR2Bの関連がほかのFCGR多型との連鎖不平衡による二次的な関連である可能性を検討した。これらの集団では、FCGR3A-176Phe, FCGR3B-NA2の有意な関連も検出され、これらとFCGR2Bとの間には連鎖不平衡も認められたが、解析の結果、FCGR2B-232Thrの関連は、ほかのFCGRとの連鎖不平衡では説明できず、これらそれぞれが単独で寄与することが示唆された (26)。

次に、同様の関連が、米国在住のヨーロッパ系集団においても見られるか否かを検討した。この集団では2B-232Thrアレル頻度は少なく、2A-131Argのみに有意な関連が検出された (28)。しかし、その後、ヨーロッパ系アメリカ人集団において、FCGR2Bプロモーター領域の多型とSLEとの関連が報告されたため、日本人検体においてその多型の検出を試み、SLE28例、健常対照者24例、計104染色体の塩基配列を決定したが、ヨーロッパ系集団で関連が報告された多型は日本人集団では検出されな

った。FCGR2Aの関連は、ヨーロッパ系集団のデータを主体としたメタアナリシスの結果と一致するものであり、アジア集団とヨーロッパ系集団では、同じFCGR遺伝子群の中でも、別の遺伝子座が疾患感受性に関連していることを示すとともに、集団の遺伝的背景に依存して、FCGR2Bの別の多型部位がSLEに関連していることが示された(表2)。

次に、河野、本田ら(東大アレルギーリウマチ内科)との共同研究により、膜貫通領域に位置するFCGR2B-Ile232Thrによる機能的変化を検討した。SLE関連232Thrアレル導入細胞では、232Ile導入細胞と比較して、B細胞受容体刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度上昇の増強、PLC $\gamma$ 、Aktリン酸化の増強など、B細胞の活性化、生存シグナルの増強が観察された。一方、B細胞の膜脂質ラフトへのFc $\gamma$ RIIb蛋白の局在とリン酸化の低下、SHIP動員の低下が観察された。これは、SLEにおけるB細胞の過剰な活性化と整合性を持つ結果と考えられた(35)(図2)。

RAとの関連の検討では、FCGR2A, 2B, 3A, 3Bいずれも、単独では有意な関連が検出されなかった。しかし、確立したRAの疾患感受性遺伝子であるHLA-DRB1 shared epitopeを持つ群において、FCGR3A-176Phe/Phe遺伝子型がRAに有意に増加していることが見出された(18)。

## CD72

FCGR2B同様、B細胞の抑制型受容体であるCD72(9q13.3)を候補遺伝子として解析した。10個所の変異が検出され、うち4個所が多型の定義に相当する頻度で認められた。これら4個所の多型部位は、ほぼ完全な連鎖不平衡にあり、日本人集団では2種の主要ハプロタイプを形成して存在していた。以後の解析では、ハプロタイプ・タグ多型として、第8イントロンの13塩基反復配列(1回を\*1, 2回を\*2)を利用した。

SLEとの関連解析では、SLE全体との関連は検出されなかったが、SLE群を腎症の有無により層別化すると、腎症を有する群において、\*2ハプロタイプおよび\*2/\*2ディプロタイプの有意な減少が認められた。タイ人集団においても、ほぼ同様の傾向が検出された。

4個所の多型部位のうち2個所(13塩基反復配列、4塩基欠失)が第8イントロンに位置していたため、これらの多型がスプライシングに影響する可能性を、末梢血単核球を用いたRT-PCR法により解析したところ、第8エクソンを欠失した新規スプライシング・アイソフォーム(AS型)が検出された。AS型は、通常型アイソフォームにおいてはストップコドンを持つ第8エクソンの欠失により、C末端側42アミノ酸が、新たな49アミノ酸に変化する蛋白をコードすると予測され、実際に蛋白として翻訳されることが、AS型cDNA導入COS-7細胞において確認された。

次に、遺伝子型とスプライシング効率の関連を検討したところ、腎症抵抗性の\*2ハプロタイプに、遺伝子量依存的にAS型mRNAが増加することが見出された。第7エクソンから第9エクソンまでの遺伝子断片導入COS-7細胞を用いたミニジーン・アッセイにより、第8イントロンの13塩基反復配列、4塩基欠失のいずれもがスプライシング効率に影響することが確認された(図3)。

最後に、CD72多型とFCGR2B多型の遺伝子間相互作用を検討したところ、CD72の\*2アレル陽性例では、FCGR2B-232Thr多型による発症リスクが有意に減弱することが見出された(30)(図4)。

## CD19

CD19はB細胞に発現する表面分子で、CD21, CD81, Leu 13と会合して複合体を形成し、B細胞受容体からのシグナルを増強する。CD19欠損マウスでは免疫不全が、CD19過剰発現マウスではdsDNA抗体やリウマトイド因子などの自己抗体産生が報告されている。ヒトのCD19遺伝子は16p11.2に位置するが、この領域はRAの疾患感受性候補領域の一つとして報告されている。また、末梢血B細胞に表面におけるCD19発現強度が、SLEでは低く、全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)では増強していることが報告されている。

多型スクリーニングにより、計9個所のSNPと、3' UTRのGTリピート多型が検出された。関連解析の結果、3' UTRのGTリピートが15回以上の群が、SLEに有意に増加していた(OR 2.50, 95%CI 1.23-5.08, P=0.0061)。ヨーロッパ系アメリカ人集団では、この多型の頻度が低く、有意な関連は認められなかった。

一般に、3' UTRはmRNAの安定性や翻訳効率に影響する可能性が指摘されていることから、末梢血からB細胞を単離し、RT-PCRを用いて、mRNAレベルとGTリピートとの関連を検討した。検体数が少ないこともあり、有意差に到達しなかったものの、健常者においても、SLE患者においても、15回以上のGTリピートを有する群において、mRNAレベルが20~35%程度低下傾向にあることが見出された。

以上の結果から、CD19の3' UTRに存在するGTリピート多型の延長が、CD19レベルの発現低下を介して、日本人集団において、SLE発症に関連する可能性が示唆された(16)。

