

## 全身性強皮症の発症に関係する遺伝子多型を確認

～転写因子 *FLI1* のマイクロサテライト多型が発症に関連する～

### 研究成果のポイント

1. 転写因子 *FLI1* 遺伝子内に位置するマイクロサテライト多型が全身性強皮症 (SSc) の疾患感受性に関連することを初めて見出しました。
2. *FLI1* 遺伝子内の GA リピート延長を伴うアリルが、SSc 疾患感受性と *FLI1* mRNA 発現低下に関連していました。
3. 本研究は、遺伝子多型に関連する *FLI1* 発現低下がヒトにおいて全身性強皮症の疾患感受性を上昇させることを示唆し、全身性強皮症の治療法開発に結びつくことが期待される成果です。

国立大学法人筑波大学人間総合科学研究科の山下計太・生命システム医学専攻生(浜松医科大学医学部附属病院検査部臨床検査技師長)、医学医療系の川崎綾助教、土屋尚之教授らの研究グループは、国内の多施設共同研究により、転写因子 *FLI1* 遺伝子内に位置するマイクロサテライト多型<sup>注1)</sup> (GA リピート多型) が全身性強皮症の疾患感受性に関連することを、初めて明らかにしました。

全身性強皮症は膠原病<sup>注2)</sup>の一つで、皮膚及び臓器の線維化と血管病変を主な症状とし、自己抗体産生が観察されるのが特徴です。複数の遺伝因子と後天的因子が発症に関与すると考えられる多因子疾患ですが、全身性強皮症に特徴的な症状を説明できる遺伝因子はあまり見出されていませんでした。

Fli1 (Friend leukemia integration 1 transcription factor) は血管内皮細胞、血球系細胞、線維芽細胞などに発現する転写因子<sup>注3)</sup>です。近年、動物モデルを用いた研究で、Fli1 の発現低下が線維化、血管障害、自己抗体産生という、全身性強皮症の特徴的な病態を起こすことが大きく注目されてきました。しかし、ヒトにおける *FLI1* 遺伝子多型との関連は報告されておりませんでした。

本研究では、ヒトの *FLI1* 遺伝子内に位置し、ゲノムワイド関連研究では解析が困難なマイクロサテライト多型に注目した関連解析を行い、全身性強皮症群では、GA の繰り返し数が大きいアリル<sup>注4)</sup> が有意に増加していることを見出しました。また、繰り返し数が大きいアリルを持つ場合、末梢血の *FLI1* mRNA の発現が低下していることも分かりました。

本研究成果は、*FLI1* 遺伝子のマイクロサテライト多型が全身性強皮症の特徴的な病態を説明する遺伝因子の一つである可能性を示し、ヒトにおける全身性強皮症の病因や病態の解明、治療法の開発に有用な情報を与えるものです。

※本研究の成果は、2020年7月22日付 *Rheumatology* (Oxford) でオンライン公開されました。

## 研究の背景

全身性強皮症(systemic sclerosis, SSc)は代表的な膠原病の一つで、皮膚および臓器の線維化、血管障害、自己抗体産生を特徴とします。原因は未解明ですが、複数の遺伝因子と後天的因子の複合により発症に至る多因子疾患と考えられています。

複数のゲノムワイド関連研究を含めた疾患関連遺伝子解析により、HLA 遺伝子をはじめとする数十の座位の関連が報告されてきましたが、他の免疫疾患と共通するものが多くを占め、膠原病の中でも特徴的な強皮症の病態を説明し得る遺伝因子は見い出されていませんでした。

一方、東京大学大学院医学系研究科皮膚科学教室などによる近年の一連の研究により、血球系細胞、血管内皮細胞、皮膚線維芽細胞などに強く発現し、抗線維化作用を有する転写因子Fli1 (Friend leukemia integration 1)の発現低下が、モデルマウスに強皮症様の病態(線維化や血管障害、自己抗体産生など)を誘導することが明らかになりました[1]。更に、強皮症の患者さんにおいても、皮膚における *FLI1* 発現低下が認められることが示され [2]、疾患感受性候補遺伝子としても注目されてきました。しかし、これまでのゲノムワイド関連研究では、*FLI1* 遺伝子の多型と全身性強皮症の関連は検出されていませんでした。

