

令和 5 年 4 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10509

研究課題名（和文）NKG2Dリガンド多型のメンデル無作為化解析によるガン発症の因果解明

研究課題名（英文）Causal inference between the NKG2D-ligand expression and the human phenome

研究代表者

須藤 洋一（Sutoh, Yoichi）

岩手医科大学・いわて東北メディカル・メガバンク機構・特命准教授

研究者番号：50810561

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）：末梢血から取得した単核球（リンパ球、単球など、白血球と呼ばれる細胞の一部）の遺伝子発現解析を行い、遺伝子発現情報を得た。対象者のゲノム情報と、対応する遺伝子発現情報から、遺伝子発現量に関連する遺伝子多型（eQTL）を検出した。eQTLの中でも、細胞ストレスに対応して発現するデンジャーシグナルと呼ばれる分子の一群、NKG2DリガンドのeQTLに注目し、この発現量と各疾患のリスクとの関連を、フェノムワイド関連解析とメンデル無作為化法と呼ばれる方法で解析した。その結果、NKG2Dリガンドの一つMICA発現量と、バセドウ病などの疾患リスクとの間に統計的に有意な関連性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NKG2Dリガンドの機能についてはこれまで動物を使用した研究では示されてきたが、人間における機能については不明な点が多かった。また、NKG2Dリガンドは人間と動物の間で違いが大きいことが知られており、動物で判明したことを人間に応用することが比較的困難であると考えられていた。今回の研究により、人間において、少なくともNKG2DリガンドのうちMICAの末梢血単核球における発現量と、バセドウ病などの疾患リスクとの間に因果関係があることが統計的に示唆され、将来的に、こうした疾患のメカニズム解明に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：We conducted transcriptome analysis of peripheral mononuclear cells (PBMCs). The expression-quantitative trait loci (eQTL) were detected from the genotype data and the corresponding transcriptome data. Of the eQTLs, we focused on the NKG2D ligands - a group of molecules known as danger signals that are expressed in response to cellular stress. We conducted an analysis of the association between their expression levels and the risk of each disease using phenome-wide association analysis (PheWAS) and Mendelian randomization (MR) analysis. As a result, we confirmed a statistically significant association between the expression level of MICA - one of the NKG2D ligands, and the risk of diseases such as Graves' disease.

研究分野：免疫学

キーワード：遺伝子発現解析 eQTL 単核球 細胞ストレス NKG2Dリガンド メンデル無作為化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA へのダメージ、感染、酸化等の傷害は細胞の正常な機能を害し、ストレス応答を惹起する。こうした被ストレス細胞の一部は悪性化してがん細胞へと分化する(Nausch and Cerwenka, 2008)。ストレス下の細胞は自身の悪性化が進行する前に、DS と呼ばれる一群の分子を細胞表面に発現し、付近を巡回する免疫細胞を活性化することで、被ストレス細胞自身を早期に排除するよう促す(Raulet et al., 2013)。被ストレス細胞が発現する主要な DS として、NKG2D リガンドと呼ばれる分子群が知られている。これらのリガンドの受容体である NKG2D は、主に NK 細胞などの免疫細胞に発現しており、ストレスを受けている細胞表面の NKG2D リガンドを受容体である NKG2D を介して免疫細胞が認識すると免疫細胞は被ストレス細胞を攻撃・排除する。

NKG2D リガンドはいずれも NKG2D という単一の受容体に結合する分子であるが、その構造は極めて多様である。ヒトの NKG2D リガンドには、2 種の MIC ファミリー (MICA, MICB) と 6 種の ULBP ファミリー (ULBP1-6) が存在する。これらは構成するドメインの種類こそ共通であるが、ドメイン数、膜貫通領域の構造、分泌性型の存在が異なる。進化免疫学的な研究からも、NKG2D リガンドは短期間に重複と多様化を起こしていることがわかっている。また、NKG2D リガンドをコードする各遺伝子は、非免疫関連遺伝子と比較して高い多様性が維持されているが、NKG2D リガンドに多様性が必要な理由は明らかとなっていない(Kasahara and Yoshida, 2012)。

