

難治性血管炎のゲノム解析

安波 道郎^{*,**} 柴田 宏樹^{**} 高橋めぐみ^{**} 沼野 藤夫^{***} 木村 彰方^{*,**}

要 旨：高安動脈炎疾患感受性遺伝子座をHLA領域のMICB遺伝子-TNFA遺伝子間の領域にマッピングした。この領域に存在する候補遺伝子としてIKBL遺伝子多型を解析し、プロモーター多型と高安動脈炎との関連を明らかにした。IKBL蛋白の機能は未解明であるが、種々の組織において核に局在し、遺伝子発現制御を介して高安動脈炎をはじめ種々の炎症性の病態に関与することが想定された。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 169-174)

Key words: Association study, Multifactorial disease, Takayasu arteritis, HLA region, Linkage disequilibrium

序 言

高安動脈炎は、大動脈およびその主分枝の血管壁に病変の主座をおき、それら大血管の閉塞をきたす慢性炎症性疾患であり、また、SLE, JRA, 潰瘍性大腸炎, I型糖尿病, Graves病などの自己免疫疾患を合併する例があることから、免疫応答の調節機構の異常がその発症、進展に関与することが推測されている^{1,2)}。高安動脈炎はHLAの特定の型との関連が報告されているが^{3,4)}、HLA遺伝子が存在するヒト第6番染色体の領域には、自己-非自己の識別や抗原提示に関わるHLA分子以外にも補体やTNFなど炎症反応、生体防御の調節に重要な分子の遺伝子が存在している⁵⁾。これらの遺伝子には各民族集団に特徴的な高いレベルの多型が見られ、それらの多型が互いに連鎖不平衡を示す特定の組み合わせで集団に存在するため、真の要因でなくとも特定のアリルと疾患との関連を観察することがある。当該領域について、SNPやマイクロサテライトなどを含めてより緻密に遺伝子多型を検索して、関連の強さをおおのこの要因間で比較するとともに、それらの相互関係を層別化解析する、あるいはハプロタイプ解析することによって真の要因となっている遺伝子座位を同定することが可能と考えられる。

HLAクラスIII領域には前述の補体やTNFの遺伝子が

存在するが、それら以外にもいまだその機能が明らかでない遺伝子が存在している⁵⁾。IkB様のアンキリンリピートを持つIKBL蛋白をコードするNFKBIL1 遺伝子(以下IKBL遺伝子)も、そのような遺伝子の一つであり、ATP6G遺伝子, BAT1 遺伝子とともにTNF遺伝子群とMICB遺伝子にはさまれた区間に位置している。蛋白のアミノ酸配列にIkBのNFκBとの結合に重要な機能ドメインであるアンキリンリピートに相同性を示す部分があるが、IkBやNFκBとどう関わり合うかは、明らかにされていない。

本研究では、動脈硬化症や多くの自己免疫疾患と同様に、血管を主座とする炎症機転がその発症あるいは進展に深く関与していると推測される高安動脈炎について、HLA領域の遺伝子多型の関連解析から真の要因となっているゲノム領域を探り、その区間内に存在する遺伝子座位(IKBL遺伝子)が真の要因たりうるかを検証することを目的とした。

方 法

多型解析

高安動脈炎患者(n=97)から同意書にて同意を得たうえで採血し、末梢血有核細胞からゲノムDNAを調製した。同様に健常者対照集団(n=308)からもゲノムDNAを調製した。HLA遺伝子多型は、アリル特異的オリゴヌクレオチドプローブ法により^{6,7)}、マイクロサテライト多型は蛍光標識したオリゴヌクレオチドプライマー

*東京医科歯科大学疾患生命科学研究所

**同難治疾患研究所

***同大学院医歯学総合研究科

2004年5月20日受理

を用いたPCR産物のDNAフラグメント解析により^{8,9)}, IKBL遺伝子多型はヘテロ二重鎖コンフォーメーション多型解析法を開発して型決定を行った。患者群, 対照群について, アリル頻度, 特定のアリル保有頻度, 遺伝子型頻度を算出して頻度差の有意性を検定した。また, 複数の座位についてのハプロタイプ頻度を推定し, ハプロタイプによってもたらされるリスクを評価して, どの遺伝子座位のどのアリルが主要因になっているかを解析した^{10, 11)}。

