

全身性エリテマトーデス患者におけるDNA多型の解析

●橋本博史

順天堂大学医学部膠原病内科

〈研究の目的と進め方〉

(I) 全身性エリテマトーデス(SLE)の疾患感受性候補遺伝子を明らかにし、遺伝子多型と各種病態との関連を明らかにすることにより、SLEの複雑な病態の解明につなげる。

(II) SLEの臨床像は不均一性を示し、前景にたつ臨床病態や患者個々により治療に対する反応性と予後が異なる事が知られている。そこでSLEの治療効果や予後に関連する可能性がある遺伝子多型について解析する。

〈研究開始時の研究計画〉

1) 当大学通院加療中のSLE患者に、当大学倫理委員会承認された同意書を用いた綿密なインフォームドコンセントを行い、約300症例のDNA検体を採取する。

2) 採取された検体を用いて下記の解析を行う。

(1) 候補遺伝子を設定したcase-control studyで疾患感受性候補遺伝子、SLEの治療効果や予後を左右する遺伝子について解析を行う(疾患感受性候補遺伝子の関連解析は、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室徳永等と共同で解析する)。検出された疾患候補遺伝子についてはSLEの母親から出生した児のDNA検体で確認、検討する。

(2) SLEモデルマウスやヒトのゲノムワイド連鎖解析により連鎖が認められたSLE疾患感受性候補領域が多数存在する第一染色体において、東海大学猪子等が設定した高密度マイクロサテライトマーカー(第一染色体上に1615個設定)を用いた相関解析により感受性候補領域を100kb程度まで絞り込む。絞り込んだ各感受性候補領域について、候補領域内に存在するsingle nucleotide polymorphism(SNP)マーカーを用いて相関解析・ハプロタイプ解析を行い、疾患感受性候補遺伝子を検出する。検出された候補遺伝子について、発現および機能解析を施行し疾患感受性遺伝子を同定する。

〈研究期間の成果〉

(1) 疾患候補遺伝子を設定したcase-control study になる疾患候補遺伝子、SLEの治療効果や予後を左右する遺伝子の同定

①マウスにおけるSLEとの関連が注目を集めているBcell maturation antigen(BCMA)について、多型解析を行ったが、多数の多型部位を検出したものの、有意差は得られなかった。(公表論文.1)

②B細胞のco-receptor complexの構成要素であり、B細胞受容体からの伝達を増強する分子であるCD19の変異解析を行い、3'非翻訳領域に位置するGTリピート多型がSLEと関連することが判明した。(公表論文.3)

③B細胞と単球に発現する抑制型受容体であり、自己免疫モデルマウスにおいてその重要性が確立した、Fc γ R2Bの膜貫領域にアミノ酸置換を伴う多型を検出し、SLEとの関連をみいだした。(公表論文.4)

④SLE患者及び健常人のDNAを用いて、GR遺伝子の全

coding領域(一部intronも含む)においてprimer及びPCR条件を設定し、当施設が現有するApplied Biosystems ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems /HITACHI 3100 Genetic Analyzerを用いてdirect sequenceを行い、6箇所のSNPs(Exon 4 箇所、intron 2 箇所)を検出した。さらにそれらのハプロタイプとSLEとの関連について検討し、SLEと関連を認めるハプロタイプ、ある病態(抗Sm抗体陽性、腎症)との関連を認めるハプロタイプを検出した。

(2) 高密度マイクロサテライトマーカーをもちた第一染色体における疾患感受性候補遺伝子の同定

マイクロサテライトマーカーを用いたスクリーニングにより、1番染色体上に3箇所の疾患感受性候補領域を見出した。このうち1q41における候補領域の近傍に存在する遺伝子について、SNPマーカーを設定しさらに検討を行った結果、イントロン部分に存在するSNPにおいて患者群と健常者群間で多型頻度に有意差を認めた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

