

論文の内容の要旨

論文題目

関節リウマチと全身性エリテマトーデス共通の感受性遺伝子
*IRF5*の解析

指導教員 山本一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

島根謙一

背 景

代表的な全身性自己免疫疾患である関節リウマチ (RA) と全身性エリテマトーデス (SLE) では、家系解析・双生児解析から遺伝要因が罹患の危険因子であることが想定されてきた。また、SLE の同胞では RA 罹患の相対危険率が 3~5 倍高いことから、これらの 2 疾患の間には共通の遺伝要因が存在することが示唆されている。実際に、これまでの疾患感受性遺伝子の探索により、ヒト白血球抗原 (*HLA*) 遺伝子に加えて、*PTPN22* (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22)や *STAT4* (signal transducer and activator of transcription 4)などの RA と SLE に共通した疾患感受性遺伝子が存在することが明らかになってきた。我々は RA と SLE に共通の感受性遺伝子を探索する目的とし、その候補遺伝子として SLE の有力な感受性遺伝子として報告されている *IRF5* (interferon regulatory factor 5) に注目した。*IRF5* は *IRF* ファミリーに属する転写因子であり、B 細胞、マクロファージや樹状細胞で構成的に発現している。Toll-like receptor のアダプター分子である *MyD88* との相互作用により活性化して核内に移行し、細胞内

でのシグナル伝達に関与する。IRF5 は、SLE で重要なタイプ I インターフェロンのみならず、RA で大きな役割を果たす IL-6 や TNF α といった炎症性サイトカインの誘導にも関与していることから、RA においてもその病態に関与していることが考えられる。IRF5 が SLE の感受性遺伝子であることは多くの報告から支持されているが、RA についてはまだ十分な評価がなされていない。ここで我々は IRF5 の RA 感受性との関連を評価するため、日本人の RA 患者検体を用い、ケース・コントロール関連解析を行った。

また、IRF5 の遺伝子多型の機能解析の結果から、IRF5 の mRNA のスプライシングにかかわる一塩基多型 (SNP) や mRNA 発現量に影響を及ぼすいくつかの多型が、その SLE 感受性に影響していることが示唆されている (表 1)。そこで、これらの多型が IRF5 の mRNA の発現やスプライシングにどのような影響を与えているかを評価するため、日本人由来の細胞株を用いて多型の遺伝子型と IRF5 発現量についてその相関を評価した。

さらに、患者の遺伝的背景や病態の違いにおいて、IRF5 遺伝子多型が果たす役割を評価するため、RA の最大の遺伝要因である HLA-DRB1 多型、および関節破壊の重症化との関連が示唆されている自己抗体である抗 CCP 抗体 (抗環状シトルリン化ペプチド抗体) の有無によって、患者を層別化し、解析を行った。

対象と方法

対象

RA について 2 セットのケース・コントロール関連解析を行った。RA 患者 1,942 人 (第 1 群 830 人、第 2 群 1,112 人)、対照コントロール 1,598 人 (第 1 群 658 人、第 2 群 940 人) の検体を用いた。

ジェノタイピングを行う多型の選択

IRF5 遺伝子領域から、国際 HapMap 計画によって公表されている SNP 情報のうち日本人と中国人のジェノタイピングデータを利用して、網羅的に SNP の抽出を行った。

これらのうち連鎖不平衡状態にある SNP をグループ化し ($r^2 \geq 0.8$)、そのグループを代表する SNP をタグ SNP として選択した。これに SLE と関連が強いと報告された多型も含め、あわせて 14 の SNPs と CGGGG の繰り返し配列の多型 (繰り返し数は 3 または 4) についてジェノタイピングした (図 1)。

ジェノタイピング

SNP については TaqMan 法でジェノタイピングした。CGGGG の繰り返し配列についてはフラグメント解析を実施した。

HLADR-B1 のジェノタイピング

第 1 群 RA 患者を対象に *HLA-DRB1* のジェノタイピングを行った。まず SSP-PCR 法 (sequence-specific primer polymerase chain reaction) により DRB1, DRB2, DRB4, DRB5 の低解像度のタイピングを行った後、DRB1 の増幅産物をダイレクト・シーケンシングにより高解像度のジェノタイピングを行った。*DRB1* アレルは、Shared epitope 仮説に基づき、第 70-74 残基の共通アミノ酸配列 (shared epitope ; SE) の有無によって分類し、*HLA-DRB1**0101, *0401, *0404, *0405, *0410, *1001, *1402, *1406 を、RA 感受性アレル (SE アレル) とした。

