

[論文内容の要旨]

論文題目: Association of Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor (*LILR*) Family Gene with Rheumatic Diseases

和訳: リウマチ性疾患感受性における *LILR* ファミリー遺伝子群多型の役割

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 13 年 4 月進学

博士後期課程

国際保健学専攻

氏名: 黒木 喜美子

ヒト染色体 19q13.4 は leukocyte receptor complex/cluster(LRC)として知られ、Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR) 遺伝子群をはじめ、killer cell immunoglobulin-like receptor(KIR) 遺伝子群、FCAR 遺伝子を含む、免疫系で重要な役割を担っていると予想される免疫グロブリン様受容体ファミリー遺伝子群がクラスターを形成して存在している領域である。また、LRC は、白人、アイランド人を対象としたゲノムワイドスクリーニングにより全身性エリテマトーデス(SLE)感受性遺伝子候補領域のひとつとして示唆されている。KIR ファミリーは、各遺伝子座の有無によって遺伝子数の多様性が存在し、約 150kb にわたって主要なハプロタイプを形成している。LILR 遺伝子、蛋白についてはまだ不明な点が多いが、抗原提示細胞を中心とした血球系の細胞に広く分布しており、その遺伝子構造から抑制型、活性型、分泌型に分類されることが知られている。LILRB1, LILRB2, LILRA1 分子はリガンドとして HLA クラス I 分子やヒトサイトメガロウィルス UL18 タンパクと結合することが報告されている。LILR 遺伝子のマウスホモログ paired immunoglobulin-like receptor(PIR)にも活性型 Pira、抑制型 Pirb が存在し、抑制型の Pirb 遺伝子欠損マウスでは B 細胞の異常活性化や Th2 反応の増強が観察されている。今回、これらの機能的、位置的重要性から、LILR ファミリー遺伝子群をリウマチ性疾患の感受性候補遺伝子と考え、系統的な多型解析とともに、関節リウマチ(RA)、SLE を対象とした関連研究を行った。

まず、既に発現、機能等の解析が行われていた抑制性受容体 LILRB1 遺伝子について解析を行った。日本人 18 例の多型スクリーニングにより、5 箇所の非同義置換(P68L、A93T、I142T、S155I、E625K)を含む 17 箇所の一塩基多型(SNPs)を検出した。検出された多型部位について日本人 31 家系、118 例を用いた検討から、これらの SNP のうち遺伝子上流側に位置する 12SNPs は日本人において3つの主要なハ

プロタイプを形成していることが見いだされた。これらを家系両親 124 ハプロタイプにおける頻度の高い順に、暫定的に、LILRB1.EC01、.EC02、.EC03 と命名した。これらのハプロタイプは機能的重要性が予想される細胞外領域の 4 箇所のアミノ酸配列の組み合わせが異なり、そのうち LILRB1.EC01 は 3 箇所では他2つのハプロタイプと異なる配列を有していた。次に、決定したハプロタイプは日本人において保存されているものと仮定した上で、各ハプロタイプを代表するタグ SNPs を用いたタイピング法を確立し、RA 患者 559 例、SLE 患者 172 例、健常対照者 409 例を対象とした関連研究を行った。その結果、RA、SLE 群全体では健常群と比較して有意な差は認められなかった。しかし、LILRB1 ハプロタイプと RA との関連を、複数集団において RA 感受性遺伝要因として確立している HLA-DRB1 shared epitope(SE)を持つ群と持たない群に層別化して解析を行ったところ、SE を持たない RA 患者群と SE を持たない健常群の比較においてのみ LILRB1.EC01/.EC01 ディプロタイプ頻度の有意な増加が認められた ( $P=0.037$ 、 $OR=1.86$ )。一方、SE 陽性群同士の比較では差が認められなかった ( $P=0.91$ )。この結果から、LILRB1 は、特に SE 陰性群における RA 感受性遺伝子である可能性が示唆された。SLE と LILRB1 との有意な関連は認められなかった。また、LILRB1 遺伝子領域内において、有意な連鎖不平衡が認められた。

