

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02373

研究課題名(和文) アレル優位性を有するクロマチン高次構造解析による子宮内膜症の分子機序解明

研究課題名(英文) Allelic Imbalance in Regulation of ANRIL through Chromatin Interaction at 9p21 Endometriosis Risk Locus

研究代表者

井ノ上 逸朗 (Inoue, Ituro)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授

研究者番号：00192500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内膜症におけるアレルに伴う遺伝子発現変化を検討している。遺伝子領域に存在していないSNPは、エンハンサー活性に影響を与える。アレルによるエンハンサー活性の違いをクロマチン3次元構造などで示すことができた。in vivo測定としてエンハンサー候補領域をGFP遺伝子の5'側にクローニングし、ゼブラフィッシュ受精卵にインジェクションし、エンハンサー活性をGFP活性として検出した。疾患に関連するSNP解析からアレルに伴うエンハンサー活性の違い、in vivoでのエンハンサー活性を示すことができ、疾患遺伝子研究に大きく貢献することとなった。

研究成果の概要(英文)：We explored regulatory mechanism of a SNP on chromosome 9p21 associated with endometriosis by leveraging "allele-specific" functional genomic approaches. By re-sequencing 1.29 Mb of 9p21 region and scrutinizing DNase-seq data from the ENCODE project, we prioritized rs17761446 as a candidate functional variant that was in perfect linkage disequilibrium with the GWAS SNP (rs10965235) and located on DNase I hypersensitive site. Chromosome conformation capture followed by high-throughput sequencing revealed that the protective G allele of rs17761446 exerted stronger chromatin interaction with ANRIL promoter. The protective allele exhibited preferential binding affinities to TCF7L2 and EP300 by chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses. The allele specific expression analysis for eutopic endometrial tissues and endometrial carcinoma cell lines showed that rs17761446 was a cis-regulatory variant where G allele was associated with increased ANRIL.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：子宮内膜症 アレル優位性 エンハンサー活性 クロマチン高次構造 疾患関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

2012年に発表されたゲノム全域での転写調節を網羅した ENCODE 計画の成果報告は common disease の研究環境を一変させた。ヒトゲノムの約 80%が転写制御エレメント(転写領域、プロモーター、エンハンサーなど)としての機能を有すること、転写制御エレメントは組織や細胞株特異的にゲノム上に分布することなどが示された。特に Maurano et al. (Science 2012)は GWAS で同定された SNP の大半が転写制御エレメント(DHS: DNase hypersensitive site)に位置することを示した。このことは common disease のメカニズムに重要な示唆を与えてくれる。本研究では子宮内膜症を対象とし、ENCODE 計画の提供する DNase-seq データを解析し、実験的に子宮内膜症関連組織における転写制御エレメントを同定し、クロマチン高次構造解析による転写制御メカニズム、ひいては疾患分子メカニズムの解明そして治療法の手がかりを得る。

子宮内膜症は生殖年齢の女性の 10%が罹患している頻度の高い疾患である。月経困難症や不妊の原因であり、女性の社会進出を防ぐ要因かつ少子化とも関連する社会的損失の大きい疾患ともいえる。さらに重要な問題は、子宮内膜症が卵巣癌の基礎疾患となっていることである。多くの女性を苦しめている子宮内膜症ながら、原因はいまだ不明である。我々を含め複数の施設から子宮内膜症に対して GWAS 成果が報告され、感受性遺伝子同定が進んできている。これらの成果は子宮内膜症発症過程を遺伝統計学的に検討するものであるが、それだけでは疾患分子メカニズムの理解には繋がらないし、治療法の開発もできない。本研究では ENCODE データの利用と実験手法により疾患と直接関連する機能的 SNP を同定し、アレル優位性を有する遺伝子発現調節分子メカニズムを解明する。かつ、子宮内膜症組織での遺伝子発現プロファイルとの関連を検討する。

2. 研究の目的

子宮内膜症 GWAS メタ解析により同定されたすべての SNPs から機能的 SNPs を同定し、そのクロマチン高次構造解析から転写調節変化を明らかにし、疾患分子メカニズムの全貌を明らかにする。日本人において最も有意差の高かった SNP は rs10965235 で 9p21 に存在していた。ただし、この SNP は単にマーカーで真の機能的 SNP が連鎖不平衡にある可能性を否定できない。真の機能的 SNP は転写調節に関与していると予想できるので、以下に示すヒト子宮内膜由来細胞、子宮内膜組織を用いた一連の実験的研究により組織特異的に機能する SNP による転写調節メカニズム解明を目指す。また子宮内膜症由来組織(卵巣および腹膜)での遺伝子発現プロファイルも検討する。

