

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08331

研究課題名(和文) HLA関連眼疾患におけるゲノム全域を対象とした遺伝子間相互作用の検討

研究課題名(英文) Genome-wide investigation of gene-gene interactions in HLA-associated ocular diseases

研究代表者

安村 玲子 (Yasumura, Reiko)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：80534362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ベーチェット病とサルコイドーシスはHLA関連眼疾患であり、ベーチェット病ではHLA-B*51アレルが、サルコイドーシスでは複数のHLA-DRB1アレルが発症リスクと顕著に相関することが知られている。近年、HLA関連疾患において、HLAリスクアレルと他の遺伝子が相互作用を示し、疾患の発症リスクを有意に上昇させることが報告されている。本研究では、両疾患について、ゲノム全域を対象に、HLAリスクアレルと遺伝子間相互作用を示す遺伝子の網羅的なスクリーニングを行った。その結果、ベーチェット病およびサルコイドーシスのHLAリスクアレルと相互作用を示す遺伝子の候補をゲノム全域に渡って網羅的に検出した。

研究成果の概要(英文)：Behcet's disease and sarcoidosis both are HLA-associated ocular diseases. It is well established that Behcet's disease and sarcoidosis are strongly associated with HLA-B*51 allele and some HLA-DRB1 alleles, respectively. Recent studies have reported that gene-gene interactions between HLA risk alleles and other risk genes are observed in HLA-associated diseases, leading to increase the risk of the diseases. In this study, we performed a genome-wide investigation of gene-gene interactions between HLA risk alleles and other genes in Behcet's disease and sarcoidosis. Our genome-wide gene-gene interaction analysis identified several candidate genes which interact with HLA risk alleles of Behcet's disease and sarcoidosis.

研究分野：眼科学

キーワード：ベーチェット病 サルコイドーシス HLA 遺伝子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) ベーチェット病およびサルコイドーシスは全身の諸臓器に炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患である。ベーチェット病では、口腔内アフタ性潰瘍、眼症状、皮膚症状および外陰部潰瘍の4症状を主症状とし、副症状としてしばしば関節炎、副睾丸炎、消化管病変、血管病変、中枢神経症状を伴う。サルコイドーシスでは、眼、肺、リンパ節、皮膚において高い罹患頻度を示し、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、神経系、筋肉、骨、唾液腺、子宮などの臓器にも病変が出現する。両疾患ともに、長期間にわたり再発と寛解を繰り返すため、両疾患において重篤な症状を来す患者は少なくない。このような疾患の予防、治療に当たっては、疾患の早期発見が極めて重要であり、疾患の予防および治療に先立った疾患の発症要因の十分な解明が必要とされる。

(2) ベーチェット病およびサルコイドーシスは免疫系の異常が関与して発症する疾患であるが、いずれの疾患においても、その免疫系の異常には何らかの遺伝要因が関与していることが示唆されている。以前より、HLA (human leukocyte antigen: ヒト白血球抗原) 遺伝子が両疾患の有力な遺伝要因であることが知られており、ベーチェット病では HLA-B*51 アリルと HLA-A*26 アリルが、サルコイドーシスでは複数の HLA-DRB1 アリル (主に HLA-DRB1*08, HLA-DRB1*09, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*12, HLA-DRB1*14) が各々の疾患と顕著に相関することが報告されている (Lancet. 1973; 2: 1383-1384. Ann Rheum Dis. 2010; 69: 747-754. Jpn J Ophthalmol. 1996; 40: 86-94. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: 7109-115.)