一方、強皮症群では、プロモータ領域のSNP -4991G>Tにおいて、Tアレル陽性者の有意な増加が検出された(OR 2.18, 95%CI 1.31-3.86, P=0.003)。臨床病型別に検討すると、この関連は、限局性皮膚硬化型強皮症群、抗セントロメア抗体陽性群に特に集積していた。広汎性皮膚硬化型強皮症群、抗トポイソメラーゼI抗体陽性群においても、499Tアレル陽性率の増加傾向は認められたが、統計学的有意差には到達しなかった。

末梢血B細胞表面におけるCD19発現強度と遺伝子型との関連を検討したところ、-499Tアレル陽性患者では、陰性患者と比較して、ナイーブB細胞、メモリーB細胞いずれにおいても、約19%のCD19発現強度の増強が認められた。ステロイド使用量とCD19発現強度に有意な相関は認められなかった(31)。

以上の結果から、過去に報告されたSLEにおけるCD19の発現低下、SScにおける発現増強の一つの要因は、CD19遺伝子自体の多型であることが強く示唆された。異なる膠原病において、CD19発現が逆の傾向を有することが、病態にどのように関連するかは推測の域を出ないが、CD19発現低下は未分化の自己反応性B細胞のトレランス誘導不全、CD19発現増強は末梢の成熟B細胞の活性化や生存の増強と関連する可能性が想定される。

## BlyS(BAFF, TNFSF13B), APRIL(TNFSF13), BAFF-R(BR3, TNFRSF13C), TACI (TNFRSF13B), BCMA(TNFRSF17)

BlySは近年注目されるTNFスーパーファミリーに属する分子で、B細胞の生存、分化、活性化に重要な役割を果たす。APRILはBlySと受容体の一部を共有する類縁分子である。BlySの受容体としては、BAFF-R, TACI, BCMAが存在し、BlySの活性化シグナルは主としてBAFF-Rで伝達される。APRILはTACI, BCMAに結合するが、最近、プロテオグリカンと結合することが報告され

た。BlySやAPRILは、SLE, RA, Sjögren症候群、SScなどの病態への関与が報告されている。われわれは、これらの分子群の系統的な多型解析と関連研究を施行した。

BlySについては、プロモーター領域に4個所のSNP、翻訳領域に1個所の非同義置換をコードする変異が見出された。SLEやRAの感受性との関連は検出されなかったものの、プロモーター領域 -871T/T遺伝子型が抗Sm抗体陽性SLE群に増加している傾向が観察された。-871T陽性者においては、末梢血単球のBlyS mRNAレベルの有意な上昇が認められた(17)。

APRILについては、本研究の進行中に、Gly67Arg多型とSLEとの関連が、Koyamaら(九大)によって報告された。われわれの解析では、翻訳領域に既報の2個所の非同義置換c.199G>A (Gly67Arg)、c.287A>G (Asn96Ser)が見出され、さらに、プロモーター領域、非翻訳領域、イントロンに計4個所の多型が見出された。Koyamaら同様、67Arg/Arg遺伝子型の有意な減少が観察された。臨床病型との関連を検討したところ、抗Sm抗体陽性SLE群において、3'非翻訳領域に位置するc.\*263Tの有意な増加が観察された。

APRILの関連が隣接するTWEAK(TNFSF12)との関連による二次的な関連である可能性を検討するために、TWEAKの多型スクリーニングを施行したところ、6個所の多型部位が見出され、APRIL多型との間に連鎖不平衡が認められたものの、SLEとの有意な関連は認められなかった。

APRIL Gly67Argは、APRILが切断されて分泌される際に、細胞側に残る部分に位置するため、受容体との相互作用に影響することは考えられない。このため、発現に影響する可能性を検討した。c.\*263Tアレルについては、Cアレルと比較して、mRNA量が有意に増加していた。一方、Gly67Argについては、mRNAレベルでも、細胞内APRIL蛋白量にも、多型との有意な関連が見出されなかったものの、血清中APRIL濃度と有意な関連が見出された。このことから、このアミノ酸置換は、プロテアーゼによる切断などの翻訳後修飾に影響し、疾患に関連する可能性が示唆された。

BAFF-R, TACIについても、多数の新規多型が見出されたが、SLE, RAとのはっきりした関連は検出されなかった。

#### HLA, TNF, TNFR2(TNFRSF1B)

前年度までに確立した、日本人集団に高頻度に検出される、TNF $\alpha$  プロモーター -1031, -863, -857のSNPによって構成されるハプロタイプのタイピング系を利用し、各種疾患において、連鎖不平衡を考慮に入れ、HLAとTNF $\alpha$ それぞれの寄与を検討した。さらに、われわれがSLEとの関連を世界に先駆けて報告したTNFR2 (TNFRSF1B) Met196Arg(1p36.2)も、TNF $\alpha$ との組み合わせを考慮しつつ、あわせて検討した。

RAについては、HLAの寄与が第一義的であり、TNF $\alpha$ の独立の寄与は認められなかった(1)。TNFR2については、弱い関連の傾向が認められた。SLEについてはヨーロッパ系アメリカ人集団において検討し、発症においてはHLAの寄与が第一義的と考えられたが、TNF $\alpha$ と臨床症状との関連が見出された(11)。顕微鏡的多発血管炎(microscopic polyangiitis, MPA)では、日本人集団において、HLA-DRB1\*0901-DQB1\*0303の関連が見出された。本ハプロタイプはアジア集団には高頻度であるがヨーロッパ系集団にはほとんど存在しないため、本疾患の疫学の集団差に寄与している可能性があると考えられた(24,

36)。やはり、TNF $\alpha$  プロモーターの寄与は検出されなかった。

クローン病においては、HLA-DRB1\*0405, 0410とTNF $\alpha$  プロモーター多型が、独立に寄与することが見出された(3)。

#### NKG2A, NKG2C, CD94

12p13にクラスターを形成して存在する、C型レクチンファミリーに属するNK細胞受容体であるNKG2A(KLRC1), NKG2C(KLRC2)とCD94(KLRD1)の多型解析を施行した。NKG2Aには11個所、NKG2Cには4個所、CD94には1個所の変異・多型が見出された。RA3例のみに検出されたアミノ酸置換(NKG2A Cys80Ser)は存在したものの、SLEやRAとの統計学的有意差に到達した関連は見出されなかった。