発現解析

諸臓器におけるIKBL遺伝子発現を, SYBR-Green Iを用いたリアルタイム定量PCR法によりmRNAの存在量比として求めた。

細胞内局在

RT-PCR法にて単離したIKBL遺伝子cDNAを, GFPとの融合蛋白としてHeLa細胞に発現させ, 共焦点顕微鏡で, 細胞内分布を明らかにした。

結 果

HLA-Bアリルとの関連

高安動脈炎患者(n=97)と対照群(n=308)のHLA DNA タイピングの結果, HLA-B*5201, B*3902, HLA-DRB1*1502を保有する頻度が患者群で有意に高く^{6,7,12)}, これまでのHLAの血清学でのタイピングの研究結果を確認した(**Table 1**)。また, 例数が少ないため統計学的には有意とはならないが, B*3901やB*67も患者群でより高頻度に観察された。HLA-B*5201-DRB1*1502は日本人集団で強い連鎖不平衡にあるため, 一方の頻度が

上昇しているときには, もう一方の頻度が上昇して観察される。すなわちアリル間の連鎖不平衡による二次的な関連が認められることとなる。アリル間の連鎖不平衡による二次的な関連であるか否かは, 2座位間の階層化解析で検定でき, この場合はHLA-DRB1*1502の頻度増加はHLA-B*5201に伴う二次的な関連であることが判明した^{10, 11)}。

HLA-B*52(B*5201)とB*39(B*3901と B*3902)は, おおのが高安動脈炎に関連するが, 患者群をB*52やB*39を保有するかで分けてみると, その臨床像(主要病変部位や合併症)に相違があり, B*52保有者は胸部の大血管の病変が強いのに対し, B*39を保有する患者では, 腹部の大血管の病変が顕著であるという傾向が見られた¹³⁾(**Fig. 1**)。このことは, HLA-B遺伝子自体があるいはその近傍に高安動脈炎の発症に寄与する遺伝因子が存在するが, それはB*52とB*39をコードする染色体とで若干性質が異なることを意味している。

HLA-B遺伝子座位近傍のマイクロサテライト多型の解析

次にHLA-B遺伝子座位周辺のマイクロサテライト多型を解析し, HLA-B自体が高安動脈炎に対する疾患感受性を規定しているかを明らかにした。D6S273, TNFd, TNFa, C1_2_A, MICA, MIB, C1_4_1, C1_2_5, C1_3_1の9座位のタイピングの結果, 有意な正の関連を示すアリルが存在しないC1_4_1を除き, 各座位において最も強い関連を示したアリルのORと関連の有意性(p)をプロットすると, とともにHLA-B遺伝子座位と, それに加えて約200kbセントロメア側のC1_2_Aの位置する領域にピークを持つ2峰性のパターンを示

Table 1 Association of HLA alleles with Takayasu arteritis
Fractions of positive individuals for HLA alleles in patients and control population are compared. Odds ratio was calculated with Woolf's formula. P value was corrected for multiple comparisons for each locus.

HLA allele	Patients (n=97)	Control (n=308)	Odds ratio	p _c
B*5201	50.5%	24.1%	3.21	<0.00001
B*39	8.2	3.1	2.79	<0.04
B*3901	4.1	2.7	1.56	ns
B*3902	4.1	0.5	9.59	<0.02
B*67	6.6	2.7	2.54	ns
B*51	12.3	13.8	0.88	ns
DRB1*1502	44.3	25.0	2.39	<0.0005

