

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題名 **Studies on the role of Fc gamma receptor family genes  
in the genetic background of human rheumatic diseases.**

和訳 ヒトリウマチ性疾患の遺伝素因における Fc $\gamma$ 受容体ファミリー  
遺伝子群の役割

指導教官 徳永勝士 教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 12 年 4 月進学  
博士後期課程 国際保健学専攻  
氏名 京極千恵子

研究の背景と目的：ヒト低親和性 Fc $\gamma$ 受容体はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する分子で、IgG の Fc 部位に結合し、種々の免疫応答に関与する。Fc $\gamma$ RIIA、IIB、IIC、IIIA、IIIB の 5 つのファミリーから成り、その遺伝子群 (FCGR2A、2B、2C、3A、3B) はヒト 1 番染色体の 1q23 にクラスターを形成する。これまで、FCGR2A、3A、3B の遺伝子多型と、全身性エリテマトーデス (SLE) や関節リウマチ (RA) などのリウマチ性疾患との関連が様々な集団において研究され、数多くの報告がなされてきた。しかしながらその結果は多様であり、同一集団を対象としてなされた研究でさえも、関連の有無に不一致が生じる場合がある。このような背景から、Fc $\gamma$ R 遺伝子領域に存在する別の遺伝子が本質的な疾患感受性を持っており、これまでに報告のある Fc $\gamma$ R 遺伝子と連鎖不平衡の関係にあるために、見かけ上の関連が検出されている可能性が考えられる。

これまで、FCGR2A-131R/H、3A-176V/F、3B-NA1/2 多型が報告されているが、FCGR2B や 2C に関しては系統的な多型スクリーニングを行ったという報告が無かった。中でも Fc $\gamma$ RIIB は、ヒト Fc $\gamma$ 受容体ファミリーの中で唯一、細胞内領域に ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) を持ち、抑制性のシグナルを伝達するという点で特徴的な性質の受容体である。近年、Fc $\gamma$ RIIb 欠損マウスは自己免疫を発症するということや、自己免疫疾患高感受性マウスの Fc $\gamma$ RIIb プロモーター、イントロン、エクソンに多型が発見され、その自己免疫制御における重要性が認識されてきた。よって、FCGR2B はヒトリウマチ性疾においても重要な候補遺伝子と考えられた。

そこで、今回の研究では、ファミリー遺伝子間の高い相同性から、特異的な PCR 増幅が困難だとされていた FCGR2B 遺伝子の多型スクリーニングを試みることに、検出された多型について SLE、RA 患者、および対照健常者で遺伝子型タイピングを行い、疾患

との関連を検討すること、さらに、同じ対象群において、*FCGR2A*-131R/H、*3A*-176V/F、*3B*-NA1/2 についても遺伝子型を決定し、SLE や RA に本質的な疾患感受性を示す遺伝子がいずれであるかを包括的に検討することを目的とした。

**検体と方法：***FCGR2B* の多型スクリーニングには、75 人の SLE 患者および 94 人の対照健常者の末梢血リンパ球から調整した cDNA を用い、*FCGR2B* 全長を PCR で増幅した産物を PCR-SSCP 法 (PCR-single strand conformation polymorphism method) で解析した。さらに 40 検体の *FCGR2B* cDNA 全長の塩基配列を決定し、SSCP で検出されない多型がある可能性を検討した。検出された多型の遺伝子型を多数検体で決定するため、ゲノム DNA を用い、nested PCR とリアルタイム PCR 装置を用いた蛍光標識プローブハイブリダイゼーション法に基づいたタイピング法を確立した。

解析対象は、東大病院、順天堂大学病院の SLE 患者 193 人 (男性 19 人、女性 174 人、平均年齢  $40.7 \pm 13.7$ )、東大病院、松多内科医院の RA 患者 382 人 (男性 40 人、女性 342 人、平均年齢  $58.8 \pm 11.6$ )、対照健常者 303 人 (男性 167 人、女性 136 人、平均年齢  $35.3 \pm 9.9$ ) である。また、オランダ人健常者 148 人 (男性 90 人、女性 58 人、平均年齢  $37 \pm 16.2$ ) についても解析を行った。

