

論文の内容の要旨

論文題目 ゲノムワイド関連解析および HLA 領域内ハプロタイプ

解析を用いた関節リウマチ感受性遺伝子の探索

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19年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

岡田 随象

<序文>

関節リウマチ (rheumatoid arthritis; RA) は、多発性関節炎を特徴とし関節および骨破壊をきたす自己免疫性疾患である。疫学的研究により、RA は環境因子と遺伝因子の集積によって生じる多因子疾患であると考えられている。RA の遺伝因子の中で中心的な役割を果たしているのが、ヒトゲノムの6番染色体短腕上 (6p21) の HLA (human leukocyte antigen) 領域であり、なかでも、*HLA-DRB1* 遺伝子と RA 発症・重症化リスクとの関連が報告されている。*HLA-DRB1* 遺伝子と RA 発症機序との関連を説明する因子として、抗シトルリン化ペプチド (CCP) 抗体 (anti-cyclic citrullinated peptide antibody) が指摘されている。抗 CCP 抗体は RA 患者において高い感度・特異度を有し、RA の病態形成に直接的に関与する自己抗体と考えられている。*HLA-DRB1* 遺伝子における RA 感受性は、特定の *HLA-DRB1* アレルが抗 CCP 抗体の産生を促進して抗 CCP 抗体陽性 RA の発症を誘発し、産生された抗 CCP 抗体が関節破壊を引き起こすモデルが考えられている。

HLA-DRB1 以外の HLA 領域内遺伝子が、独立して RA 感受性および抗 CCP 抗体陽転化リスクへ寄与することが示唆されているものの、確定的なコンセンサスは得られていない。その原因として、HLA 領域における連鎖不平衡 (linkage disequilibrium; LD) 構造が他の領域と比較して複雑であり、それに付随する統計学的解析手法の難しさが挙げられている。

本研究においては、日本人 RA 患者集団における抗 CCP 抗体陽転化リスクに関する検討を行った。HLA 領域内に *HLA-DRB1* アレルとは独立したハプロタイプリスクが存在することを、EM

(expectation-maximization) アルゴリズムに基づく最尤法により、遺伝統計学の観点より厳密に検討した。

HLA 領域以外の遺伝子領域に関しても、2000 年代に開始されたゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study; GWAS) を中心に RA 感受性遺伝子の探索が行われている。特に 2007 年に英国の WTCCC (Wellcome Trust Case Control Consortium) が数千人規模のサンプルを用いた大規模なゲノムワイド関連解析を実施して以来、欧米人集団における非 HLA 領域 RA 感受性遺伝子が多数同定されている。日本人集団においては、これまでに *PADI4* (peptidyl arginine deiminase 4)、*FCRL3* (Fc receptor-like 3)、*SLC22A4* (solute carrier family 22, member 4)、*CD244* (cluster of differentiation 244) が非 HLA 領域 RA 感受性遺伝子として同定されているものの、数千人規模のゲノムワイド関連解析は未だ行われていなかった。本研究においては、日本人 RA 患者 2,303 人、コントロール検体 3,380 人を用いたゲノムワイド関連解析により、日本人集団における非 HLA 領域 RA 感受性遺伝子の探索を行った。

<方法>

対象

日本人 RA 患者 7,071 名 (第 1 群 1,389 名、第 2 群 914 名、第 3 群 3,662 名、第 4 群 1,106 名)、コントロール検体 20,739 名 (第 1 群 3,380 名、第 2 群 15,873 名、第 3 群 1,486 名) を対象とした。

抗CCP抗体価測定およびジェノタイピング

第 1 群 RA 患者を対象に MESACUP[®] CCP テスト (医学生物学研究所) を用いた抗 CCP 抗体価の測定、WAKFlow[®] HLA タイピング試薬 (湧永製薬株式会社) を用いた *HLA-DRB1* アレルの高解像度ジェノタイピング (4-digit)、Perlegen Science 社 (Mountain View, CA, USA) および Affymetrix 社 (Santa Clara, CA, USA) が提供する高密度 SNP アレイを用いた HLA 領域内における一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) のジェノタイピングを行った。