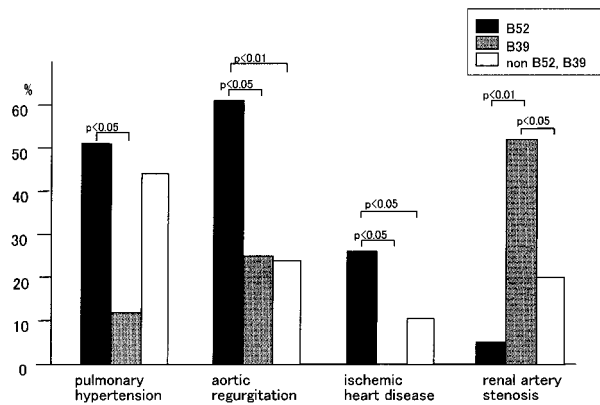


Figure 1 Clinical features of patients with Takayasu arteritis. Patients are sorted by the presence of HLA-B*52 or B*39. Frequencies of complications with Takayasu arteritis are shown in the bar graph. Significant difference ($p < 0.05$ or less) in the frequency between patient subgroups is also indicated.

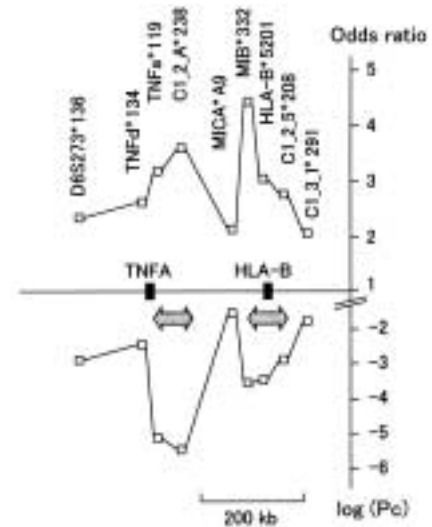


Figure 2 Association of HLA-linked polymorphic markers with Takayasu arteritis. Odds ratio and corrected p value of the alleles which give the maximal odds ratio for respective loci are plotted along the physical map of the HLA region.

し、高安動脈炎の発症に寄与する遺伝因子が約200kbの比較的近い場所に2つ存在する可能性が示された^{10, 11, 13)} (Fig. 2)。さらに、これらのアリルがハプロタイプとしてどのように高安動脈炎の発症に寄与するかを解析した^{10, 11)} (Fig. 3)。集団内には比較的高頻度に観察される HLA-B*5201-DRB1*1502に代表されるようなコモンハプロタイプもあるが、個々人ではその一部が組換えによって別のアリルとの組み合わせになっている場合も多く、そのようなハプロタイプ(リコンビナントハプロタイプ)でのリスクを評価することで、コモンハプロタイプを構成する個々のアリルの寄与度を知ることができる。B52ハプロタイプ、B39ハプロタイプともにHLA-Bアリル、C1.2.Aのアリルのいずれを欠いても、大きくリスクが低下する。このことから、高安動脈炎の発症に寄与する遺伝因子がHLA-B遺伝子座とC1.2.Aの近傍に2つ存在する可能性が支持された。

IKBL遺伝子多型

C1.2.Aの近傍にはTNFA遺伝子とその遺伝子ファミリーであるLTA、LTB遺伝子のほか、IKBL、ATP6G、BAT1、MICBなどの遺伝子が存在し、これらの遺伝子が高安動脈炎の遺伝因子の候補となることから、この領域のゲノム多型を調べた。IKBL遺伝子については、日本人集団ではコード領域には頻度の高い多型は見いだせなかったが、遺伝子の上流域(プロモーター領域)

に4カ所のSNP：T₈-422T₉、C-325G、A-263G、T-63Aが存在していた。これら4カ所の2アリル性の多型の組み合わせは理論上16種が存在しうる。この組み合わせ(SNPハプロタイプ)をDNAコンフォーメーション多型を応用して直接実験的に検出する方法を開発して、日本人集団の多型の組み合わせを調べると、原型と考えられる-422T₈、-325C、-263A、-63Tのほか4種の組み合わせ(IKBLp*01~*05)が存在した(Table 2)。高安動脈炎患者群(n=94)の60.0%にA-263Gのみ原型(IKBLp*01)と異なるIKBLp*03が検出され、その頻度は対照群(n=213)の35.2%に比べ有意に高かった(OR=2.84, $p < 0.0002$)。すなわち高安動脈炎とIKBL遺伝子プロモーター多型のアリルIKBLp*03の関連が認められた¹¹⁾。

