

遺伝学手法を用いたヒトゲノムの疾患感受性遺伝子探索
～全身性エリテマトーデス(SLE)の原因解明を目指して～

神戸大学医学部医学科 分子薬理・薬理ゲノム学分野 3年
京極千恵子

序論

全身性エリテマトーデス(SLE : systemic lupus erythematosus)は、慢性的、炎症性の自己免疫疾患で、複数の遺伝的要因と環境要因によって引き起こされる多因子の難病である。本来なら、免疫とは、自分の身を細菌やウイルスなどから守ってくれる大切な役割をしているが、この病気にかかると、この免疫力が自分の体を攻撃するようになり、全身にさまざまな炎症を引き起こす。SLE は皮膚の病変だけでなく、腎臓・脳・血液・心臓・肺などの内臓器官が侵される疾患であり、これらの組織では、ヒストン、DNA、Ro、La といったクロマチン成分に対する自己抗体が作られ、免疫複合体の形成とその沈着が見られる。日本全国に2万人～4万人程の患者がおり、その男女比は1:9で、圧倒的に出産可能年齢の女性に多く起こるため、その原因の一つにホルモンの関与が考えられる。また、紫外線(海水浴、日光浴、スキーなど)、風邪などのウイルス感染、怪我、外科手術、妊娠・出産、ある種の薬剤(ケイ酸やニコチン)などが、病気発症の誘因となることが知られている。根本的な原因は分かっていないものの、双子研究(一卵性双生児で二人とも SLE を発症する一致率は 30%程度、これに対し、二卵性双生児では 5-10%)や SLE 多発家系の研究から、遺伝的要因が大きく関与することが示唆されている。

私はこれまで、SLE にかかりやすくなる原因の遺伝子(これを疾患感受性遺伝子と呼ぶ)を、主に候補遺伝子アプローチを用いて同定して来た。候補遺伝子アプローチとは、以下の4つのステップを伴う、遺伝学的な関連解析手法である。これにより、疾患とある遺伝子の関連性を検定することができ、疾患の本質的な原因遺伝子発見の第一歩となる。

ステップ1) 動物や細胞を用いた実験、またはこれまでの遺伝研究から明らかになっている遺伝学的、機能的知見をもとに、疾患に関連するのではないかと予想される候補遺伝子を選ぶ。

ステップ2) 選出した候補遺伝子に関して、遺伝子の配列中に様々な頻度で存在する単一塩基多型(SNP: single nucleotide polymorphism*)を見つける。

ステップ3) 遺伝子中の SNP 多型の存在を、患者集団(ケース)と健常者集団(コントロール)で調べ、遺伝子型**を決定(タイピング)する。

ステップ4) タイピング結果から、患者と健常者集団間で遺伝子型頻度やアリル頻度に違いがないかどうかを、統計学的手法で検定する(これをケースコントロール関連解析と言う)。

* ヒトゲノムは、A(アデニン)、C(シトシン)、G(グアニン)、T(チミン)の4塩基が並んだ構造をしており、これらの配列の組み合わせが、特定の遺伝子を作っている。SNP とは、本来の塩基配列のうち、ある一箇所の塩基が異なる塩基に置換している状態をいう。ヒトゲノム中には、2本ずつ同じ染色体があるため、どの遺伝子も基本的に2コピー(それぞれを、アリルと言う)存在することになる。その片方だけが SNP 部位で塩基置換する場合(ヘテロ接合体)と、両方が塩基置換している場合(ホモ接合体)がある。また塩基置換により、アミノ酸の置換も伴うもの(非同義置換)と、伴わないもの(同義置換)があり、アミノ酸を変化させるSNPのほうが、機能的な重要性がより示唆される。

** 置換なし、ヘテロで置換、ホモで置換を区別したものが、遺伝子型となる。たとえば、A(アデニン)から C(シトシン)に置換する SNP の場合は、AA、AC、CC の3つの遺伝子型が存在する。

近年進められている国際ハップマッププロジェクトにより、ヒト全ゲノム中の SNP が同定され、またそれらの SNP 間のつながり(これをハプロタイプ構造***と言う)が、白人、黒人、アジア人など人種別に明らかになり、一層効率良く SNP と様々なヒト疾患との関連解析を行う事が可能になった。特に、本研究の特徴の一つでもある、「候補遺伝子アプローチ」と「網羅的な SNP タイピング」を組み合わせた解析は、現在、疾患感受性遺伝子をつきとめる最も有効な先端手法の一つだと考えられる。本研究では、この手法を用いて、SLE の疾患感受性遺伝子の同定に成功した。研究成果の一部は、参考文献にある国際学会誌に報告している。

