

論文の内容の要旨

論文題目 一塩基多型を用いたケース・コントロール関連解析による関節
リウマチ関連遺伝子の探索と同定

氏名 徳 廣 臣 哉

関節リウマチ (rheumatoid arthritis ; RA) は、全身の関節に破壊性の慢性炎症を起こすことを特徴とする自己免疫疾患である。RA には過去の疫学研究より遺伝性が存在することが知られている。これまでに、RA 関連遺伝子は候補遺伝子アプローチやマイクロサテライトマーカーを用いた罹患者対解析により解析されてきたが、*HLA-DRB1* 遺伝子以外には RA 関連遺伝子として確定的な結果が得られたものはなかった。その背景には RA は複数の遺伝子座と環境要因が相互に作用を及ぼし合いながら発病を規定する多因子疾患であり、個々の遺伝子座の遺伝的寄与が大きくないことが考えられる。近年、ヒトゲノム配列の決定に伴い、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism ; SNP) をゲノム上に正確に位置付け、遺伝マーカーとして用いることへの有用性が期待されている。SNP は 1 つの塩基が他の塩基に置き換わったタイプの多型であり、他の多型と比較して圧倒的に数が多く、ゲノム全域に比較的均一に分布していることが特徴である。さらに、SNP を正確で高速にタイピングする技術が開発されたことで体系的遺伝子多型解析を行う素地が整ってきた。本研究において、申請者は、ゲノム上に高密度に存在する SNP を用い、遺伝的寄与の低い遺伝子座を検出することに適した解析法であるケース・コントロール関連解析を行い、RA

関連遺伝子を探索・同定した。

1. 第5番染色体長腕5q31領域の連鎖不平衡分布の確認

第5番染色体長腕5q31領域は、サイトカイン遺伝子などの免疫に関係する遺伝子がクラスターする領域である。また、クローン病や気管支喘息などの炎症性・自己免疫疾患に関連することも示唆されていることから、RAにおいても関連遺伝子の存在が期待された。そこで、5q31領域内のNT_007072.11(NCBI, build31)で示される2.3Mbの範囲を解析対象領域とし、日本人のSNPデータベース(JSNP データベース)より対象領域内に位置する172 SNPsを抽出した。それらのSNPを非疾患群658検体を用いてタイピングし、以下の3つの条件、1) タイピング成功率が90%を超える、2) マイナーアレル頻度が20%を超える、3) Hardy-Weinberg 平衡検定p値が0.01を超えることを満たす、115 SNPsを解析に用いるSNPとして採用した。次に、対象領域の連鎖不平衡(linkage disequilibrium; LD)の分布を解析するために、115 SNPsすべての組み合わせによるpairwise LD index, Δ を算出し、2次元にプロットした。その結果、本領域は $\Delta > 0.5$ で判別すると6つのLDのブロック(block 1-6)に分かれた。

2. ケース・コントロール関連解析

まず、互いにLDの関係が強いSNPは、同じようなジェノタイプ分布を示すことが推測されることから、関連解析を効率化するために115 SNPsを Δ 値($\Delta > 0.97$)によりグループ化した。結果、115 SNPsのうち90 SNPsが18のグループに分類された。各グループから1つ代表SNPを抽出し、ケース・コントロール解析を行った(疾患群: 830 検体, 非疾患群: 658 検体)。その結果、劣性遺伝モデル形式による比較で、強い関連強度を示すSNPを検出した(*slc2F1*; χ^2 値 = 17.1, $p = 0.000034$)。Bonferroniの補正を代表18 SNPsあるいは115 SNPsで行っても、*slc2F1*は統計学的に有意であった。このことから申請者は*slc2F1*の位置するblock 2の領域がRA関連領域であると考えた。

3. RA関連領域block 2の関連解析

block 2は約240kbの範囲に4つの既知遺伝子、*PDZ and LIM domain protein 4 (RIL)*, *solute carrier family 22, member 4 (SLC22A4)*, *SLC22A5*, *interferon regulatory factor 1 (IRF1)*を含む領域である。また、この範囲には115 SNPs中38 SNPsが位

置し、うち 32 SNPs はグループに分類されている。どのグループにも分類されない SNP が 6 個存在したのでそれらの SNP についてケース・コントロール解析を行ったが、RA と関連は示唆されなかった。従って、block 2 の RA との関連は、slc2f1 と同じグループに分類される SNP に由来するものと申請者は考えた。それらの SNP は *SLC22A4*, *A5* の遺伝子領域に分布していたことから、本領域の RA 関連候補遺伝子を *SLC22A4,A5* の 2 遺伝子に絞った。

