

高齢関節リウマチ患者に高頻度に伴う間質性肺病変と HLA との関連

研究代表者 国立病院機構相模原病院臨床研究センター遺伝子診断・治療研究室 室長 古川 宏

共同研究者 国立病院機構相模原病院臨床研究センターリウマチ性疾患研究部 部長 當間重人

【まとめ】

高齢関節リウマチ (RA) 患者に高頻度に伴う間質性肺病変 (ILD) は関節外病変の一つであり、予後に大きな影響を及ぼす。RA 治療ではメトトレキサート (MTX) と生物学的製剤の普及により、薬剤誘発性 ILD が生命予後を左右する重篤な有害事象として問題となっている。RA に合併した ILD と RA 患者における薬剤誘発性 ILD 発症とに、遺伝因子が関連するかどうかを明らかにすることを目的とする。ILD の合併と薬剤誘発性 ILD の既往が明らかでない RA 症例について、関連解析を行った。*HLA-DRB1*04*, shared epitope, *DQB1*04* は ILD 発症のリスクと負の関連を示し、*DRB1*16*, *DR2 (DRB1*15, *16)*, *DQB1*06* は ILD 発症と正の関連を示した。MTX 単独投与または生物製剤との併用中に発症した薬剤誘発性 ILD は、*A*31:01* と関連した。

1. 研究の目的

近年の関節リウマチ (RA) 治療は種々の抗リウマチ薬や生物学的製剤により格段の進歩をみせており、特に関節破壊抑制効果に極めて有効な結果が報告されている。しかし、RA に合併する関節外病変の一つとして間質性肺病変 (ILD) は生命予後に重大な影響を及ぼしうるにもかかわらず、その発症機序の解明や治療法の確立は不十分である。又、本邦 RA 患者では薬剤誘発性 ILD の発症頻度が他国と比し著しく高いとの報告もあり、RA に関連する ILD 発症機序の解析は極めて重要な研究課題である。RA の発症に関わる遺伝因子は報告されているが、ヒト白血球抗原 (HLA) との関連に関する報告は多数ある。日本人では RA の疾患感受性が *HLA-DRB1*04:05* と関連するが、そのほかの人種では **01:01*, **04:01*, **04:04*, **04:10*, **10:01*, **14:02*, **14:06* との関連が報告されてい

る。これらのアレルは HLA-DR β 鎖の 70-74 番目のアミノ酸配列を共有しており (QKRAA, RRRRA, QRRAA)、この配列は Shared Epitope (SE) と呼ばれている。血管炎、肺病変、フェルティ症候群など関節外病変を伴う RA だけでなく、重症 RA 症例でも、両方のアレルに SE を持つ例が多いと報告されている。このことは、SE が骨破壊、関節外症状といった RA の予後決定因子と強く関係し、dosage effect (SE を 2 つ持つ症例には重症例、関節外症状を伴う例が多い。) があることを示している。薬剤応答性や感染応答性と HLA の関連に関する報告が近年相次いでいる。HLA class I と Stevens-Johnson Syndrome との関連は極めて強く、原因薬剤ごとに異なるアレルとの関連が報告されている。

2. 研究方法と経過

2-1 対象

この研究は国立病院機構相模原病院および以下の施設の倫理委員会によって承認されている。姫路医療センター、別府医療センター、盛岡病院、都城病院、北海道医療センター、下志津病院、九州医療センター、嬉野医療センター、倉敷成人病センター、都立多摩総合医療センター、横浜南共済病院、横浜市立大学附属市民総合医療センター、長崎医療センター、熊本整形外科病院、高崎総合医療センター、新潟県立リウマチセンター、がん・感染症センター都立駒込病院、北里大学、帝京大学、松多内科医院、千葉県済生会習志野病院、勤医協中央病院、北見赤十字病院、天理よろづ相談所病院、熊本再春荘病院、久留米大学、名古屋医療センター、下北沢病院、京都第一赤十字病院、東京大学。本研究は、上記施設通院または入院中の、アメリカリウマチ学会分類基準を満たす RA 患者であり、かつ本研究への文書による同意が得