IRF5 発現量と遺伝子型との相関

日本人一般集団由来 41 検体のヒト不死化 B 細胞 (Epstein-Barr virus 感染により樹立) より、RNA 抽出、逆転写反応による cDNA の合成を行った。TaqMan 法で定量的 PCR を行い、*IRF5* の主要なスプライシング・バリエーションを検出するプローブと exon 1B をもつバリエーションのみを検出プローブを用いて発現量を測定した。定量は $\Delta \Delta C_t$ 法で行った。多型の遺伝子型を独立変数、遺伝子発現量を説明変数として単回帰分析を行った。

抗CCP抗体の測定

第 2 群 RA 患者を対象に ELISA 法により抗 CCP 抗体価の測定を行った。4.5U/ml 以上を陽性とした。

統計学的解析

SNP のアレル頻度および遺伝子型頻度のケース・コントロール関連解析は、2×2 表における χ^2 検定を用いて行った。オッズ比（以下 OR）の 95%信頼区間（以下 95%CI）の算出には Woolf の方法を用いた。2 つの関連解析の結果の統合（メタアナリシス）には Mantel-Haenszel 法を用い、その結果に対して Bonferroni 法により多重検定の補正を行った。

結 果

IRF5 遺伝子多型とRAとの関連解析

ジェノタイピングした 15 の遺伝子多型のうち、プロモーター領域に存在する rs729302 のみが第 1 群と第 2 群の両方のケース・コントロール関連解析で RA 感受性と有意に関連することが確認された(第 1 群, OR 1.21 [95%CI 1.03-1.43], P=0.021; 第 2 群, OR 1.22 [95%CI 1.06-1.40], P=0.0051) (図 2, 表 2)。そのメタアナリシスの結果では、多重検定の補正後でも有意な関連を認めた(OR 1.22 [95%CI 1.09-1.35], 補正後 P=0.0045)。

IRF5 発現量と遺伝子型との相関

IRF5 総発現量は IRF5 のイントロン 1 の rs3807306 でジェノタイプにより有意に回帰され、最も強い相関を認めた($r=0.389$, $P=0.012$)。exon 1B をもつバリアントの定量的 PCR では、スプライシングに関与する rs2004640 で最も強い相関を認めた($r=0.878$, $P=5.9 \times 10^{-14}$)。IRF5 総発現量は RA 感受性と最も強い関連を示した rs729302 では有意な相関が認められなかった ($r=0.074$, $P=0.65$)。

Shared Epitope (SE) による層別化解析

第 1 群 RA 患者を HLA-DRB1 の SE アレルの有無で層別化したところ、SE 陽性患者に比べ SE 陰性患者で rs729302 は RA 発症に強く寄与することがわかった(SE 陰性 RA 患者, OR 1.50 [95%CI 1.17-1.92], P=0.0013; SE 陽性 RA 患者, OR 1.11, [95%CI 0.93-1.33],

P=0.24)(表 3)。さらに、SE 陽性患者と SE 陰性患者の 2 群間でアレル頻度比較を行った結果、有意差を認めた(P=0.022)。

抗CCP抗体による層別化解析

第 2 群 RA 患者について抗 CCP 抗体の有無で層別化解析をした結果、抗 CCP 抗体陽性 RA 患者に比べ抗 CCP 抗体陰性 RA 患者で、rs729302 は RA 発症に強く寄与することがわかった(抗 CCP 抗体陰性 RA 患者, OR 1.35 [95%CI 1.04-1.75], P=0.024; 抗 CCP 抗体陽性 RA 患者, OR 1.20, [95%CI 1.04-1.38], P=0.015)(表 4)。しかしながら、抗 CCP 抗体陽性患者と抗 CCP 抗体陰性患者との間でのアレル頻度比較では、有意差は認めなかった。