IKBL遺伝子の機能解析

IKBL遺伝子自体の働きが高安動脈炎の成立、進展に関わる可能性があるが、IKBL蛋白はその構造から、炎症反応に関わる多くの遺伝子発現を制御するNFκBやその内在性インヒビターであるIκBと相互作用する可能性が想定されているものの、実際にはIκBとの相同性は低く、実験的にも証明されていないのでIKBLの機能を知

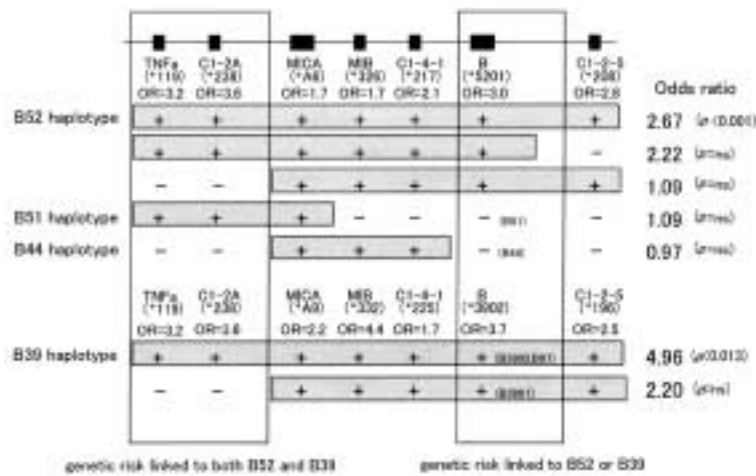


Figure 3 Risk of Takayasu arteritis for common HLA haplotypes and their recombinant variants. Presence (+) and missing (-) for the alleles in the corresponding common haplotype (in the parenthesis) are shown.

るために、その発現の組織分布と細胞内局在について検討した。リアルタイム定量PCR法によりヒト諸臓器におけるmRNAの存在比を測定したところ、骨格筋を除く多くの組織で広範な発現が検出された。中でも、脾臓ではその他の臓器の3~5倍、膵臓で2~3倍の発現が検出された。また、細胞内での局在を明らかにする目的でオワンクラゲの緑色蛍光蛋白GFPとの融合蛋白を培養細胞に強制発現するプラスミドを作製してHeLa細胞にトランスフェクションして、緑色の蛍光を観察した(**Fig. 4**)。融合蛋白は細胞核内に斑点状に分布し、核内の機能的構造である、いわゆる核スペckルに位置すると考えられた。これらの知見は予備的ではあるが、遺伝子の転写や転写後のmRNAプロセッシングにおけるIKBLの役割を示唆すると考えられた。

考 察

高安動脈炎は以前からHLAと関連することが知られていたが、HLA領域に見られる連鎖不平衡のためにHLA領域に存在する遺伝子のうちのどれが一次的な要因であるかが不明確であった。マイクロサテライト座位を含む、より詳細な多型解析と、層別化解析、ハプロタイプ解析によりHLA-B座とマイクロサテライトC1_2_A座近傍の2カ所に異なる疾患感受性遺伝子が存在することが明らかとなった^{10,11)}。HLA-B座近傍では発現している遺伝子がHLA-Bに限られるため、疾患感受性遺伝子のうちの一つはHLA-Bそのものである可能性が高く、実際HLA-Bのアリルで患者群を分けてみる

Table 2 IKBL promoter polymorphism observed in Japanese. Five common combinations of four SNPs are designated as promoter alleles.

