

**多因子疾患における疾患リスク遺伝子多型を用いた  
病態解析に関する新しい方法論の確立**

Establishment of a novel strategy for pathological analysis  
of multifactorial diseases using genetic risk variants



課題番号：18H05285

山本 一彦 (YAMAMOTO, KAZUHIKO)

理化学研究所・生命医科学研究センター・副センター長

研究の概要（4行以内）

ゲノムワイド関連解析が確立され、多くの多因子疾患でリスク遺伝子多型が明らかにされているが、疾患の理解や創薬に十分に結び付いていない。我々は、疾患リスク遺伝子多型の多くが、遺伝子発現に影響を与える多型という知見を基に、疾患に対して因果関係をもった因子を同定し、病態の理解と新しい治療法開発の方向へ展開できるシステムを構築する。

研究分野：臨床免疫学

キーワード：多因子疾患、ゲノムワイド関連解析、リスク多型、量的形質遺伝子座

1. 研究開始当初の背景

多因子疾患は、複数の遺伝的要因に環境要因などが加わって発症する。遺伝的要因に関してはゲノムワイド関連解析 (GWAS) が確立され、多くの疾患でリスク遺伝子多型が明らかにされつつある。しかし、これらが疾患の理解や創薬に十分に結び付いている例は多くない。この点で、「ゲノム要因は疾患に対して因果関係を明示する」という遺伝学の原理に則ると、観察可能な中間形質例えば特定の細胞に観察される遺伝子発現、エピゲノム変化などの中から、ゲノム要因と関連しているものを確定させることで、疾患に対して「因果関係をもつ中間形質」の同定が可能となる。

2. 研究の目的

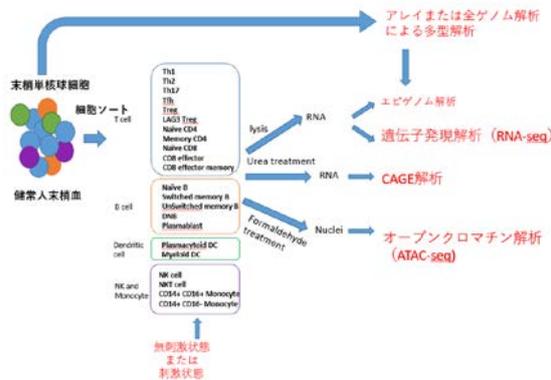
ヒトの疾患研究の中に、因果関係を持つ要素を特定するために必要なデータの構築と方法論を確立することが目的である。多因子疾患における疾患リスク遺伝子多型の多く (80%以上) が、遺伝子発現に影響を与える遺伝子多型であるという最近の知見を基盤として、遺伝子発現、エピゲノム、パスウェイ変化などの観察可能な中間形質の中から、疾患成立や進展に対して因果関係をもった要

素を同定し、このような確実な情報をもとに病態の理解と新しい治療法開発の方向へ展開できるシステムを構築することで、新しい疾病研究の方法論の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、免疫が関係する疾患を対象として研究を進める。多因子疾患のリスク多型の多くはプロモーターやエンハンサーなどの遺伝子発現調節領域にあることが判明しつつあり、これらは発現に関する量的形質遺伝子座 (eQTL) と言われる。そこで、健常日本人の末梢血を用い、免疫担当細胞の各サブセットにセルソーターで分離し、無刺激のまま、または刺激を入れた後の状態の細胞の遺伝子発現を次世代シーケンサーにて解析 (RNA-seq) を行う。さらに、クロマチンの状態の観察のための ATAC-seq 法、エンハンサー、プロモーターの活性を網羅的に解析可能な CAGE 解析を行う。これらに各疾患リスク多型の情報を統合して、リスク多型と eQTL の重複領域に関して、細胞特異的遺伝子発現のメカニズムを解明するために、エピゲノム修飾を含めた周辺領域の詳細な解析を行い、責任リスク多型とその多型が関与する責任