***異なるゲノム配列部位に2つのSNP ①G→A ②C→T が存在したとして、ある集団においてSNP①のGアリルとSNP②のCアリルが、SNP①のAアリルとSNP②のTアリルが常に一緒に出現する、もしくは一緒に出現することのほうが多いような場合、この2つのSNP間には「連鎖不平衡(LD: linkage disequilibrium)の関係がある」と言う。つまり、2つのSNP間のアリルがリンクしている状態を言い、その場合、両方のSNPをタイピングしなくても、一方のSNPをタイピングするだけでリンクしているSNPの情報も同時に得られるため、実験の労力とコストを半分にすることが出来る。

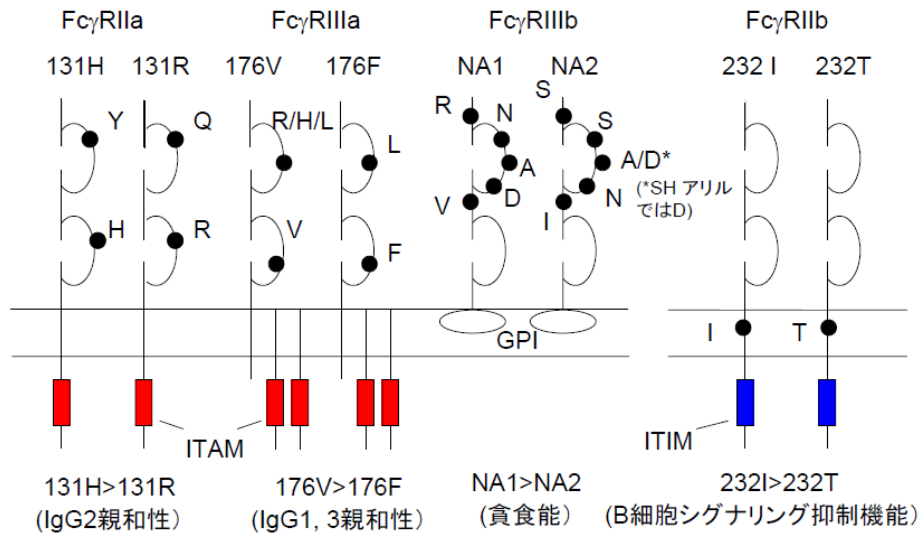
第1章 Fc gamma receptor IIB (FCGR2B)

1-1 Fc γ 受容体ファミリーとその遺伝子多型

ヒト低親和性 Fc γ 受容体はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する分子で、IgG の Fc 部位に結合し、種々の免疫応答に関与する。Fc γ RIIIA、IIB、IIC、IIIA、IIIB の 5 つのファミリーから成り、その遺伝子群(FCGR2A、2B、2C、3A、3B)はヒト1番染色体の1q23にクラスターを形成する。これまで、FCGR2A-131R/H、3A-176V/F、3B-NA1/2 多型が報告され、全身性エリテマトーデス(SLE)や関節リウマチ(RA)などのリウマチ性疾患との関連が様々な集団において示されてきた(図1)。Fc γ RIIIB は、ヒト Fc γ 受容体ファミリーの中で唯一、細胞内領域に

ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) を持ち、主に B 細胞において抑制性のシグナルを伝達する重要な受容体である(図1)。Fc γ RIIb 欠損マウスは自己免疫を発症するということや、自己免疫疾患高感受性マウスの Fc γ RIIb プロモーター、イントロン、エクソンに多型が発見され、その自己免疫制御における重要性が認識されてきた。よって、FCGR2B はヒトリウマチ性疾においても重要な候補遺伝子だと考えられた。

