

# 全身性エリテマトーデスの遺伝素因におけるI型インターフェロン制御系分子群の役割

●土屋 尚之<sup>1)</sup> ◆本田 善一郎<sup>2)</sup> ◆古川 宏<sup>3)</sup> ◆伊藤 健司<sup>4)</sup>

1) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 2) 東京大学大学院医学系研究科 3) 東北大学大学院医学系研究科 4) 国立国際医療センター

## <研究の目的と進め方>

全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus, SLE)は発症に遺伝素因が少なからず関与する多因子疾患である。近年、SLEにおける末梢血網羅的遺伝子発現解析を報告した4グループのすべてから、I型インターフェロン(type I IFN, IFN  $\alpha$  /  $\beta$ )によって誘導される遺伝子の発現上昇が報告された(“IFN signature”)。Type I IFN産生誘導には、ウイルス感染細胞において見られる、RIG-I, TBK1を介する経路と、樹状細胞などの免疫系細胞に見られる、TLR3, 4, 7, 9を介する経路が存在するが、いずれにおいても、IRFファミリー遺伝子群が重要な役割を有する。また、type I IFN産生制御系は十分解明されていないが、IRF2, BDCA-2, NKp44, A20などの分子が関与するとされている。

SLEにおいて何がIFN signatureを誘導しているかは未解明であるが、微生物をはじめとする各種刺激に対するtype I IFN系の過剰応答が、病態上重要な役割を果たすと考えられる。

IRFファミリーをはじめとするtype I IFN誘導系・抑制系遺伝子群の分子多様性は、これまで、十分検討されていないものの、複雑な分子間ネットワークによる制御系であることから、一つの分子の多型やアイソフォームが、分子間相互作用を介して、個体レベルのtype I IFN応答に影響すると想定される。本研究では、type I IFNパスウェイ分子群の多型解析・関連研究により、SLEに対する疾患感受性や臨床病型に関連する遺伝子多型を見出すとともに、それが発現や機能におよぼす影響を検討する。

## <2007年度の研究の当初計画>

近年、type I IFN誘導に関与する転写因子であるinterferon regulatory factor 5 (IRF5)の多型とSLEとの関連が報告され(Sigurdsson et al., 2005)、すでに7報の再現研究で再現性が確認されている。IRF5には、3個所の機能的多型が存在し(intron 1のsplice site、exon 6の10アミノ酸挿入、exon 9のpoly A site)、ヨーロッパ系集団におけるリスクハプロタイプには、それらすべてが含まれていることが、ごく最近示された(Graham et al., 2007, Cunnigame Graham et al., 2007, Kozyrev et al., 2007)。

本年度の研究では、日本人集団におけるSLEとIRF5との関連を検討し、日本人におけるSLE関連ハプロタイプを明らかにし、原因的多型を探るとともに、HapMapデータベースを利用して、関連多型がtype I IFN経路遺伝子発現におよぼす影響を検討する。

また、カスタムアレイ(Golden Gate アッセイ, Illumina)により、type I IFN経路の55遺伝子から選択した384 tag SNPにつき、SLEとの関連の一次スクリーニングを施行する。

さらに、個体におけるSLE発症リスク推定の試みとして、リスク遺伝子型のオッズ比(OR)が1.5以上で、日本人集団を含む複数の独立の研究で再現性が確認されたSLEの疾患感受性遺伝子としてHLA-DRB1\*1501, FCGR2B-232Thr, APRIL(TNFSF13)-

67Gly, IRF5 rs41298401Cを選び、個人における保有リスクアレル数と疾患感受性との関連を検討する。

## <2007年度の成果>

1) ヨーロッパ系集団において関連が報告された、IRF5 intron 1にsplice donor siteを導入するrs2004640 Tアレルは、日本人集団においてもSLEとの関連の傾向が検出された。この結果は、韓国人集団(Shin et al., 2007)における結果ともよく一致し、メタアナリシスの結果、Tアレルがアジア集団においてもSLEと関連することが確認された( $P=8.3 \times 10^{-5}$ , OR=1.31, 95% CI 1.14-1.49)。

