

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09830

研究課題名（和文）ベーチェット病とサルコイドーシスを対象としたマルチオミックス解析

研究課題名（英文）Multi-omics analysis of Behcet's disease and sarcoidosis

研究代表者

目黒 明（MEGURO, Akira）

横浜市立大学・医学研究科・特任教授

研究者番号：60508802

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、ベーチェット病とサルコイドーシスを対象に、「ゲノムワイド関連解析」と「トランスクリプトーム解析」を統合したマルチオミックス解析を行い、ベーチェット病とサルコイドーシスの発症リスク、重症度および臨床症状の形成に関与する新規遺伝要因の候補を網羅的に同定した。同定した遺伝情報を基に、遺伝要因を対象とした機能解析およびパスウェイ解析を行い、同定した遺伝要因が関与するベーチェット病とサルコイドーシスの発症パスウェイを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

両疾患の多様な臨床症状の形成には遺伝要因が影響していることが示唆されている。したがって、既知および本研究で同定される遺伝要因と各疾患の臨床症状の相関性を検討することで、両疾患において、遺伝要因を用いた臨床症状分類が構築されることが期待される。遺伝要因を用いた臨床症状分類が構築されることで、疾患の発症初期段階での遺伝子検査で、今後形成し得る臨床症状の予測が可能になり、患者への早期の適切な治療に繋がることが期待される。また、本研究の成果を基に、同定した遺伝要因および発症パスウェイを標的とした医薬分子を網羅的にスクリーニングすることで、患者個々の遺伝要因に応じた治療薬の開発も可能になる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed a multi-omics analysis integrating "genome-wide association analysis" and "transcriptome analysis" for Behcet's disease and sarcoidosis, and comprehensively identified novel genetic factors involved in the development, severity, and clinical manifestations of Behcet's disease and sarcoidosis. Based on the results of the multi-omics analysis, we performed functional analyses and pathway analysis and identified found pathogenic pathways of Behcet's disease and sarcoidosis involving the identified genetic factors.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：ベーチェット病 サルコイドーシス ゲノムワイド関連解析 トランスクリプトーム解析 マルチオミックス解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) ぶどう膜炎とは、眼内の虹彩、毛様体、脈絡膜およびそれらに隣接する組織に起きる炎症の総称であり、ぶどう膜炎により重度の視力障害を来す患者も少なくなく、ぶどう膜炎は本邦において失明原因の上位を占める難治性眼疾患である。ぶどう膜炎は発症機序の違いから、「外因性」と「内因性」に大別される。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、「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。本研究の対象疾患であるベーチェット病とサルコイドーシスは内因性ぶどう膜炎疾患であり、両疾患で見られる免疫異常には、遺伝要因と環境要因が複合的に関与していると考えられているものの、両疾患の病因および病態の全容は未だ明確ではない。

(2) ベーチェット病とサルコイドーシスは眼以外の様々な臓器にも炎症症状を呈する。ベーチェット病は眼症状以外に口腔内アフタ性潰瘍、皮膚症状、外陰部潰瘍を主症状とし、しばしば関節炎、精巣上体炎(副睾丸炎)、消化器症状、血管病変、中枢神経病変などの副症状を伴う。サルコイドーシスでは眼、肺、リンパ節、皮膚の罹患頻度が高く、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。ベーチェット病およびサルコイドーシスともに、長期間に渡って再発と寛解を繰り返すため、両疾患により重篤な症状を引き起こしうる。ベーチェット病とサルコイドーシスの罹患による医学的、社会的、経済的影響は大きく、両疾患はいずれも厚生労働省に難病指定されている。このような多様な臨床症状を示す疾患の有効な診断、治療に当たっては、疾患の病因および病態の解明が必須である。したがって、ベーチェット病とサルコイドーシスの病因・病態を解明し、迅速な診断法および適切な治療法を確立することは大変意義がある。

(3) 近年、ベーチェット病とサルコイドーシスを対象に、ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study: GWAS)が盛んに行われており、遺伝要因が多数報告されている。しかしながら、現在までに報告されている遺伝要因は両疾患の発症要因全体の20-30%程度と見積もられており、未同定の遺伝要因(Missing Heritability)が多く存在することが示唆される。通常のGWASでは、偽陽性の可能性を孕む結果を最大限除外するため、データの品質基準や有意水準を厳格に設定しており、遺伝的効果の強くない遺伝子や遺伝的効果が強くても低頻度の遺伝子多型はGWASの品質基準や有意水準をクリアできず、Missing Heritabilityが生じる一因になっている。このMissing Heritabilityを解決することが、両疾患の遺伝要因の全容解明において最も重要な課題である。