*FCGR2A*-131R/H、*3A*-176V/F、*3B*-NA1/2 の遺伝子型は、それぞれ、PCR-RFLP 法 (PCR-restriction fragment length polymorphism method)、PCR-SSCP 法、PCR-PHFA 法 (PCR-preferential homoduplex formation assay) と PCR-SSP 法 (PCR-sequence specific primers method) を用いて決定した。

疾患との関連の検討には、 $\chi^2$  検定、Fisher の直接検定、Lathrop による遺伝子型相対危険度推定法、Armitage の trend test、二座位解析法などを用い、患者-対照者関連解析を行った。ハプロタイプ頻度や連鎖不平衡パラメーターの推定には EH アルゴリズムを使用した。

## 結果：

### (1) *FCGR2B* の新規の多型

多型スクリーニングの結果、*FCGR2B* の exon 3、exon 4、exon 5 にそれぞれ一ヶ所の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) を検出した。このうち、exon 5 の SNP のみ、Fc $\gamma$ RIIB の膜貫通部位の 232 番目のアミノ酸をイソロイシン (232I) からスレオニン (232T) に置換する非同義置換であったため、この *FCGR2B*-232I/T 多型について解析を行うことにした。

### (2) *FCGR2B*-232I/T の遺伝子型頻度と疾患との関連

対照健常者における *FCGR2B*-232I/T の遺伝子型頻度は、232I/I 60.4%、232I/T 34.3%、232T/T 5.3%であった。これに対し、SLE では 232I/I 54.9%、232I/T 34.2%、232T/T 10.9%、RA では 232I/I 58.6%、232I/T 35.4%、232T/T 6.0%であった。SLE 患者においては、232I

アリル陽性率が有意に減少しており ( $P=0.02$ )、232T/T 遺伝子型は 232I/I に比べオッズ比 (OR) で 2.3 倍 ( $P=0.018$ ) のリスクを示した。一方、RA においては統計学的に有意な関連は見出されなかった。

オランダ人健常者の *FCGR2B*-232I/T の遺伝子型頻度は、232I/I 79.7%、232I/T 19.6%、232T/T 0.7%で、日本人と比べ 232T のアリル頻度が低いことが示された。

### (3) SLE における *FCGR2B* と *FCGR3A* の関連

*FCGR2A*、*FCGR3A*、*FCGR3B* についても遺伝子型を決定した結果、このうち *FCGR3A* にのみ有意な関連が示された。SLE 患者で 176F アリル陽性率が有意に増加しており ( $P=0.03$ )、176F/F 遺伝子型は 176V/V に比べ OR で 2.8 倍 ( $P=0.016$ ) のリスクを示した。対照群の遺伝子型頻度を、ハーディーワインバグ平衡に適應するように補正した解析法である遺伝子型相対危険度推定法によると、*FCGR2B*-232T/T の関連はさらに強く検出されたものの (OR : 2.35,  $P=0.002$ )、*FCGR3A* では 176V/V に弱い疾患抵抗性の効果が見られるのみであった (OR : 0.4,  $P=0.016$ )。

二座位解析法を試みた結果、*FCGR2B*-232T/T (OR : 2.2,  $P=0.02$ ) と *FCGR3A*-176F (OR : 2.4,  $P=0.04$ ) は両方とも SLE 疾患感受性を示し、両者を共に持つことにより、さらにリスクが高まることが示された (OR : 4.6,  $P=0.003$ )。4 つの *FCGR* 遺伝子のアリル間には連鎖不平衡の関係があること、また二座位解析法の結果から、以前日本人 SLE で検出されていた *FCGR3B*-NA2 の関連は、*FCGR2B*-232T と非常に強い連鎖不平衡があるために検出された二次的なものであることが示された。

SLE の臨床症状別に関連解析を行ったところ、腎炎発症患者では *FCGR2B* の関連が最も強く検出され、発症年齢 20 歳以下および抗 dsDNA 抗体陽性患者においては *FCGR3A* が有意な関連を示した。