られている患者を対象とした。RA767 例から末梢静脈血約 7mL を採取し、DNA を抽出した。全例日本在住の日本人であった。ILD 合併の有無については、画像所見から評価基準 (Sagamihara Criteria) に基づいて評価を行った。アンケートによる喫煙歴・薬剤性肺炎歴・粉塵曝露歴などの臨床情報収集を行った。MTX 誘発性 ILD (MI-ILD) 症例では、MTX の単独投与または生物製剤と併用されていた期間に、空咳・息切れの臨床症状、ベルクロラ音の臨床所見、びまん性間質性肺病変の画像所見を伴っていたが、明らかな感染症と心不全は除外されている。

2-2 遺伝子タイピング

HLA-A, B, C, DRB1, DQB1, DPB1 の各遺伝子座について HLA タイピングを行った。ゲノム DNA から WAKFlow HLA タイピング試薬 (湧永製薬、広島) と Bio-Plex 200 system (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて HLA タイピングを行った。RA480 例のゲノム DNA 検体はアジア人向け Axiom アレイ (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて全ゲノム 70 万塩基多型 (SNP) が無駄なくタイピングされた。

2-3 統計解析

CT 所見に基づく ILD 評価基準 (Sagamihara Criteria) に従って分類された ILD 合併 RA 例 [ILD(+)] RA と ILD 非合併 RA 例 [ILD(-)] RA のタイピング結果より比較して関連解析を行った。MTX 誘発性 ILD 発症 RA 例 [MI-ILD(+)] と非発症 RA 例 [MI-ILD(-)] のタイピング結果より、[MI-ILD(+)] 対 [MI-ILD(-)] で比較して関連解析を行った。HLA は 2x2 分割表を用いた Fisher の正確確率検定で、SNP はカイ 2 乗検定で解析した。HLA アレルの多重比較は Bonferroni 法で補正した。SNP に関してはゲノムワイド関連解析 (GWAS) の有意水準 P 値 ($P=5.0 \times 10^{-7}$) を基準とした。

3. 研究の成果

3-1 ILD(+)] RA と ILD(-)] RA の HLA 関連解析

ILD(+)] RA では高齢であり、男性が多く、罹病期間が長く、リウマトイド因子陽性例が多い。ILD(+)] RA では *DRB1*16* (補正後 P 値 [P_c]=0.0372, OR 15.21, 95% 信頼区間 [95%CI] 1.82-127.01), *DQB1*06* ($P_c=0.0333$, OR 1.57, 95%CI 1.14-2.17) が多く、*DRB1*04* ($P_c=0.0054$, OR 0.57, 95%CI 0.41-0.78), *DQB1*04* ($P_c=0.0036$, OR 0.57, 95%CI 0.41-0.79) が少なかった。ILD(+)] RA では DR2 (*DRB1*15*, **16*, $P=0.0020$, OR 1.75, 95%CI 1.22-2.51) が多く、SE ($P=0.0055$, OR 0.66, 95%CI 0.49-0.88) が少なかった。

3-2 MI-ILD(+)] と MI-ILD(-)] の HLA 関連解析

MI-ILD(+)] 55 例と MI-ILD(-)] 709 例で関連解析を行った。MI-ILD(+)] 群の平均年齢と標準偏差 (SD) は 69.3 ± 8.5 歳で、そのうち 15 例が男性、平均 MTX 投与量と SD は 6.7 ± 2.6 mg/週で、平均投与期間と SD が 3.0 ± 4.4 年であった。MI-ILD(-)] 群の平均年齢と SD は 63.6 ± 11.5 歳で 146 例が男性であった。*HLA-A*31:01* との有意な関連が認められた ($P=8.06 \times 10^{-5}$, $P_c=1.93 \times 10^{-3}$, OR 2.97, 95%CI 1.80-4.88)。また、A19 (*A*29-*33*, **74*) との関連も認めた ($P=6.47 \times 10^{-5}$, OR 2.59, 95%CI 1.67-4.01)。