(3) 近年、複数の HLA 関連遺伝性免疫疾患において、HLA リスクアリルが他の遺伝要因と相互作用することにより、疾患の発症リスクに対して相乗効果をもたらすことが報告されている。2013年に我々のグループは、ベーチェット病の発症リスクに対する ERAP1 遺伝子と HLA-B*51 アリルの相互作用を見出している (Nat Genet. 2013; 45: 202-207.)。ERAP1 遺伝子と HLA リスクアリルの相互作用は乾癬 (HLA-C*06 アリル) と強直性脊椎炎 (HLA-B*27 アリル) においても報告されている (Nat Genet. 2000; 42: 985-990. Nat Genet. 2011; 43: 761-767.)。このような HLA リスクアリルを対象とした遺伝子間相互作用は、他の遺伝子においても存在すると考えられるが、ゲノム全域を対象とした評価はこれまでに殆ど行われていない。

2. 研究の目的

(1) 私たちのグループは日本人集団を対象としたベーチェット病およびサルコイドーシスのゲノムワイド関連解析 (genome-wide

association study: GWAS) をすでに完了しており、両疾患においてゲノム全域にわたる SNP (single nucleotide polymorphisms: 一塩基多型) の情報を取得している (ベーチェット病: Nat Genet. 2010; 42: 703-706. サルコイドーシス: 論文投稿中)。

(3) したがって本研究では、すでに取得している両疾患の GWAS データ (ゲノム全域にわたる SNP 情報) を有効的に活用し、HLA リスクアリルと遺伝子間相互作用を有する遺伝子のゲノムワイドなスクリーニングを実行する。

3. 研究の方法

(1) 日本人集団を対象としたベーチェット病 (患者 612 例、健常者 740 例、50 万個以上の SNP) およびサルコイドーシス (患者 700 例、健常者 900 例、70 万個以上の SNP) の GWAS を完了しており、両疾患におけるゲノム全域にわたる SNP 情報 (GWAS データ) を取得している。本研究では、これらの GWAS データを用いて、HLA リスクアリルと遺伝子間相互作用を有する遺伝子のゲノムワイドなスクリーニングを行う。

(2) まず始めに、日本人集団のベーチェット病およびサルコイドーシスの GWAS データを対象に、Imputation 解析をゲノム全域に渡って網羅的に実行した。Imputation 解析は、リファレンスとして、1000 人ゲノムプロジェクト (<http://www.1000genomes.org/>) のデータを用いて Impute2 ソフトウェアにより行われた。

(3) GWAS および Imputation 解析によって得られたゲノム全域の SNP データおよび HLA アリルデータについて、PLINK ソフトウェア (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) の fast epistasis 機能を用いて SNP-HLA アリル間の相互作用をゲノム全域に渡って評価した。

(4) fast epistasis 機能により得られた P 値をボンフェローニ法で補正し、SNP-HLA アリル間の遺伝子間相互作用の有意判定を行った。

(5) HLA リスクアリルとの遺伝子間相互作用に有意性を示す SNP について、GWAS で使用した患者検体および健常者検体を用いて実際に TaqMan アッセイによりジェノタイプングを行い、特定した SNP が HLA リスクアリルと遺伝子間相互作用を真に示すかを確認した。TaqMan アッセイは Life Technologies 社のプロトコルを準拠して行った。

(6) HLA リスクアリルと遺伝子間相互作用を示す SNP を対象に、SNP が位置する遺伝子の機能解析を実行した。

(7) エクソン領域外に位置する遺伝子変異は、遺伝子発現量の制御に関与することが知られているため、同定したエクソン領域外の SNP と近傍遺伝子の発現量の関連を調査した。本遺伝子発現解析では、リアルタイム RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) 法を用いて遺伝子の発現量を定量し、SNP の遺伝子型の変動における遺伝子発現量の比較を実行する。本遺伝子発現解析は Life Technologies 社のプロトコルを準拠して行った。

(8) また、アミノ酸置換を伴う遺伝子変異 (non-synonymous SNP) は発現するタンパク質の機能に直接的に影響を与え、結果として疾患の発症を引き起こす可能性がある。したがって、同定した non-synonymous SNP がタンパク質の機能にどのような影響を与えるかを立体構造解析により評価した。具体的には、アミノ酸置換前後のタンパク質の構造および分子動力の比較を行うとともに、他のタンパク質との相互作用・ドッキング作用の変動を評価した。

