

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03843

研究課題名（和文）難治性ぶどう膜炎疾患を対象としたエクソーム解析

研究課題名（英文）whole-exome sequencing analysis of uveitis diseases

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：主要なぶどう膜炎疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の発症機序および病態の全容は未だ明確ではないものの、これら疾患の発症および病態において遺伝要因と環境要因が重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、これら疾患を多発する複数家系を対象にエクソーム解析を実行した。その結果、各々の疾患多発家系において疾患発症の原因となる責任遺伝子変異を特定した。特定した疾患責任遺伝子の機能解析を行った結果、疾患責任遺伝子変異の一部が遺伝子の機能減弱や機能不全に關与することが認められ、遺伝子変異に起因する疾患責任遺伝子の機能変化が各疾患の発症の引き金になっていることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、難治性ぶどう膜炎疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎を対象に大規模にエクソーム解析を実行した遺伝学的調査である。本研究で得られるエクソーム解析のデータは、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の発症機序や病態を解明するための重要な情報になり得ると考えている。また、本研究の成果は、各々のぶどう膜炎疾患における新規治療薬（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）の開発にも繋がり、その医学的意義は大変高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：The etiology of Behcet's disease, sarcoidosis, and ankylosing spondylitis remains unclear, but both genetic and environmental factors are involved in the pathogenesis of these diseases. In this study, we performed exome sequencing on multiple families of these diseases and identified a causative variant in each family. Functional analyses revealed that some of the identified causative variants are involved in the reduction or dysfunction of causative genes, suggesting that functional changes in genes caused by causative variants trigger the development of Behcet's disease, sarcoidosis, and ankylosing spondylitis.

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 強直性脊椎炎 エクソーム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ぶどう膜炎は、眼内の虹彩、毛様体、脈絡膜およびそれらに隣接する組織(網膜や強膜)に生じる炎症の総称であり、発症機序の違いから、ぶどう膜炎は「外因性」と「内因性」に大別分類される。ウイルスや細菌などの病原体の感染や外傷・手術に起因する「外因性ぶどう膜炎」に対して、「内因性ぶどう膜炎」は、免疫系に異常を来す全身疾患の1症状として起こる。内因性ぶどう膜炎の多くは両眼性であり、しばしば重篤な視力障害を引き起こす場合がある。

(2) 本研究の対象疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎は難治性の「内因性ぶどう膜炎」疾患であり、いずれの疾患においても免疫系の異常が発症の要因となる。これらぶどう膜炎疾患で見られる免疫系の異常には、特定の内的要因(遺伝要因)のもとに何らかの外的要因(環境要因)が関与していると考えられているものの、これらぶどう膜炎疾患の発症メカニズムは未だ明確に特定されていない。

(3) ベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎は、ヒト6番染色体上に位置するHLA遺伝子の特定のアリルが人種を超えて顕著な相関を示すことが知られている。ベーチェット病ではHLA-B遺伝子のHLA-B*51アリルおよびHLA-A遺伝子のA*26アリルが、サルコイドーシスではHLA-DRB1遺伝子の複数のアリル(HLA-DRB1*08、-DRB1*11、-DRB1*12、-DRB1*14など)が、強直性脊椎炎ではHLA-B遺伝子のHLA-B*27アリルが強く相関を示すことから、それぞれのHLAアリルは各疾患の主要な遺伝要因であることが考えられる。一方、各疾患の患者の中にはHLAリスクアリルを保有しない患者も存在するため、各疾患の発症にはHLAリスクアリル以外の遺伝要因も関与している可能性が示唆される。

(4) 近年、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎を対象に、非血縁の患者・健常者集団を用いたゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)が国際的に盛んに行われており、多くの遺伝要因が報告されている。しかしながら、いずれの疾患においても、現在までに報告されている遺伝要因は、各々の疾患における表現型分散全体の30%に満たないことが試算されており、GWASにおいて同定できなかった遺伝要因(missing heritability)が依然として多く存在することが示唆される。したがって、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の遺伝要因の全容を解明する上で、missing heritabilityの解決が非常に重要である。