第 1 群および第 2 群の RA 患者、第 1 群のコントロール検体を対象に、Illumina HumanHap610-Quad および Illumina HumanHap550v3 Genotyping BeadChip (Illumina, CA, USA) を用いたゲノムワイドの SNP ジェノタイピングを行った。新規に RA の疾患感受性が認められた SNP : rs3093024 に対して追認試験 (replication study) を施行する目的で、第 3 群、第 4 群の RA 患者および第 2 群、第 3 群のコントロール検体におけるジェノタイピングを実施した。第 3 群のコントロール検体におけるジェノタイピングには Illumina HumanHap610-Quad Genotyping BeadChip を、それ以外のサンプルにおけるジェノタイピングには TaqMan 法を採用した。

統計学的解析

①：HLA 領域内における抗 CCP 抗体陽転化リスクの評価

各 SNP における抗 CCP 抗体陽転化リスクを、Cochran-Armitage's trend 検定を用いて評価した。抗 CCP 抗体陽転化リスクを代表する HLA 領域内 SNP の組み合わせを、Forward 型ステップワイズロジスティック回帰を用いて選択した。選択された SNP により構成されるハプロタイプ (SNP ハプロタイプ) に対する頻度推定を行った。SNP ハプロタイプおよび *HLA-DRB1* アレルにおける抗 CCP 抗体陽転化リスクを、アレル型 2×2 分割表に対する χ^2 検定を用いて評価した。SNP ハプロタイプにおける *HLA-DRB1* アレルと独立した抗 CCP 抗体陽転化リスクを、パラメーターとして個々の *HLA-DRB1* アレルのリスクを用いた EM アルゴリズムに基づく最尤法により評価した。

②：ゲノムワイド関連解析

ゲノムワイドの SNP ジェノタイピングが実施された RA 患者およびコントロール検体について、IBD (identity by descent) に基づく第一および第二親等近親者の除外、主成分分析に基づく集団構造化の評価を行った。これらのサンプル単位の Quality Control を施行後、SNP 単位の Quality Control を施行した (コントロール検体内 Hardy-Weinberg 平衡 P 値 $< 10^{-6}$ の SNP、マイナーアレル頻度 < 0.05 の SNP、不適切なクラスタリングが行われていた SNP を除外した)。各 SNP における RA 感受性リスクを Cochran-Armitage's trend 検定を用いて評価した。ゲノムワイド関連解析における有意水準である、 $P < 5.0 \times 10^{-8}$ を満たした SNP を、有意な関連を示した SNP と判定した。関連解析結果における統計量分布の帰無仮説下からの乖離の程度 (inflation) を、Genomic Control 法を用いて評価した。Replication study における rs3093024 の RA 感受性を、Cochran-Armitage's trend 検定を用いて評価した。ゲノムワイド関連解析結果および 2 セットの replication study 結果に対するメタアナリシスを、アレル型 2×2 分割表に対する Mantel-Haenszel 検定を用いて評価した。

<結果>

①：HLA 領域内における抗 CCP 抗体陽転化リスクの評価

1,389 名の RA 患者群のうち、1,117 名 (80.4%) が抗 CCP 抗体陽性、272 名 (19.6%) が陰性であった。34 の *HLA-DRB1* アレルが観測され、*DRB1*0405* における susceptible な抗 CCP 抗体陽転化リスクが有意に認められた (OR = 2.24, 95% confidence interval (95%CI) 1.74-2.88, $P = 2.0 \times 10^{-10}$)。 *HLA-DRB1* アレル群において、抗 CCP 抗体陽転化リスクの有意な heterogeneity が認められた (Shared epitope; SE アレル群 : $P = 0.0095$ 、非 SE アレル群 : $P = 9.8 \times 10^{-9}$)。HLA クラス I、クラス III、クラス II の各領域において、有意な抗 CCP 抗体陽転化リスクを示す SNP が認められた ($P < 0.001$)。

HLA 領域内の抗 CCP 抗体陽転化リスクを代表する SNP の組み合わせを、Forward 型ステップワイズロジスティック回帰を用いて選択した結果、HLA クラス I 領域もしくはクラス II 領域に含まれる、4 個の SNP が選択された (rs9262638、rs7775228、rs4713580、rs9277359)。これら 4 SNP から構成

される 16 通りの SNP ハプロタイプのうち、2 ハプロタイプにおいて有意に susceptible なリスクが、4 ハプロタイプにおいて有意に protective なリスクが認められた ($P < 0.0031$)。SNP ハプロタイプにおける *HLA-DRB1* アレルと独立した抗 CCP 抗体陽転化リスクを評価した結果、CTTC ハプロタイプにおいて有意な susceptible なリスクが認められた。(OR = 2.00, 95%CI 1.44-2.79, $P = 2.6 \times 10^{-5}$)。