4. 研究成果

(1) ゲノム全域を対象とした遺伝子間相互作用解析により、ベーチェット病およびサルコイドーシスの各々の疾患において、HLA リスクアリルと遺伝子間相互作用を示す候補遺伝子を網羅的に検出した。

(2) 網羅的に検出した候補遺伝子を対象に、機能解析を実行した結果、複数の遺伝子において、同定した SNP が遺伝子の発現量に影響を与える可能性を示した。また、他の遺伝子において、特定した non-synonymous SNP が発現タンパク質の立体構造を不安定化させ、タンパク質の機能に影響を与える可能性を示した。

(3) 本研究の成果はベーチェット病およびサルコイドーシスの発症機序の解明を進展させると考えられる。

(4) また、本研究の遺伝情報はベーチェット病およびサルコイドーシスの迅速な遺伝子診断構築の基礎となり、患者への早期の適切な治療を可能にする。ベーチェット病およびサルコイドーシスの早期発見・早期治療は、ベーチェット病患者およびサルコイドーシス患者の予後を改善し、両疾患による重篤症例の低下を促すと考えられる。

(5) さらに、特定した遺伝子間相互作用を介したベーチェット病およびサルコイドーシスの発症機序が解明されれば、特定した遺伝子間相互作用を対象とした分子標的薬の開発も可能になる。将来的に、モノクローナル抗体、標的分子結合ペプチドや酵素阻害剤

などのベーチェット病およびサルコイドーシスを対象とした発症・進行予防薬が開発されれば、その医学的意義は大変高いと考えられる。

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 20 件)

Kawagoe T, Ota M, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Shimazaki H, Takeuchi M, Okada E, Teshigawara T, Mizuki N. Associations between CRYBA4 gene variants and high myopia in a Japanese population. Clin Ophthalmol 2017;11:2151-2156. 査読有
DOI: 10.2147/OPHT.S146038.

Ishido T, Horita N, Takeuchi M, Kawagoe T, Shibuya E, Yamane T, Hayashi T, Meguro A, Ishido M, Minegishi K, Yoshimi R, Kirino Y, Kato S, Arimoto J, Ishigatsubo Y, Takeno M, Kurosawa M, Kaneko T, Mizuki N. Clinical manifestations of Behçet's disease depending on sex and age: results from Japanese nationwide registration. Rheumatology (Oxford) 2017;56(11):1918-1927. 査読有
DOI: 10.1093/rheumatology/kex285.

Yamazoe K, Meguro A, Takeuchi M, Shibuya E, Ohno S, Mizuki N. Comprehensive analysis of the association between UBAC2 polymorphisms and Behçet's disease in a Japanese population. Sci Rep 2017;7(1):742. 査読有
DOI:10.1038/s41598-017-00877-3

Takeuchi M, Mizuki N, Meguro A, Ombrello MJ, Kirino Y, Satorius C, Le J, Blake M, Erer B, Kawagoe T, Ustek D, Tugal-Tutkun I, Seyahi E, Ozyazgan Y, Sousa I, Davatchi F, Francisco V, Shahram F, Abdollahi BS, Nadji A, Shafiee NM, Ghaderibarmi F, Ohno S, Ueda A, Ishigatsubo Y, Gadina M, Oliveira SA, Gül A, Kastner DL, Remmers EF. Dense genotyping of immune-related loci implicates host responses to microbial exposure in Behçet's disease susceptibility. Nat Genet 2017;49(3):438-443. 査読有
DOI:10.1038/ng.3786

Horie Y, Meguro A, Ohta T, Lee EB, Namba K, Mizuuchi K, Iwata D, Mizuki N, Ota M, Inoko H, Ishida S, Ohno S,

Kitaichi N. HLA-B51 Carriers are Susceptible to Ocular Symptoms of Behçet Disease and the Association between the Two Becomes Stronger Towards the East Along the Silk Road: A Literature Survey. *Ocul Immunol Inflamm* 2017;25(1):37-40. 査読有 DOI:10.3109/09273948.2015.1136422