3-3 GWAS

ILD(+)] RA と ILD(-)] RA の GWAS と MI-ILD(+)] と MI-ILD(-)] の GWAS でそれぞれの最小の $P=4.85 \times 10^{-6}$, 1.76×10^{-7} であり、GWAS の有意水準に近く、各 SNP は異なる遺伝子に位置していた。今後はこの結果から候補 SNP を選定し、high-density association mapping を行い、validation とする。

4. 今後の課題

関節外病変を伴う RA では両方のアレルに SE を

持つ例が多いと報告されているが、ILD に焦点を置いた研究は少なく、ILD(+)RA で SE が減少していることを初めて報告した。このことは ILD(+)RA での SE の役割は ILD(-)RA での SE の役割とは異なっている可能性を示唆している。*DRB1*15:02* と ILD(+)RA の関連は報告されている。一方、DR2(*DRB1*15, *16*) と ILD(+)RA との関連はこの研究で確認されている。*DRB1*15:01* と **16:02* では共通のペプチドが提示されることが知られており (DENPVVHFFKNIIVTPRTPP)、このことは DR2 が ILD(+)RA の感受性遺伝子であることの説明になる。

HLA class I と Stevens-Johnson Syndrome との関連は極めて強く、原因薬剤ごとに異なるアレルとの関連が報告されている。*HLA-A*31:01* と *B*15:02* が carbamazepine と、*B*58:01* が allopurinol と、*B*57:01* が abacavir と関連している。この研究成果は *HLA-A*31:01* が多剤感受性マーカーである可能性を示唆しているだけでなく、薬剤誘導性 ILD と Stevens-Johnson Syndrome とには共通の病因・病態がある可能性を提起している。*HLA-A*31:01* は優性モデルでも有意な関連を示すが ($P=2.35 \times 10^{-4}$, $P_c=5.65 \times 10^{-3}$, OR 3.18, 95%CI 1.77-5.72)、このマーカーの特異性は 84.8% で、感度は 36.4% であった。これは臨床マーカーとしてはやや不十分なものであるかもしれないが、MI-ILD の予後が悪く、生命予後に関わる重篤な有害事象であることを考えると、その予防はきわめて重要である。今後の GWAS の結果から得られる更なるマーカーと組み合わせるとより精度の高い予防マーカーを作成すれば、臨床応用にも耐える可能性がある。*A*31:01* のアレル頻度は日本人で高いことが知られている。一方、*A*31:01* は日本人 RA に最も多い *DRB1*04:05* と連鎖不平衡にあることが、日本人 RA には MI-ILD が多い理由を説明しうる。

5. 研究成果の公表方法

5-1 論文発表

1. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Sugii S, Ohashi J, Matsui T, Ikenaka T, Nakayama H, Hashimoto A, Takaoka H, Arinuma Y, Okazaki Y, Futami H, Komiya A, Fukui N, Nakamura T, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Association of human leukocyte antigen with interstitial lung disease in rheumatoid arthritis: A protective role for shared epitope. *PLoS ONE* 2012;7:e33133.
2. Oka S, Furukawa H, Kashiwase K, Tsuchiya N, Tohma S. Identification of a novel HLA allele, *HLA-DQB1*06:51*, in a Japanese rheumatoid arthritis patient. *Tissue Antigens* 2012;80(4):386-7.
3. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Rheumatoid Arthritis associated Interstitial Lung Disease (RA-ILD) Study Consortium, Tsuchiya N, Tohma S. *HLA-A*31:01* and methotrexate-induced interstitial lung disease in Japanese rheumatoid arthritis patients: A multi-drug hypersensitivity marker? *Ann Rheum Dis.* 2013;72(1):153-5.
4. Furukawa H, Oka S, Matsui T, Hashimoto A, Arinuma Y, Komiya A, Fukui N, Tsuchiya N, Tohma S. Genome, epigenome and transcriptome analyses of a pair of monozygotic twins discordant for systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2013;74(2):170-5.
5. Furukawa H, Oka S, Shimada K, Sugii S, Hashimoto A, Komiya A, Fukui N, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Miyashita T, Migita K, Suda A, Nagaoka S, Tsuchiya N, Tohma S. Association of increased frequencies of *HLA-DPB1*05:01* with the presence of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies in Japanese rheumatoid arthritis and

systemic lupus erythematosus patients. *PLoS One*. 2013;8(1):e53910.