考 察

我々は *IRF5* のプロモーター領域にある SNP (rs729302) で 2 つの独立したケース・コントロールセットで RA 感受性との関連を確認した。他方コーカシアンでは、RA・SLE とともに exon 1 のスプライシングに関与する rs2004640 と強い関連が報告されている。日本人 RA 検体を用いた本研究での関連解析の結果からは rs2004640 と RA 感受性との有意な関連は認めなかったが、その背景として、*IRF5* の疾患感受性には複数の機能的多型が関与していることと、これらの多型間の人種による連鎖不平衡状態の違いが考えられた。

層別化解析により、*HLA-DRB1* SE アレルの RA 患者群では、陽性の患者群より *IRF5* の RA 感受性への寄与が大きいたことが明らかになった。これまで、SE の有無と抗 CCP 抗体の産生が強い相関を示すことが報告されていることから、*IRF5* 多型は SE 陰性患者で抗 CCP 抗体産生を介さない形で、炎症性サイトカインの発現に影響を与えることで RA の病態に関与している可能性が考えられた。

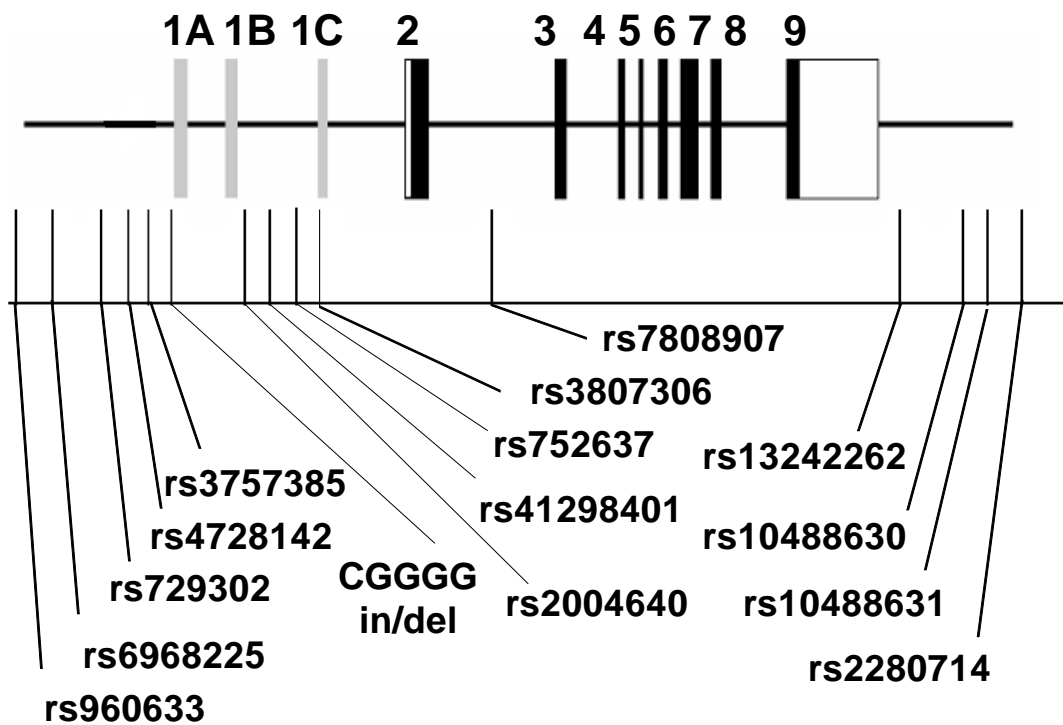
今回の研究を通じて、*IRF5* は SLE と RA 共通の感受性遺伝子であるとともに、日本人とコーカシアンの人種差を超えた疾患感受性遺伝子であることが明らかになった。

表 1. *IRF5* の SLE との関連または機能との関連が報告された遺伝子多型の一覧

多型 (dbSNP number)	遺伝子内での 位置	SLE との関連*		機能との関連
		コーカシアン	日本人	
rs729302	promoter	▲		未知
CGGGG in/del [†]	promoter	▲		mRNA (発現量) の増加
rs2004640	intron 1	○	-	スプライシング
rs41298401	intron 1		○	未知
30bp in/del [†]	exon 6	-	-	アミノ酸配列の挿入/欠失
rs2070197	3' UTR	○		未知
rs10954213	3' UTR	▲	-	mRNA (発現量) の増加
rs10488631	3' flanking	○		未知
rs2280714	3' flanking	-		mRNA (発現量) の増加