2) IRF5 rs2004640の6塩基下流に、ヨーロッパ系集団には見られない多型rs41298401を検出した。rs41298401のGアレルは、SLEに有意に減少していた( $P=0.017$ , OR=0.65, 95% CI: 0.46-0.93)。一方、intron 1に、完全な連鎖不平衡にある2個所のSNP(-4001C>A, rs6953165C>G)が検出された。これらのマイナーアレル頻度は、SLEに有意に増加していた( $P=0.034$ , OR=1.76, 95% CI: 1.04-2.99)。

3) ヨーロッパ系集団においてSLEとの関連が報告されているexon 6のindel, poly A site多型(rs10954213)は、日本人では関連が検出されなかった。

4) 日本人集団とヨーロッパ系集団では連鎖不平衡が異なり、ヨーロッパ系集団におけるリスクハプロタイプは、日本人には検出されないことが明らかになった。一方、rs41298401Gを含むハプロタイプが、日本人におけるSLE抵抗性ハプロタイプとして、新たに同定された。

5) HapMapドナーより樹立されたB細胞株のトランスクリプトームのデータベース(GENEVAR)を利用した解析により、exon 9のpoly A siteを置換するrs10954213と、IRF5自体およびIRF5によって誘導される遺伝子群のmRNA量との間に有意な関連があることが見出された。一方、日本人SLEと関連するintron 1多型についても、STATファミリー、IFNAファミリーを含む複数のtype I IFN遺伝子群のmRNA量と関連することが見出された。

6) IRF5多型と日本人全身性強皮症、関節リウマチ(RA)との関連を示唆するデータが得られた。このことから、IRF5は多数のリウマチ性疾患あるいは自己免疫疾患に共通の感受性遺伝子である可能性が示唆された。

7) Type I IFN関連55遺伝子の384 tag SNPを用いた一次スクリーニングを施行し、データの取得を完了した。現在、順次関連解析を進めているが、これまでに、ヨーロッパ系集団においてSLEおよびRAとの関連がごく最近報告されたSTAT4のrs7574865(Remmers et al., 2007)が、日本人集団においても、SLE, RAと関連することを示すデータが得られ、さらに、いくつか新規の関連を示唆するデータも得られている。

8) SLEおよび健常対照者において、各個体をもつHLA-

*DRB1\*1501*, *FCGR2B-232Thr*, *APRIL (TNFSF13)-67Gly*, *IRF5 rs41298401C* アリル数の総和を比較したところ、SLEにおいて 3.86 +/- 1.08、健常対照群においては 3.30 +/- 0.99 で、SLEに有意に増加していた( $P=0.00005$ )。ロジスティック回帰分析により、1アリルの増加により、OR は 1.68 倍(95%CI 1.29- 2.19,  $P=0.0001$ )上昇することが示された。さらに、5個以上リスクアリルを有する群では、3個である群と比較して、オッズ比は3.48 (1.52-7.93,  $P=0.002$ )であった。

#### <国内外での成果の位置づけ>

ヨーロッパ系集団とアジア系集団における *IRF5* ハプロタイプ構造が著しく異なること、それにもかかわらず、いずれの集団においても SLE との関連が認められることを示したことは、新規の知見であり、SLE における *IRF5* 多型の重要性を示すものであるとともに、複数の機能的多型のうちで、いずれが病態の分子機序を説明するものであるかを特定する上で、重要な知見を与えるものである。

特に、*IRF5* の mRNA 量に直接影響する poly A site の多型ではなく、intron 1 多型が集団を超えて SLE と関連することを示した点は、SLE における *IRF5* の役割を解明する上で、重要な示唆を与える知見と考えられる。

ごく最近、*IRF5* は、ヨーロッパ系集団においても、関節リウマチ、Sjögren 症候群、炎症性腸疾患などとの関連が報告されており、本研究の知見とあわせ、集団を超えて共通の自己免疫疾患感受性遺伝子である可能性が示唆される。

また、HapMap 発現データベースを用いた発現解析法は、多型が存在する位置にかかわらず、トランスクリプトームとの関連を統計的に解析しうる点、疾患感受性多型が影響するパスウェイを細胞レベルで同定しうる点で、汎用性のある、優れた方法である。