4. RA 関連遺伝子 *SLC22A4* の同定

SLC22A4, *A5* は、互いにアミノ酸配列で約 76%の相同性をもつ有機カチオントランスポーターをコードする遺伝子である。RA との関わりを推測するために、RA と関係する免疫系の組織・細胞を中心にヒトの組織発現分布を定量的 RT-PCR にて解析した。*SLC22A5* mRNA は腎臓での発現が著しく高いこと、*SLC22A4* mRNA は腎臓でも発現するが、骨髄や末梢血でも発現量が高いことが分かった。また、*SLC22A4* は末梢血 mononuclear 細胞の中では、CD14 陽性細胞で特に発現が高いことが分かった。さらに、RA の主病変部である滑膜組織由来の滑膜線維芽細胞では、炎症性の刺激である TNF α で処理することにより、*SLC22A4* mRNA 発現量は 2 倍程度上昇することが分かった。

コラーゲン誘発関節炎マウス(CIA マウス)は、関節炎モデルマウスとして一般的に用いられている動物モデルである。病態モデルのマウス *Slc22a4* 発現を解析するために、CIA マウスの肢切片を作製し、抗マウス *Slc22a4* 抗体を用いて免疫染色すると、炎症が惹起されている関節部位の浸潤細胞に強い染色性が得られた。一方、抗マウス *Slc22a5* 抗体による染色ではこのような染色性は得られなかった。また、正常マウスの関節には抗マウス *Slc22a4* 抗体による染色性は観察されなかった。ヒト組織での発現分布と CIA モデルの発現解析から、申請者は RA とより関連が推測できる *SLC22A4* を本領域の RA 関連遺伝子として結論付けた。

5. 責任 SNP の探索

申請者は *SLC22A4* 遺伝子領域内に直接 RA と関連を示す SNP (責任 SNP) が存在する可能性を検討し、cSNP が 3 個、5' flanking 領域に 3 個の rSNP を見出したが、これらの SNP は RA との関連が示唆されなかった。イントロン領域にも発現制御領域があることが考えられるため、イントロン 1 内の SNP を解析し

た結果、9 SNPs が slc2F1 と強い LD の関係にあることが分かった。それらの SNP 周辺配列に結合する因子を TRANSFAC データベースにより SNP アレル別に推測したところ、slc2F2 周辺配列では C, T アレルのうち、T アレルで RUNX1 結合コンセンサス配列と 100%の一致を示したが、C アレルでは < 85%しか示さなかった。そこで、slc2F2 周辺配列への結合を Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて解析した結果、slc2F2 の C, T アレルともに結合因子が存在するが、T アレルの方が結合因子との結合度が高く、また、その結合因子は抗 RUNX1 抗体による supershift assay で RUNX1 であることが分かった。さらに、slc2F2 周辺配列の転写活性に与える影響をレポーターアッセイで検証した結果、T, C アレル間で差が認められ、RA 感受性 T アレルで転写活性が低いことが分かった。

6. RUNX1 遺伝子領域内 SNP のケース・コントロール関連解析

RUNX1 は主に血球系の細胞に発現する転写因子であり、血球系細胞の分化・増殖に関与する。最近、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスおよび乾癬の疾患関連遺伝子としても報告されている。RUNX1 遺伝子領域内の SNP についても RA との関連を評価した結果、RUNX1 のイントロン 6 に存在する SNP が RA と関連を示すことが分かった（優性遺伝モデル形式： χ^2 値=12.76, $p=0.00035$ ）。

このように申請者は SNP によるケース・コントロール関連解析により RA 関連遺伝子 *SLC22A4* を同定した。SLC22A4 は免疫系組織、細胞に発現することを明らかにし、また、転写因子 RUNX1 結合配列に位置する RA 関連 SNP を見出した。SLC22A4 の SNP に認められた RA との関連と、その SNP が RUNX1 の結合と転写活性に与える影響から、SLC22A4 の発現量の低下が RA への罹患しやすさをもたらすと推測した。さらに、RUNX1 も RA 関連遺伝子であることを示した。これらの結果は、複数の遺伝子が相互作用を及ぼしあいながら発症に至る RA の遺伝的側面を考察する上で有意義と考えられた。