

論文の内容の要旨

論文題目 関節リウマチ感受性遺伝子 *FcRH3* の同定
指導教官 山本一彦 教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 13 年 4 月入学
医学博士課程
内科学アレルギーリウマチ学専攻
氏名 高地 雄太

< 緒言 >

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は全身の関節炎および骨破壊をきたす原因不明の自己免疫性疾患である。疫学的研究から、環境因子と複数の遺伝素因の集積によって発症する多因子疾患であると考えられている。RA 感受性遺伝子探索のため、多くの連鎖解析や関連解析が行われてきたが、人種を超えた共通の RA 感受性遺伝子として繰り返し同定されてきたのが *HLA-DR* 遺伝子の多型である。DR 抗原のサブタイプを規定しているのはその β 鎖をコードする *HLA-DRB1* の多型であるが、コーカシアンでは *DRB1*0401*, **0404*, 日本人では **0405*, ユダヤ人では **0101* が RA 感受性と関連することが報告されている。これらの RA 感受性対立遺伝子は、抗原ペプチドが結合する部位 (第 70~74 残基) に共通のアミノ酸配列を持つため、この共通配列が RA 発症に関与しているとの仮説が提唱された (shared epitope 仮説)。 *HLA-DR* 多型は RA 遺伝素因のおよそ 1/3 を占めると推定されるが、家系連鎖解析では、 *HLA-DR* 以外にも、複数の遺伝子が RA 発症に関与していることが明らかにされている。このような、遺伝素因としての HLA 多型と非 HLA 遺伝子多型の組み合わせは、他の多くの自己免疫性疾患においてもみられるが、連鎖解析の候補領域における非 HLA 遺伝子多型の同定は、少数の例外を除いて、必ずしも成功には至っていない。連鎖解析によって絞られるゲノム領域に大きな幅があることと、その疾患への寄与度が、HLA 遺伝子多型のそれと比較して相対的に低いことが解析を困難にしている要因である。

非 HLA 感受性遺伝子探索の別の試みとして、動物の自己免疫性疾患モデルにおける遺伝解析も行われてきた。これらモデル動物における連鎖解析によって明らかにされた候補領域を、ヒト自己免疫性疾患の家系連鎖解析の結果と合わせて解析することにより、ゲノム上のいくつかの領域に、感受性遺伝子座が重複して存在することが明らかにされた。このことは、異なった疾患の間のみならず、ヒト・動物モデル間でも、共通の感受性遺伝子が存在することを示唆する。1 番染色体長腕 21-23 領域 (1q21-23) は、このような重複して遺伝子座の存在する候補領域の一つである。1q23 に存在する *Fcγ Receptors* (*FcγRs*) は、この領域における有力な候補遺伝子であり、その多型は、RA や全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) の感受性との関連が報告されている。最近、1q21 領域に、*FcγR* 遺伝子と相同性の高い遺伝子群 *Fc Receptor Homologs* (*FcRHs*) の存在が明らかにされ、B 細胞での特異的な発現が確認された。*FcRH* 遺伝子群が存在する 1q21 領域は、乾癬および多発性硬化症の感受性遺伝子候補領域であると同時に、マウスではコラーゲン誘導性関節炎モデルを含む複数の自己免疫疾患モデルの候補領域である。これらの事実は、1q21-23 において、自己免疫性疾患共通の遺伝素因が存在することを強く示唆する。本研究では、この領域における RA 感受性遺伝子を探索する目的で、一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism; SNP) を用い、ケース・コントロール関連解析を行った。

<対象・方法>

RA 患者 1370 人 (第 1 群 830 人, 第 2 群 540 人), SLE 患者 564 人, 自己免疫性甲状腺疾患 (autoimmune thyroid disease; AITD) 患者 509 人 (バセドウ病患者 351 人, 橋本病患者 158 人), および RA・SLE・AITD に罹患していない対照群 2046 人 (第 1 群 658 人, 第 2 群 636 人, 第 3 群 752 人を対象とし、1q21-23 領域に存在する 507SNP を用いて連鎖不平衡解析および関連解析を行った。

SNPs は、JSNP データベースに登録されているもの、および新規同定したものをを用いた。SNP のジェノタイピングには Invader 法および TaqMan 法を用いた。*HLA-DRB1* のジェノタイピングは SSP-PCR 法およびダイレクト・シーケンス法により行った。*FcRH3* 遺伝子プロモータ領域配列の転写活性は、ルシフェラーゼ・アッセイを用いて評価した。同配列に結合する転写因子の同定にはゲルシフト・アッセイを用いた。正常組織および細胞での *FcRH3* 遺伝子発現の定量は定量的 PCR 法 (TaqMan 法) を用いた。RA 滑膜組織での *FcRH3* 遺伝子発現は、*in situ* ハイブリダイゼーション法により確認した。リウマトイド因子の抗体価は、*FcRH3* のジェノタイプ別に比較した。