NKG2Cの変異スクリーニングの過程で、NKG2C内の複数のprimer setを用いたPCRにより、いずれも増幅産物が得られない例が見出された。NKG2Cプローブを用いたサザンブロットにより、本領域のゲノム構造の変化が示唆され、RT-PCRにより、NKG2C転写産物の欠如が確認された。このことから、これらの個体では、NKG2C遺伝子が欠失していることが強く示唆された(22)。

この切断点を同定し、NKG2C欠失ハプロタイプ検出系を作製して検討したところ、欠失ハプロタイプ頻度は日本人集団で20.2%, オランダ人集団で20.0%、欠失ハプロタイプのホモ接合体は、日本人で4.1%, オランダ人で3.8%と決定され、NKG2Cが生存や生殖に必須の分子ではないことが示唆された(27)。

#### KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor) 遺伝子群

KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor) 遺伝子群は、NK細胞や一部のT細胞に発現する活性化および抑制型受容体をコードする多重遺伝子ファミリーであり、互いに高度の相同性を有する多数の遺伝子からなるクラスターを19q13.4に形成する。抑制型受容体のリガンドの一つはHLA-class I分子であり、活性化受容体もHLA-class Iを認識することが示唆されているが、他の受容体の存在も示唆されている。

KIRには各遺伝子座の塩基配列の違いによる多型のみならず、遺伝子座自体の有無による多型が存在し、近年、関節リウマチに伴う血管炎、尋常性乾癬、乾癬性関節炎、強皮症、I型糖尿病などのリウマチ性疾患・自己免疫疾患や、HIV感染症、C型肝炎などのウイルス感染症に対する抵抗性との関連が報告され始めている。

本研究では、KIR遺伝子座の有無によって規定される多型とRA, MPAとの関連を解析した。

RAについては、各KIR遺伝子座の有無による多型に、差は認められなかった。

MPAにおいては、活性化受容体であるKIR2DS3の陽性率が、健常対照群の16.7%と比較して、MPA群では4.7%と、有意に減少していた(OR 0.24, 95%CI 0.06-0.94, P=0.038)。

次に、リガンドであるHLA-class Iと活性化型KIR, 抑制型KIRの組み合わせについて検討したところ、リガンドであるHLA-B Bw4 陽性かつ抑制型のKIR3DL1陽性、活性化型のKIR3DS1陰性群が、MPAに有意に増加していた(46.5% vs 27.0%, OR 2.35, 95%CI 1.18-4.79, P=0.014)。さらに、これにHLA-C group 2と抑制型のKIR2DL1の組み合わせをも追加して、活性化型シグナル優位、中立、抑制型シグナル優位の3群に分けて解析したところ、抑制型シグナルが優位になるにつれて、MPAのリスクが高くなる傾向が認められた(37)。

このことは、ウイルスなどの感染症に対する抵抗性の減弱がMPA発症の遺伝素因の一つとなる可能性を示唆すると思われる。MPAにおけるウイルス感染の関与を示唆する報告は散見され、また、MPA治療中にサイトメガロウイルス感染症が重篤な合併症となることはしばしば経験される。本研究の結果は、ウイルスなどの感染症に対する抵抗性の減弱が、発症の一つの誘因となる可能性を示唆すると考えられる。

#### LILR (leukocyte immunoglobulin-like receptor) 遺伝子群

LILR (leukocyte immunoglobulin-like receptor, ILT, LIRとも呼ばれる) 遺伝子群は、やはり19q13.4にKIRファミリーに隣接して位置する多重遺伝子ファミリーで、活性化型、抑制型、可溶性受容体および偽遺伝子を合わせて13の遺伝子座から構成される。単球・マクロファージ、樹状細胞、顆粒球を中心に、血球系に広範に発現し、免疫寛容やサイトカイン産生制御などにおける役割が示されている。われわれは、LILRファミリーの多型解析と関連研究を系統的に進め、リウマチ・膠原病との関連を検討した。

抑制型受容体であるLILRB1遺伝子には、17個所のSNPが検出され、うち5個所は非同義置換であった。家系試料を用いた検討から、プロモーター領域および細胞外領域のアミノ酸置換を伴うSNPが主として3種類のハプロタイプを形成して存在することが見出され、これらを.PE01, 02, 03と命名した。これらのうち、LILRB1 .PE01/01ディプロタイプが、HLA-DRB1の疾患感受性アリル("shared epitope")を有しない群において、RAに有意に増加していた(OR 2.05, 95% CI: 1.13-3.72, P=0.037)。

このハプロタイプには、プロモーター多型およびリガンド結合ドメインのアミノ酸置換が含まれる。関連の機序を追求する目的で、各ハプロタイプ産物に相当する組換え蛋白を作製し、結晶構造解析、リガンドであるHLA-class Iとの相互作用を施行したが、RA関連ハプロタイプに有意な変化は見られなかった。一方、RA関連ハプロタイプでは、リンパ球、単球表面におけるLILRB1発現強度の低下が認められた。以上の結果から、.PE01/01ディプロタイプでは、抑制型受容体の発現低下を介して、RA感受性が増強することが示唆された(33)。

#### 2) 遺伝子発現解析に基づく、病態関連遺伝子の探索

RAの病変の主座である関節滑膜には、滑膜表層細胞、炎症性浸潤細胞、血管系細胞など、さまざまな構成要素が存在し、滑膜増殖、血管新生、炎症、骨・軟骨破壊などの複雑な病態を形成している。かかる複雑な病態を解明するためには、包括的な遺伝子発現解析から、病態形成上重要な分子を探索することが有用と思われる。

