

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03209

研究課題名（和文）ANCA関連血管炎の体細胞ゲノム解析

研究課題名（英文）Somatic genome analysis of ANCA-associated vasculitis

研究代表者

鎌谷 洋一郎（Kamatani, Yoichiro）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：00720880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ANCA関連血管炎の活動性に免疫細胞における体細胞変異が影響すると考え、患者DNAと血液検体を用いて遺伝子領域の体細胞変異の検出を行うための実験体制の確立と、その解析を行った。研究期間を通じてANCA関連血管炎患者を主体とする104症例の全ゲノムシーケンシング、並びに63検体の血液RNAseqを実施し、RNA-Mutect法を用いて体細胞変異を検出して疾患に関わる体細胞変異を同定した。また、MENTR法などのインシリコ解析で機能的影響を推定した。また、活動期と寛解期とでは体細胞変異の検出パターンが変化することを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、主に生殖細胞系列ゲノム解析や遺伝子発現解析によって行われてきた自己免疫性疾患解明のための生体ビッグデータ解析において、生まれたあとでゲノムに発生する体細胞変異の影響を網羅的に解明するため計画された。体細胞変異は主にがんの主要な要因であるが、自己免疫性疾患の発症や活動性への影響ははっきりわかっていない。本研究では自己免疫性疾患の一つであるANCA関連血管炎発症や、再発と寛解に関わる可能性のある体細胞変異を見出した。これらは将来の同疾患の治療に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we hypothesized that somatic mutations in immune cells affect the activity of ANCA-associated vasculitis. We established an experimental system for detecting somatic mutations in gene regions using patient DNA and blood samples, and performed statistical analysis. Throughout the study period, we conducted whole-genome sequencing of 104 cases mainly consists of ANCA-associated vasculitis patients and blood RNA-seq of 63 samples. We detected somatic mutations by using the RNA-Mutect method and identified disease associated mutations. We also estimated functional impacts using in-silico analysis such as the MENTR method. Furthermore, we clarified that the pattern of somatic mutations changes between the active phase and the remission phase.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：体細胞ゲノム ゲノム解析 ANCA関連血管炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

体細胞突然変異はがんにおいて勢力的に研究されているが、がん以外の疾患における体細胞変異の役割はあまりわかっていない。一般に病気の主座である分化した組織・細胞種では体細胞ゲノムをもとに遺伝子発現が行われるため、体細胞突然変異が病気の発症に影響する可能性は高い。これまでは技術的・解析的な困難があったため、研究があまり進んでいなかったが、次世代シーケンサーの開発とその実験コストが相対的に安価となってきたことと合わせ、具体的に体細胞変異を網羅的に検出し、疾患発症やその活動性と関係する体細胞変異を同定することが可能であると考えられた。

そんな中我々は ANCA 関連血管炎(以下 AAV)と体細胞変異の関わりに着目した。その理由は、好発年齢が 55~74 歳と高齢者に多いこと、患者毎に重症度、病型、治療反応性が異なる原因の一つに抗体産生細胞の増殖や免疫に関連した遺伝子に体細胞変異が入っている可能性が考えられたことによる。また、我々が研究開始した直後には、同じ血管炎であるクリオグロブリン血管炎で体細胞変異の関与が報告された (Singh et al. Cell 2020;180(5):878-894.)

2. 研究の目的

本研究計画では、多因子疾患における体細胞変異の役割を観察するための研究デザインとして、自己免疫疾患である AAV を対象として血液細胞の体細胞ゲノム変異をターゲットとすることにより技術的困難を克服し、その疾患発症に与える役割を解明する。それによってがん以外の疾患が体細胞突然変異によって引き起こされ得るものが評価し、ひいては発症予防や治療へと導く医学的知見の創出を目的とする。

3. 研究の方法

104 例の AAV 患者を主体とする全ゲノムシーケンス (WGS) 並びに健常者を含む 63 検体の血液細胞 RNA シーケンス (RNAseq) を行った。生殖細胞系列ゲノムデータである WGS には存在せず、RNAseq には存在する体細胞変異を効率的に検出するため RNA-Mutect アルゴリズム (Yizhak et al. Science 2019; 364: eaaw0726.) を軸に解析し、より確度の高い体細胞変異の同定を行うパイプラインを策定した。これにより血液中細胞の持つ体細胞ゲノムに発生した体細胞変異を検出し、AAV やその活動性と関連する変異を解析した。

4. 研究成果

17 例の疾患活動期 AAV (顕微鏡的多発血管炎 12 例、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症 2 例、多発血管炎性肉芽腫症 3 例) 疾患コントロール (他の自己免疫性疾患 7 例) 健常者 10 例について解析した。17 例の AAV 患者のうち、12 例については疾患安定期からも検体を採取し同様に解析を行った。健常人 10 例のデータは、テクニカルアーチファクトにより生じる体細胞変異の偽陽性を取り除くために用いた。