Higashi K, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Kitaichi N, Horie Y, Namba K, Ohno S, Nakao K, Sakamoto T, Sakai T, Tsuneoka H, Keino H, Okada AA, Takeda A, Fukuhara T, Mashimo H, Ohguro N, Oono S, Enaida H, Okinami S, Mizuki N. Investigation of Association between IL10 Gene Polymorphisms and Vogt-Koyanagi-Harada Disease in a Japanese Population. *Ophthalmic Genet* 2017;38(2):187-189. 査読有 DOI:10.3109/13816810.2016.1145698

Okui S, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Okada E, Iijima Y, Mizuki N. Analysis of the association between the LUM rs3759223 variant and high myopia in a Japanese population. *Clin Ophthalmol* 2016;10:2157-2163. 査読有 <https://www.dovepress.com/analysis-of-the-association-between-the-lum-rs3759223-variant-and-high-peer-reviewed-article-OPHTH>

Horie Y, Kitaichi N, Hijioaka K, Sonoda KH, Saishin Y, Kezuka T, Goto H, Takeuchi M, Nakamura S, Kimoto T, Shimakawa M, Kita M, Sugita S, Mochizuki M, Hori J, Iwata M, Shoji J, Fukuda M, Kaburaki T, Numaga J, Kawashima H, Fukushima A, Joko T, Takai N, Ozawa Y, Meguro A, Mizuki N, Namba K, Ishida S, Ohno S. Ocular Behçet's disease is less complicated with allergic disorders. A nationwide survey in Japan. *Clin Exp Rheumatol* 2016;34(6 Suppl 102):111-114. 査読有 <http://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=10697>

Yoshino A, Polouliakh N, Meguro A, Takeuchi M, Kawagoe T, Mizuki N. Chum salmon egg extracts induce upregulation of collagen type I and exert antioxidative effects on human dermal fibroblast cultures. *Clin Interv Aging* 2016;11:1159-1168. 査読有 DOI:10.2147/CIA.S102092

Levinson RD, Yung M, Meguro A, Ashouri E, Yu F, Mizuki N, Ohno S, Rajalingam R. KIR and HLA Genotypes Implicated in Reduced Killer Lymphocytes Immunity Are Associated with Vogt-Koyanagi-Harada Disease. *PLoS One* 2016;11(8):e0160392. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0160392

Ogasawara M, Meguro A, Sakai T, Mizuki N, Takahashi T, Fujihara K, Tsuneoka H, Shikishima K. Genetic analysis of the aquaporin-4 gene for anti-AQP4 antibody-positive neuromyelitis optica in a Japanese population. *Jpn J Ophthalmol* 2016;60(3):198-205. 査読有 DOI:10.1007/s10384-016-0441-5

Nakamura K, Miyano K, Tsuchida T, Meguro A, Mizuki N. Interleukin-17A gene polymorphism with the susceptibility of intestinal symptoms in patients with Behçet's disease. *J Dermatol* 2016;43(6):708-709. 査読有 DOI:10.1111/1346-8138.13251

Nishisako M, Meguro A, Nomura E, Yamane T, Takeuchi M, Ota M, Kashiwagi K, Mabuchi F, Iijima H, Kawase K, Yamamoto T, Nakamura M, Negi A, Sagara T, Nishida T, Inatani M, Tanihara H, Aihara M, Araie M, Fukuchi T, Abe H, Higashide T, Sugiyama K, Kanamoto T, Kiuchi Y, Iwase A, Chin S, Ohno S, Inoko H, Mizuki N. SLC1A1 Gene Variants and Normal Tension Glaucoma: An Association Study. *Ophthalmic Genet* 2016;37(2):194-200. 査読有 DOI:10.3109/13816810.2015.1028649

Oguchi T, Ota M, Ito T, Hamano H, Arakura N, Katsuyama Y, Meguro A, Kawa S. Correction: Investigation of Susceptibility Genes Triggering Lachrymal/Salivary Gland Lesion Complications in Japanese Patients with Type 1 Autoimmune Pancreatitis. *PLoS One* 2016;11(1):e0146738. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0146738