* ○は複数の報告で一致して関連が確認されたもの、▲は一部の報告のみでしか関連が確認されていないもの、-は（単独では）有意な関連なし、空欄は未評価。

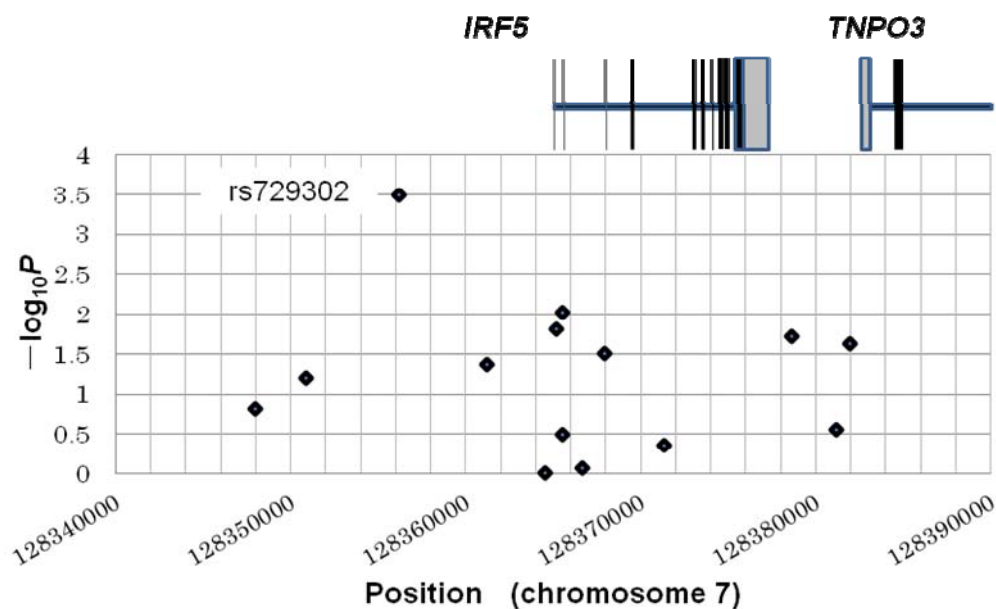
図 1. *IRF5* 遺伝子とジェノタイプングした多型の位置



黒色はエクソン、灰色は非翻訳エクソン、白は非翻訳領域。

この図では各多型やエクソン間の距離について、縮尺は正確ではない。

図 2. *IRF5* 領域の遺伝子多型と RA 感受性との関連解析結果



横軸は染色体 7 番上での位置、縦軸はジェノタイピングした多型におけるメタアナリシスの結果 (P 値) を $-\log_{10}P$ の値で表した. *IRF5* 遺伝子もスケールに合わせて並置した. 遺伝子の図で、灰色は非翻訳領域、黒色はエクソン.

表 2. rs729302 と RA 感受性との関連

dbSNP number	Risk Allele	Sample Set	Allele frequency		OR (95% CI)	P
			Cases	Controls		
			(1st n = 830)	(1st n = 658)		
			(2nd n = 1,112)	(2nd n = 940)		
rs729302	A	Combined*	0.75	0.71	1.22 (1.09-1.35)	0.00032
		1st	0.76	0.72	1.21 (1.03-1.43)	0.021
		2nd	0.74	0.70	1.22 (1.06-1.40)	0.0051

n = 検体数; OR=オッズ比; 95% CI = 95% 信頼区間

* Mantel-Haenszel 法により結果を統合した

表 3. Shared Epitope (SE) による層別化解析

Subjects	Allele frequency (risk allele = A)	OR (95%CI)	P
Controls (n = 658)	0.72	-	-
Cases (n = 830)	0.76	1.21 (1.03-1.43)	0.021
SE (+) (n = 570)	0.74	1.11 (0.93-1.33)	0.24
SE (-) (n = 254)	0.80	1.50 (1.17-1.92)	0.0013

表 4. 抗 CCP 抗体による層別化解析

Subjects	Allele frequency (risk allele = A)	OR (95%CI)	P
Controls (n = 940)	0.70	-	-
Cases (n = 1,112)	0.74	1.22 (1.06-1.40)	0.0051
CCP (+) (n = 917)	0.74	1.20 (1.04-1.38)	0.015
CCP (-) (n = 181)	0.76	1.35 (1.04-1.75)	0.024