遺伝子を決定する。これらのデータから、疾患に関係する細胞サブセットと遺伝子発現に関係する情報を得ることにより、病態の理解と創薬の方向性が明らかになる。



#### 4. これまでの成果

新しい手法としての CAGE の導入にあたって、予備的研究として健康人の 5 サブセットの CAGE 解析を行った。リファレンスゲノムへのマッピング、特に CAGE シグナルの eQTL としての検出法などの新しい手法を適用し、細胞サブセット別に異なるシグナルを検出し、プロモーター、エンハンサーの場所の特定が可能であることを確認した。例えば、ベーチェット病のリスク多型と報告されていた領域に関して、CD8 陽性細胞において、従来リード SNP されてきた多型より 1000 塩基離れた場所に転写開始点 (TSS: transcription start site) が観察され、そのシグナル部位の多型が、遺伝子 KLRC4(killer cell lectin like receptor C4) の TSS としての eQTL であると判明した。すなわち、この部位の遺伝子多型がベーチェット病に対する責任多型であり、それが CD8 陽性細胞においての KLRC4 遺伝子の発現量を変えることが疾患の原因因子であると考えられた。

続いて、健康人ボランティアの 70 名 (2020 年 3 月現在) について、インフォームドコンセントを取得後末梢血 50ml を採取し、単核球 (PBMC) に分離した。次に、各種細胞サブセットに対する蛍光標識モノクローナル抗体と 2 台のセルソーターにて、25 種類のサブセットに分離した。それらから、RNA を抽出し、発現 RNA 測定のための RNA-seq 法、オープンクロマチンの検出のための ATAC-seq 法、5' 末の転写開始点を正確に検出するための CAGE 法に向けた処理をして、それぞれ次世代シーケンサーにてシグナ

ルを解析した。また、PBMC より DNA を採取し、一塩基多型の網羅的解析を行った。現在、RNA-seq、ATAC-seq、CAGE にて得られたシグナルをリファレンスゲノムにマッピングし、免疫が関与する種々の疾患リスクゲノム多型との関係を、発現に関する量的形質遺伝子座 (eQTL) 解析を並行して行いながらそれらを統合している。

さらに、当初はそれぞれのサブセットを正常状態のまま解析しているが、それぞれのサブセット別に細胞を刺激することで、より病態に近いクロマチン状態とともに遺伝子多型と遺伝子発現の関係が明らかになると考え、その方向の研究を構築している。

#### 5. 今後の計画

2020 年 3 月現在、健康人サンプルの採取は 70 名であり、さらに 1 年半はこれを継続して、検体数を 200 名まで増やす予定である。これによる 25 サブセットからも RNA-seq、ATAC-seq、CAGE を統合して、複数の免疫疾患のリスク多型情報を用い、リスク多型がもたらす疾患に因果関係をもつ細胞サブセット特異的リンパ球機能変化を数多く明らかにする。

さらに健康人リンパ球サブセットを CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球に分けた分画を、それぞれの分画特異的な刺激法で刺激し、経時的に RNA を採取する研究を本格的に開始する。集団全体または Th1、Th2 などのサブセットに分画して、上述と同様に RNA-seq、ATAC-seq、CAGE 解析を行う。これにより無刺激のままの解析では検出できなかった多くの疾患関連リスク遺伝子多型の関与が検出できることが期待される。さらに、転写因子結合解析、プロモーター解析、CRISPR/Cas9 を用いた変異導入解析などを行い、責任多型の正確な位置の同定と責任細胞を特定することで、より詳細な疾患メカニズム研究に進む予定である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)  
Okada Y, Eyre S, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status, Ann Rheum Dis, 78, 446-453 (2019)

#### 7. ホームページ等

[https://www.riken.jp/research/labs/ims/aut/oimmun\\_dis/#h2Anchor7](https://www.riken.jp/research/labs/ims/aut/oimmun_dis/#h2Anchor7)