図1 Fc γ 受容体ファミリーとその遺伝子多型



1-2 FCGR2B の多型と SLE 疾患感受性

多型スクリーニングの結果、exon 5 に、Fc γ RIIB の膜貫通部位の 232 番目のアミノ酸をイソロイシン(232I)からスレオニン(232T)に置換する SNP:FCGR2B-232I/T を発見した。日本人集団において、SLE193 人、健常者 303 人のサンプルを用いてタイピングを行ったところ、健常者における FCGR2B-232I/T の遺伝子型頻度は、232I/I 60.4%、232I/T 34.3%、232T/T 5.3%であった。これに対し、SLE では 232I/I 54.9%、232I/T 34.2%、232T/T 10.9%であった。SLE 患者においては、232I アリル陽性率が有意に減少しており(P=0.02)、232T/T 遺伝子型は 232I/I に比べオッズ比(OR)で 2.3 倍(P=0.018)の疾患リスクを示した。

次に、FCGR2A、FCGR3A、FCGR3B についてもタイピングを行った結果、このうち FCGR3A にのみ有意な関連が示された。SLE 患者で 176F アリル陽性率が有意に増加しており(P=0.03)、176F/F 遺伝子型は 176V/V に比べ OR で 2.8 倍(P=0.016)の疾患リスクを示した。

二座位解析法を試みた結果、FCGR2B-232T/T と FCGR3A-176 は両方とも独立に SLE 疾患感受性を示し、両者を共に持つことにより、さらに疾患へのリスクが高まることが示された。

1-3 FCGR2B-232I/T 多型の機能解析

FCGR3A-176V/F 多型は細胞外ドメインに位置し(図1)、176V より IgG1、3 に対する親和性が弱い 176F アリルが疾患のリスク上昇と関連を示した。一方、FCGR2B-232I/T は新規の多型のため、機能解析を試みた。その結果、232T 多型をもつ Fc γ RIIB 分子は、lipid raft への

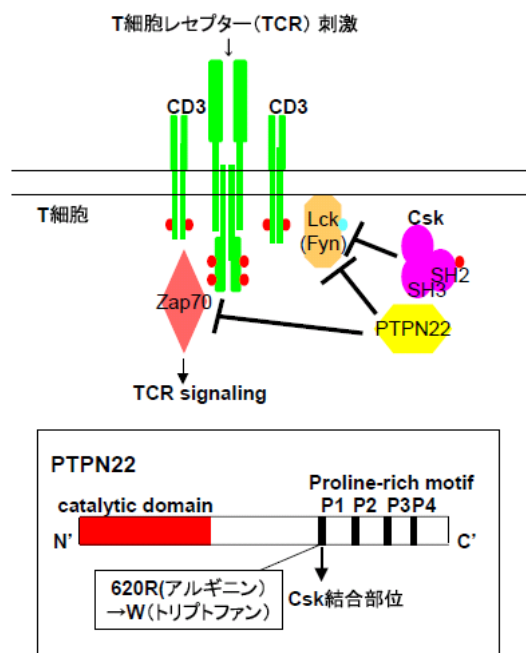
association が少なく、FCGR2B が十分にリン酸化されないのでリクルートされてくる SHIP の量が減少し、FCGR2B の抑制性の機能が十分発揮されない。そのため、B 細胞 signaling が亢進されてしまっており、これが自己免疫につながる可能性が示唆された。

第2章 Protein tyrosine phosphatase N22 (PTPN22)

2-1 複数の自己免疫疾患に共通の原因遺伝子

PTPN22 は主に B 細胞、T 細胞に発現している、細胞内チロシンフォスファターゼである。T 細胞において PTPN22 は、Csk (C-terminal Src tyrosine kinase) とドッキングし、共同で TCR 刺激を伝達するカスケードの上流分子である ZAP70 や Lck を脱リン酸化し、T 細胞 signaling を抑制することが知られている(図2)。PTPN22 は N 末に触媒ドメインを持ち、C 末にある4つのプロリンリッチドメインのうち P1 に、620 番目のアミノ酸をアルギニンからトリプトファンに変える SNP が報告された。これはちょうど Csk 結合部位に当たり、実際 620W アリルは、Csk への結合を著しく減少させる(図2)。この多型が、1型糖尿病(T1D)と、関節リウマチ(RA)に関連しているという二つの関連研究が報告されたことから、PTPN22 は複数の自己免疫疾患に共通のリスクファクターなのではないかと考え、SLE においても関連解析を試みた。