### (4) RA における *FCGR3A* の関連

全対象群の解析では、*FCGR2B* も含めたいずれの *FCGRs* にも有意な関連は検出されなかった。次に、すでに様々な集団での研究によって確立された RA 疾患感受性因子である *HLA-DRB1* shared epitope (SE) を持つかどうかでクラス分けした解析をおこなった。その結果、SE 陽性患者・対照者の比較において、*FCGR3A*-176V/F に有意な関連が検出され ( $P=0.03$ )、SE 陽性の RA 患者で 176F/F が有意に増加していることが示された ( $P=0.009$ )。SE 陽性で 176F/F 遺伝子型を持たない場合の OR は 2.71 なのに対し、SE 陽性で 176F/F を持つ場合は OR が 4.84 に増加した。このような関連は、SE 陰性群の比較においてはみられなかった。

考察：

#### (1) *FCGR2B* の多型

*FCGR* 遺伝子群は、互いに非常に高い相同性を示すため、多型スクリーニングには慎重な

取り組みが必要とされたが、本研究では新規に *FCGR2B* の多型を発見した。この多型の 232T アリル頻度は、日本人では 22.4%、オランダ人では 10.5%であったことから、Caucasian においては比較的稀な多型でことが考えられた。

### (2) 日本人 SLE における *FCGR* 遺伝子群の役割

*FCGR2B* と *3A* の両方が、日本人 SLE の疾患感受性の危険因子であることが示され、さらにその関連は *FCGR2B* ほうが *3A* より強いことが示唆された。*FCGR3A* の関連は、これまでの報告と一致し、176V より IgG1、3 に対する親和性が弱い 176F アリルが疾患のリスク上昇と関連を示した。これまでのいくつかの報告で、*FCGR2A* と腎炎との関連が示されているが、日本人においては *2B* が腎炎、もしくはより重症度の高い SLE と関連している可能性がある。*FCGR2B-232I/T* に関しては、アリル間の機能的な差についての検討が必須であり、現在進行中である。

### (3) 日本人 RA における *FCGR* 遺伝子群の役割

SE 陽性群において、*FCGR3A* の RA 疾患感受性への関連が検出され、*HLA-DRB1* と *FCGR3A* 遺伝子間に遺伝的な相互作用があることが示唆された。この遺伝的相互作用がどのような分子間相互作用に基づくものかは現時点で不明である。

### (4) リウマチ性疾患における *FCGR* 遺伝子群の関連研究

ヒトリウマチ性疾患の遺伝素因における *Fcγ* 受容体遺伝子群の役割は非常に複雑で、複数の遺伝子が異なった個々の病態にかかわっている可能性がある。また、そのような関連をさらに複雑にしているのは、集団ごとの遺伝的背景の違いである。本研究でも示されたように、多型の遺伝子型頻度のみならず、アリル間にみられる連鎖不平衡の関係についても、集団差がみられる。よって、疾患感受性を示すアリルを検討する際は、様々な集団において、これらのことを配慮した考察が必要であると思われる。

本研究は、いずれの *Fcγ* 受容体ファミリーが日本人 SLE、RA において、疾患感受性を示すかを検討したものであるが、検討対象の遺伝子は *FCGR2A*、*3A*、*3B* に、新規の多型を見出した *FCGR2B* を加えた 4 遺伝子であった。SLE における *FCGR2B-232I/T* の関連は、これまでの矛盾する関連解析の結果を説明しうる可能性があるものが、そのためにはこの多型の機能的な特徴を明確に示す必要がある。この他にも 1q23 には *FCGR2C* や、最近新たに発見されたイムノグロブリンスーパーファミリーが存在する。よって、本研究で検出された遺伝子のアリルと連鎖不平衡にある、別の遺伝子のアリルが本質的に重要である可能性も否定できない。今後は、*FCGR2B* 多型の機能的解析とともに、さらに候補遺伝子を広げた関連研究が必要である。