(5) ベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎では、数世代に渡って血縁者内に複数の疾患発症者を持つ多発家系が稀に観察される。このような特定の疾患が多発する濃厚家系では、疾患の成因に特定の遺伝要因がより大きな役割を担っているため、ベーチェット病、サルコイドーシスまたは強直性脊椎炎の多発家系を対象に遺伝子解析を実行することで、各疾患の遺伝要因(疾患責任遺伝子)の同定を効果的に実施することが可能となる。難治性ぶどう膜炎疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の責任遺伝子を特定し、各疾患の病態の解明および有効な予防・治療法を確立することは、患者やその血縁者、そして私たち医療従事者にとって大変意義のあることである。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ぶどう膜炎の主要な原因疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎を対象に、各々の疾患を多発する複数家系を用いて、全遺伝子上のエクソン領域の全塩基配列を決定(エクソーム解析)することにより、各疾患の発症要因となる疾患責任遺伝子の特定を行うことを目的とする。

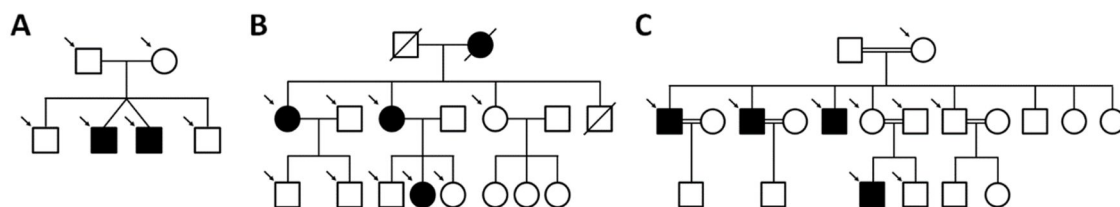
(2) さらに本研究では、特定した疾患責任遺伝子の遺伝情報をもとに、責任遺伝子の機能解析を実行し、責任遺伝子の介するベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の発症機序の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) エクソンはタンパク質に翻訳される領域であり、機能的に非常に重要である。また、エクソンにはタンパク質に翻訳されない領域(非翻訳領域)も存在し、遺伝子発現量の制御に重要に関与することが報告されている。したがって、特定の疾患が多発する濃厚家系の多くでは、エクソン領域内の遺伝子変異により疾患の発症が惹起されると考えられる。本研究では、ゲノム上の全遺伝子のエクソン領域を対象に網羅的なシーケンシング(エクソーム解析)を系統的に実行し、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の発症の原因となる責任遺伝子変異の

特定を行った。

(2) 本研究では、ベーチェット病を多発する2組の日本人家系、サルコイドーシスを多発する2組の日本人家系、および強直性脊椎炎を多発する4組のイラン人家系を対象にエクソーム解析を実行した。強直性脊椎炎を多発するイラン人家系の検体はいずれもイラン・テヘラン大学から提供を受けた。各ぶどう膜炎の罹患者および非罹患者の末梢血から抽出したDNAを実験試料とした。下図1に、本研究で用いた各疾患の発症家系の1例を示す。



■：罹患者男性、□：非罹患者男性、●：罹患者女性、○：非罹患者女性、／：死亡
近親婚のカップルを二重線で結ぶ、矢印を付された検体を収集済み

図1. 本研究で用いた(A)ベーチェット病(一卵性双生児2名が発症)、(B)サルコイドーシス(優性遺伝)および(C)強直性脊椎炎(劣性遺伝)の発症家系の例

(3) 本エクソーム解析では、SureSelect Human All Exon V6 Kit (Agilent 社) を用いて全遺伝子上のエクソン領域を選択的に抽出し、次世代シーケンサーHiSeq 2500 (Illumina 社) を用いてシーケンシングを行った。本解析は Illumina 社のプロトコルに準拠して実行した。本エクソーム解析において、真の疾患責任遺伝子変異を特定するために考慮した点を以下 ~ に示す。

本エクソーム解析で用いる疾患発症家系の罹患者例および非罹患者例は、国内外の各疾患診療の専門家により確定診断された症例である。したがって、本研究における検体由来の偽陽性および偽陰性の結果の発生の可能性を除外できると考えている(確実な症例の評価と診断)。

本エクソーム解析では、罹患者例のシーケンシングデータを非罹患者例のデータと比較するとともに、ヒトゲノムデータベースである 1000 Genomes Project、HapMap Project、Human Genetic Variation Database、NHLBI GO Exome Sequencing Project および Integrative Japanese Genome Variation Database の情報とも比較を行い、疾患責任遺伝子変異を絞り込んだ(バイオインフォマティクス解析)。

さらに、アミノ酸置換変異、フレームシフト変異等のタンパク質に影響を与える変異とそのアレル頻度情報を総合的に検討し、疾患責任遺伝子変異を特定した(バイオインフォマティクス解析)。