IKBL promoter alleles	SNPs			
	-422	-325	-263	-63
IKBLp*01	T ₈	C	A	T
IKBLp*02	T ₉	C	A	T
IKBLp*03	T ₈	C	G	T
IKBLp*04	T ₈	G	A	A
IKBLp*05	T ₈	C	A	A

と臨床像が異なっているなど、HLA-Bが病態を左右する要因であることを支持する結果が得られている。

一方、C1_2_A座近傍の領域にはTNFA, LTA, NFKBIL1(IKBL), ATP6G, BAT1, MICBの6遺伝子の存在が知られている⁵⁾。これらの遺伝子のうちのいずれかが高安動脈炎の疾患感受性遺伝子となっていると推定され、SNP等の詳細な多型解析が必要である。本研究では、IKBL遺伝子に注目して解析を進めプロモーター多型との関連を明らかにした。このプロモーター多型は、アリルは異なるが別の自己免疫疾患であるI型糖尿病や慢性関節リウマチとの関連が認められる(**Table 3**)。現時点では確定的ではないが、多型に伴うIKBLの機能変調でこれらの疾患の病態を説明できる可能性はある。現在IKBLと相互作用する蛋白の同定を試みており、相互作用する相手の遺伝子多型も高安動脈炎の疾患感受性に寄与しうるかを検討することによ

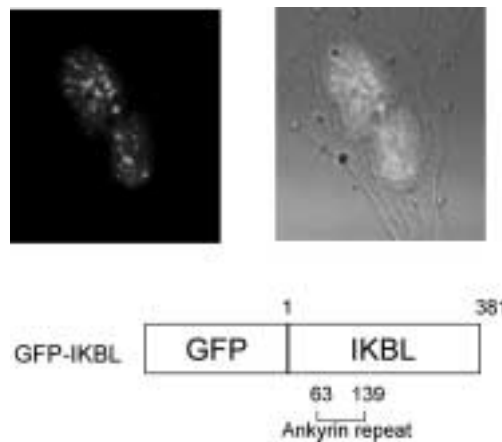


Figure 4 Subcellular localization of IKBL protein. Confocal view (left panel) and its superimposition to phase-contrast view (right panel) are shown.

Table 3 Association of IKBL promoter polymorphism with autoimmune diseases
Increase (↑) or decrease (↓) in frequency of the IKBL allele in the patients is shown.

IKBLp allele	Phenotype frequency in patients		
	Takayasu arteritis	Type I diabetes	Rheumatoid arthritis
IKBLp*01	↓	↑	↑
IKBLp*02	→	→	→
IKBLp*03	↑	↓	→
IKBLp*04	→	→	→
IKBLp*05	→	→	→

てIKBLが疾患感受性遺伝子であることを実証できると考えている。

最近、心筋梗塞とLTA(lymphotoxin A)との関連が報告され¹⁵⁾、心筋梗塞の発症に炎症機転の関与が想定されることから、高安動脈炎についてもLT-A多型がその疾患感受性を規定する可能性を検討する必要がある。心筋梗塞との関連が報告されたLTA*2アリル(LTA IVS1+252G)はIKBLp*04および*05と、もう一方のアリルLTA*1(LTA IVS1+252A)はIKBLp*01、*02および*03とほぼ完全な連鎖不平衡にある。高安動脈炎はIKBLの特定の型IKBLp*03とのみ関連を示し、同一のLTAアリルと連鎖不平衡にあるIKBLp*01、*02は関連しないためLTAは感受性遺伝子の候補から除外される。

結 論

高安動脈炎の関連解析から、疾患感受性遺伝子座位がHLA-B近傍とMICB-TNFA間のゲノム領域に少なくとも2つ存在することが明らかになった。後者の候補としてIKBL遺伝子の多型解析、機能解析を試み、高安動脈炎をはじめいくつかの疾患でIKBL遺伝子プロモーター多型との関連が明らかになり、IKBLがこれらの病態に関与する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Subramanyan R, Joy J, Balakrishnan KG: Natural history of aortoarteritis (Takayasu's disease). *Circulation*, 1989, **80**: 429-437.
- 2) Cid MC, Font C, Coll-Vincent B et al: Large vessel vascu-