(4) マルチオミックス解析はMissing Heritabilityを解決する有効な手段の一つである。マルチオミックス解析では、生体の様々な分子情報(ゲノム(遺伝子)、トランスクリプトーム(遺伝子発現)、プロテオーム(タンパク質)、メタボローム(代謝物)など)を各々ではなく、一括して総合的に解析を実行するため、ベーチェット病やサルコイドーシスのような多因子疾患を対象にマルチオミックス解析を行うことで、新規の遺伝要因の網羅的な同定が効果的に実行可能である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ベーチェット病とサルコイドーシスを対象に、「ゲノム解析」と「トランスクリプトーム解析」を統合したマルチオミックス解析を行い、ベーチェット病とサルコイドーシスの発症および病態に関与する遺伝要因を総合的に評価し、各疾患の遺伝要因の網羅的な同定を試みる。

(2) さらに本研究では、同定した遺伝情報を基に、疾患の発症に関与するパスウェイ(生物学的過程・経路)の特定も行い、ベーチェット病とサルコイドーシスの発症機序および病態の全容解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) ベーチェット病とサルコイドーシスを対象としたGWAS「ゲノム解析」
これまでに私達のグループは、日本人および海外人種集団を対象としたベーチェット病とサルコイドーシスのGWAS国際共同研究を実行し、複数の遺伝要因を同定している(ベーチェット病: Nat Genet 2010;42:698-702. Nat Genet 2010;42:703-706. Nat Genet 2013;45:202-207. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:8134-8139. Nat Genet 2017;49:438-443. サルコイドーシス: Commun Biol 2020;3:465.)。しかしながら、両疾患ともに、未同定の遺伝要因が多く存在することが示唆されるため、本研究では、取得済みのGWASデータを活用して大規模なGWASメタ解

析を実行した。具体的には、両疾患において取得済みの各人種の GWAS データについて Imputation 解析を実行して Imputed GWAS データを取得したのち、Imputed GWAS データを対象にメタ解析 (Imputed GWAS メタ解析) を行い、ベーチェット病とサルコイドーシスの候補遺伝要因を網羅的に検出した。

その後、Imputed GWAS メタ解析において網羅的に検出した候補遺伝要因を対象に、新たな集団を用いて TaqMan アッセイにより追認試験 (Replication study) を行い、ベーチェット病およびサルコイドーシスの遺伝要因の候補を絞り込んだ。

右表に本 Imputed GWAS メタ解析に用いた検体数を示す。

「ゲノム解析」に用いた検体数

ベーチェット病		サルコイドーシス	
人種	総計 (患者数/健常者数)	人種	総計 (患者数/健常者数)
<u>Imputed GWASメタ解析コホート</u>		<u>Imputed GWASメタ解析コホート</u>	
日本人	1,348 (611/737)	日本人	1,586 (700/886)
トルコ人	3,679 (1,900/1,779)	チェコ人	975 (517/458)
イラン人	1,800 (900/900)		
<u>Replication study コホート</u>		<u>Replication study コホート</u>	
日本人	1,200 (300/900)	日本人	1,800 (800/1,000)
トルコ人	900 (400/500)	チェコ人	400 (200/200)

(2) ベーチェット病とサルコイドーシスを対象とした「トランスクリプトーム解析」

「ゲノム」とは、細胞内の DNA の全遺伝情報を意味するのに対し、「トランスクリプトーム」とは、細胞内の全転写産物 (全 RNA) を示す。本研究では、各疾患の患者の末梢血単核球から抽出した RNA サンプルを実験試料として、次世代シーケンサー (NovaSeq 6000) を用いて全 RNA シーケンス (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析を系統的に実行し、各疾患における遺伝子発現の変化の広範な影響を捉え、各疾患の発症リスク、重症度および臨床症状の形成に關与する候補遺伝子を網羅的に検出した。本トランスクリプトーム解析はイルミナ社のプロトコルに準拠して実行した。