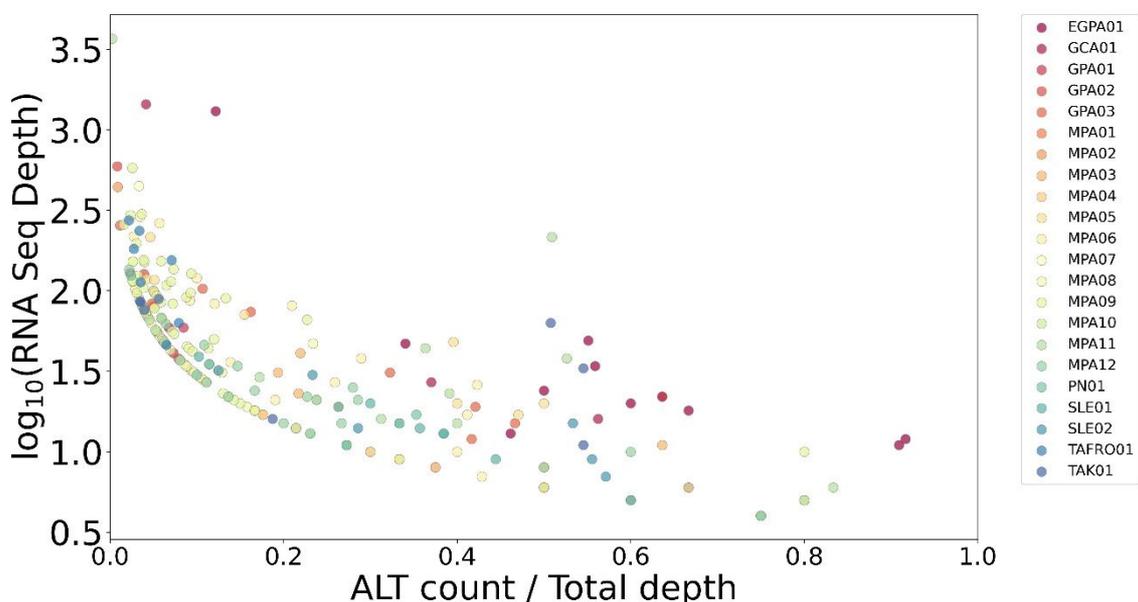
AAV 患者および疾患コントロール群からのべ 249 個の体細胞変異を同定した。得られた変異の中で GTEx プロジェクトにおける 467 人、2,519 検体から得られた 8,870 個の変異と共通するものはなかった。変異箇所におけるシーケンスの深度と変異を有するリードの割合の関係を観察したところ、シーケンスのカバレッジの高い箇所でもより割合の少ない変異が検出されていることが分かった(図 1)。17 人の疾患活動期 AAV 患者のうち 15 人 (88.2%) は 1 つ以上の体細胞変異を有していた。1 患者における体細胞変異数の中央値は 5 個であり、その数は疾患コントロール群や、安定期における体細胞変異数と有意な差をみとめなかった(図 2)。また、変異部位の翻訳領域、非翻訳領域、スプライシング領域の割合は、理論上考えられるものから有意な逸脱をみとめなかった(図 3)。

249 個の変異にそれぞれ 1 個の遺伝子に対応させ、合計 186 個の遺伝子を得た。186 個の遺伝子のうち 41 個は免疫系に関連する遺伝子 (ImmPort に含まれるものとして定義) であったが、変異を有する遺伝子の中で免疫系の細胞が多いという傾向はみられなかった(カイ二乗検定、 $p = 0.42$)。同様に、細胞増殖に関わる遺伝子が多く含まれるかどうかを検討したが、有意な傾向はみとめなかった。186 個の遺伝子のうち 13 個については複数の患者において共通して観察され、うち 5 つはユビキチンシステムに関連するものであり、13 個の遺伝子についての機能的特徴を Metascape を用いて解析を行うと、ユビキチンシステムに関連する遺伝子が有意に多く含まれることが分かった(図 3)。