*FLI1*遺伝子には、遺伝子発現を制御する領域に、GAという2塩基の繰り返しの回数が個人によって異なるマイクロサテライト多型<sup>注1)</sup> (GAリピート多型)が存在し、Tリンパ球における*FLI1* mRNA発現と関連すると報告されていました(図1)[3]。マイクロサテライト多型は、ゲノムワイド関連研究等に用いられる解析系では解析が困難なことから、これまで全身性強皮症との関連は報告されてきませんでした。

本研究では、この*FLI1*遺伝子のGAリピート多型と全身性強皮症の疾患感受性との関連を解析しました。

## 研究内容と成果

探索研究群(discovery stage)、確認研究群(replication stage)あわせて 639 人の全身性強皮症患者さんと 851 人の健常対照者のゲノム DNA を対象に、GA リピート多型の遺伝型を決定しました。

リピート数は 11 回から 31 回までに分布していました。患者群においては、リピート数が多い方向に有意に偏っていました。ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析に基づき、リピート数 22 以上を L (long)、21 以下を S (short)アレルとして、強皮症群と対照群の遺伝型を解析しました。図2に探索研究群の結果を示します。探索研究群と確認研究群をメタアナリシスした結果、L アレルが強皮症群で有意に増加していました( $P=5.0 \times 10^{-4}$ 、オッズ比 1.34、95%信頼区間 1.14–1.58)。この関連は、強皮症のサブセット(びまん皮膚硬化型、限局皮膚硬化型)にかかわらず検出されましたが、皮膚硬化の強い群では弱い群よりも強い関連が見られました。

次に、GA リピート数と末梢血における *FLI1* mRNA 発現との関連を検討しました。強皮症全体では、健常対照群全体と比較して、*FLI1* mRNA の発現に減少傾向が見られました。強皮症群と健常対照群をそれぞれ GA リピート数別に分けて比較すると、健常対照群では、L アレル保有者の *FLI1* mRNA が非保有者と比較して有意に低下していました。一方で、患者群では L アレルの保有の有無にかかわらず、L アレルを持たない健常者群と比較して *FLI1* mRNA の有意な低下が認められました(図3)。

## 今後の展開

マウスモデルにおいては *Fli1* の遺伝子欠失による発現低下で強皮症に特徴的な臨床所見が報告されていました。今回の研究により、ヒトにおいても、遺伝的に規定された *FLI1* 発現低下が強皮症発症に関連する可能性が示されました。ヒトの全身性強皮症における *FLI1* 発現低下は、エピゲノム修飾<sup>注5)</sup>を介するものと報告されていましたが、今回の研究成果から、ゲノム DNA 多型も *FLI1* 発現低下の原因となり得ることが

示されました(図1)。GA リピートに近接して、DNA メチル化を受ける CpG アイランドが位置することから、GA リピート延長がエピゲノム修飾の一因となる可能性も考えられます。更に、患者群では L アリルの有無に関わらず *FLI1* mRNA 低下傾向が見られたこと(図3)から、この GA リピート多型以外にも *FLI1* の発現低下をきたす分子機構があることが示唆されます(図1)。

マイクロサテライト多型は、強い連鎖不平衡<sup>注6)</sup>にある一塩基バリエント<sup>注7)</sup>(SNV)がない場合、ゲノムワイド関連研究では捕捉しがたいため、“missing heritability”問題(ある疾患において想定される遺伝因子の一部しか見つかっていない問題)の一因となっている可能性があります。今回の知見は、ヒトの全身性強皮症の治療標的としての *FLI1* の重要性を更に支持するとともに、今後の多因子疾患の遺伝因子解明における、SNV 以外のバリエントを探索する重要性をも示唆しています。

