

自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子の同定

●原田 晴仁 ◆白澤 専二

国立国際医療センター研究所・臨床病理研究部

〈研究の目的と進め方〉

免疫システムにおける自己寛容の破綻した状態として捉えられる自己免疫疾患は複数の遺伝要因と環境要因の相互作用により発症する多因子疾患である。遺伝要因、環境要因とともに免疫システムの全体的な反応性、免疫細胞の性質に影響を与えることにより自己免疫疾患への感受性を増大させ、さらに遺伝・環境要因はどの抗原が、ひいてはどの臓器が免疫システムからの攻撃の対象となるかを制御する。臓器特異的な自己免疫疾患の代表的存在である自己免疫性甲状腺疾患 (Autoimmune Thyroid Disease: AITD) は、自己免疫疾患の中では最も頻度の高い疾患である。その内、甲状腺機能亢進の症状を呈する Graves' 病 (GD) は、TSH receptor (TSHR) に対する自己抗体が TSHR を刺激することにより結果的に甲状腺ホルモンの過剰分泌が起こることにより発症し、甲状腺機能低下症を呈する橋本病 (HT) は、リンパ球の甲状腺への浸潤、細胞障害性 T 細胞による甲状腺組織の破壊によるものである。これまでに、疾患感受性を規定している第一の遺伝要因としては、その他の自己免疫疾患と同様に主要組織適合抗原遺伝子 (MHC；ヒトでは HLA) が示唆されてきた。しかしながら、真の病因となる遺伝子、および遺伝子変異については、ほとんど解明されていないのが現状である。また、Graves' 病と橋本病は、①多発家系の存在、②一卵性双生児における発端者関連一致率が、二卵性双生児よりも有意に高い、③HLA や CTLA4 といった遺伝マーカーとの連鎖あるいは相関などの所見により発症に遺伝要因の関与が強く示唆されている。

本研究では、罹患同胞対法とそれに引き続く相関解析を利用したポジショナルクローニング法により AITD 感受性遺伝子を同定することを目的とする (図1)。更に同定された遺伝子と疾患発症の分子生物学的メカニズムを解析し、AITD の病因・病態の解明を目指す。

〈研究開始時の当初計画〉

- 1) 罹患同胞対を利用した連鎖解析による AITD 感受性遺伝子座の同定
- 2) AITD 疾患感受性遺伝子座 8q23-q24 領域の絞込み
 - ①マイクロサテライトマーカーによる絞込み
 - ②一塩基多型 (SNPs) による絞込み
 - ③疾患感受性遺伝子領域のシーケンス、SNPs の発見
 - ④候補領域の遺伝子構造の決定
 - ⑤疾患感受性遺伝子の同定
 - ⑥AITD 感受性遺伝子の変異の同定

〈研究期間の成果〉

- 1) 罹患同胞対を利用した連鎖解析による AITD 感受性遺伝子座の同定 (論文1)

我々は AITD 感受性遺伝子を同定するために、AITD の罹患同胞対 (兄弟・姉妹で発症している症例) を収集し、第1段階として罹患同胞対法と呼ばれる連鎖解析を用いたゲノムワイド研究を行い感受性遺伝子座の同定を行った。123組の AITD 罹患同胞対を対象とした連鎖解析を行い、14個の染色体の19領域に連鎖の可能性がある (maximum lod score (MLS) >1) 領域を検出した (表1)。特に5番染色体長腕の5q31-q33領域、8番染色体長腕の8q23-q24領域では MLS >3 であり強い連鎖が示唆された。その後、白人家系を用いた連鎖解析において8q24領域との連鎖が報告されたことにより、8q24領域には人種を越えて共通の AITD 感受性遺伝子が存在することが示唆された。また、5q31-q33領域は複数の免疫・アレルギー疾患における連鎖が報告されている領域であり、今後の解析が期待される。

図1 AITD感受性遺伝子の探索

1. ゲノムワイド研究
罹患同胞対法を利用した連鎖解析による感受性遺伝子座の同定
 - * 400 個のマイクロサテライトマーカー
 - * 123 組の罹患同胞対
2. マイクロサテライトマーカーと SNPs による感受性遺伝子領域の絞込み
 - * 症例 (連鎖を示した同胞対の発端者) 一対照研究による相関解析
3. 2と独立した AITD 症例と対照群を用いた相関の追試
4. 感受性遺伝子の同定と SNP の機能解析