6. Furukawa H, Kawasaki A, Oka S, Shimada K, Matsui T, Ikenaka T, Hashimoto A, Okazaki Y, Takaoka H, Futami H, Komiya A, Kondo Y, Ito S, Hayashi T, Matsumoto I, Kusaoi M, Takasaki Y, Nagai T, Hirohata S, Setoguchi K, Suda A, Nagaoka S, Kono H, Okamoto A, Chiba N, Suematsu E, Fukui N, Hashimoto H, Sumida T, Ono M, Tsuchiya N, Tohma S. Association of a single nucleotide polymorphism in the *SH2DIA* intronic region with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2013;22(5):497-503.
7. Oka S, Furukawa H, Shimada K, Hayakawa H, Fukui N, Tsuchiya N, Tohma S. Serum biomarker analysis of collagen disease patients with acute-onset diffuse interstitial lung disease. *BMC Immunology* 2013;14:14(1):9.
8. Oka S, Furukawa H, Kashiwase K, Tsuchiya N, Tohma S. A novel *HLA-DQB1*04* allele, *DQB1*04:10*, identified in a Japanese individual. *Tissue Antigens*. 2013 Aug;82(2):148-9.

5-2 学会発表

1. 古川宏, 岡笑美, 島田浩太, 杉井章二, 松井利浩, 池中達央, 橋本篤, 高岡宏和, 有沼良幸, 岡崎優子, 二見秀一, 小宮明子, 中村正, 右田清, 須田昭子, 長岡章平, 土屋尚之, 當間重人:RA に伴う間質性肺病変と HLA との関連(第 56 回日本リウマチ学会)
2. 古川宏, 島田浩太, 杉井章二, 松井利浩, 池中達央, 橋本篤, 高岡宏和, 有沼良幸, 岡崎優子, 二見秀一, 小宮明子, 中村正, 右田清, 須田昭子, 長岡章平, 土屋尚之, 當間重人:RA に伴う

間質性肺病変と HLA との関連(第 21 回日本組織適合性学会大会)

3. 古川宏, 島田浩太, 杉井章二, 松井利浩, 池中達央, 橋本篤, 高岡宏和, 有沼良幸, 岡崎優子, 二見秀一, 小宮明子, 中村正, 右田清, 須田昭子, 長岡章平, 土屋尚之, 當間重人:関節リウマチに伴う間質性肺病変と HLA(第 40 回日本臨床免疫学会総会)
4. 古川宏, 岡笑美, 島田浩太, 杉井章二, 松井利浩, 池中達央, 橋本篤, 高岡宏和, 有沼良幸, 岡崎優子, 二見秀一, 小宮明子, 中村正, 右田清, 須田昭子, 長岡章平, 土屋尚之, 當間重人:RA に伴う間質性肺病変と HLA との関連(第 57 回日本人類遺伝学会大会)
5. 古川宏, 岡笑美, 島田浩太, 土屋尚之, 當間重人:*HLA-A*31:01* と薬剤誘発性間質性肺病変(第 110 回日本内科学会総会・講演会)
6. 古川宏, 島田浩太, 杉井章二, 橋本篤, 小宮明子, 永井立夫, 廣畑俊成, 瀬戸口京吾, 岡本享, 千葉実行, 末松栄一, 宮下賜一郎, 右田清志, 須田昭子, 長岡章平, 土屋尚之, 當間重人:関節リウマチと全身性エリテマトーデスにおける抗 Ro/SS-A、抗 La/SS-B 抗体と *HLA-DPB1*05:01*(第 57 回日本リウマチ学会)
7. 古川宏, 島田浩太, 土屋尚之, 當間重人:*HLA-A*31:01* とメトトレキサート誘発性間質性肺病変(第 57 回日本リウマチ学会)

謝辞

本研究の遂行に当たり、貴重な研究助成を賜りました公益財団法人三井住友海上福祉財団に深謝いたします。