

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104
研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）
研究期間：2010～2014
課題番号：22133003
研究課題名（和文）HLA領域非コードRNA群の多様性と機能解析

研究課題名（英文）Epigenetic variation in HLA genome

研究代表者

山本 健（Yamamoto, Ken）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60274528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 47,800,000円

研究成果の概要（和文）：HLA領域のエピゲノム多様性を解明し、エピジェネティックスの観点から疾患発症におけるHLA領域の意義解明を目指した。HLAアレル特異的にDNAメチル化レベルが変化する領域を同定するために、A, C, B, DRB1, DQB1, DPB1遺伝子座について網羅的な解析を進め、DPB1*05:01に特異的な低DNAメチル化CpGサイトをDPA1とDPB1のプロモーター領域に同定した。また、Cw*07:02と有意に関連するCpGサイトをC遺伝子座領域内に複数同定した。これらのHLAの発現量は他のアレルと異なっており、ゲノムのみならずエピゲノムにもHLAアレルとリンクした多様性が存在していた。

研究成果の概要（英文）：We investigated a role of epigenetic variation in HLA genomic region for better understanding of the pathogenesis of HLA-associated diseases. Through the association analysis between HLA alleles in HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQB1 and -DPB1 loci and DNA methylation levels of CpG sites located in 3.8 Mb of HLA region, we identified correlation of DPB1*05:01 or Cw*07:02 to the methylation levels of the sites around DPA1 and DPB1 promoter region or around Cw locus, respectively. In addition, the expression level of DPB1*05:01 was associated with the methylation levels. These results suggest that particular HLA alleles possess their own epigenetic status in HLA region.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：HLA epigenome DNA methylation SNP disease

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノムワイド相関解析により、免疫関連疾患と強く相関する遺伝子多型が HLA 領域内に同定され、免疫疾患と HLA との相関があらためて確認された。しかし、HLA 領域の際立った遺伝学的特徴(多重遺伝子族、高度の多型性、強い連鎖不平衡、高い遺伝子密度)により、真の原因遺伝子が HLA なのか、HLA と連鎖不平衡にある非 HLA 遺伝子なのか、不明のまま解決すべき課題として残っている。

HLA 領域内の非 HLA 遺伝子の中には、非コード RNA (non-coding RNA:ncRNA) が、偽遺伝子に由来する高分子 RNA を含め存在する。転写制御をはじめとするその多彩な機能に鑑みれば、HLA 領域内 ncRNA の機能と多様性を理解することは、本領域が掲げる「HLA の成り立ちの進化学的解明」および「免疫応答関連疾患発症における HLA の役割の解明と HLA を標的とした分子創薬のための免疫抑制分子の解明」という目的の達成に必須である。また、ncRNA のみならず、HLA 領域エピゲノム多様性については不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、HLA 領域の ncRNA を含むエピゲノム多様性を解明し、エピジェネティクスの観点から疾患発症における HLA 領域の意義解明を目指す。

3. 研究の方法

HLA 領域に位置する ncRNA の同定：ヒト不死化 B 細胞株 (LCL) 14 検体について、定法に従い、短鎖 ncRNA を標的としてトランスクリプトーム解析を行う。次世代シーケンサー(現有 G11x)を用いる。用いる LCL は既に HLA 6 遺伝子座のタイピングがなされており、かつ、拡大 HLA 領域に位置する約 6,000 個のコモン SNP のタイピングが終了しており、これを活用して、マッピングとともに HLA および SNP アレル間での発現量の違いを解析する。

long ncRNA DPB2 が制御する標的遺伝子の同定：特に自己免疫性甲状腺炎との相関が示唆される DPB2 に着目している。DPB2 をクローニングし、そのエクソン構成を解析したところ、多種多様なスプライシングが生じていることを明らかにした。中でも、細胞表面ドメインのみを発現するアイソフォームに注目し、これが、DP 分子の機能を阻害する可能性を作業仮説として、DP 分子拘束性免疫応答との干渉を細胞生物学実験にて証明する。具体的には、DP5 を介した免疫応答の解析を A04 笹月と連携して実施する。