参考図

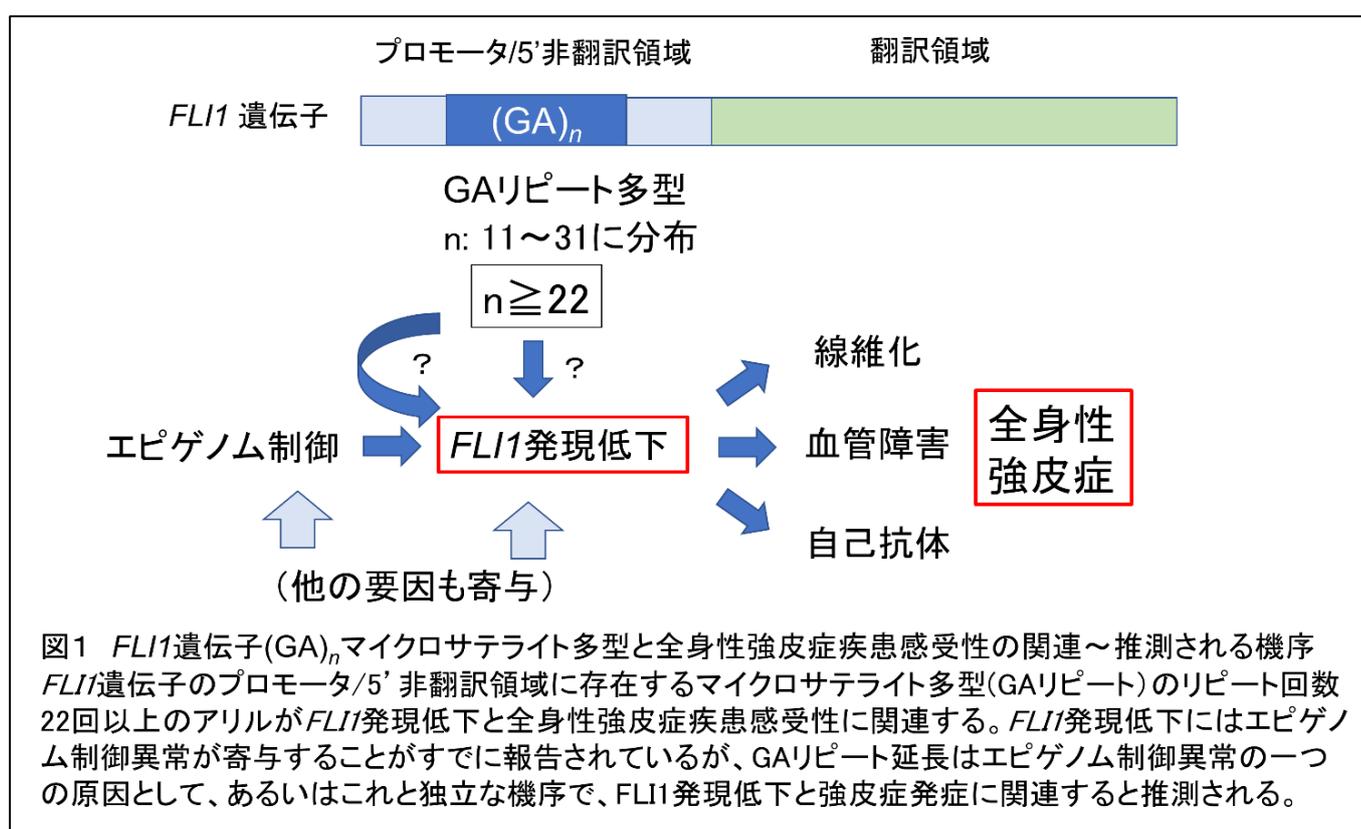