表 1 :AITD罹患同胞対 123組 を用いた連鎖解析の結果

Chromosome	Marker	cM	Multipoint LOD score	
1	D1S213	232	1.12	
2	D2S335	179	1.17	
2	D2S125	264	1.18	
3	D3S1580	212	1.64	
5	D5S407	67	1.95	
5	5q31-q33	D5S436	156	3.14
6	D6S462	89	1.01	
6	D6S281	188	1.87	
8	8q24	D8S272	149	3.77
9	D9S1677	108	1.69	
10	D10S249	0	1.11	
11	D11S905	53	1.08	
12	D12S336	22	1.45	
13	D13S159	74	1.11	
15	D15S1007	22	1.48	
15	D15S130	100	1.08	
18	D18S53	40	1.11	
18	IDDM6	D18S487	77	1.12
22	D22S423	42	1.52	

2) ZFAT (zinc-finger gene in AITD susceptibility region) の同定 (論文2)

①8q24候補領域の絞込み

連鎖解析で同定された候補遺伝子領域8q24の約20Mb に対して、マイクロサテライトマーカーを約100 kb に一個の割合で設定し (図2)、まず“連鎖のもとでの相関”を検出するために、罹患同胞対のうちMLSが最も高かったマーカーを共有する同胞対の発端者と対照群を利用した相関解析を行い、感受性遺伝子座の狭小化を行った。その結果、強い相関を示すマイクロサテライトマーカーが2個存在する約420 kbのcontig (NT_007994:図2) が同定

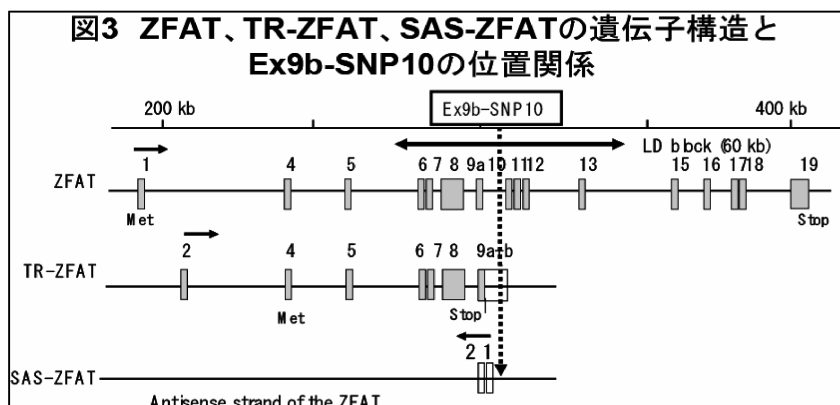
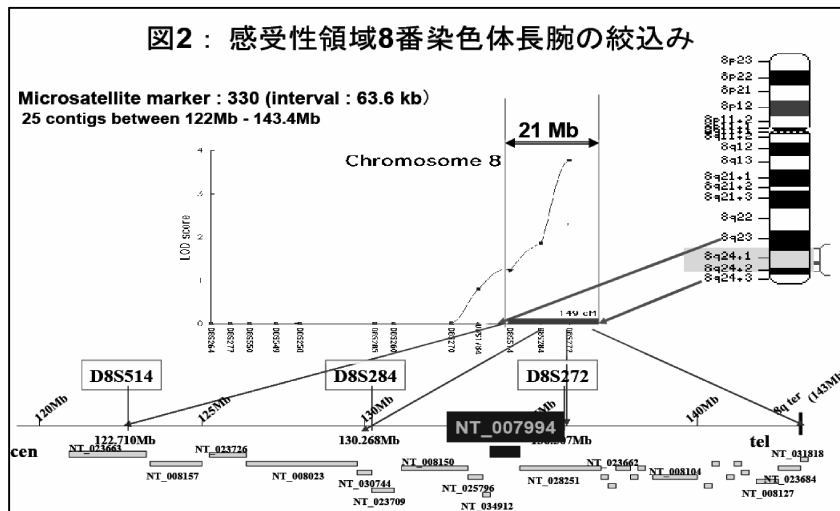
された。次に、この420 kbに存在するSNP (約5 kb間隔) を用いて、相関解析・連鎖不平衡解析を行った結果、疾患感受性領域を連鎖不平衡を示す約60 kbに狭小化することができた (図3)。さらに、独立な集団のAITD 515例—対照群526例を用いた相関解析により、この60 kbに存在する複数のSNPsとの相関が確認され、この領域に感受性遺伝子が存在することが強く示唆された。