(3) 「ゲノム解析」と「トランスクリプトーム解析」を統合したマルチオミックス解析

「ゲノム解析」と「トランスクリプトーム解析」の結果を統合したマルチオミックス解析を行い、各疾患の発症リスク、重症度および臨床症状の形成に關与する候補遺伝子を「ゲノム」および「トランスクリプトーム」の両方面から総合的に評価し、新規遺伝要因の網羅的な同定を実行した。

(4) 特定した遺伝要因 (疾患感受性遺伝子) の機能解析

本解析では、特定した SNP が遺伝子に与える影響を評価するため、遺伝子の立体構造解析を行うとともに、特定した遺伝子のマウス眼球内における発現や局在を *in situ* hybridization により確認した。さらに、遺伝子発現が確認された組織の細胞に目的遺伝子に対する siRNA 発現ベクターを導入したのち、細胞の動態を観察し、遺伝子の発現量抑制が細胞に与える影響を検討した。

(5) ベーチェット病とサルコイドーシスを対象としたパスウェイ解析

「ゲノム解析」と「トランスクリプトーム解析」の結果を統合したパスウェイ解析も実行し、各疾患の発症、重症度、臨床症状の形成に關与するパスウェイ (生物学的過程・経路) を網羅的に評価した。本パスウェイ解析では、研究協力者の Ugur Sezerman 教授 (トルコ・Acibadem 大学) のグループが独自に開発した解析手法 (Eur J Hum Genet 2015;23:678-687.) および KEGG や Reactome を含む 32 種類の公開データベースの情報を統合した「ConsensusPathDB」オンラインデータベース (Nucleic Acids Res 2013;41:D793-800. <http://cpdb.molgen.mpg.de/>) を用いて、各々の疾患の発症、重症度、臨床症状の形成と統計学的有意に相関を示すパスウェイを抽出した。

(6) 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、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 は連結匿名化の上、本研究に關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。

(7) 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) ベーチェット病とサルコイドーシスの各々において、日本人集団および海外人種集団の GWAS データを対象に Imputed GWAS メタ解析を実行し、ベーチェット病とサルコイドーシスの発症リスク、重症度および臨床症状の形成に關与する疾患感受性候補 SNP を網羅的にスクリーニングした。

(2) その後、Imputed GWAS メタ解析において網羅的にスクリーニングした疾患感受性候補 SNP を対象に、新たな日本人集団および海外人種集団を用いて追認試験を実行し、ベーチェット病とサルコイドーシスの疾患感受性候補 SNP を絞り込んだ。

(3) また、ベーチェット病とサルコイドーシスの患者を対象とした RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実行し、各疾患における遺伝子発現の変化を網羅的に見出した。

(4) 上記「ゲノム解析」と「トランスクリプトーム解析」で取得した結果を統合したマルチオミックス解析を実行し、ベーチェット病とサルコイドーシスの発症リスク、重症度および臨床症状の形成に關与する新規遺伝要因の候補を網羅的に同定した。

(5) その後、マルチオミックス解析で同定した遺伝情報を基に、遺伝要因を対象とした機能解析およびパスウェイ解析を行い、同定した遺伝要因が關与するベーチェット病とサルコイドーシスの発症パスウェイを見出した。

(6) 今後、本研究の成果（ゲノム情報）を基に、同定した遺伝要因および発症パスウェイをターゲットとした医薬分子の候補を網羅的にスクリーニングし、患者個々の遺伝要因に応じた治療薬（ゲノム創薬）を探索する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhong Z, Su G, Zhou Q, Meguro A, Takeuchi M, Mizuki N, et al.	4. 巻 139
2. 論文標題 Tuberculosis Exposure With Risk of Behcet Disease Among Patients With Uveitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JAMA Ophthalmology	6. 最初と最後の頁 415-422
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1001/jamaophthalmol.2020.6985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Meguro A, Ishihara M, Petrek M, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Genetic control of CCL24, POR, and IL23R contributes to the pathogenesis of sarcoidosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01185-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Su G, Zhong Z, Zhou Q, Meguro A, Takeuchi M, Mizuki N, et al.	4. 巻 74
2. 論文標題 Identification of Novel Risk Loci for Behcet's Disease-Related Uveitis in a Chinese Population in a Genome-Wide Association Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 671-681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/art.41998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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	水木 信久 (MIZUKI Nobuhisa) (90336579)	横浜国立大学・医学研究科・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			
米国	National Institutes of Health			
フランス	Strasbourg University			
トルコ	Acibadem University			
チェコ	Palacky University			
イラン	University of Tehran			