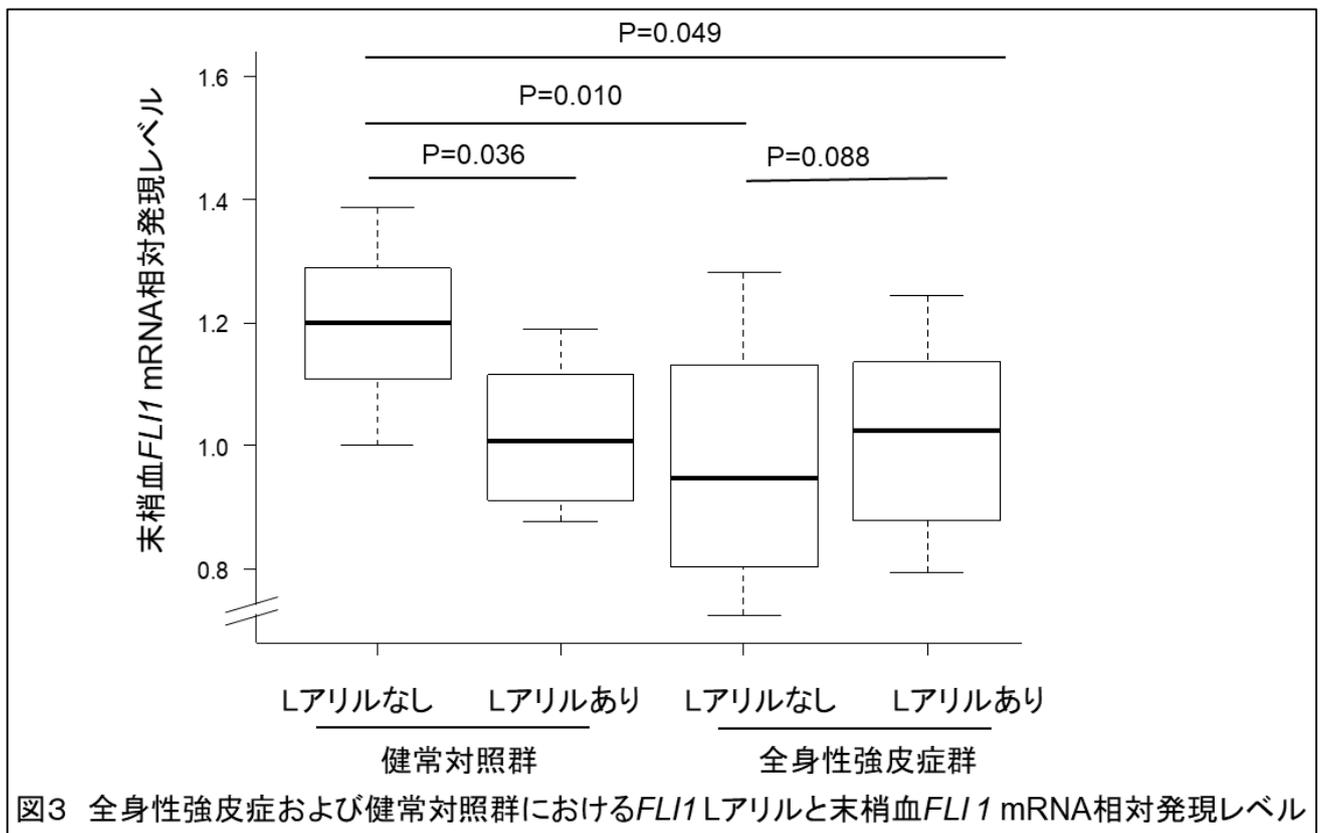
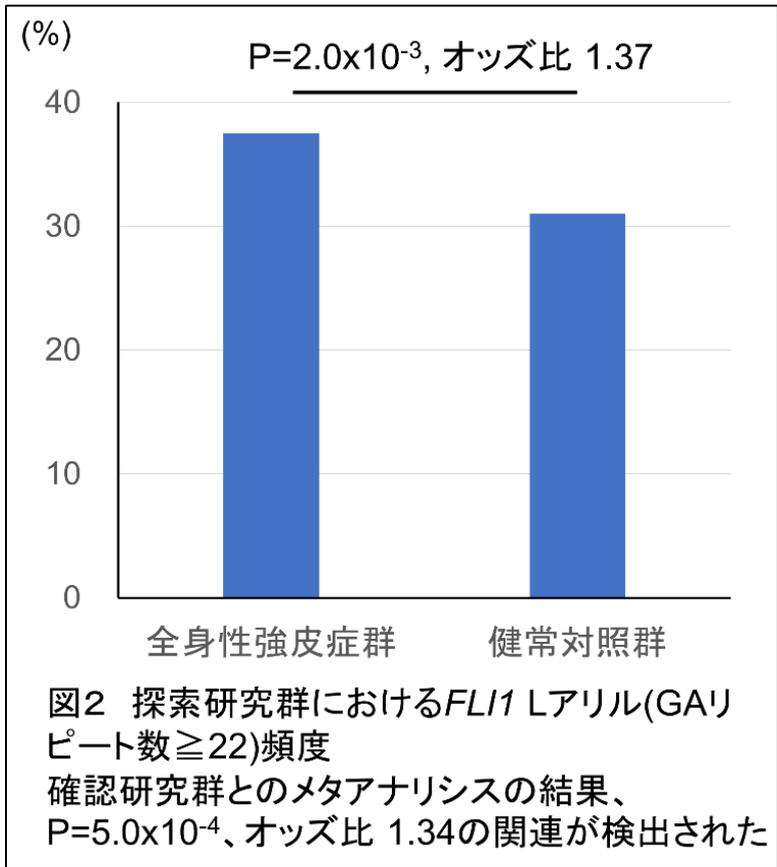