- 1) GWAS ヒット SNP と連鎖不平衡にあり DHS に位置する SNP を同定
- 2) 子宮内膜由来細胞での chromatin conformation capture (3C) 法によりクロマチン高次構造によるプロモーターとの相互作用の検討。これにより機能的 SNP 同定とターゲット遺伝子を明らかにできる。同時にディープシーケンシングによりアレル優位性を有するクロマチン相互作用を明らかにする
- 3) in silico および ChIP-seq 解析により機能的 SNP サイトに特異的に結合する転写因子同定
- 4) 正所性子宮内膜組織を用いた機能的 SNP によりターゲット遺伝子のアレル優位の遺伝子発現変化の検討
- 5) 子宮内膜症組織(卵巣、腹膜)における網羅的遺伝子発現プロファイルによる病態の検討と転写調節との因果関係の解明

3. 研究の方法

本研究では子宮内膜由来細胞、組織、および子宮内膜症組織を用い、GWAS ヒットした遺伝子座について機能的 SNP を同定し高次クロマチン構造解析から転写調節ネットワークへの機能的関与を網羅する。子宮内膜症 DNA 検体 800 例および対照 2,000 例を有しており、必要に応じ遺伝子タイピングを行う。またすべての症例で詳細な臨床症状をファイル化できている。現時点で正所性子宮内膜組織は 23 例収集しており、アレル優位の遺伝子発現解析に供与する。子宮内膜症組織は腹膜、卵巣から 21 例得ている。連携研究者の新潟大学、日本医科大学の協力により検体は随時増やす予定である。子宮内膜由来癌細胞株は 4 種有している。機能的 SNP の同定に伴いヘテロ接合性を有する細胞をアレル優位のクロマチン相互作用解析に用いる。

子宮内膜症 GWAS メタ解析で同定されている SNP は 11 カ所あり、その中で P 値 10^{-10} 以下の有意差を示す SNP は 6 カ所同定されている。9p21 に存在するマーカーである rs10965235 についてはすでに解析完了している。9p21 領域の検討から子宮内膜症の発症への Wnt シグナル経路の関与が推察されたため、WNT4 近傍の rs7521902 を優先的に解析する。GWAS ヒット SNP と連鎖不平衡にあり DNS に存在する機能的 SNP 同定などは多くの SNP を同時に解析する、異なる転写因子による遺伝子発現調節などは個別に検討する。

4. 研究成果

GWAS ヒットした遺伝子座について、機能的 SNP 解析の同定そしてどの転写因子、またパスウェイが関与しているかを実験手法で明らかにすることができた。かつアレルによるわずかな差異を実験的手法と統計学的手法

で明確に示すことができた。具体的には 9p21 に存在する rs10965235 はマーカーとなっており、連鎖不平衡にある rs17761446 が機能的 SNP であり ANRIL の転写調節に関与することを明らかにし、その調節には Wnt シグナルが関与することまで示すことができています。同時に子宮内膜症に関連する遺伝子ネットワークの全貌を明らかにすることができています。

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 23 件)

