

慢性関節リウマチの疾患感受性遺伝子解析

●堤 明人 ◆住田 孝之

筑波大学大学院人間総合科学研究科先端応用医学専攻臨床免疫学

〈研究の目的と進め方〉

関節リウマチ(RA)発症に関与する未知の遺伝子を分子生物学的手法により特定し、その機能解析を行う事を目的とする。一方がRAを発症し、他方が正常の一卵性双生児よりの末梢血、もしくはRA患者関節滑膜と変形性関節症(OA)関節滑膜を対象として、RA患者で特異的に発現している遺伝子の候補を同定する。候補遺伝子の選別にはDNAマイクロアレイ法、In-gel competitive reassociation (IGCR)法を主に使用し、必要により他の方法を併用する。得られた候補遺伝子のRAとOA関節滑膜における発現の差を定量的に検討すると共に、SNP多型の存在の有無を調査し、SNP多型が存在する場合には多型と疾患感受性との関連を明らかにする。さらに、候補遺伝子の機能解析を行いRAの発症機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) IGCR法の確立。IGCR法はサブトラクション法の改良法であり、2つの検体よりのcDNAを制限酵素で消化し、アダプターを連結する。これを混合し、ゲルに泳動してゲル内で変性と再結合を行わせる。ゲルから逆に泳動させ、テストアアダプター特異的なPCRをかけることによって、テストcDNAに特異的な遺伝子を増幅させる。IGCR法はゲノム遺伝子の比較に利用され新しい方法であるが、これをcDNAの比較に応用する系を確立する。
- 2) IGCR法によりRA関節滑膜とOA関節滑膜での遺伝子発現の比較を行う。
- 3) IGCR法により一方がRAを発症し、他方が正常の一卵性双生児よりの末梢血を用いてゲノム遺伝子、cDNAそれぞれについてサブトラクションを行う。
- 4) DNAマイクロアレイ法を用いて同様の比較を行う。
- 5) 得られた候補遺伝子についてリアルタイムPCR法によりそれぞれ20検体以上のRAおよびOA患者由来関節滑膜間で遺伝子発現の比較を行う。

〈研究期間の成果〉

- 1) Differential display PCR法により、RA滑膜に高発現している遺伝子候補としてtristetraprolin(TTP)をすでにあげていたが、リアルタイムPCR法により、RA関節滑膜24検体、OA関節滑膜21検体で遺伝子発現を比較したところ、RA関節滑膜で発現が有意に高度であった。さらに、TNF α の遺伝子発現に比較してTTPの遺伝子発現が低い患者ではCRPが高い傾向が見られ、TTP遺伝子発現とRAの活動性との間に関連があることが示唆された。また、TTP遺伝子をJurkat T細胞に導入しTNF α のmRNA量が減少することを確認した。さらにTTP遺伝子のプロモーター領域に1塩基多型1部位の存在を確認し、臨床症状等との関連を検討中である。
- 2) IGCR法により、二つの組織間の遺伝子発現のサブトラクションを行い、一方の組織で発現が亢進していると思われる遺伝子を選別することが可能となった。
- 3) IGCR法により、RA患者関節滑膜とOA患者関節滑膜の

遺伝子発現を比較した。OA由来cDNAをドライバー、RA由来cDNAをテスターとしてサブトラクションを実施した結果得られたライブラリーのうち、300bp以上のものをクローニングし、70個についてシーケンスを行った。その結果、cartilage acidic protein 1, laminin receptor 1, eukaryotic translation elongation factor 1 gamma など33個の既知の遺伝子、6個の未知の遺伝子を確認した。

4) 一方がRAであり、他方が健常である一卵性双生児2組の末梢血由来血球細胞より、ゲノムDNA、cDNAを作成し、それぞれIGCR法によりサブトラクションを行った。ゲノムDNA間の比較では明確な差異は認められなかった。一方、cDNA間の比較では、CXCR4などの発現増強が示唆された。

5) DNAアレイ法にて同様の検討を行い、RA滑膜で発現の亢進が示唆される遺伝子を検出しその解析を行っている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

TTPノックアウトマウスがRA様の関節炎を発症することが知られていたが、RA患者におけるTTP遺伝子発現の報告は初めてである。TTPをはじめとしたmRNA結合蛋白がTNF α 産生、ひいてはRAの病勢を左右している可能性が考えられ、今後RAの病態の理解、さらには治療法の開発に繋がることが期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

一卵性双生児のゲノムDNA比較ではIGCR法で差があると思われた遺伝子もシーケンスを行ったところ差は認められなかった。cDNA比較にても予想外の遺伝子の発現亢進といった結果は得られていない。

〈今後の課題〉

DNAアレイ法で多数の候補遺伝子が得られており、RA患者における発現の測定および機能解析を行う予定である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) Tsutsumi A, Suzuki E, (7名省略), Sumida T. Expression of tristetraprolin (G0S24) mRNA, a regulator of TNF- α production, in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 31:1044-1049, 2004
- 2) Tomoo T, Tsutsumi A, Yasukochi T, (7名省略), Sumida T. Analysis of abnormally expressed genes in synovium from patients with rheumatoid arthritis using a column gel electrophoresis-coupled subtractive hybridization technique. *International Journal of Molecular Medicine* 15:453-457, 2005
- 3) Suzuki E, Tsutsumi A, (7名省略), Sumida T. Gene transduction of tristetraprolin or its active domain reduces TNF α production by Jurkat T cells. *International Journal of Molecular Medicine* (in press)