②：ゲノムワイド関連解析

得られたジェノタイプデータに対して Quality Control を適用した結果、RA 患者 2,303 名、コントロール検体 3,380 名における、393,217 SNP のジェノタイプデータが得られた。

ゲノムワイド水準 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) を満たす関連のピークを、6 番染色体短腕上の HLA 領域 (6p21) および 6 番染色体長腕上 (6q27) に認めた。前者における最小 P 値は HLA クラス II 領域内の SNP において (rs13192471; OR = 1.97, 95%CI 1.82-2.14, $P = 1.9 \times 10^{-58}$)、後者における最小 P 値は *CCR6* (C-C chemokine receptor type 6) 遺伝子のコーディング領域内に位置する SNP において認められた (rs3093024; OR = 1.27, 95%CI 1.18-1.37, $P = 4.9 \times 10^{-10}$)。RA 患者 4,768 名、コントロール検体 17,359 名で構成される 2 群の RA ケースコントロールコホートにおいて replication study を行った結果、rs3093024 における有意な関連が認められた (replication study 1 : OR = 1.16, 95%CI 1.11-1.22, $P = 6.3 \times 10^{-9}$ 、replication study 2 : OR = 1.18, 95%CI 1.06-1.32, $P = 0.0031$)。ゲノムワイド関連解析および replication study をメタアナリシスにて統合した結果は、OR = 1.19, 95%CI 1.15-1.24, $P = 7.7 \times 10^{-19}$ であった。

<考察>

本研究においては、関連解析を通じて、RA の疾患感受性および病態形成に関与する遺伝因子の探索を行った。HLA 領域におけるハプロタイプ解析においては、特定の SNP ハプロタイプが *HLA-DRB1* アレルと独立した抗 CCP 抗体陽転化リスクを有することを示した。ゲノムワイド関連解析においては、6 番染色体長腕上 (6q27) の *CCR6* 遺伝子の SNP が RA 感受性に寄与することを示した。

HLA 領域におけるハプロタイプ解析においては、二点の新しい知見が得られた。第一点目は、HLA 領域のクラス I、III、II 領域に渡って存在する SNP ハプロタイプが、抗 CCP 抗体陽転化リスクを有する点である。これまで抗 CCP 抗体陽転化リスクに対する *HLA-DRB1* アレルや単 SNP の関連は知られていたが、ハプロタイプに基づく関連は指摘されていなかった。第二点目は、*HLA-DRB1* アレルとは独立した抗 CCP 抗体陽転化リスクを有する SNP ハプロタイプが存在することを、個々の *HLA-DRB1* アレルのリスクを考慮したモデルの導入により、遺伝統計学の観点より厳密に検討し、確認した点である。これまでも *HLA-DRB1* アレルと独立したリスクの存在の評価を試みた先行研究が複数報告されているが、それらの研究は複数の *HLA-DRB1* アレルを一群にまとめた上で行うものであり、*HLA-DRB1* アレルリスクの heterogeneity を考慮できていない点が不十分であった。本研

究においては、個々の *HLA-DRB1* アレルのリスクをパラメーターとして与えた上で EM アルゴリズムに基づく最尤法を導入することにより、上記の問題を解決した。推定された *HLA-DRB1* アレルと独立した抗 CCP 抗体陽転化リスクは 2.00 であり、SE アレル群がもつ抗 CCP 抗体陽転化リスク (= 2.25) に匹敵するものと考えられた。

本研究において実施されたゲノムワイド関連解析は、本邦において 2010 年 10 月現在までに実施・公表されたゲノムワイド関連解析としては、対象疾患を問わず過去最大規模のものであり、新規の RA 感受性遺伝子 *CCR6* の同定を通じて、日本人集団の疾患感受性遺伝子探索におけるゲノムワイド関連解析の有用性を示すものと考えられた。

CCR6 は、ケモカインレセプターファミリーに属する遺伝子であり、ヘルパー T 細胞の一種である Th₁₇ 細胞の表面マーカーである。Th₁₇ 細胞はサイトカインの一種であるインターロイキン-17 (IL-17) の産生を介して自己免疫疾患の発症に関与することが知られており、本研究の成果は Th₁₇ 細胞の RA の病態への関与を含めた今後の研究に貢献するものと考えられた。