本研究では、微生物由来のmRNAをも含めた未知の遺伝子断片をも検出するdifferential display法を用い、変形性関節症(osteoarthritis, OA)を対照として、RAにおいて発現が増強する遺伝子を探した結果、約20種の遺伝子断片が検出され、その中に特に興味深い遺伝子として、ID (inhibitor of DNA binding/differentiation) 遺伝子が存在した。Idには、Id1-Id4の4種が存在し、血管新生や細胞増殖への関与が知られ、RAの病態に寄与する可能性が高いと考えられた。

半定量的RT-PCRにより、RA13例、OA6例の滑膜組織におけるIdファミリーのmRNA発現レベルを検討したところ、ID1, ID3において、RAに有意に増加が検出された。

次に、滑膜組織における局在を、免疫組織化学染色にて検討したところ、Id1, Id3ともに、血管内皮細胞に強い

染色が検出された(9)。

次に、滑膜におけるIdの役割を、*in vitro*の系で検討した。遺伝子導入により臍帯静脈由来ヒト血管内皮細胞(HUVEC)にID3を過剰発現させると、HUVECの増殖、ICAM-1, E-selectin,  $\alpha$  v integrin, MMP2, MMP9発現、IL-1, VEGFに対する走化性、マトリゲル・アッセイによる管腔形成の増強が検出され、Idの過剰発現のみで、血管内皮細胞の活性化、血管新生が誘導されることが見出された。

また、HUVECをVEGF刺激すると、ID1, ID3 mRNAの発現が誘導された。

一方、Id1およびId3に対するshRNA導入によりこれらの遺伝子の発現を抑制したHUVECにおいては、VEGF刺激に対する増殖、ICAM-1, E-selectin, 走化性、MMP2, MMP9産生、管腔形成のいずれもが、ほぼ完全に抑制された。

以上の結果から、HUVECにおけるVEGF誘導性活性化、血管新生には、Idが必須の因子であることが示された。この成果は、今後、RAのみならず、腫瘍などを含めた、血管新生関連疾患の創薬の分子標的として、Idが有用である可能性を示すものと考えられる(29) (図5)。

#### <国内外での成果の位置づけ>

上記の成果の大多数は、世界に先駆けての発見であり、論文発表後、短期間に多くの引用を受けていることから、国内外において注目されているものと考えられる。

FCGR2Bの膜貫通領域多型とSLEとの関連は、SLEの疾患感受性遺伝子解析という観点からのみならず、膜貫通領域のアミノ酸置換のシグナル伝達における重要性を示唆した。この成果は、American College of Rheumatologyのプレナリー演題として採択された。また、B細胞におけるわれわれの機能解析の論文(35)の直後に、同様の知見をマクロファージを用いて示した論文が出版された(Floto et al., Nat Med 2005)。FCGR2B多型とSLEとの関連に関するわれわれの論文は、2006年1月時点で、成果(14)が56回、(23)(26)がそれぞれ14回、(18)が12回、(28)が7回の引用を受けている。

CD72については、転写後修飾に影響するゲノムDNA多型が、遺伝子多型間相互作用を介して疾患感受性を修飾する、という2点において、ポスト・シーケンス時代の疾患研究におけるゲノム・ネットワーク解析の重要性を象徴的に示したものと言うことができ、成果(30)は、2004年12月の出版でありながら、すでに3回の引用を受けている。

CD19については、成果(16)が12回、(31)は、2004年12月の出版でありながら、すでに6回の引用を受けている。

HLA/TNF  $\alpha$  /TNFR2に関しては、われわれが最初にTNFR2 Met196Arg多型の検出とSLEとの関連を示した論文(Komata et al., 1999)は、その後、各種疾患との関連が報告され、多型の機能解析の報告もあり、すでに70回の引用を受けている。本研究成果の中では、(1)が31回、(3)が29回、(11)が21回、(24)が8回の引用を受けている。

BlyS, APRIL系に関しては、APRIL多型とSLEとの関連を先行研究と独立に再現し得たことから、APRILは日本人におけるSLE感受性遺伝子であることが確認された。現在、BlySを標的とした生物製剤が臨床治験段階にあるが、本知見を考慮すると、少なくとも日本においては、BlySとAPRILの両方を阻害する生物製剤(可溶性TACI, BCMAなど)を考慮すべきではないかということ提唱しえた点で、臨床に直結する成果と考えられる。引用回数は、成果(17)が14回、(10)が12回である。

NKG2ファミリーについては、従来多型性に乏しいと考えられていたが、多数の多型部位が存在すること、さらに、NKG2Cについては、一般集団に高率に欠失ハプロタイプが存在し、この領域にも copy number polymorphismが存在することを初めて示すことができた。引用回数は、成果(22)が7回、(27)が1回である。

KIRについては、稀少疾患であるMPAについて、病態形成を考える上で示唆に富む結果を見出すことができた。論文はまだin pressであるが、この演題は、日本リウマチ学会のプレナリー演題として採択された。

LILRファミリーに関しては、これまで、系統的な多型解析が行われていなかったため、われわれの成果は、このファミリー全体の疾患感受性への関与を示唆するものとして、この分野の研究の先駆けになると期待される。

RA滑膜血管内皮におけるIdの発現とその血管新生上の重要性を示した研究は、RAのみならず、腫瘍など、血管新生関連疾患の治療を考える上で有益な情報を提供した。実際、本研究がきっかけとなり、腫瘍細胞におけるIdの重要性に関する共同研究が進行中であり、その成果は、すでに、2報の論文に報告された(Tsuchiya et al., *Cancer Sci* 2005, Okaji et al., *Eur J Cancer* in press)。成果(9)は8回、(29)は2004年11月の出版であるが、すでに6回の引用を受け、国外の研究者からも多数の問い合わせを受けている。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

疾患との関連が見出された多型のうち、一部のものは、その機能解析により、発症機構や病態を説明しうる知見を得るところまで達成し得なかった。これは、一アミノ酸や制御領域の一塩基置換という微細な変化を検出するに十分な感度と特異性を持った検出系を作製することが時として困難であること、in vitroの実験が必ずしもin vivoの状況を反映するとは限らないこと、今回検討した遺伝子の多くでは、ヒトとマウスの間にゲノムレベルで大きな差が存在し、モデル動物の利用が困難であったことなどがその理由としてあげられる。