1. Imine M, Lee HC, Nakaoka H, Orita H, Kobayashi T, Mizuguchi K, Endo M, Inoue I, Sato K, Yokomizo T. The Relationship between TP53 Gene Status and Carboxylesterase 2 Expression in Human Colorectal Cancer. *Disease Markers* 1-7, 2018. 査読有
DOI: 10.1155/2018/5280736
2. Horikawa Y, Hosomichi K, Ishiura H, Suzuki Y, Tsuji S, Inoue I, Takeda J. No novel, high penetrant gene might remain to be found in Japanese patients with unknown MODY. *Journal of Human Genetics*, 2018. in press 査読有
DOI: 10.1038/s10038-018-0449-4
3. Higashino T, Takada T, Nakaoka H, Toyoda Y, Stiburkova B, Miyata H, Ikebuchi Y, Nakashima H, Shimizu S, Kawaguchi M, Sakiyama M, Nakayama A, Akashi A, Tanahashi Y, Kawamura Y, Nakamura T, Wakai K, Okada R, Yamamoto K, Hosomichi K, Hosoya T, Ichida K, Ooyama H, Suzuki H, Inoue I, Merriman TR, Shinomiya N, Matsuo H. Multiple common and rare variants of ABCG2 cause gout. *RMD Open* 3, e000464, 2017. 査読有
DOI: 10.1136/rmdopen-2017-000464
4. Akatsuka H, Kuga S, Masuhara K, Davaadorj O, Okada C, Iida Y, Okada Y, Fukunishi N, Suzuki T, Hosomichi K, Ohtsuka M, Tanaka M, Inoue I, Kimura M, Sato T. AMBRA1 is involved in T cell receptor-mediated metabolic reprogramming through an ATG7-independent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 491, 1098-1104, 2017. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.019
5. Kawano T, Hosomichi K, Inoue I, Shimono R, Onishi S, Nakame K, Matsufuji H, Ieiri S. Identification of a novel variant of the RET proto-oncogene in a novel family with Hirschsprung's disease. *Pediatric Surgery International* 33, 1041-1046, 2017. 査読有
DOI: 10.1007/s00383-017-4134-z
6. Ito J, Sugimoto R, Nakaoka H, Yamada S, Kimura K, Hayano T, Inoue I. Systematic identification and characterization of regulatory elements derived from human endogenous retroviruses. *PLoS Genetics* 13, e1006883, 2017. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pgen.1006883
7. Nakayama A, Nakaoka H, Yamamoto K, Inoue I, Shinomiya N, Merriman TR, Matsuo H, et al. GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Annals of the Rheumatic Diseases* 76, 869-877, 2017. 査読有
DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-209632
8. Watanabe H, Goto S, Mori H, Higashi K, Hosomichi K, Aizawa N, Takahashi N, Tuchida M, Suzuki Y, Yamada T, Horii A, Inoue I, Kurokawa K, Narita I. Comprehensive microbiome analysis of tonsillar crypts in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation* 32, 2072-2079, 2017. 査読有
DOI: 10.1093/ndt/gfw343
9. Kanzawa-Kiriyama H, Kryukov K, Jinam TA, Hosomichi K, Saso A, Suwa G, Yoneda M, Tajima A, Shinoda KI, Inoue I, Saitou N. A partial nuclear genome of the Jomons who lived 3000 years ago in Fukushima, Japan. *Journal of Human Genetics* 62, 213-221, 2017. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2016.110
10. Ahmadloo S, Nakaoka H, Hayano T, Hosomichi K, You H, Utsuno E, Sangai T, Nishimura M, Matsushita K, Hata A, Nomura F, Inoue I. Rapid and cost-effective high-throughput sequencing for identification of germline mutations of BRCA1 and BRCA2. *Journal of Human Genetics* 62, 561-567, 2017. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2017.5
11. Yamaguchi T, Hosomichi K, Yano K, Kim YI, Nakaoka H, Kimura R, Otsuka H, Nonaka N, Haga S, Takahashi M, Shiota T, Kikkawa Y, Yamada A, Kamijo R, Park SB, Nakamura M, Maki K, Inoue I.

