

# 関節リウマチにおける薬剤性肺障害発症に関わる遺伝子の探索

国立病院機構相模原病院 臨床研究センター

遺伝子診断・治療研究室長 古川 宏

## はじめに

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<sup>1</sup>、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<sup>2</sup>、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・鎖の70-74番目のアミノ酸配列を共有しており (QKRAA, RRRRAA, 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<sup>3</sup>。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<sup>4</sup>、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。

## 対象及び方法

### 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)<sup>5</sup>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。

### 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。

### 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。

## 結 果

### 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。表1はHLA class IIのタイピング結果であり、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<sup>5</sup>。ILD(+)]RAではDR2血清型グループ (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。

### 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

表1 HLA class IIアレル頻度

	ILD(+)RA	ILD(-)RA	P	OR	Pc	95%CI
DRB1*01	21 (8.1)	44 (6.8)	0.5692	1.20	NS	
DRB1*04	71 (27.5)	257 (40.1)	0.0004	0.57	0.005	(0.41-0.78)
DRB1*07	0 (0)	2 (0.3)	1	0	NS	
DRB1*08	11 (4.2)	38 (5.9)	0.4167	0.71	NS	
DRB1*09	43 (16.6)	103 (16.0)	0.8419	1.04	NS	
DRB1*10	2 (0.7)	5 (0.7)	1	0.99	NS	
DRB1*11	3 (1.1)	8 (1.2)	1	0.93	NS	
DRB1*12	13 (5.0)	30 (4.6)	0.8632	1.08	NS	
DRB1*13	15 (5.8)	25 (3.9)	0.2141	1.52	NS	
DRB1*14	18 (6.9)	32 (5.0)	0.2610	1.43	NS	
DRB1*15	55 (21.3)	95 (14.8)	0.0228	1.55	0.296	(1.07-2.25)
DRB1*16	6 (2.3)	1 (0.1)	0.0029	15.2	0.037	(1.82-127.01)
SE	92 (35.7)	166 (64.3)	0.0055	0.66	*	(0.49-0.88)
DR2	61 (23.6)	197 (76.4)	0.0020	1.75	*	(1.22-2.51)
DQB1*02	0 (0)	2 (0.3)	1	0	NS	
DQB1*03	73 (28.5)	182 (28.3)	1	1.01	NS	
DQB1*04	63 (24.6)	233 (36.2)	0.0007	0.57	0.004	(0.41-0.79)
DQB1*05	38 (14.8)	77 (11.9)	0.2688	1.28	NS	
DQB1*06	82 (32.0)	148 (23.0)	0.0067	1.57	0.033	(1.14-2.17)
DPB1*02	70 (27.1)	206 (32.0)	0.1509	0.79	NS	
DPB1*03	7 (2.7)	28 (4.3)	0.3400	0.61	NS	
DPB1*04	42 (16.2)	103 (16.0)	0.9204	1.02	NS	
DPB1*05	96 (37.2)	227 (35.3)	0.6448	1.08	NS	
DPB1*06	1 (0.3)	5 (0.7)	0.6797	0.50	NS	
DPB1*09	25 (9.6)	47 (7.3)	0.2766	1.36	NS	
DPB1*13	5 (1.9)	7 (1.0)	0.3403	1.79	NS	
DPB1*14	8 (3.1)	10 (1.5)	0.1846	2.02	NS	
DPB1*17	0 (0)	1 (0.1)	1	0	NS	
DPB1*19	2 (0.7)	3 (0.4)	0.6282	1.66	NS	
DPB1*38	0 (0)	2 (0.3)	1	0	NS	
DPB1*41	1 (0.3)	2 (0.3)	1	1.25	NS	
DPB1*47	1 (0.3)	1 (0.1)	0.4914	2.49	NS	

OR: オッズ比, 95%CI: 95%信頼区間, Pc: 補正後P値, NS: 有意差無 カッコ内はアレル頻度を表す(%). 2X2分割表を用いたカイ2乗検定またはFisher正確確率検定で解析した.\*カイ2乗検定

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)<sup>6</sup>。また、A19 (A\*29-\*33, \*74) 血清型グループとの関連も認めた ( $P=6.47 \times 10^{-5}$ , OR 2.59, 95%CI 1.67-4.01)。