#### 〈今後の課題〉

ヒトSNPデータベースおよびHapMapプロジェクトの進展により、ゲノムワイド関連解析・連鎖不平衡解析が現実の可能性となった。今後、リウマチ・膠原病においても、そのような方法の利用は有用と考えられる。しかし、一方では、本研究課題の対象としたFCGR, KIR, LILR遺伝子群において見られるように、遺伝子座自体の有無(copy number polymorphism)を含めた高度の多様性が存在する遺伝子群に対しては、候補遺伝子アプローチの併用が必要と考えられる。

さらに、今後、ヒトの個体レベルにおいて、疾患関連多型の機能的意義を考える上で、トランスクリプトーム、プロテオームとの関連の検討が有意義と思われる。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

##### 1) 論文/プロシーディング

1. 0111081527

Shibue T, Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Shiota M, Ohashi J, Wakui M, Matsuta K, Tokunaga K. Tumor necrosis factor alpha 5'-flanking region, TNF receptor II and HLA-DRB1 polymorphisms in the Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43: 753-757(2000)

2. 0111081534

Kato H, Tsuchiya N, Tokunaga K. Single nucleotide polymorphisms in the coding regions of human CXCL12 chemokine receptors CXCR1, CXCR2, and CXCR3. *Genes Immun* 1: 330-337(2000)

3. 0111081539

Kawasaki A, Tsuchiya N, Hagiwara K, Takazoe M, Tokunaga K. Independent contribution of HLA-DRB1 and TNF  $\alpha$  promoter polymorphisms to the susceptibility to Crohn's disease. *Genes Immun* 1:351-357(2000)

4. 0111081546

Matsushita M, Tsuchiya N, Oka T, Yamane A, Tokunaga K. New polymorphisms of human CD80 and CD86. Lack of association with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 1: 428-434(2000)

5. 0111081553

Tsuchiya N, Komata T, Matsushita M, Ohashi J, Tokunaga K. New single nucleotide polymorphisms in the coding region of human TNFR2. *Genes Immun* 1: 501-503(2000)

6. 0111081558

Hikami K, Tsuchiya N, Tokunaga K. New variations in human OX40 ligand (CD134L) gene. *Genes Immun* 1: 521-522, 2000.

7. 0111081605

Wakui M, Yamaguchi A, Sakurai D, Ogasawara K, Yokochi T, Tsuchiya N, Ikeda Y, Tokunaga K. Upregulated genes in the early phase of murine graft-versus-host reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 200-206(2001)

8. 0111081614

Hagiwara K, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Kitamura S, Iwadare J, Sahara R, Yamamoto K, Tokunaga K. Identification of genes differentially expressed in the inflamed colonic lesions of Crohn's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 283: 130-135(2001)

9. 0111081623

Sakurai D, Yamaguchi A, Tsuchiya N, Yamamoto K, Tokunaga K. Expression of ID family genes in the synovia from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 436-442(2001)

10. 0111081635

Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K. Presence of four major haplotypes in human BCMA gene: Lack of association with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 2: 276-279(2001)

11. 0111081642

Tsuchiya N, Kawasaki A, Tsao BP, Komata T, Grossman JM, Tokunaga K. Analysis of the association of HLA-DRB1 and TNFA promoter polymorphisms with SLE using transmission disequilibrium test. *Genes Immun* 2:317-322(2001)

12. 0112061829

Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, Tsuchiya N, Tokunaga K. Variations in the human CC chemokine eotaxin gene. *Genes Immun* 2: 461-463(2001)

13. 0202141130

Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Tadokoro K, Juji T, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T. Identification of novel single nucleotide substitutions in the NKp30 gene expressed in human natural killer cells. *Tissue Antigens* 58: 255-258(2001)