- litides. *Curr Opin Rheumatol*, 1998, **10**: 18–28.
- 3) Isohisa I, Numano F, Maezawa H et al: HLA-B*52 in Takayasu disease. *Tissue Antigens*, 1978, **12**: 246–248.
- 4) Moriuchi J, Wakisaka A, Aizawa M et al: HLA-linked susceptibility of Takayasu disease. *Hum Immunol*, 1982, **42**: 87–91.
- 5) The MHC Sequencing Consortium: Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 1999, **401**: 921–923.
- 6) Yoshida M, Kimura A, Katsuragi K et al: DNA typing of HLA-B gene in Takayasu's arteritis. *Tissue Antigens*, 1993, **42**: 87–90.
- 7) Dong RP, Kimura A, Numano F et al: HLA-DP antigen and Takayasu arteritis. *Tissue Antigens*, 1992, **39**: 106–110.
- 8) Tamiya G, Ota M, Katsuyama Y et al: Twenty-six new polymorphic microsatellite markers around the HLA-B, -C, and -E loci in the human MHC class I region. *Tissue Antigens*, 1998, **51**: 337–346.
- 9) Foissac A, Cambon-Thomsen A: Microsatellites in the HLA region: 1998 update. *Tissue Antigens*, 1998, **52**: 318–352.
- 10) Kimura A, Ota M, Katsuyama Y et al: Mapping of the HLA-linked genes controlling the susceptibility to Takayasu's arteritis. *Int J Cardiol*, 2000, **75**: S105–S110.
- 11) Kimura A, Takahashi M, Shibata H et al: Identification of HLA-linked susceptibility genes for Takayasu arteritis. In "HLA 2002: Immunobiology of the Human MHC" vol. 1 (Hansen HA, Dupont B, eds.), IHWG Press, Seattle, in press.
- 12) Kimura A, Kitamura H, Date Y et al: Comprehensive analysis of HLA genes in Takayasu arteritis in Japan. *Int J Cardiol* 1996, **80**(Suppl): S61–69.
- 13) Kitamura H, Kobayashi Y, Kimura A et al: Association of clinical manifestations with HLA-B alleles in Takayasu arteritis. *Int J Cardiol*, 1998, **66** (Suppl): S121–126.
- 14) Kimura A, Kobayashi Y, Takahashi M et al: MICA gene polymorphism in Takayasu's arteritis and Buerger's disease. *Int J Cardiol*, 1998, **66** (Suppl): S107–113.
- 15) Ozaki K, Ohnishi Y, Iida A et al: Functional SNPs in the lymphotoxin-alpha gene that are associated with susceptibility to myocardial infarction. *Nat Genet*, 2002, **32**: 650–654.

Genome Analysis of Vasculitis: Mapping of Multiple Susceptibility Loci for Takayasu Arteritis to the HLA Region

Michio Yasunami,^{*,**} Hiroki Shibata,^{**} Megumi Takahashi,^{**} Fujio Numano,^{***} and Akinori Kimura^{*,**}

^{*}School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

^{**}Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University

^{***}Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

Key words: Association study, Multifactorial disease, Takayasu arteritis, HLA region, Linkage disequilibrium

Takayasu arteritis (TA) is an inflammatory vascular disease affecting the aorta and its major branches. The etiology of TA is still unknown, but previous HLA analyses have revealed strong associations of TA with specific HLA alleles such as B*52 and B*39 in Japanese. In this study, HLA and HLA-linked microsatellite markers were examined and the haplotype analysis of these markers strongly suggested that one susceptibility locus for TA is the HLA-B gene, while another independent susceptibility locus for TA was mapped between TNFA and MICB. We then investigated polymorphisms in the TNFA, NFKBIL1 and ATP6G genes and the analyses revealed that NFKBIL1 promoter allele IKBLp*03, defined by –263A instead of G, was greatly associated with TA (60.0% in patients vs. 35.2% in control, odds ratio=2.84, *pc*=0.0002). IKBLp*03 was in linkage disequilibria with both HLA-B*52 and B*39, suggesting that the one susceptible to TA mapped between TNFA and MICB is the NFKBIL1 gene. (J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, **44**: 169–174)