図1 *FLI1*遺伝子(GA)<sub>n</sub>マイクロサテライト多型と全身性強皮症疾患感受性の関連～推測される機序  
*FLI1*遺伝子のプロモータ/5'非翻訳領域に存在するマイクロサテライト多型(GAリピート)のリピート回数22回以上のアリルが*FLI1*発現低下と全身性強皮症疾患感受性に関連する。*FLI1*発現低下にはエピゲノム制御異常が寄与することがすでに報告されているが、GAリピート延長はエピゲノム制御異常の一つの原因として、あるいはこれと独立な機序で、*FLI1*発現低下と強皮症発症に関連すると推測される。



## 用語解説

### 注1) マイクロサテライト多型 (microsatellite polymorphism)

ゲノム配列の中には、同じ塩基配列が何度も繰り返し、その繰り返しの数が個人によって異なる「反復配列多型」が存在します。一般に、反復配列の単位が2～9塩基程度のものを、マイクロサテライトと呼びます。今回対象としたのは、GA という2塩基の配列が繰り返すマイクロサテライト多型です。後述する一塩基バリエーション(SNV)等と比較して、アリル<sup>注4)</sup>数が非常に多いという特徴があります。

### 注2) 膠原病 (collagen diseases, autoimmune rheumatic diseases)

膠原病は全身に症状が現れ、病態に自己免疫が関与すると推定される疾患群です。代表的疾患として、関節破壊を伴う多発関節炎を主徴とする関節リウマチ(RA)、抗核抗体、抗 dsDNA 抗体など、多彩な自己抗体産生と腎、中枢神経、血液、皮膚など全身に症状を呈する全身性エリテマトーデス(SLE)、抗好中球細胞質抗体(ANCA)が産生され、急速進行性糸球体腎炎、間質性肺疾患等をきたす ANCA 関連血管炎(AAV)などがあります。皮膚および肺などの線維化、肺高血圧症などの血管障害等を主徴とし、抗トポイソメラーゼ I 抗体、抗セントロメア抗体などの自己抗体が産生される全身性強皮症(SSc)も代表的な膠原病の一つです。

### 注3) 転写因子 (transcription factor)

DNA に結合して RNA への転写を促進あるいは抑制するタンパク質を転写因子と言います。

### 注4) アリル (allele)

ヒトは両親のそれぞれから染色体を 1 本ずつ受け継ぐので、同じ染色体を2本持っています。片方の染色体にコードされている遺伝子配列をアリル(またはアレル、allele)と呼びます(従来は対立遺伝子と呼ばれてきました)。2本ある同じ染色体の座位ごとに 2 種類のアリルが存在しますが、そのアリルの組み合わせを遺伝型(genotype)と呼びます(従来は遺伝子型と呼ばれてきました)。ある集団において、それぞれのアリルが占める比率のことをアリル頻度と言います。

### 注5) エピゲノム修飾 (epigenetic modification)

DNA の塩基配列の変化を伴わず、DNA メチル化やヒストン修飾(メチル化、アセチル化など)の変化により、遺伝子発現パターンに変化が起こる現象のことをエピゲノム修飾と呼びます。

### 注6) 連鎖不平衡 (linkage disequilibrium, LD)

同じ染色体上にある2カ所以上のバリエーション<sup>注7)</sup>の特定の組み合わせが、偶然期待される頻度と異なる頻度で観察されることを連鎖不平衡と言います。例えば、ある SNV①のアリルが A であるとき、SNV②のアリルが、偶然期待される頻度以上に C になりやすいという現象があれば、SNV①と②は連鎖不平衡の関係にあるといえます。同じ染色体の近くに位置するバリエーションほど連鎖不平衡が強くなる傾向にあります。

### 注7) 一塩基バリエーション (single nucleotide variant, SNV)

遺伝情報は4種類の塩基(A、T、G、C)が連なって構成されています。ヒトが生まれつき持っている塩基配列には、個人間で配列の違いがあります。これをバリエーション(variant)と呼びます。バリエーションのうち、一般集団中に、ある程度の頻度で見出されるものは、これまで多型(polymorphism)と呼ばれてきました。最近では、一般集団中の頻度にかかわらず、バリエーションと総称されることが多くなっています。このうち、1個の塩

基の違いによるものが一塩基バリエーション(SNV)と呼ばれます。ゲノムワイド関連研究は、集団中頻度が比較的高い、ゲノム全体に分布する数十万～数百万個所の SNV を対象とし、連鎖不平衡を利用してゲノム全体を調べて疾患感受性遺伝子のスクリーニングを行う方法です。マイクロサテライト多型は一般にアリル数がSNVよりも多く、SNVとの連鎖不平衡でマイクロサテライト多型の関連を捕捉することが難しくなりがちなため、ゲノムワイド関連研究で関連が見つからない”missing heritability”の一因となると考えられます。