14. 0206042018  
Kyogoku C, Dijkstra HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, Fukazawa T, Jansen MD, Hashimoto H, van de Winkel JGJ, Kallenberg CGM, Tokunaga K. Fc  $\gamma$  receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. Contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum* 46, 1242-1254(2002)  
15. 0206111401  
Sirikong M, Tsuchiya N, Chandanayingyong D, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Siriboonrit U, Tokunaga K. Association of HLA-DRB1\*1502 - DQB1\*0501 haplotype with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 59:113-117(2002)
16. 0209191452  
Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossman JM, Fukazawa T, Hagiwara K, Kano H, Takazoe M, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K. Polymorphisms of human CD19 gene: possible association with susceptibility to systemic erythematosus in Japanese. *Genes Immun* 3(Suppl 1): S21-S30(2002)
17. 0211191046  
Kawasaki A, Tsuchiya N, Fukazawa T, Hashimoto H, Tokunaga K. Analysis on the association of human BLYS (BAFF, TNFSF13B) polymorphisms with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Genes Immun* 3; 424-429(2002)
18. 0212211859  
Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Tokunaga K. Studies on the association of Fc  $\gamma$  receptor IIA, IIB, IIIA and IIIB polymorphisms with rheumatoid arthritis in the Japanese: evidence for a genetic interaction between HLA-DRB1 and FCGR3A. *Genes Immun* 3; 488-493(2002)
19. 0212211913  
Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Kashiwase K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T. Association of HLA-A\*3303-B\*4403-DRB1\*1302 haplotype, but not of TNFA promoter and NKp30 polymorphism, with postherpetic neuralgia (PHN) in the Japanese population. *Genes Immun* 3; 477-481(2002)
20. 0212262208  
Tsuchiya N, Ohashi J, Tokunaga K. Variations in immune response genes and their associations with multifactorial immune disorders. *Immunological Rev* 190:169-181(2002)
21. 0303051947  
Sekiya T, Tsunemi Y, Miyamasu M, Ohta K, Morita A, Saeki H, Matsushima K, Yoshie O, Tsuchiya N, Yamaguchi M, Yamamoto K, Tamaki K, Hirai K. Variations in the human Th2-specific chemokine TARC gene. *Immunogenetics* 54; 742-745(2003)
22. 030307114  
Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K. Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population. *Genes Immun* 4; 160-167(2003)
23. 0305191929  
Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Fujiwara K, Chandanayingyong D, Tokunaga K. Association of Fc  $\gamma$  receptor IIB and IIIB polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais. *Tissue Antigens* 61: 374-383(2003)  
24. 0308081132  
Tsuchiya N, Kobayashi S, Kawasaki A, Kyogoku C, Arimura Y, Yoshida M, Katsushi Tokunaga K, Hashimoto H. Genetic background of Japanese patients with ANCA-associated vasculitis: Association of HLA-DRB1\*0901 with microscopic polyangiitis. *J Rheumatol* 30: 1534-1540(2003)  
25. 0308081154  
Karassa FB, Bijl M, Davies KA, Kallenberg CGM, Khamashta MA, Manger K, Michel M, Piette J-C, Salmon JE, Song YW, Tsuchiya N, Yoo D-H, and Ioannidis JPA. The role of the Fc  $\gamma$  RIIA polymorphism in the antiphospholipid syndrome. An international meta-analysis. *Arthritis Rheum* 48: 1930-1938(2003)  
26. 0312272014  
Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K. Association of Fc  $\gamma$  receptor IIB polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens* 63:21-27(2004)  
27. 0312272032  
Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Bijl M, Kallenberg CGM, Hashimoto H, Yabe T, Tokunaga K. Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion. *Int Immunol* 16:163-168(2004)  
28. 0402091809  
Kyogoku C, Tsuchiya N, Wu H, Tsao BP, Tokunaga K. Association of Fc  $\gamma$  receptor IIA, but not of IIB and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus: A family-based association study in Caucasians. *Arthritis Rheum* 50:671-673(2004)  
29. 0411041514  
Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Kobata T, Takahashi K, Tokunaga K. Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J Immunol* 173: 5801-5809(2004)  
30. 0411122149  
Hitomi Y, Tsuchiya N, Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Suzuki T, Fukazawa T, Bejrachandra S, Siriboonrit U, Chandanayingyong D, Suthipinittharm P, Tsao BP, Hashimoto H, Honda Z, Tokunaga K. CD72 polymorphisms associated with alternative splicing modify susceptibility to human systemic lupus erythematosus through epistatic interaction with FCGR2B. *Hum Mol Genet* 13: 2907-2917(2004)  
31. 0412111820  
Tsuchiya N, Kuroki K, Fujimoto M, Murakami Y, Tedder TF, Tokunaga K, Takehara K, Sato S. Association of a functional CD19 polymorphism with susceptibility to systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 50: 4002-4007(2004)  
32. 0501071856  
Ehara Y, Sakurai D, Tsuchiya N, Nakano K, Tanaka Y, Yamaguchi A, Tokunaga K. Follistatin-related protein gene (FRP) is expressed in the synovial tissues of rheumatoid arthritis, but its polymorphisms are not associated with genetic susceptibility. *Clin Exp Rheumatol* 22: 707-712(2004)  
33. 0602021451

Kuroki K, Tsuchiya N, Shiroishi M, Rasubala L, Yamashita Y, Matsuta K, Fukazawa T, Kusaoi M, Murakami Y, Takiguchi M, Juji T, Hashimoto H, Kohda D, Maenaka K, Tokunaga K. Extensive polymorphisms of LILRB1 (ILT2, LIR1) and their association with HLA-DRB1 shared epitope negative rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet* 14: 2469-2480(2005)  
 34. 0602021509  
 Tsuchiya N, Kyogoku C. Role of Fc $\gamma$  receptor IIb polymorphism in the genetic background of systemic lupus erythematosus: Insights from Asia. *Autoimmunity* 38: 347-352(2005)  
 35. 0602021533  
 Kono H, Kyogoku C, Suzuki T, Tsuchiya N, Honda H, Yamamoto K, Tokunaga K, Honda Z. Fc $\gamma$ RIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet* 14, 2881-2892(2005)  
 36. 0602021600  
 Tsuchiya N, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K. Association of HLA-DRB1\*0901-DQB1\*0303 haplotype with microscopic polyangiitis in Japanese. *Genes Immun* 7,81-84, (2006)  
 37. (in press)

Miyashita R, Tsuchiya N, Yabe T, Kobayashi S, Hashimoto H, Ozaki S, Tokunaga K. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotypes with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum* (in press).

2) データベース/ソフトウェア  
 該当なし

3) 特許出願  
 38. 全身性エリテマトーデスの感受性遺伝子およびその使用 出願番号2001-258594 出願人：オリンパス光学工業(株)、発明者：徳永勝士、土屋尚之(平成13年8月28日)  
 39. ANCA関連血管炎への罹患またはその発病可能性を検査するためのキットおよび方法 出願番号2002-303070 出願人：ヒュービット ジェノミクス(株)、発明者：橋本博史、小林茂人、土屋尚之、徳永勝士(平成14年10月17日)  
 40. ヒト血管内皮細胞のVEGF誘導性活性化及び血管新生におけるIdの役割 出願番号2003-331089 出願人：山口晃弘、土屋尚之、徳永勝士、櫻井大祐 発明者：山口晃弘、土屋尚之、徳永勝士、櫻井大祐(平成15年9月24日)

4) その他顕著なもの  
 該当なし

表1 アジア集団におけるFCGR2A, 2B, 3A, 3BとSLEとの関連：日本、中国、タイ集団のメタアナリシス(成果14, 23, 26, 34)。

	odds ratio (95%CI)	P
<i>FCGR2A</i>		
R vs H	1.12 (0.92-1.36)	0.28
RR vs HH	1.10 (0.68-1.78)	0.69
RH vs HH	1.18 (0.91-1.54)	0.22
<i>FCGR2B</i>		
T vs I	1.47 (1.19-1.81)	0.0004
TT vs II	2.45 (1.49-4.02)	0.0004
TI vs II	1.26 (0.95-1.68)	0.11
<i>FCGR3A</i>		
F vs V	1.43 (1.18-1.73)	0.0003
FF vs VV	2.20 (1.36-3.55)	0.001
FV vs VV	1.49 (0.92-2.40)	0.10
<i>FCGR3B</i>		
NA2 vs NA1	1.30 (1.09-1.55)	0.004
NA2/2 vs NA1/1	1.79 (1.22-2.63)	0.002
NA1/2 vs NA1/1	1.23 (0.93-1.62)	0.14