図2 T細胞シグナリングにおけるPTPN22の役割とその遺伝子多型



2-2 PTPN22 の多型と SLE 疾患感受性

白人集団において、SLE患者525人、健常者1961人をタイピングしたところ、健常者に比べ(8.6%)、SLE患者では(12.7%)、620Wアリル頻度の有意な増加が見られた。(P=0.00009)。また、リスクアリル620Wをヘテロで持つ場合に比べ(OR=1.37; 95% confidence interval [CI] 1.07-1.75)、620Wアリルをホモで持つと、2倍以上の疾患リスクが示された(OR=4.37; 95% CI

1.98-9.65)。関連研究では、異なる遺伝的バックグラウンドをもつ集団でも同じ結果が再現されて始めて、病因の真髄にかかわる機能的な多型である可能性を示すことができる。PTPN22 の多型と SLE との関連は、その後、スペイン、スウェーデン、イギリスなどの多数のグループで再現された。また T1D や RA への関連も、その後多くの集団で再現されており、PTPN22 はこの 3 つの自己免疫疾患に共通した重要なリスクファクターであると言える。

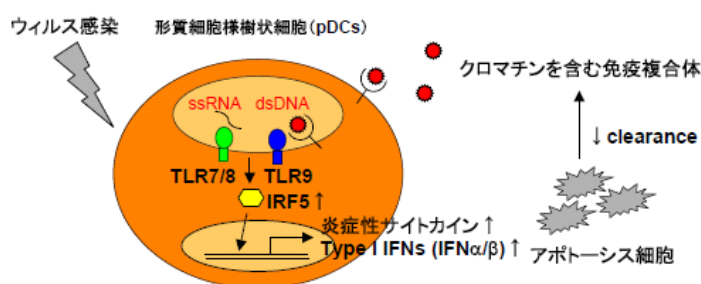
第3章 Interferon regulatory factor 5 (IRF5)

3-1 SLE における type I IFN pathway の重要性

SLE 患者の血清中では、高濃度の Type I interferon (IFN) 発現が見られる。また、ウイルス感染やがん治療の薬剤として IFN- α を投与された人の約 4 分の 1 が、SLE に見られるような抗核抗体を発症することが分かっている。近年のマイクロアレイを用いた研究では、SLE で高発現する Type I IFN pathway 関連遺伝子群 (“IFN signature”) が同定され、疾患のバイオマーカーとしての応用が期待されている。このように、Type I IFN pathway の異常が SLE の病因の中心的な役割を果たしている可能性が、20 年以上も前から示唆されてきた。

SLE 患者で type I IFN が高発現される最初のきっかけは、ウイルス感染もしくは、アポトーシスを起こした細胞からのクロマチン成分だと言われている。SLE では通常、アポトーシス細胞が増加、そのクリアランスが低下している傾向にあり、特に ssRNA や dsDNA といったクロマチンを含む免疫複合体 (ICs) が産生されると、形質細胞様樹状細胞 (pDCs) にとりこまれ、エンドソーム内で Toll-like receptor (TLR) 7/8 と TLR9 にそれぞれ認識され、TLR-MyD88 signaling pathway を開始させる。Interferon regulatory factor 5 (IRF5) は、MyD88 に結合する細胞内分子で、TLR からのシグナルを受けて活性化されると、核内に移行して転写因子として働き、炎症性サイトカインや Type I IFN の遺伝子発現を誘導する (図3)。

図3 SLEにおけるType I IFN高発現のメカニズム



3-2 IRF5 の多型と SLE 疾患感受性

Sigurðsson らは、type I IFN pathway にある 13 の遺伝子から 44 の SNP をピックアップし、スウェーデン、フィンランド、アイスランド集団において、SLE との関連解析を行った。その結果、IRF5 に有意な関連を見出した。我々はさらに、IRF5 の SLE 疾患感受性を包括的に検討するため、IRF5 のエクソン、イントロン、プロモーター領域をシークエンスし、遺伝子全領域を網羅

するような 26 の TagSNP と、短い DNA 配列の insertion/deletion 多型(挿入/欠失多型: indel)を同定した。そして、これらの TagSNP と indel に関して、アメリカ、イギリス、スウェーデンからの合計 555 trio 家系サンプル、2188 人の患者、3596 人の健常者のサンプルを用いてタイピングを行い、TDT (transmission disequilibrium test)およびケースコントロール関連解析により、SLE との関連を検討した。その結果、下記の 3 つの多型(rs2004640、exon 6 indel、rs10954213)が、いずれも独立に疾患感受性を示すことが分かった。さらに、IRF5 の SLE 感受性は、この 3 の多型が合わさった時に最大となり、他に疾患リスクを上げる要因となる多型は無いことを、条件付き回帰解析によって突き止めた。