HLA 領域の DNA メチル化解析：HLA 6 遺伝子座タイピング、拡大 HLA 領域に位置する約 6,000 個のコモン SNP タイピングが終了した LCL92 検体について、DNA メチル化チップにより HLA 領域約 14,000 サイトの DNA メチレーションレベルを取得した。HLA 遺伝子座固有、HLA アレル固有の DNA メチル化レベルを解明し、顕著に関連があるものについては、発現量との関連を解析する。HLA 領域のヒストン修飾解析：上記 LCL24 検体に関して、ヒストン H3K9 メチル化修飾に特異的に結合する HP1 分子を用いて、H3K9 メチル化ヌクレオゾームを単離した。そのヌクレオゾーム DNA の配列決定を行い、HLA 領域における上記ヒストン修飾の分布を解明する。H3K9 修飾は主に転写抑制に関わっている。本解析の後に、抗ヒストン H3 および H4 アセチル化抗体を用いた Chip-seq により、転写活性化修飾の分布を明らかにする。

4. 研究成果

(1) HLA 領域に存在する ncRNA を同定するために、日本人由来 LCL 細胞 7 株について RNA を抽出し、RNAseq を行った。その結果、H-Inv データベースに登録されているもの以外の新規の ncRNA は同定出来なかった。また発現量も低く、個別の ncRNA の機能の検討を継続することは困難であった。発現は細胞種によって異なることから LCL 株以外の細胞株を実験に利用することも考慮したが、HLA 多様性の観点から研究を進めるためには、一定規模の異なる個体由来の細胞が不可欠であり、ncRNA の検討を通して、HLA 領域のエピゲノム多様性を解明する研究手法は平成 24 年度までとした。

(2) 日本人由来 LCL 細胞株 92 検体を用い、HLA-A, C, B, DRB1, DQB1, DPB1 座の各アレルと拡大 HLA 領域約 8Mb に位置する 6,502 個の日本人コモン SNP との連鎖不平衡について詳細に解析し、各アレルと強い連鎖不平衡にある SNP 座位ならびに SNP ハプロタイプを同定した。これにより、HLA と相関する疾患において考慮すべき非 HLA 遺伝子や SNP 遺伝子型からの HLA 遺伝子型予測が可能となり、この成果を、Genes Immune 誌に報告した。

(3) HLA 領域 DNA メチル化の多様性解析：HLA アレル特異的に DNA メチル化レベルが変化する領域を同定するために、A, C, B, DRB1, DQB1, DPB1 遺伝子座について網羅的な解析を進め、DPB1*05:01 に特異的な低 DNA メチル化 CpG サイトを DPA1 と DPB1 のプロモーター領域に同定した。アレル特異的な定量 PCR により、DPB1*05:01 の転写産物が他に比して高い事を証明し、DP5 が

他の DP と比較して高発現である可能性を示唆した。また、Cw*07:02 と有意に関連する CpG サイトを C 遺伝子座領域内に複数同定した。主成分分析において、Cw*07:02 を有する個体は他の個体と明確に判別できた。これは、Cw*07:02 がアレル特異的に特有の DNA メチル化レベルを遺伝子領域内に有することを示している。Cw*07:02 は他のアレルと比較して低発現であることが知られており、本研究が明らかにした特有のエピゲノム状態が Cw*07:02 の発現を規定している可能性がある。

(4) 領域内研究者と連携してゲノム解析を推進し、HLA と疾病との関連研究を進めた。A04 笹月班との共同研究を実施し、グレープス病と橋本病の遺伝要因の差異を解明するために、ゲノムワイドでの相関解析を、グレープス病 547 名、橋本病 446 名に対して二段階スクリーニングにて実施し、最終的に、 $P = 3.90 \times 10^{-8}$; $OR = 1.77$; $95\%CI = 1.44-2.17$ の有意差を示す SNP を VAV3 遺伝子座に同定した (rs7537605)。コントロール群 1363 名との比較から、VAV3 遺伝子座は橋本病に特異的な感受性遺伝子であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Oryoji D, Ueda S, Yamamoto K, Yoshimura Noh J, Okamura K, Noda M, Watanabe N, Yoshihara A, Ito K, Sasazuki T: Identification of a Hashimoto thyroiditis susceptibility locus via a genome-wide comparison with Graves' disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100: E319-24, 2015 (査読有り)

Oryoji D, Hisamatsu T, Tsuchiya K, Umeno J, Ueda S, Yamamoto K, Matsumoto T, Watanabe M, Hibi T, Sasazuki T: Associations of HLA class I alleles in Japanese patients with Crohn's disease. *Genes Immun.* 16: 54-56, 2015 (査読有り)