#### 参考文献

- [1] Noda S, Asano Y, Nishimura S, et al. Simultaneous downregulation of KLF5 and Fli1 is a key feature underlying systemic sclerosis. *Nat Commun* 2014; 5: 5797.
- [2] Takahashi T, Asano Y, Sugawara K, et al, Epithelial Fli1 deficiency drives systemic autoimmunity and fibrosis: possible roles in scleroderma *J Exp Med* 2017; 214:1129-1151.
- [3] Morris EE, Amria MY, Kistner-Griffin E, et al. A GA microsatellite in the Fli1 promoter modulates gene expression and is associated with systemic lupus erythematosus patients without nephritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R212.

#### 掲載論文

【題名】 Association of functional (GA)<sub>n</sub> microsatellite polymorphism in the *FLI1* gene with susceptibility to human systemic sclerosis (日本語訳: *FLI1* 遺伝子内の(GA)<sub>n</sub>マイクロサテライト多型がヒト全身性強皮症の疾患感受性に関連する)

【著者名・所属】Keita Yamashita<sup>1,2,3</sup>, Aya Kawasaki<sup>1,2</sup>, Takashi Matsushita<sup>4</sup>, Hiroshi Furukawa<sup>1,2,5,6</sup>, Yuya Kondo<sup>7</sup>, Naoko Okiyama<sup>8</sup>, Shouhei Nagaoka<sup>9</sup>, Kota Shimada<sup>5,10</sup>, Shoji Sugii<sup>10</sup>, Masao Katayama<sup>11</sup>, Shunsei Hirohata<sup>12</sup>, Akira Okamoto<sup>13</sup>, Noriyuki Chiba<sup>14</sup>, Eiichi Suematsu<sup>15</sup>, Keigo Setoguchi<sup>16</sup>, Kiyoshi Migita<sup>17</sup>, Takayuki Sumida<sup>7</sup>, Shigeto Tohma<sup>5,6</sup>, Yasuhito Hamaguchi<sup>4</sup>, Minoru Hasegawa<sup>18</sup>, Shinichi Sato<sup>19</sup>, Yasushi Kawaguchi<sup>20</sup>, Kazuhiko Takehara<sup>4</sup>, Naoyuki Tsuchiya<sup>1,2</sup>

1 Molecular and Genetic Epidemiology laboratory, Faculty of Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.

2 Doctoral Program in Biomedical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.

3 Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

4 Department of Dermatology, Kanazawa University, Kanazawa, Japan.

5 Clinical Research Center for Allergy and Rheumatology, National Hospital Organization Sagamihara Hospital, Sagamihara, Japan.

6 Department of Rheumatology, National Hospital Organization Tokyo National Hospital, Kiyose, Japan.

7 Department of Internal Medicine, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.

8 Department of Dermatology, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.

9 Department of Rheumatology, Yokohama Minami Kyosai Hospital, Yokohama, Japan.

10 Department of Rheumatology, Tokyo Metropolitan Tama Medical Center, Fuchu, Japan.

11 Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan.

12 Department of Rheumatology and Infectious Diseases, Kitasato University School of Medicine,

Sagamihara, Japan.

13 Department of Rheumatology, National Hospital Organization Himeji Medical Center, Himeji, Japan.

14 Department of Rheumatology, National Hospital Organization Morioka Medical Center, Morioka, Japan.

15 Department of Internal Medicine and Rheumatology, Clinical Research Institute, National Hospital Organization Kyushu Medical Center, Fukuoka, Japan.

16 Allergy and Immunological Diseases, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center Komagome Hospital, Tokyo, Japan.

17 Department of Rheumatology, Fukushima Medical University School of Medicine, Fukushima, Japan.

18 Department of Dermatology, University of Fukui, Japan.

19 Department of Dermatology, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

20 Department of Rheumatology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine, Tokyo, Japan.

【掲載誌】 *Rheumatology* (Oxford) 2020 Jul 22:keaa306. doi: 10.1093/rheumatology/keaa306.

Online ahead of print.

問合わせ先

土屋 尚之(つちや なおゆき)

筑波大学 医学医療系 (分子遺伝疫学研究室) 教授