1) 5' UTR の Exon 1b スプライス部位 SNP : rs2004640 T/G

IRF5 遺伝子は、3 つの異なるプロモーターから転写され、11 のアイソフォームを発現する。そのため、IRF5 mRNA は、5' UTR として Exon 1a、1b、1c のいずれか一つを持つことになる。rs2004640 は、exon 1b から 2bp 下流のスプライスドナー部位の認識配列(GT)に位置する(図4)。PBMC を用いた RT-PCR により、rs2004640 T アリルを持つ時のみ、exon 1b がスプライシングされてくることが分かった。

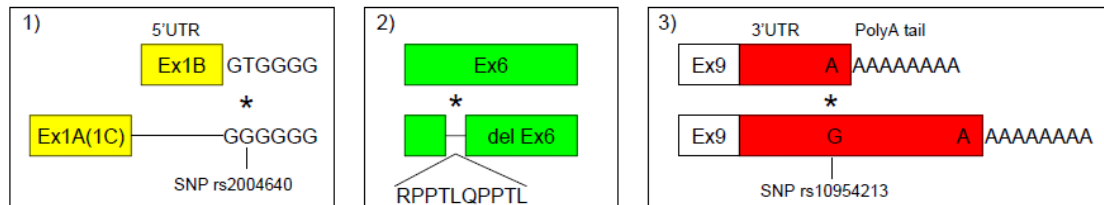
2) Exon 6 の PEST ドメインの 10 アミノ酸 insertion/deletion : exon 6 indel

シークエンスの結果、exon 6 に 30bp、すなわち 10 アミノ酸(RPPTLQPPTL)の insertion/deletion 多型が存在することが明らかになった(図4)。この indel は、プロリン、グルタミン酸、セリン、スレオニンに富んだ配列で構成される PEST domain に位置し、タンパク質の安定性に関与することが示唆された。

3) 3' UTR の mRNA の長さや安定性を決める SNP : rs10954213 A/G

210 のハップマップサンプル (CEU, CHB, JAP and YRI population)および 233 の CEPH サンプルからの IRF5 mRNA 発現量データをもとに、遺伝子発現量と最も良く相関する SNP の同定を試みた。その結果、rs10954213 A アリルが、IRF5 遺伝子高発現に強く関連することが示された。ノーザンブロットングおよび TaqMan 定量的 RT-PCR により、rs10954213 A は 3' UTR の polyA 付加シグナル配列(AAUAAA)に位置し、この配列の直後に転写が停止すること、rs10954213 G アリル(AAUGAA)だと転写はさらに下流の PolyA 付加部位まで進み、648 bp 長い mRNA を転写することを明らかにした(図4)。mRNA decay の時間を測定したところ、長い mRNA に比べ短い mRNA は半減期が長く、より安定であり、ウエスタンブロットングでは、rs10954213 G アリルに比べて A アリルのほうが、5 倍多くタンパク質発現していることが示された。

図4 IRF5の3つの機能的な多型により構成されるハプロタイプとそのSLE疾患関連



ハプロタイプ	rs2004640	Exon6 Indel	rs10954213	頻度*		OR (95% c.i.)	Pooled P
				患者	健常者		
Meta analysis 1	T	Insertion	A	0.190	0.117	1.78 (1.57-2.02)	1.4 x 10 ⁻¹⁹
Meta analysis 2	T	Deletion	A	0.376	0.360	1.09 (0.99-1.19)	0.0437
555 trio SLE家系 3	T	Insertion	G	0.040	0.040	0.95 (0.76-1.19)	0.6743
患者 n= 2188 4	G	Insertion	G	0.269	0.340	0.76 (0.69-0.84)	5.0 x 10 ⁻⁸
健常者 n= 3596 5	G	Deletion	A	0.124	0.143	0.76 (0.67-0.87)	2.8 x 10 ⁻⁵