## 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  $P=4.85 \times 10^{-6}$ ,  $1.76 \times 10^{-7}$  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。

## 考 察

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<sup>3</sup>、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<sup>7</sup>。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<sup>4</sup>、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て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。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たり、貴重な調査研究助成を賜りました公益財団法人大和証券ヘルス財団に深謝いたします。さらに、遺伝子タイピングに協力して下さった岡笑美博士（相模原病院）、西田奈央博士，豊岡理人修士（東京大学）と、研究デザインと統計解析に協力して下さった當間重人先生（相模原病院）、徳永勝士先生（東京大学）、土屋尚之先生（筑波大学）、大橋順先生（筑波大学）、検体収集に協力して下さったRA-ILD 研究コンソーシアムの先生方に深く感謝いたします。RA-ILD 研究コンソーシアム：岡本享先生（姫路医療センター）、末永康夫先生，宇都宮勇人先生（別府医療センター）、税所幸一郎先生（都城病院）、市川健司先生（北海道医療センター）、末石眞先生（下志津病院）、末松栄一先生（九州医療センター）、河部庸次郎先生（嬉野医療センター）、吉永泰彦先生（倉敷成人病センター）、千葉実行先生（盛岡病院）、長岡章平先生，須田昭子先生（横浜南共済病院）、大野滋先生（横浜市立大学市民総合医療センター）、右田清志先生，宮下賜一郎先生（長崎医療センター）、中村正先生，高岡宏和先生（くまもと森都総合病院）、茂木充先生（高崎総合医療センター）、伊藤聡先生（新潟県立リウマチセンター）、河野肇先生（帝京大学）、瀬戸口京吾先生（がん感染症センター都立駒込病院）、長谷川公範先生（勤医協中央病院）、廣畑俊成先生，永井立夫先生，有沼良幸先生（北里大学）、杉井章二先生，島田浩太先生（都立多摩総合医療センター）、渡邊紀彦先生（千葉県済生会習志野病院）、松多邦雄先生（松多内科医院）、八田和大先生（天理よろづ相談所病院）、佐藤健夫先生（北見赤十字病院）、森俊輔先生（熊本再春荘病院）、福田孝昭先生，本多靖洋先生（久留米大学医療センター）、片山雅夫先生（名古屋医療センター）、山口晃弘先生（下北沢病院）、福田亙先生（京都第一赤十字病院）、角田慎一郎先生（兵庫医科大学）、松井利浩先生，池中達央先生，橋本篤先生，二見秀一先生，野木真一先生，岡崎優子先生，小宮明子先生，福井尚志先生（相模原病院）。

## 要 約

関節リウマチ (RA) にしばしば伴う間質性肺病変 (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の既往が明らかな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血清型 (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、HLA-A\*31:01と関連した。

## 文 献

1. Koduri, G. et al. Interstitial lung disease has a poor prognosis in rheumatoid arthritis: results from an inception cohort. *Rheumatology* 49, 1483-9 (2010).
2. Shidara, K. et al. Incidence of and risk factors for interstitial pneumonia in patients with rheumatoid arthritis in a large Japanese observational cohort, IORRA. *Mod Rheumatol* 20, 280-6.(2010).
3. Turesson, C. et al. The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7, R1386-93. (2005).
4. Chung, W.H. et al. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature*. 428, 486. (2004).
5. Furukawa, H. et al. Association of Human Leukocyte Antigen with Interstitial Lung Disease in Rheumatoid Arthritis: A Protective Role for Shared Epitope. *PLoS ONE* 7, e33133 (2012).
6. Furukawa, H. et al. HLA-A\*31:01 and Methotrexate-Induced Interstitial Lung Disease in Japanese Rheumatoid Arthritis Patients: A Multi-Drug Hypersensitivity Marker? *Ann Rheum Dis*. in press.
7. Migita, K., Nakamura, T., Koga, T. & Eguchi, K. HLA-DRB1 alleles and rheumatoid arthritis-related pulmonary fibrosis. *J Rheumatol*. 37, 205-7. (2010).