以上の結果から、検出された LILRB1 多型と RA との有意な関連は、LILRB1 と連鎖不平衡にある他の近傍の遺伝子によるものである可能性も考えられた。そのため、次に LILRB1 に隣接して存在する LILRA1、LILRB4 遺伝子について、同様に多型解析、関連研究を行った。LILRA1 遺伝子は LILRB1 遺伝子から約 30kb セントロメア側に位置する活性型受容体である。多型スクリーニングの結果、8 箇所の非同義置換(V5L, R12G, H164Y, S194W, L220P, R289P, Y291H, Y301H)を含む計 24 箇所の SNPs が検出された。LILRB1 と同様に、日本人 31 家系を用いた検討を行ったところ、プロモーター領域から細胞外領域内に位置する 14SNPs は、日本人において主要な 2 種のハプロタイプを形成することが見出された。それぞれのハプロタイプを、家系内両親における頻度の高いほうから暫定的に、LILRA1.01、LILRA1.02 と命名した。家系両親 124 ハプロタイプのうち、4 例がそれぞれ上記ハプロタイプ以外の異なるハプロタイプを有していたが、RA、SLE を対象とした関連研究は、2 種のハプロタイプが保存されていると仮定した上で行った。その結果、マイナーハプロタイプ LILRA1.02 陽性率の SLE における有意な減少が見出された ( $P=0.02$ 、 $OR=0.64$ )。一方、RA との有意な関連は、RA 群全体でも、LILRB1 ハプロタイプで有意な関連が検出された HLA-DRB1 SE 陰性群においても認められなかった。また、LILRB1 遺伝子内に認められた連鎖不平衡が LILRA1 遺伝子にも及ぶか否か検討したところ、LILRB1、LILRA1 遺伝子内に比べると弱いものの、LILRB1 多型と LILRA1 多型の間でも有意な連鎖不平衡が認められた。

最後に、LILRB1 遺伝子から約 25kb テロメア側に位置している抑制性受容体、

LILRB4について解析を行った。多型スクリーニングにより、7箇所の非同義置換(F5L, R18S, G223D, R317G, N335D, R347W, Q414R)、一箇所の7bp欠失を含む計29箇所の多型が検出された。日本人31家系を用いて解析を行った結果、LILRB1、LILRA1遺伝子とは対照的に、LILRB4多型は互いに強い連鎖不平衡を示さず、各アレル頻度も異なっていたため、日本人における主要なハプロタイプを決定できなかった。ゆえに、RA、SLEを対象とした関連研究は、機能的に重要であると予想されるプロモーター領域内多型、UTR内多型、翻訳領域内の多型について行った。方法としては、まず一次スクリーニングをRA192例、SLE96例、健常群197例を用いて行い、カイ二乗検定によりP値0.06以下を示した多型についてさらにサンプル数を増やして疾患との関連の有無を検討した。その結果、最終的にプロモーター領域内に位置する-965G>A多型、Gアレル頻度のRA群における有意な増加(P=0.0005, OR=1.60)と5'UTR内のc.-306C>T多型、TアレルのSLE群における有意な減少(P=0.005, OR=0.37)が検出された。

以上のように、3つの遺伝子の解析を行った結果、複数のLILR遺伝子多型がRA、SLE各疾患と有意な関連を示した。また、RAと有意な関連を示したLILRB1.EC01/.EC01とLILRB4-965G間、SLEと有意な関連を示したLILRA1.02とLILRB4c.-306T間にはそれぞれ有意な連鎖不平衡が認められた。そのため、それぞれの多型部位で検出された疾患との有意な関連が、遺伝的に独立なものか、遺伝子間の連鎖不平衡により二次的にもたらされるものか、遺伝子座間関連解析により検討した。その結果、LILRB4-965Gは独立にRA感受性に関与し、LILRB1.EC01/.EC01もまたその可能性が高いことが示唆された。一方、SLE感受性においては、LILRB4c.-306Tが一義的な感受性遺伝子でありLILRA1.02との関連は連鎖不平衡による二次的なものであることが示唆された。

以上の結果より、LILR遺伝子ファミリーは機能的変化を伴うと予想される多型を多数保持しており、また複数のファミリー遺伝子にわたって有意な連鎖不平衡が認められることが見いだされた。一部のLILR分子が、多型性の高いHLAクラスI分子をリガンドとすることから、機能的な相互作用と多型との関連も重要であることが予想される。また、今回複数のLILRファミリー遺伝子多型がリュウマチ性疾患の感受性に関与している可能性が示唆された。今後、更なるLILRファミリー遺伝子群の検討により、LILRファミリー多型と疾患との関連を明らかにするとともに、それぞれの関連が独立であるか否かの検討が必要である。また、今回疾患との有意な関連が見られたLILRハプロタイプの機能的変化について、リガンドとの結合能の変化とともに発現量の変化の有無について検討中である。