②8q24領域の感受性遺伝子の同定

この60 kbの領域を詳細に解析した結果、ゲノム上に約200 kbに渡って存在し、19個のエクソンより成る遺伝子ZFATをAITD感受性遺伝子の候補として同定した。ZFATは最長1243アミノ酸からなる18個のC₂H₂タイプのZn-fingerモチーフを有し、N末側にAT-hook (AT-richなDNAに結合する) を持つ転写制御因子であると推定される。ZFATには複数のスプライシングバリエントが存在するが、この内、truncated form (TR-ZFAT)はZFATとは異なるエクソンを利用し、11個のZn-fingerモチーフを有し846アミノ酸からなる蛋白をコードする。興味深いことに、ZFAT遺伝子の相補鎖上には最長でもopen reading frameがわずか39アミノ酸しかないnon-coding転写産物と思われる939bpのsmall antisense transcript of ZFAT (SAS-ZFAT)が存在した。すなわち、遺伝統計学的解析の結果から同定されたこの感受性領域にはZFAT、TR-ZFAT、SAS-ZFATの3つのZFAT関連転写物が存在することが明らかになった (図3)。

③ZFAT,TR-ZFAT,SAS-ZFATのmRNA発現と感受性SNP

RT-PCRによる発現解析では、ZFATは胎盤、腎臓、脾臓、精巣と末梢血リンパ球に、TR-ZFATは胎盤、卵巣、扁桃と末梢血のCD19⁺B細胞、CD14⁺細胞に、SAS-ZFATは胎盤と末梢血リンパ球のCD19⁺B細胞に強く発現して





いた。疾患と強い相関を示したEx9b-SNP10はZFATのイントロン9、TR-ZFATの3'-UTR、SAS-ZFATのプロモーター領域に存在した(図3)ことから、このSNPの3種類のZFAT発現に対する影響を検討した。健康者末梢血リンパ球のB細胞を採取し、3種類のZFATの発現をEx9b-SNP10の遺伝子型別で比較すると、ZFAT mRNAの発現は遺伝子型間で差は認められなかったが、疾患相関アリルを有するとTR-ZFAT mRNAの発現は高く、逆にSAS-ZFAT mRNAは低い傾向があった(図4)。このことから、このSNPの遺伝子型の違いがTR-ZFATおよびSAS-ZFATのmRNA発現量に影響することが示唆された。Ex9b-SNP10を含むオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフト解析により疾患相関アリルに特異的に結合する核内蛋白質の存在が示唆された。さらに、Ex9b-SNP10はSAS-ZFATのプロモーター領域に存在するわけであるが、レポーター解析により疾患対立アリルでは疾患相関アリルの約3倍の転写活性を認めた。これらのことより、Ex9b-SNP10の疾患相関アリルには何らかの転写抑制因子がより強く結合することにより、SAS-ZFAT mRNAの転写が抑制されることが示唆された。