過去に申請者らは腫瘍組織片を含むティッシュ・マイクロアレイ解析において、各 NKG2D リガンドの発現には、組織、がんの進行度に応じた違いがあり、多様化した NKG2D リガンドの組織発現は分子ごとに異なっていることを報告した(Fujita et al., 2015)。しかし、サンプルサイズが限られていたため、これらの多様な NKG2D リガンドの機能面での違いや、発現を誘導するストレス要因の違いを十分に解明するまでには至らなかった。

2. 研究の目的

本研究では、日本最大規模のゲノムコホート研究の 15 万人のゲノム情報と罹患情報、生活習慣情報を活用し、メンデル無作為化の手法により DS と疾患の因果推論を行うことを目的とした。また、多層オミックス解析と組み合わせることで、少規模な解析では解明できなかった「DS が介在するストレス要因とがん罹患などの疾患発症との関連性」を分子レベルで解明することを目指した。

3. 研究の方法

1) まず、末梢血単核球 (PBMC) のトランスクリプトーム解析を行った。続いて、expression-quantitative trait locus (eQTL) 解析を通じ、各 NKG2D リガンドの遺伝子発現量を変化させる多型の同定を行った。eQTL は遺伝子発現量の変化に関連する遺伝的多型を指し、eQTL 解析はこの多型を検出する解析手法である。また、他のグループによる日本人 eQTL データ、及び大規模な海外 eQTL データベースも存在しており、これらも合わせて活用した。

2) 本邦における最大規模のゲノムコホート研究である東北メディカル・メガバンク計画 (TMM) のゲノム・コホートデータを利用し、1) で同定された多型と、各種コホートデータとの間で表現型関連解析 (PheWAS) を行った。NKG2D リガンドは、がん以外にも、自己免疫疾患、感染症、糖尿病、心疾患との関連が報告されている(Lanier, 2015)。TMM が分譲する約 6.7 万人分のゲノム・コホートデータのうち、データの揃っている検体、約 4.5 万人分を対象とし、性別、年齢、ジェノタイプ PCA の PC1-10 を補正に利用した。関連解析には Plink2 に実装された logistic/Firth 回帰モデルを使用した。

3) 上記 1) 及び 2) の結果を基に、メンデル無作為化解析により、因果推論を行った。因果推論は関連解析と異なり、単純に関連の有無を調べるのではなく、因果の方向性を考慮して検証することができる。本研究では、NKG2D リガンド発現量の変化を暴露要因として、アウトカムである各種表現型に引き起こす影響 (各リガンドの発現による身体的影響) を検証した。メンデル無作為化解析には R の TwoSampleMR パッケージを用いた。操作変数となる eQTL は、 $p < 5 \times 10^{-3}$ を示した多型の中から $R^2 > 0.01$ の多型を除いて選んだ。また、F 統計量 < 10 、MR-PRESSO による外れ値検定で有意な多型も除外した。多型の多面的な効果が解析結果に与える影響を検証するため、MR-Egger 法による解析も実施した。

4. 研究成果

1) eQTL 解析: PBMC のトランスクリプトーム解析結果を利用し、NKG2D リガンドの eQTL 解析を行ったところ、NKG2DL のうち、*MICA* と *MICB* において、ボンフェローニ水準を超える p 値を示す関連多型が得られた。*MICA* の eQTL のうち最も低い p 値を示した多型 (rs2523484) は国外における大規模 eQTL データベース GTEx でも *MICA* の白血球における eQTL として登録されていた。同様に、*MICB* の eQTL のうち、最も低い p 値を示した多型 (rs41293891) についても、GTEx に白血球における *MICB* の eQTL として登録があった。その他の NKG2D リガンドについては、PBMC における発現量が極めて低いか、有意な eQTL が検出されなかったため、以降の解析を行わなかった。

2) PheWAS 解析: eQTL 解析で示唆的 ($p < 5 \times 10^{-3}$) だった eQTL を使い、58 の表現型について PheWAS を行った。結果、ボンフェローニ水準を超える p 値を示した表現型が *MICA*, *MICB* それぞれ、10 及び 13 検出された。そのうち、8 表現型は両遺伝子に共通していた (B 型肝炎、バセドウ病、橋本病、脂質異常症、アレルギー性結膜炎、スギ花粉症、アレルギー性鼻炎、接触性皮膚炎)。一方、脳腫瘍、関節リウマチは *MICA* のみ有意であり、肺がん、前立腺がん、子宮筋腫、高血圧及び虫歯は *MICB* のみ有意であった。