表2 *FCGR2B*多型とSLEの関連の集団による違い(成果14, 23,

26, 28, 34)

	promoter	transmembrane
アジア集団		
日本	当該多型なし	関連あり
中国、タイ		関連あり
ヨーロッパ系アメリカ人*	関連あり	アレル頻度低く、関連なし

\* ヨーロッパ系アメリカ人のプロモーター多型は、他研究者のデータに基づく(Su et al., 2004, Blank et al., 2005)

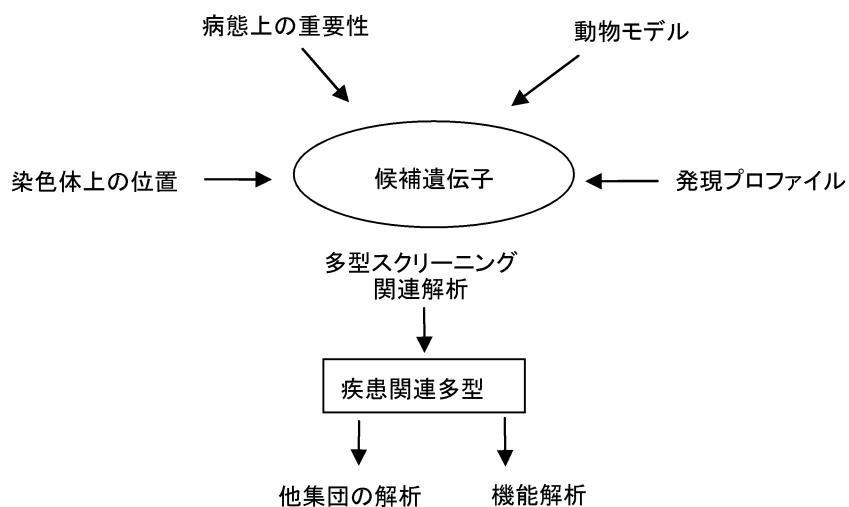


図1 候補遺伝子アプローチによる疾患感受性遺伝子の探索

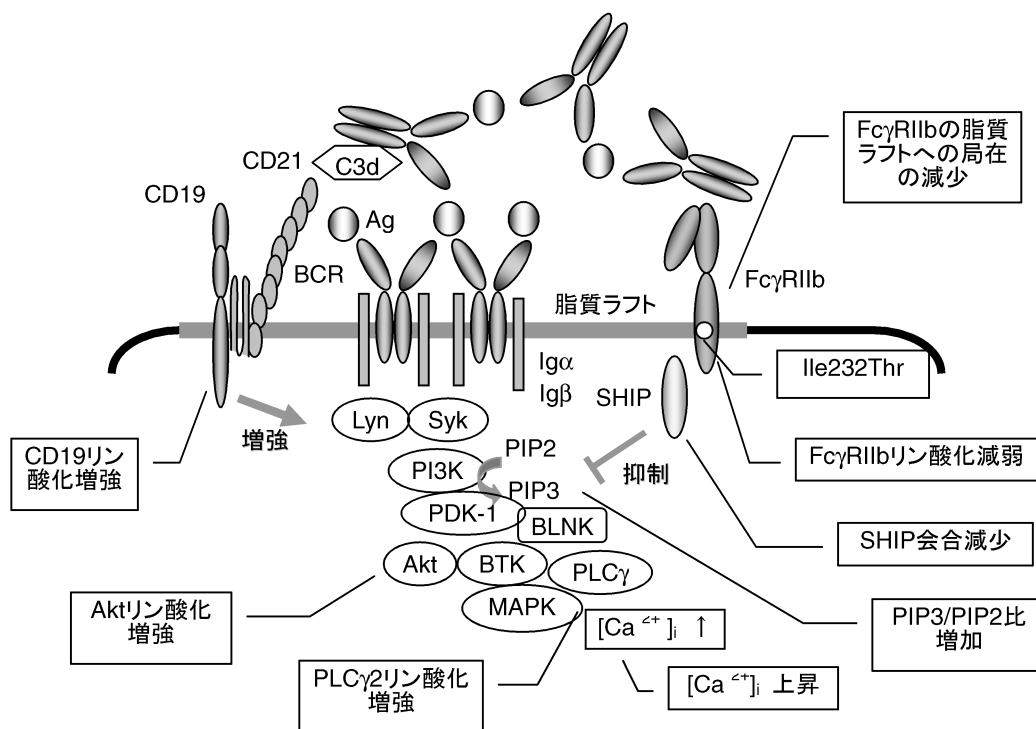


図2 SLE 関連 FcγRIIb 多型(Ile232Thr)による機能的変化(成果 35, 土屋、本田、目で見えるバイオサイエンス:全身性エリテマトーデスに見られる遺伝子多型。内科 96:1115-1119, 2005より改変)。