<結果>

1q21-23 領域における関連解析

まず、対照群 658 人の 491SNP をジェノタイピングし、この領域の連鎖不平衡の評価をしたところ、110 個の連鎖不平衡ブロックが同定された。次に、RA 患者 94 人について 491SNP のジェノタイピングを行い、対照群と比較したところ、9SNP に RA 感受性と関連する可能性を確認した。これらの SNP については計 830 人の RA 患者のジェノタイピングを行い、患者・対照群でアレル頻度比較をしたところ、*FcRH3* 遺伝子のイントロンに存在する SNP に強い関連を認めた ($P = 1.8 \times 10^{-5}$)。この関連の源を探索するため、*FcRH* 遺伝子群を含む 2 つの連鎖不平衡ブロックについて詳細な評価をした。2 つのブロックに存在した 41SNP について、RA 患者 830 人、対照群 658 人のジェノタイピングを行い、アレル頻度比較をしたところ、関連のピークを *FcRH3* 遺伝子の 4SNP に認めた ($P < 1.0 \times 10^{-4}$)。これら 4SNP において劣性遺伝型式のジェノタイプ比較を行ったところ、最小 P 値はプロモータ領域の SNP (-169C/T) に認めた ($P = 8.5 \times 10^{-7}$; オッズ比 = 2.15; 95%信頼区間 = 1.58-2.93)。

-169 C/T による *FcRH3* 発現制御

FcRH3 プロモータ配列の解析では、-169C/T 周辺配列のうち、RA 感受性アレルである -169C アレルで強い転写増強活性を認めた。また、-169C アレルで NF κ B の強い結合が確認された。健常人の末梢血 B 細胞における *FcRH3* 発現量を定量したところ、疾患感受性アレルを保有する群で高い発現を認めたため、生体内でも -169C/T によって *FcRH3* の発現が制御されていることが考えられた。

FcRH3 の組織での発現

正常組織では、2 次リンパ組織および B 細胞での高発現を認めた。また、末梢血 B 細胞では、CD40 の刺激により発現が誘導された。RA 滑膜では、T 細胞と集塊を形成する B 細胞において高発現を認めた。

-169C/T と自己抗体および *HLA-DR* 多型との関連

RA 患者の活動期のリウマトイド因子抗体価を -169C/T のジェノタイプ別に評価したところ、疾患感受性アレル数で有意に回帰された ($R^2 = 0.049$, $P = 0.0065$)。すなわち、感受性アレルを多く持つほど、活動期の抗体価が高くなることが考えられた。さらに、この多型と *HLA-DR* 多型との関連を検討したところ、shared epitope アレルのホモ・ジェノタイプ群で、疾患感受性アレル (-169C) の頻度が高かった。このことは、*FcRH3* 多型は shared epitope を持つ患者において、より疾患に寄与している可能性を示唆した。

RA (第 2 群)、AITD、SLE での関連解析

RA 患者第 2 群 540 人および対照第 2 群 636 人を用いて -169C/T と RA 感受性の追認関連解析を行った。アレル頻度比較では、-169C 疾患感受性アレル頻度は、RA 患者群において高かった ($P = 0.041$)。さらに、*FcRH3* 多型と他の自

自己免疫性疾患感受性との関連を検討するために、SLE 患者 564 人、AITD 患者 509 人および対照群 2046 人を用いて関連解析を行った。アレル頻度比較では、AITD 患者、SLE 患者ともに、疾患群において RA 感受性多型 (-169C) の頻度が高く、有意な関連を認められた (AITD, $P=0.0000042$; SLE, $P=0.025$)

<考察>

本研究は、*FcRH3* の機能性多型と複数の自己免疫性疾患感受性との関連を同定した。この多型は、感受性アレルにおいて、転写因子 NF κ B の強い結合を認め、*FcRH3* の高発現をもたらす結果として生体における自己抗体の産生を増大し、疾患発症に関与するものと考えられた。疾患感受性アレル頻度が *HLA-DRB1* のジェノタイプと関連していることから、*FcRH3* は、主に HLA クラス II 拘束性の環境下において機能していることが示唆された。また、B 細胞に高発現することから、B 細胞と T 細胞の相互作用の際に関与する分子であることが考えられた。動物モデルでの知見や、B 細胞除去療法が臨床的に有用であるとのことから、自己免疫性疾患における B 細胞の重要性が再認識されている。B 細胞に高発現する *FcRH3* の多型は、B 細胞異常の遺伝的背景の一部を説明する可能性があり、*FcRH3* は自己免疫疾患の病態に深く関与していることが考えられた。

FcRH3 は 2 次リンパ組織の胚中心の明領域において高発現していることが報告されている。明領域ではクローン増殖した B 細胞が選択を受け、抗原レセプターの親和性成熟が起きるが、*FcRH3* はこの過程になんらかの影響を与え、自己応答性クローンの出現に関与している可能性がある。一方、本研究での、RA 滑膜における発現解析では、T 細胞と混合して集塊となった B 細胞での *FcRH3* の高発現を認められたため、RA 滑膜での自己免疫応答においても *FcRH3* の関与していることが考えられた。今後、*FcRH3* のリガンド同定や、下流シグナルの詳細な解析が、自己免疫における *FcRH3* の役割を、明らかにするものと思われる。