3) MR 解析: eQTL 結果から選ばれた操作変数を用いてメンデル無作為化解析を行った。*MICA* 発現量についてはバセドウ病、B 型肝炎について有意な関係を示した。一方、*MICB* については B 型肝炎、虫歯について有意な関係が見られた。MR-Egger 法による検証では多面性による影響は検出されなかった。

検証のため、同様の解析を TMM 計画外のデータを用いて行った。まず、公開済みのゲノムワイド関連解析 (GWAS) 結果を IEU OpenGWAS project のデータベースより得た。これをアウトカム側のデータとして検証すると、*MICA* 発現量とバセドウ病リスクについては因果関係が再び支持された。また、同様の解析により、*MICA*, *MICB* とともに B 型肝炎リスクについての因果関係が再び支持された。

4) 結語: 本研究の結果は、特定の NKG2DL 発現と糖尿病、及び B 型肝炎リスクとの間に、これまで知られていなかった統計学的な関係性があることを示している。我々はこの結果を取りまとめ、論文として報告した (Sutoh et al., 2021)。

<引用文献>

- Fujita, H., Hatanaka, Y., Sutoh, Y., Suzuki, Y., Oba, K., Hatanaka, K.C., Mitsuhashi, T., Otsuka, N., Fugo, K., Kasahara, M., Matsuno, Y., 2015. Immunohistochemical validation and expression profiling of NKG2D ligands in a wide spectrum of human epithelial neoplasms. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 63, 217-227. <https://doi.org/10.1369/0022155414563800>
- Kasahara, M., Yoshida, S., 2012. Immunogenetics of the NKG2D ligand gene family. *Immunogenetics* 64, 855-867. <https://doi.org/10.1007/s00251-012-0638-9>
- Lanier, L.L., 2015. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol. Res.* 3, 575-582. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0098>
- Nausch, N., Cerwenka, A., 2008. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 27, 5944-5958. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.272>
- Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., Jung, H., 2013. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 413-441. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095951>
- Sutoh, Y., Komaki, S., Yamaji, T., Suzuki, S., Katagiri, R., Sawada, N., Ono, K., Ohmomo, H., Hachiya, T., Otsuka-Yamasaki, Y., Takashima, A., Umekage, S., Iwasaki, M., Shimizu, A., 2021. Low *MICA* gene expression confers an increased risk of Graves' disease: a Mendelian randomization study. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* <https://doi.org/10.1089/thy.2021.0417>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sutoh Yoichi, Komaki Shohei, Yamaji Taiki, Suzuki Shiori, Katagiri Ryoko, Sawada Norie, Ono Kanako, Ohmomo Hideki, Hachiya Tsuyoshi, Otsuka-Yamasaki Yayoi, Takashima Akira, Umekage So, Iwasaki Motoki, Shimizu Atsushi	4. 巻 32
2. 論文標題 Low <i>MICA</i> Gene Expression Confers an Increased Risk of Graves' Disease: A Mendelian Randomization Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 188 ~ 195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/thy.2021.0417	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoichi Sutoh, Shohei Komaki, Taiki Yamaji, Shiori Nakano, Ryoko Katagiri, Norie Sawada, Kanako Ono, Hideki Ohmomo, Tsuyoshi Hachiya, Yayoi Otsuka-Yamasaki, Akira Takashima, So Umekage, Motoki Iwasaki, Atsushi Shimizu
2. 発表標題 Mendelian randomization reveals the causal interaction of MICA transcription levels with the risk of Graves' disease
3. 学会等名 The American Society of Human Genetics 71st Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoichi Sutoh, Shohei Komaki, Taiki Yamaji, Shiori Nakano, Ryoko Katagiri, Norie Sawada, Hideki Ohmomo, Tsuyoshi Hachiya, Yayoi Otsuka-Yamasaki, So Umekage, Motoki Iwasaki, Atsushi Shimizu
2. 発表標題 Low MICA transcription levels are associated with the risk of Graves' disease: Mendelian randomization study
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------