Sato T, Nakagome S, Watanabe C, Yamaguchi K, Kawaguchi A, Koganebuchi K, Haneji K, Yamaguchi T, Hanihara T, Yamamoto K, Ishida H, Mano S, *Kimura R, Oota H: Genome-Wide SNP Analysis Reveals Population Structure and

Demographic History of the Ryukyu Islanders in the Southern Part of the Japanese Archipelago. *Mol. Biol. Evol.* 31: 2929-2940, 2014 (査読有り)

Kusano S, Kukimoto-Niino M, Satta Y, Ohsawa N, Uchikubo-Kamo T, Wakiyama M, Ikeda M, Terada T, Yamamoto K, Nishimura Y, Shirouzu M, Sasazuki T, *Yokoyama S: Structural basis for the specific recognition of the major antigenic peptide from the Japanese cedar pollen allergen Cry j 1 by HLA-DP5. *J. Mol. Biol.* 426: 3016-3027, 2014 (査読有り)

Ueda S, Oryoji D, Yamamoto K, Noh JY, Okamura K, Noda M, Kashiwase K, Kosuga Y, Sekiya K, Inoue K, Yamada H, Oyamada A, Nishimura Y, Yoshikai Y, Ito K, Sasazuki T: Identification of independent susceptible and protective HLA alleles in Japanese autoimmune thyroid disease and their epistasis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99: E379-383, 2014 (査読有り)

Teshiba R, Tajiri T, Sumitomo K, Masumoto K, Taguchi T, *Yamamoto K: Identification of a KEAP1 germline mutation in a family with multinodular goitre. *PLoS ONE* 8: e65141, 2013 (査読有り)

Yoshimura S, Isobe N, Yonekawa T, Matsushita T, Masaki K, Sato S, Yamamoto K, *Kira J: the South Japan Multiple Sclerosis Genetics Consortium: Genetic and infectious profiles of Japanese multiple sclerosis patients. *PLoS ONE* 7: e48592, 2012 (査読有り)

Kitajima H, Sonoda M, *Yamamoto K: HLA and SNP haplotype mapping in the Japanese population. *Gene Immun.* 13: 542-548, 2012 (査読有り)

Nakabayashi K, Tajima A, Yamamoto K, Takahashi A, Hata K, Takashima Y, Koyanagi M, Nakaoka H, Akamizu T, Ishikawa N, Kubota S, Maeda S, Tsunoda T, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y, Sasazuki T, *Shirasawa S: Identification of independent risk loci for Graves' disease within

the MHC in the Japanese population.
J. Hum. Genet. 56: 772-778, 2011 (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)

山本 健:ゲノム配列と後天的修飾の個体差に基づく多因子疾患感受性遺伝子の同定. 第31回福岡大学基盤研究機関先端分子医学研究所セミナー, 2015年1月23日, 福岡大学医学部(福岡).

Isomoto A, Kitajima H, Ichihara S, Nakatochi M, Matsubara T, Yokota M, Takayanagi R, Yamamoto K: Smoking causes epigenetic change in humans. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年12月25-27日, パシフィコ横浜(横浜).

岩谷千寿, 北島秀俊, 山本 健:マウスにおける加齢に伴う組織特異的なDNAメチル化変化の研究. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年12月25-27日, パシフィコ横浜(横浜).

西田奈央, 澤井裕美, 山本 健, 馬渡頼子, 杉山真也, 笹月健彦, 徳永勝士, 溝上雅史:日本人におけるB型慢性肝炎とHLA-DPB1 アリルの関連解析. 日本人類遺伝学会第59回大会, 2014年11月19-22日, タワーホール船堀(東京).

山本 健:DNAチップの可能性 - 相関, 連鎖, エピジェネティクス -. 第65回日本臨床眼科学会, 2011年10月7日, 東京国際フォーラム(東京).

〔図書〕(計1件)

上田 彰, 山本 健, 押領司大助, 笹月健彦:橋本病とグレイブス病の発症とHLA, 医薬ジャーナル社, 血液フロンティア, 1073-1079, 2013.

〔その他〕

領域ホームページ

http://dbhla.jp/HP_sinryoiki/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 健 (Yamamoto Ken)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号:60274528