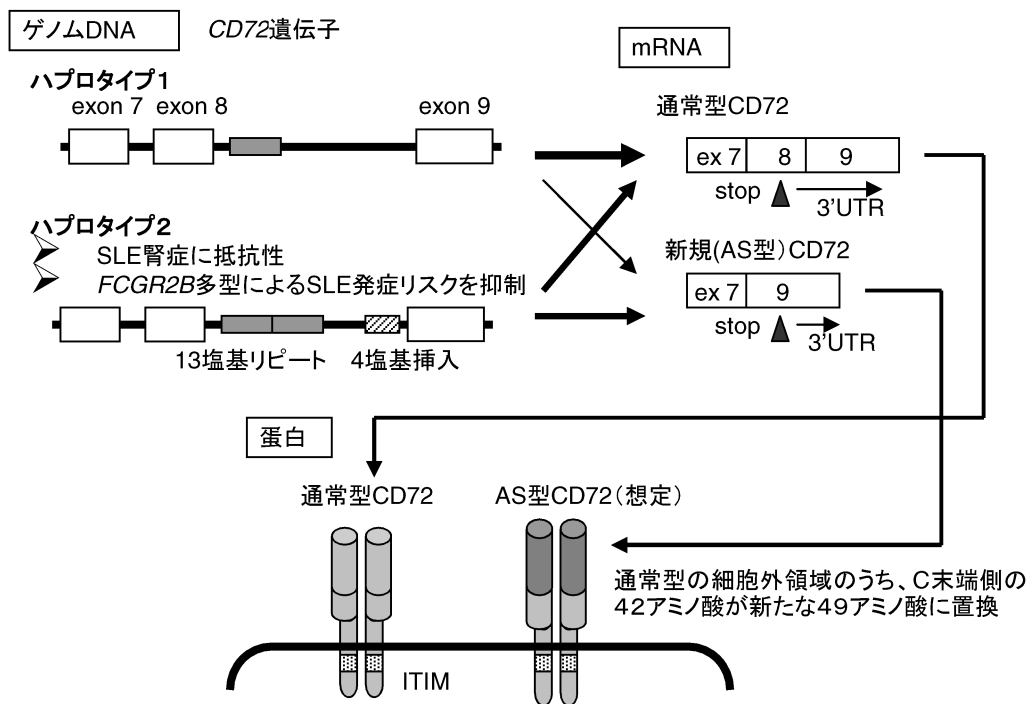


図3 CD72 ハプロタイプのスプライシングへの影響と、SLEとの関連(成果 30, 土屋、本田、目で見えるバイオサイエンス:全身性エリテマトーデスに見られる遺伝子多型。内科 96:1115-1119, 2005より改変)。

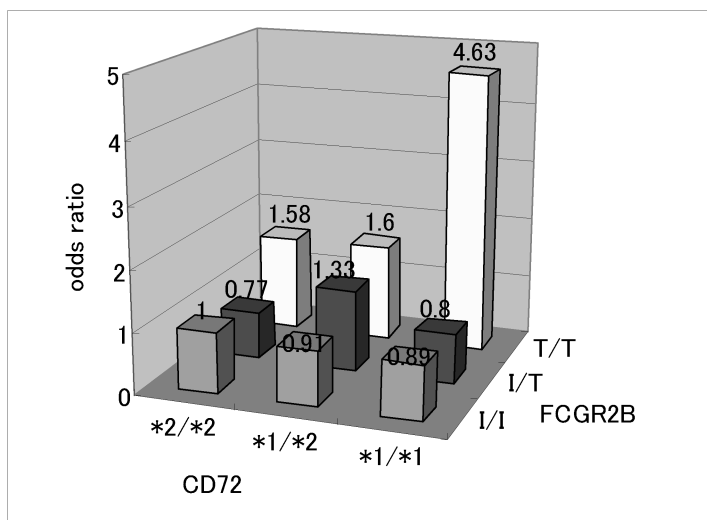


図4 SLE発症におけるFCGR2BとCD72の遺伝子間相互作用。FCGR2B 232Thr/Thr遺伝子型による発症リスクの上昇は、CD72 \*2ハプロタイプ存在下では低下する(成果30)。

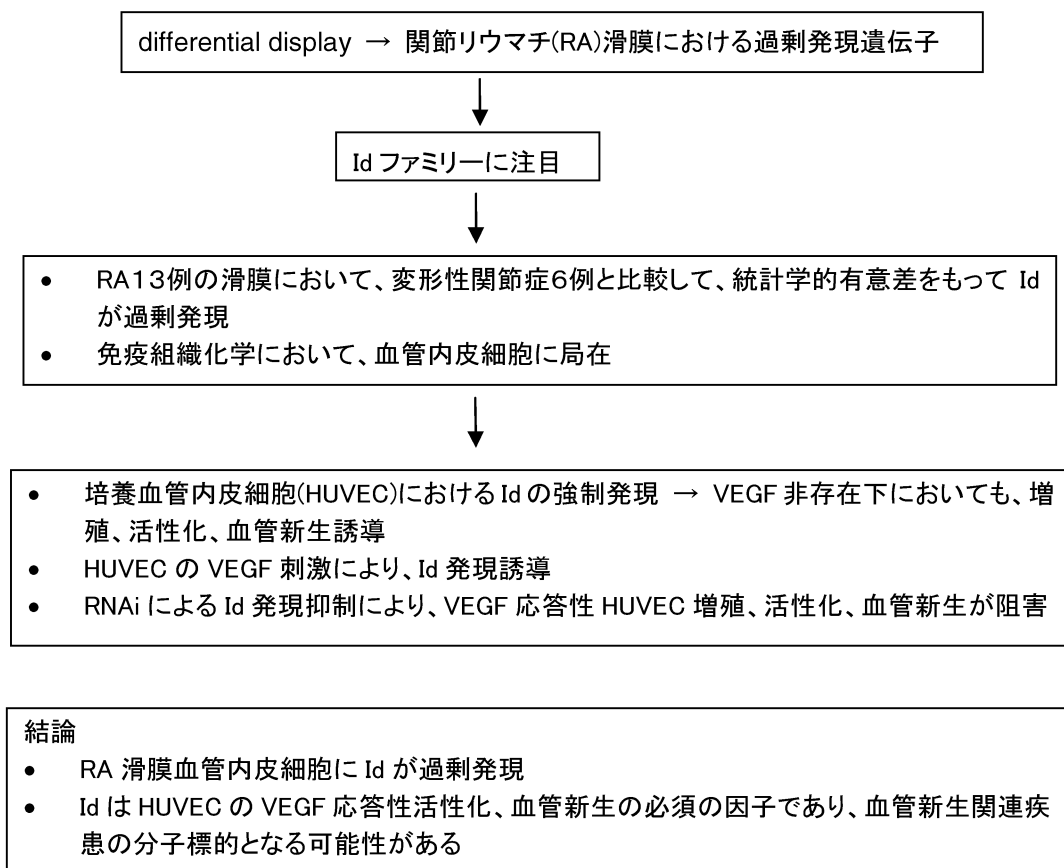


図5 遺伝子発現解析を用いた、関節リウマチ病態関連遺伝子としてのIdの検出(成果9, 29)。