*ハプロタイプ頻度は、Case-control studyによる

3-3 IRF5 ハプロタイプと SLE 疾患感受性

同定されたIRF5の3つの機能的な多型により構成されるハプロタイプを決め、ハプロタイプ関連解析を行った。図4に示すように、5つのメジャーなハプロタイプが検出され、個々の多型の関連よりさらに強いSLE疾患感受性を示した。このうち、ハプロタイプ1、すなわち1) exon 1bがスプライシングを受け、2) exon 6の10アミノ酸 PEST domainが存在し、3) 短い安定なmRNAが作られIRF5が高発現する時、SLE疾患リスクを示すのに対し、exon 1bのスプライシングを欠くハプロタイプ4とハプロタイプ5は、プロテクティブな効果を示した。

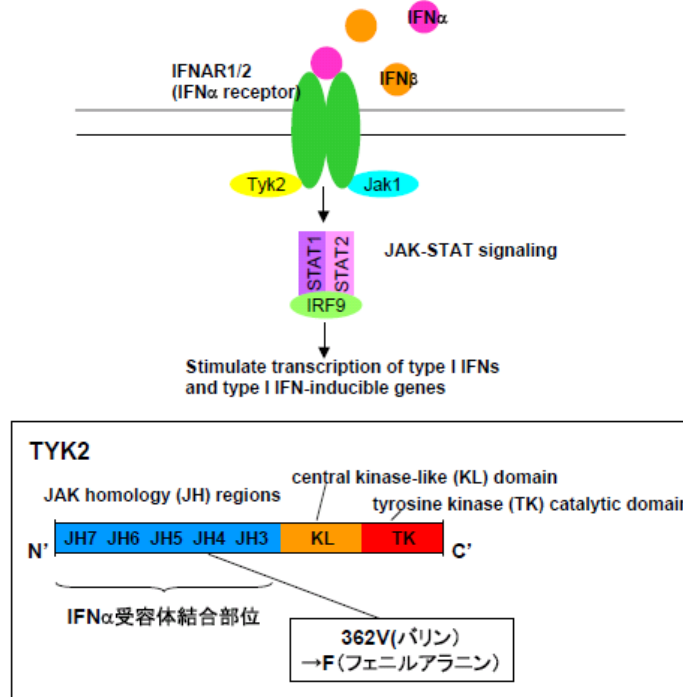
以上のような結果から我々は、IRF5の3つの機能の異なる多型が組合わさる事により、IRF5のSLE疾患リスクを決めていること結論づけた。

第4章 Tyrosine kinase 2 (TYK2)

4-1 Type I IFN pathway 関連遺伝子群とSLEとの関連

第3章のIRF5に続き、近年、他のType I IFNシグナル伝達系の遺伝子(例えば、tyrosine kinase 2 ;TYK2 や signal transducer and activator of transcription 4 ;STAT4)も、SLEの疾患感受性を示すというデータが白人集団で報告されている。これら3つのSLE疾患感受性遺伝子のうち、IRF5はその後、日本人や韓国人においても関連が認められた。しかしながら、他の2つの遺伝子に関しては、アジア集団での報告がない。そこで本研究では、Type I IFNによって自身の活性が促され、下流のJAK-STATシグナル伝達系の活性化を促し、さらなるType I IFNの高発現を引き起こすのに重要な役割を果たすTYK2に関して(図5)、日本人におけるSLE疾患感受性を検討した。

図5 Type I IFNシグナル伝達系におけるTYK2の役割とその遺伝子多型



4-2 TYK2 の多型と SLE 疾患感受性

白人集団で、SLE の疾患リスクに關与すると報告されていた 4 つの SNP(rs12720270, rs2304256, rs280519, rs12720356)のうち、rs12720356 は日本人には存在しない、もしくは非常にレアな SNP であることが、国際ハップマッププロジェクトの 45 人の日本人サンプル(45 JPT) のデータから分かった。rs12720270, rs2304256, rs280519 に関し、日本人 SLE 患者 69 人、健常者 94 人の第1サンプルセットでタイピングを行った結果、いずれの SNP にも有意な関連は見られなかった。しかし、rs12720270-T アリル, rs2304256-A アリル, rs280519-G アリルは SLE で増加傾向にあった。これらの SNP は非常に強い連鎖不平衡(LD)の関係にあり、SLE で増加傾向にあるアリルは、いずれも同一ハプロタイプ上に存在する可能性が高いことが示唆された。特に rs12720270-T アリルと rs2304256-A アリルは、完全にリンクしていた(perfect proxy set)。したがって、次に rs2304256 を TagSNP として選び、日本人 SLE 患者 125 人、健常者 373 人の第 2 サンプルセットでタイピングを行った。その結果、合計 SLE194 人、健常者 467 人のケースコントロール関連解析により、rs2304256 の有意な関連が示された。特に rs2304256-A のホモ接合体が SLE 患者で有意に増加していた(SLE 20.1%, control 13.1%, $P=0.029$, $\chi^2=4.76$)。これは、アジア集団において初めて TYK2 の SLE 疾患感受性を示したデータである。