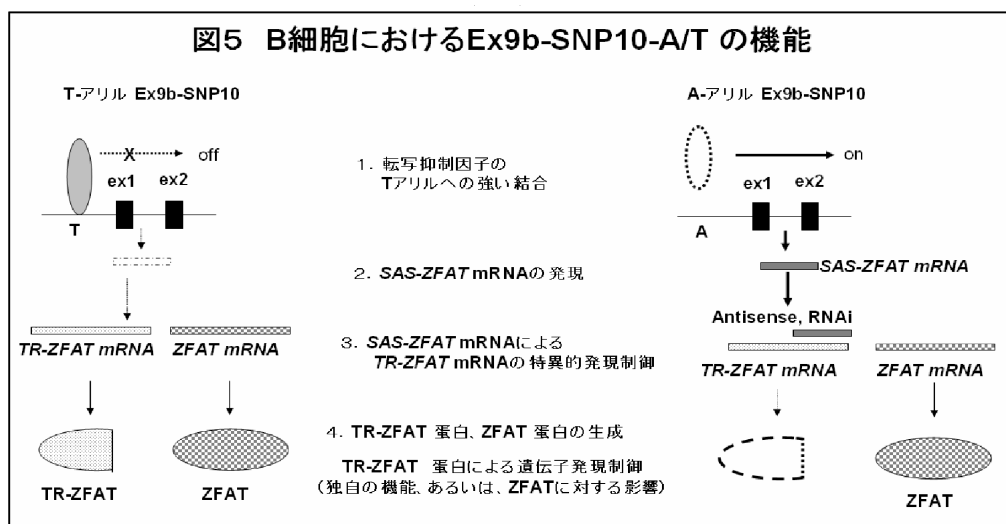
④アンチセンスRNAによる発現制御

ZFAT mRNA、TR-ZFAT mRNAに対するSAS-ZFAT mRNAの作用を細胞レベルで解析した結果、SAS-ZFAT mRNAによりTR-ZFAT mRNAの発現が特異的に減少することが示された。また、TR-ZFAT mRNAの安定性には疾患相関アリルは影響を与えなかったことより、なんらかのRNA干渉作用を通じてSAS-ZFAT mRNAはTR-ZFAT mRNAの発現制御に関与していることが示唆された。要約すると、疾患相関アリルを有すると、B細胞においてSAS-ZFAT mRNAの発現が抑制され、その結果TR-ZFAT

mRNAの発現上昇が起これ、TR-ZFAT蛋白がより多く産出され、そのTR-ZFAT蛋白が独自の機能、あるいはZFATの機能をdominant-negative的に抑制するという機構、を通じて疾患感受性を規定していることが推定された(図5)。

3) Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) (論文3) :

抗原提示細上のHLA分子により提示された抗原ペプチドをTCRが認識しT細胞反応が惹起されるわけであるが、そのシグナルだけでは不十分であり、第2のシグナルとして抗原提示細胞のcostimulatory分子とT細胞のcoreceptor分子の相互作用が必要となる。最も強力な補助刺激分子であるCD80/CD86 (B7) はT細胞のCD28と相互作用してT細胞活性化に関与する。一方、活性化されたT細胞はCTLA-4を細胞表面上に発現し、そのCD80/CD86に対するavidityがCD28より遙かに高いためにCD80/CD86はcoreceptor分子であるCTLA-4と相互作用しT細胞活性化を抑制する。CTLA4はT細胞におけるこのような抑制性のシグナルに関与するのであるが、機能的に異なる二つの転写産物(膜結合型と分泌型ペプチド)が存在することが知られていた。1型糖尿病、AITDとCTLA4との関連は連鎖解析、相関解析のいずれにおいても複数の報告がなされていたが、その原因となる1塩基多型(single nucleotide polymorphism; SNP)の同定には至っていなかった。最近、白人集団を用いた解析により、原因となるSNPがCTLA4の3' UTRに存在し、その感受性アリルを持つと、膜貫通領域を持たない放出型のCTLA4の産生が減少するという報告がなされた2)。そこで、我々は日本人集団において解析した結果、そのSNPは健康者の白人集団と日本人集団においてアリル頻度に大きな差は認めるものの、日本人AITDにおいても相



関が認められた3)。一方、CTLA多型は全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE), 関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) を含むその他の自己免疫疾患においても相関が報告されていることから、自己免疫疾患に広く共通の感受性遺伝子であることが示唆される。

4) AITD, SLE, 関節リウマチに共通の感受性遺伝子 FCRL3の同定 (論文5) :

AITD, SLE, 関節リウマチの3つの自己免疫疾患に共通の感受性遺伝子としてFCRL3 (Fc receptor-like 3) を同定した。FCRL3の転写開始点より上流に存在するSNP:-169C/Tの-169Cは-169Tに比較し、免疫応答の重要な転写因子であるNF・Bがより強く結合すること、さらに、SLE患者の抗DNA抗体価はC/C遺伝子型でC/T+T/T遺伝子型より有意に高い事を明らかにした。これらの結果からFCRL3はAITD, SLEに共通の自己免疫疾患感受性遺伝子であること、および、自己抗体産生に関与することが示唆された。

〈国内外での成果の位置づけ〉

AITDの疾患感受性遺伝子同定のために、日本人罹患同胞対を収集し、それらを用いたゲノムワイド連鎖解析を独自に行うことで、疾患感受性候補領域を同定できた。更に最有力な候補領域の一つである8q24については、疾患感受性SNPの同定・機能解析を行い、AITD疾患感受性遺伝子としてZFATを同定するまでに至った。これら一連の解析をやり遂げたことは、国内はもとより国際的にも高く評価されている (2006年3月には国際学会 (6th Human Genome Organization Pacific Meeting) にて招待講演の予定)。更にはZFAT・TR-ZFATの細胞・個体レベルでの機能解析、およびZFAT・TR-ZFATが直接的に制御する標的遺伝子群の同定にむけての準備を着々と進行させており、今後の成果に対する国内外からの期待は高い。