(1) 疾患候補遺伝子を設定したcase-control studyによる疾患候補遺伝子SLEの治療効果や予後を左右する因子の同定

Fc γ ファミリーのうち、従来SLEの疾患感受性遺伝子はFc γ R3Bと考えられていた。本研究で東京大学との共同研究で検出したFc γ R2Bの膜貫領域のアミノ酸置換を伴う多型は、Fc γ R3Bとの関連より顕著であった。3Bとの関連は2Bとの連鎖不平衡によって説明可能であり、Fc γ R2B Fが1q22-23における一義的な疾患感受性遺伝子である可能性が示唆された。

ステロイド治療反応性に関与する要因として、ステロイド吸収効率、ステロイド代謝酵素活性、ステロイド感受性を左右する因子では、シャペロン(HSP)、転写因子、コアクチベーターの異常に加え、GR多型などが挙げられ。これまでにGR多型とステロイド抵抗性や感受性についてのいくつかの報告があるが、多型と機能解析の報告はない。また臨床的には気管支喘息や潰瘍性大腸炎でGRとステロイド抵抗性の報告があるが、膠原病での報告はほとんどない。本研究で検出したDNA多型がGR発現、機能に関与していれば、今後、SLE治療指針や予後の判定において重要なマーカーとなりえる。

(2) 高密度マイクロサテライトマーカーをもちた第一染色体における疾患感受性候補遺伝子の同定

SLE疾患感受性遺伝子候補領域は、全世界で5つのグループにより罹患同胞対や多発大家系を対象としたgenome-wide linkage analysisにより、多数の領域が報告されているが、いまだに真の疾患感受性遺伝子は同定されていない。その理由のひとつとして、ゲノム全域について網羅的に解析できる利点があるが、解像度と検出力が低く、SLEのような多因子疾患の感受性遺伝子を遺伝子効果の弱いものまで含めて検出することは比較的困難であることが考えられる。しかしながら、第1染色体を

はじめとするいくつかの染色体上領域は、複数のグループにより重複して報告されていることから、これらの染色体上に疾患感受性遺伝子が存在している可能性が非常に高い。

本研究では、上述の第一染色体に焦点を絞り、その染色体上に高密度に多型マイクロサテライトマーカーを設定し解析を行っており、新たな疾患感受性候補領域が同定される可能性が非常に高いと考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

SLEの母親から出生した児から採取したDNAを用いた疾患感受性候補遺伝子の確認については、現在DNAサンプルを採取中であり、今後検討予定である。

〈今後の課題〉

(1) SLE疾患感受性遺伝子の同定

本研究で用いた高密度マイクロサテライトマーカーによる疾患感受性候補遺伝子の同定法で検出された1q41近傍のSNPについて機能解析を行う。

(2) SLEの治療効果や予後を左右する因子の同定

①検出したGRハプロタイプとステロイド反応性を検討する為に、SLE患者を臨床所見と検査データをもとに、治療有効群と治療抵抗群に分類し、GRハプロタイプとの関連解析を行い、ステロイド反応性に関連するハプロタイプを同定する。次にGR遺伝子のpromoter領域について、coding領域と同様の多型解析を行う。もし多型が検出された場合には、coding領域のSNPsとの連鎖不平衡について検討する。

②Intron領域に検出したSNPとGRの発現量への影響について、レポーター遺伝子を用いたアッセイ法により解析する。Promoter領域にSNPを検出した場合には、上記と同様の解析を行う。Exon領域に検出したSNPとステロイド結合能への影響について、wild typeとMutantのDNAを各々COS細胞にトランスフェクションし、³HラベルしたDexamethasoneを用いた binding assayを行い、検討する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 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.
2. 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.
3. Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossmann JM, Fukazawa T, Hagiwara K, Kano H, Takazoe M, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of CD19 polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun* 3 : 424-429, 2002.
4. Kuroki K, Tsuchiya N, Tsao BP, Grossmann JM, Fukazawa T, Hagiwara K, Kano H, Takazoe M, Iwata T, Hashimoto H, Tokunaga K. Association of FC γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus : independent contributions of FCGR2B and FCGR3A. *Arthritis Rheum* 46 : 1242-1254, 2002.