Type I IFN パスウェイに注目した 55 遺伝子、384 SNP の解析は、同パスウェイでは、国内外を通じて、過去最大規模である。現在、順次データ解析を進めているが、現時点までに、最近ヨーロッパ系集団において報告された *STAT4* と SLE, RA との関連が、日本人集団においても認められることを見出した。このことから、*STAT4* は、集団を超えたりウマチ性疾患感受性遺伝子であると考えられる。また、新規の関連を示唆する知見も得られており、今後、症例数を増やすとともに、高密度マッピングを施行する。

日本人集団において確立した SLE 感受性遺伝子 4 個におけるリスクアリル数を用いて、ある程度、個体における発症リスクの評価が可能であることが示された。今後、さらに疾患感受性遺伝子を確立し、このモデルに投入することにより、特異度、感度を上昇させていく必要がある。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Golden Gate Assay のカスタムアレイの実験において、遺伝子、tagSNP の選定、アレイの作製、試料の調整、遺伝子型タイピング、データ解析という一連の流れに、予想以上に長い時間を費やした。

#### <今後の課題>

カスタムアレイ解析の結果から、候補遺伝子を抽出し、SLE および健常対照群それぞれ 400-500 例による高密度マッピングを行い、新たな疾患感受性遺伝子を見出し、その分子機構を明らかにする。

われわれを含めた最近の研究により、*IRF5*, *STAT4* は、集団を超えて共通の自己免疫疾患感受性遺伝子であることが示唆さ

れ、創薬の分子標的として期待される。しかし、この知見を創薬に結びつけるためには、今後、分子機構の解明を進める必要がある。

#### <成果公表リスト>

##### 1) 論文/プロシーディング

##### 1. 611231256 (論文)

Tsuchiya, N., Honda Z, Tokunaga, K. Role of B cell inhibitory receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: a negative times a negative makes a positive. *J Hum Genet* 51:741-750 (2006)

##### 2. 702241528 (論文)

Kawasaki A, Tsuchiya N, Ohashi J, Murakami Y, Fukazawa T, Kusaoi M, Matsuta K, Hashimoto H, Tokunaga K. Role of APRIL (TNFSF13) polymorphisms in the susceptibility to systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology*, 46: 776-782 (2007)

##### 3. 702241550 (論文)

Hitomi Y, Tsuchiya N, Hasegawa M, Fujimoto M, Takehara K, Tokunaga K, Sato S. Association of human CD22 gene polymorphism with susceptibility to limited cutaneous systemic sclerosis. *Tissue Antigens*, 69:242-249 (2007)

##### 4. 702241610 (論文)

Tsuchiya N, Kyogoku C, Miyashita R, Kuroki K. Diversity of human immune system multigene families and its implication in the genetic background of rheumatic diseases. *Curr Med Chem*, 14:421-439 (2007)

##### 5. 709051123 (論文)

Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: Genetic studies on type I interferon pathway. *Genes Immun*, 8:445-455 (2007)

##### 6. (印刷中) (論文)

Kawasaki A, Kyogoku C, Ohashi J, Miyashita R, Hikami K, Kusaoi M, Tokunaga K, Takasaki Y, Hashimoto H, Behrens TW, Tsuchiya N. Association of interferon regulatory factor 5 (*IRF5*) polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese: Support for a crucial role of intron 1 polymorphisms. *Arthritis Rheum* (in press)

##### 7. (印刷中) (論文)

Mamegano K, Kuroki K, Miyashita R, Matsuta K, Maenaka K, Colonna M, Ozaki S, Hashimoto H, Takasaki Y, Tokunaga K, Tsuchiya N. Association of *LILRA2 (IL1T1, LIR7)* splice site polymorphism with systemic lupus erythematosus and microscopic polyangiitis. *Genes Immun* (in press)

##### 2) データベース/ソフトウェア

該当なし

<共同研究者> 川崎綾、氷上光輝、伊東郁恵、古賀農人、有波忠雄 (筑波大)、京極千恵子 (神戸大)、宮下リサ、大橋順、徳永勝士 (東大)、草生真規雄、深沢徹、高崎芳成、橋本博史 (順天堂大)。うち、有波忠雄、大橋順は「応用ゲノム」、徳永勝士は「基盤ゲノム」班員である。