CTLA-4 遺伝子のAITD感受性SNPが白人集団だけでなく、日本人集団でもAITDと相関することを示したことは、臨床疫学的にも疾患遺伝学的にも高く評価されている。更に、AITD,SLEに共通の感受性遺伝子としてFCRL3を同定したことは、国際的にも高く評価されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

研究開始時当初計画における研究目的は十分に達成できたと考える。

〈今後の課題〉

AITD感受性遺伝子の候補として8q24領域よりZFAT遺伝子を同定したが、今後、ZFAT、TR-ZFATがどのような遺伝子を制御しているかを明らかにし自己免疫疾患との関係を明らかにしていく必要がある。そのために、ZFATおよびTR-ZFATトランスジェニックマウス由来の細胞やBa/F3-ZFAT安定発現クローンをを用いた発現アレイ解析に着手している。また、ZFAT・TR-ZFATが直接的に制御する遺伝子群を同定するには、転写制御にあたりZFAT・TR-ZFATが相互作用するゲノム部位をクロマチン免疫沈降法などの方法で決定する必要がある。その準備段階としてZFAT・TR-ZFATに対するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製に着手している。

遺伝統計学的解析で疾患感受性遺伝子を同定したとしても、その遺伝子変異が単独で表現型 (発症) に結びつくことは起こらないと考えられる (これが多因子疾患の

概念でもある)。将来的には複数の遺伝要因が同定されることが期待されるが、これらの感受性遺伝子間の相互作用や、どのような環境要因がそれらの遺伝要因を持っている個人において発症に関与するのかを総合的に解析し、病因の解明とその理解に立脚した治療法の開発を行っていく必要があると考えられる。5q31-q33領域は複数の免疫・アレルギー疾患における連鎖が報告されている領域であり、今後の解析が期待される。

疾患関連遺伝子を同定するためには、ゲノム解析に利用するサンプルサイズと同定された遺伝子の機能を解明し疾患に関連することを示すことの二つが最も大切な条件であると考えられる。サンプルサイズに関しては現在までに合計でAITDとして1200例を超える症例の収集を行い当初の目標は達成しているが、引き続き検体収集に努めている。

〈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. Sakai K, Shirasawa S, Ishikawa N, Ito K, Tamai H, Kuma K, Akamizu T, Tanimura M, Furugaki K, Yamamoto K, Sasazuki T: Identification of susceptibility loci for autoimmune thyroid disease to 5q31-q33 and Hashimoto's thyroiditis to 8q23-q24 by multipoint affected sib-pair linkage analysis in Japanese. *Hum Mol Genet.* 10, 1379-1386, 2001
2. Shirasawa S, Harada H, Furugaki K, Akamizu T, Ishikawa N, Ito K, Ito K, Tamai H, Kuma K, Kubota S, Hiratani H, Tsuchiya T, Baba I, Ishikawa M, Tanaka M, Sakai K, Aoki M, Yamamoto K, Sasazuki T: SNPs in the promoter of a B cell-specific antisense transcript, SAS-ZFAT, determine susceptibility to autoimmune thyroid disease. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2221-2231, 2004
3. Furugaki K, Shirasawa S, Isikawa N, Ito K, Ito K, Kubota S, Kuma K, Tamai H, Akamizu T, Hiratani H, Tanaka M, Sasazuki T: Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with Graves' disease and autoimmune thyroid disease in the Japanese. *J. Hum. Genet.* 49, 166-168, 2004
4. Hiratani H, Bowden DW, Ikegami S, Shirasawa S, Shimizu A, Iwatani Y, Akamizu T: Multiple SNPs in intron 7 of thyrotropin receptor are associated with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2898-2903, 2005
5. Kochi Y, Yamada R, Suzuki A, Harley JB, Shirasawa S, Sawada T, Bae S-C, Tokuhiro S, Chang X, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Ohnishi Y, Kaufman KM, Kang CP, Kang C, Otsubo S, Yumura W, Mimori A, Koike T, Nakamura Y, Sasazuki T, Yamamoto K: A functional variant in FCRL3, encoding Fc Receptor-like 3, is associated with rheumatoid arthritis and several autoimmunities. *Nature Genet.* 37, 478-485, 2005