SLE 疾患関連を示した SNP は、TYK2 の IFN α 受容体への結合部位 JH4 の 362 番目のアミノ酸を、バリンからフェニルアラニンに変化させる非同義置換であった(図5)。TYK2 は IFN α 受容体に物理的に結合し、IFN α の刺激によって、自身が活性化されることが知られており(図5)、この SNP の機能的な重要性が示唆される。

4-3 TYK2 多型の機能的意義

次に TYK2 SNP の遺伝子型と、その上流・下流分子および関連シグナル伝達系の分子の遺伝子発現量との相関を検討した。国際ハップマッププロジェクトの 45 JPT に関し、遺伝子型と mRNA の発現量 (GENEVAR project によるマイクロアレイデータ) の相関を、STATA10 software を用いた回帰解析により検定した。入手可能なデータの制限上、今回 SLE 疾患関連が検出された rs2304256 の代理として、それと LD の関係にある rs280519 に関して解析を行った。その結果、TYK2 の疾患リスクアレルは、IFN-誘導性遺伝子(OAS, IFIX)や Toll-like リセプターシグナル伝達系遺伝子 (TLR9, IRF3, MYD88, TRAF4)、TYK2 関連サイトカイン受容体遺伝子 (IL10RA, IL12RB1, IL17R)の高発現と有意に相関していた。よって、TYK2 SNP は、SLE 患者に特徴的に高発現している Type I IFN シグナル伝達系のいくつかの遺伝子発現量に影響を与えていることが示唆された。

まとめと今後の展望

本研究では、候補遺伝子アプローチによるケースコントロール関連解析で、FCGR2B、PTPN22、IRF5、TYK2 の4つのSLE疾患感受性遺伝子の同定に成功した。この成果は、臨床医学の現場において、多いに役立つことが出来ると考える。例えば、これらの遺伝子のSNP遺伝子型を患者で検査することにより、SLEの予防や診断、オーダーメイドの治療などが、近い将来可能になるかもしれない。疾患関連を示すSNPはいずれも、それ自体が機能的に疾患リスクを高めている可能性はもちろんある。しかしながら、それと連鎖不平衡の関係にある近傍のSNPが、本質的に疾患リスクを上げるよう寄与している可能性も考えられる。これを明らかにするためには、今後、同定された遺伝子自身の他のSNP、および周辺SNPの網羅的なタイピングを、様々な人種集団で行う必要がある。また、特定のリスクアレルの機能解析が望まれる。

参考文献

- 1) 京極千恵子, 土屋尚之, 徳永勝士. Association of Fc γ receptor gene with systemic lupus erythematosus. 蛋白質核酸酵素 Vol.46 No.16, 2337-41 (2001)
- 2) Chieko Kyogoku, Hilde M. Dijstelbloem, et al. Fc γ receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: Contribution of FCGR2B to the genetic susceptibility. Arthritis Rheum, Vol.46, No.5, 1242-54 (2002)
- 3) Kono H, Kyogoku C, et al. Fc γ RIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. Hum Mol Genet. 14(19):2881-92 (2005)
- 4) Kyogoku C, Langefeld CD et al. Genetic association of the R620W polymorphism of protein tyrosine phosphatase PTPN22 with human SLE. Am J Hum Genet. 75(3):504-7

(2004)

5) Sigurdsson S, Nordmark G, et al. Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus.

Am J Hum Genet. 76(3):528-37 (2005)

6) Graham RR, Kozyrev SV, et al. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. Nat Genet. 38(5):550-5 (2006)

7) Graham RR, Kyogoku C, et al. Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(16):6758-63 (2007)

8) Kyogoku C, Tsuchiya N. A compass that points to lupus: genetic studies on type I interferon pathway. Genes Immun. 8(6):445-55 Review (2007)