また、エクソーム解析で特定した疾患責任遺伝子変異を対象にサンガー法によりシーケンシングを実行し、疾患責任遺伝子変異の保有の有無を明確に確定した(バリデーション解析)。

(4) ベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の多発家系を対象としたエクソーム解析で網羅的に特定された疾患責任遺伝子変異が、多発家系特異的なものか、または各々のぶどう膜炎疾患の症例全般において発症の原因となっているかを確認するため、各疾患の日本人および海外人種の孤発症例(ベーチェット病: 2,700 例、サルコイドーシス: 2,100 例、強直性脊椎炎: 400 例)を用いて検討を行った。孤発症例を対象とした疾患責任遺伝子変異の判定は、Thermo Fisher Scientific 社の 3730 DNA Analyzer を用いてサンガーシーケンシングにより実行した。サンガーシーケンシングは Thermo Fisher Scientific 社のプロトコルに準拠して行った。

(5) その後、特定した疾患責任遺伝子変異を対象とした機能解析を実行した。アミノ酸置換を伴う遺伝子変異(non-synonymous SNP)は発現タンパク質の機能に直接的に影響を与え、疾患発症の原因となり得る。本機能解析では、特定した non-synonymous SNP がタンパク質の機能に与える影響を立体構造解析により評価した。疾患責任遺伝子変異に起因する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、他のタンパク質分子との相互作用の変動を評価した。本立体構造解析は、主に Modeller ソフトウェア (<http://salilab.org/modeller/>) および Meta-PPISP オンラインサーバー (<https://pipe.rcc.fsu.edu/meta-ppisp/>) を用いて実行した。

(6) さらに、特定した疾患責任遺伝子変異を対象に、CRISPR/Cas9 システムを用いた非相同末端結

合により生じる塩基の欠損によるノックアウトマウスの作製を行い、特定した疾患責任遺伝子の機能(生体における役割)を評価するとともに、各疾患の表現型を呈するモデルマウスの構築を行った。

(7) 本研究では、すべての血液検体提供者(ベーチェット病患者、サルコイドーシス患者、強直性脊椎炎患者、健常者)に対して、研究の目的、研究の期間と方法、研究参加により予測される効果及び危険性、研究に協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加していただいた。すべての血液検体提供者の個人情報(連結匿名化の上、本研究に関与しない個人情報管理者によって厳重に管理されている)。

(8) 本研究に参加するすべての検体提供施設は、各々の施設の倫理委員会より本遺伝子研究への参加を承認されている。

4. 研究成果

(1) ベーチェット病、サルコイドーシスまたは強直性脊椎炎の発症を多発する家系(ベーチェット病:日本人2家系、サルコイドーシス:日本人2家系、強直性脊椎炎:イラン人4家系)を対象に、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を実行し、各々の疾患多発家系において疾患の発症要因となる責任遺伝子変異を特定した。

(2) 疾患多発家系のエクソーム解析で網羅的に特定された疾患責任遺伝子が、各疾患の多発家系特異的なものか、または各疾患の症例全般においても発症の要因となっているかを確認するため、各疾患の日本人の孤発症例および海外人種の孤発症例を用いて検討を行った。その結果、特定した疾患責任遺伝子の多くが、疾患多発家系特異的な遺伝要因であった。一方、特定した疾患責任遺伝子の一部は、各々のぶどう膜炎疾患の症例全般においても遺伝要因となる可能性が認められた。

(3) 特定した疾患責任遺伝子変異の情報をもとに、各々の疾患責任遺伝子の機能解析を実行した結果、疾患責任遺伝子変異の一部において、遺伝子の機能減弱または機能不全への関与が認められた。したがって、これら疾患責任遺伝子変異については、遺伝子変異に起因する疾患責任遺伝子の機能変化がベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の発症の引き金になっていることが推察された。

(4) 本研究は、難治性ぶどう膜炎疾患であるベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎を対象に大規模にエクソーム解析を実行した遺伝学的調査である。本研究で得られるエクソーム解析のデータは、ベーチェット病、サルコイドーシスおよび強直性脊椎炎の発症機序や病態を解明するための重要な情報になり得ると考えている。

(5) また、本研究の成果は、各々のぶどう膜炎疾患における新規治療薬(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)の開発にも繋がり、その医学的意義は大変高いと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	目黒 明 (MEGURO Akira) (60508802)	横浜市立大学・医学研究科・特任教授 (22701)	

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			
フランス	Strasbourg University			
チェコ	Palacky University			
イラン	University of Tehran			
米国	National Institutes of Health			