- Comprehensive genetic exploration of selective tooth agenesis of mandibular incisors by exome sequencing. *Human Genome Variation* 4, 17005, 2017. 査読有
DOI: 10.1038/hgv.2017.5
12. Romero V, Hosomichi K, Nakaoka H, Shibata H, Inoue I. Structure and evolution of the filaggrin gene repeated region in primates. *BMC Evolutionary Biology* 17, 10, 2017. 査読有
DOI: 10.1186/s12862-016-0851-5
13. Hayano T, Matsui H, Nakaoka H, Ohtake N, Hosomichi K, Suzuki K, Inoue I. Germline Variants of Prostate Cancer in Japanese Families. *PLoS ONE* 11, e0164233, 2016. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0164233
14. van 't Hof FN, Ruigrok YM, Lee CH, Inoue I, Han B, Rinkel GJ, de Bakker PI, et al. Shared Genetic Risk Factors of Intracranial, Abdominal, and Thoracic Aneurysms. *Journal of the American Heart Association* 5, e002603, 2016. 査読有
DOI: 10.1161/JAHA.115.002603
15. Sakiyama M, Matsuo H, Nakaoka H, Yamamoto K, Nakayama A, Nakamura T, Kawai S, Okada R, Ooyama H, Shimizu T, Shinomiya N. Identification of rs671, a common variant of ALDH2, as a gout susceptibility locus. *Scientific Reports* 6, 25360, 2016. 査読有
DOI: 10.1038/srep25360
16. Nakaoka H, Gurumurthy A, Hayano T, Ahmadloo S, Omer WH, Yoshihara K, Yamamoto A, Kurose K, Enomoto T, Akira S, Hosomichi K, Inoue I. Allelic Imbalance in Regulation of ANRIL through Chromatin Interaction at 9p21 Endometriosis Risk Locus. *PLoS Genetics* 12, e1005893, 2016. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pgen.1005893
17. 中岡 博史, 井ノ上 逸朗 「HLA アレルからみた東アジア集団～旧人類との遺伝的混合」『医学の歩み』258 巻, 172-174, 2016 査読無
18. Tamura R, Yoshihara K, Yamawaki K, Suda K, Ishiguro T, Adachi S, Okuda S, Inoue I, Verhaak RG, Enomoto T. Novel kinase fusion transcripts found in endometrial cancer. *Scientific Reports* 5, 18657, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/srep18657
19. Hayano T, Yamada S, Hosomichi K, Nakaoka H, Yoshihara K, Adachi S, Kashima K, Tanaka K, Enomoto T, Inoue I. Identification of novel exonic mobile element insertions in epithelial ovarian cancers. *Human Genome Variation* 2, 15030, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/hgv.2015.30
20. Hosomichi K, Shiina T, Tajima A, Inoue I. The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. *Journal of Human Genetics* 60, 665-673, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2015.102
21. Nakaoka H, Inoue I. Distribution of HLA haplotypes across Japanese Archipelago: similarity, difference and admixture. *Journal of Human Genetics* 60, 683-690, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2015.90
22. Jinam TA, Kanzawa-Kiriyama H, Inoue I, Tokunaga K, Omoto K, Saitou N. Unique characteristics of the Ainu population in Northern Japan. *Journal of Human Genetics* 60, 565-571, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2015.79
23. Mitsunaga S, Hosomichi K, Okudaira Y, Nakaoka H, Suzuki Y, Kuwana M, Sato S, Kaneko Y, Homma Y, Oka A, Shiina T, Inoko H, Inoue I. Aggregation of rare/low-frequency variants of the mitochondria respiratory chain-related proteins in rheumatoid arthritis patients. *Journal of Human Genetics* 60, 449-454, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/jhg.2015.50
- 〔学会発表〕(計 5 件)
1. 井ノ上 逸朗 他
「体細胞変異からの子宮内膜症の成因
その3 逆行仮説の検証」
日本人類遺伝学会 第 62 回大会、2017 年
神戸国際会議場 (日本)
2. NAKAOKA, Hirofumi et al.
“Allelic imbalance in regulation of ANRIL through chromatin interaction at 9p21 endometriosis risk locus”
The 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2016
Vancouver Convention Centre (Canada)

3. ITO, Jumpei et al.
“Systematic identification and characterization of regulatory elements derived from human endogenous retroviruses”
The 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, 2016
Vancouver Convention Centre (Canada)

4. NAKAOKA, Hirofumi et al.
“Evolution of the ‘fused’ gene family across primates”
The 13th International Congress of Human Genetics, 2016
Kyoto International Conference Center (Japan)

5. NAKAOKA, Hirofumi et al.
“Allelic imbalance in regulation of ANRIL through chromatin interaction at 9p21 endometriosis risk locus”
The 13th International Congress of Human Genetics, 2016
Kyoto International Conference Center (Japan)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

井ノ上 逸朗 (INOUE, Ituro)
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授
研究者番号：00192500

(2)研究分担者

佐藤 健人 (SATO, Takehito)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：50235363

細道 一善 (HOSOMICHI, Kazuyoshi)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：50420948

(3)連携研究者

榎本 隆之 (ENOMOTO, Takayuki)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：90283754

明樂 重夫 (AKIRA, Shigeo)
日本医科大学・医学部・教授
研究者番号：40231849

(4)研究協力者

中岡 博史 (NAKAOKA, Hirofumi)
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・助教
研究者番号：70611193