Kanemaki N, Meguro A, Yamane T, Takeuchi M, Okada E, Iijima Y, Mizuki N. Study of association of PAX6 polymorphisms with susceptibility to high myopia in a Japanese population. *Clin Ophthalmol* 2015;9:2005-2011. 査読有 DOI:10.2147/OPHTH.S95167

Toyoda H, Miyagawa T, Koike A, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Imai M, Fujimura Y, Tamura Y, Ikegami A, Wada Y, Moriya S, Furuya H, Takeuchi M, Kirino Y, Meguro A, Remmers EF, Kawamura Y, Otowa T, Miyashita A, Kashiwase K, Khor SS, Yamasaki M, Kuwano R, Sasaki T, Ishigooka J, Kuroda K, Kume K, Chiba S, Yamada N, Okawa M, Hirata K, Mizuki N, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K. A polymorphism in CCR1/CCR3 is associated with narcolepsy. *Brain Behav Immun* 2015;49:148-155. 査読有 DOI:10.1016/j.bbi.2015.05.003

Oguchi T, Ota M, Ito T, Hamano H, Arakura N, Katsuyama Y, Meguro A, Kawa S. Investigation of susceptibility genes triggering lachrymal/salivary gland lesion complications in Japanese patients with type 1 autoimmune pancreatitis. *PLoS One* 2015;10(5):e0127078. 査読有 DOI:10.1371/journal.pone.0127078

Carapito R, Shahram F, Michel S, Le Gentil M, Radosavljevic M, Meguro A, Abdollahi BS, Inoko H, Ota M, Davatchi F, Bahram S. On the genetics of the Silk Route: association analysis of HLA, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions with Behçet's disease in an Iranian population. *Immunogenetics* 2015;67(5-6):289-293. 査読有 DOI:10.1007/s00251-015-0841-6

Bakir-Gungor B, Remmers EF, Meguro A, Mizuki N, Kastner DL, Gul A, Sezerman OU. Reply to Stoimenis et al. *Eur J Hum Genet* 2015;23(10):1280. 査読有 DOI:10.1038/ejhg.2014.288

Bakir-Gungor B, Remmers EF, Meguro A, Mizuki N, Kastner DL, Gul A, Sezerman OU. Identification of possible pathogenic pathways in Behçet's disease using genome-wide association study data from two different populations. *Eur J Hum Genet* 2015;23(5):678-687. 査読有 DOI:10.1038/ejhg.2014.158

[学会発表](計4件)

Meguro A, Ishihara M, Takeuchi M, Ohno S, Mizuki N. Association between HLA class II region and ocular involvement

in sarcoidosis. ARVO 2017 Annual Meeting (アメリカ視覚眼科学研究協会会議 2017), アメリカ・ボルチモア, 2017年5月9日.

Meguro A, Yamane T, Takeuchi M, Ohno S, Mizuki N. Screening of susceptibility loci for ocular Behçet's disease using a genome-wide association study: preliminary report. ARVO 2016 Annual Meeting (アメリカ視覚眼科学研究協会会議 2016), アメリカ・シアトル, 2016年5月5日.

Meguro A, Ishihara M, Yamane T, Mizuki N. Screening of susceptibility loci for ocular sarcoidosis using a genome-wide association study: preliminary report. World Ophthalmology Congress 2016 (国際眼科学会 2016), メキシコ・グアダハラ, 2016年2月6-9日.

Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Ohno S, Mizuki N. Replication study of gene-gene interaction between HLA-B*51 and ERAP1 in Behçet's disease using a Japanese population. 13th International Ocular Inflammation Society Congress (第13回国際眼炎症学会), アメリカ・サンフランシスコ, 2015年9月26,27日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安村 玲子 (YASUMURA, Reiko)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号: 80534362

(2) 研究分担者

水木 信久 (MIZUKI, Nobuhisa)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 90336579

目黒 明 (MEGURO, Akira)
横浜市立大学・医学研究科・特任准教授
研究者番号: 60508802

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

南波 玲子 (NANBA, Reiko)

佐藤 摩雪 (SATO, Mayuki)