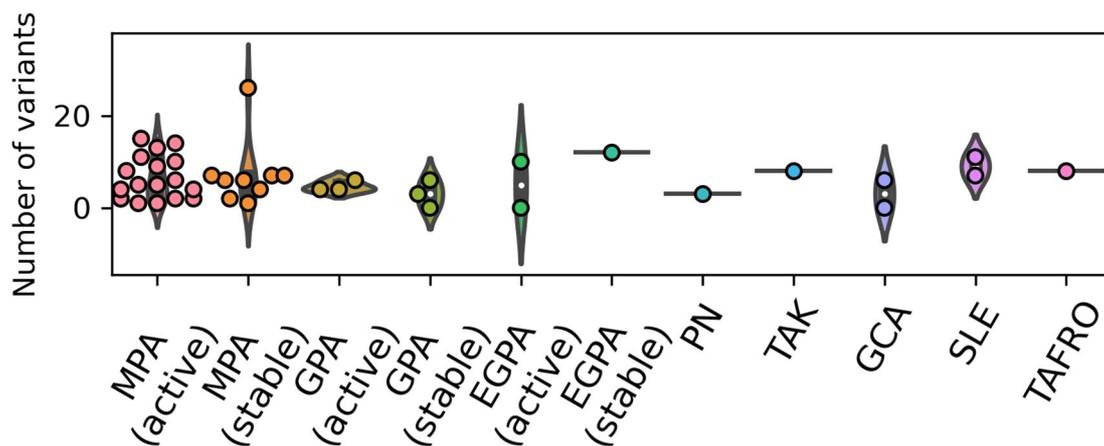
疾患活動期 AAV 患者に同定された変異 126 個のうち 19 個は MENTR 法によりいずれかの血球細胞において遺伝子発現を変化させる ($\text{abs}(\text{probability}) > 0.05$) と予測された。そのうち 4 つについては、その変異を有する検体の Bulk RNA-Seq で発現量が健常人と比較して MENTR による予測と同じ方向で有意差をもって変動していることが確認された。また 126 個のうち 41 個はアミノ酸配列を変化させるようなものであり、さらにうち 20 個はタンパク質の機能に大きく影響を与えると予測されるようなものであった (CADD phred score > 20)。その 20 個の変異の機能的意義を解析するため、K562 細胞における CRISPR によるノックアウトデータを解析したところ、うち 1 つの遺伝子では MHC-Class I 関連の、またうち 1 つの遺伝子では MHC-Class II 関連の抗原提示シグナルが上昇することが分かった。寛解導入後に 17 人中 12 人の患者を追跡調査したところ、76.4% の体細胞変異が検出されなかった。さらに、93.3% の機能喪失型変異が疾患安定期には消失した。

以上から、活動的な疾患状態を示す AAV 患者の一部で、病的な影響を及ぼす可能性のある体細胞変異を発見した。興味深いことに、これらの変異の大部分が寛解導入後には検出されなかった。

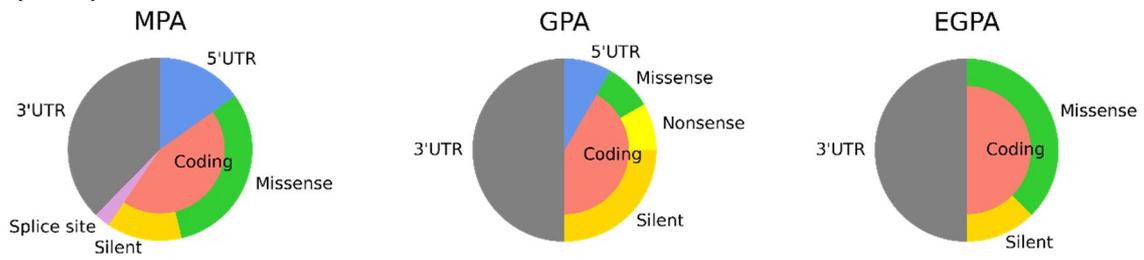
(図 1)



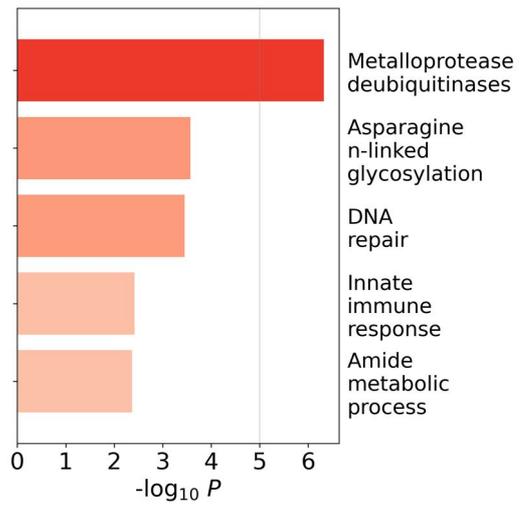
(図 2)



(2)



(3)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takeshi Iwasaki, Koichiro Ohmura, Chikako Endo, Mirei Shirakashi, Ryosuke Hiwa, Hideaki Tsuji, Koji Kitagori, Shuji Akizuki, Ran Sasai, Hajime Yoshifuji, Akio Morinobu, Fumihiko Matsuda, Yoichiro Kamatani
2. 発表標題 Identification of somatic mutations in patients with ANCA-associated vasculitis
3. 学会等名 EULAR (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森信 暁雄 (Morinobu Akio) (10294216)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	大村 浩一郎 (Ohmura Koichiro) (40432372)	京都大学・医学研究科・特命准教授 (14301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岩崎 毅 (Iwasaki Takeshi)	京都大学・学際融合教育研究推進センター・特定研究員 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------