

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19501

研究課題名（和文）自己免疫疾患におけるレトロエレメントおよびその多型の役割の解明

研究課題名（英文）Dissecting the role of retroelements and their variations in autoimmune diseases

研究代表者

高地 雄太（Kochi, Yuta）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：60415156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、自己免疫疾患におけるレトロエレメント配列の役割を明らかにすることを目的とした。まず、日本人のB細胞株(n=27)のロングリード全ゲノムシーケンスを行うことにより、レトロエレメント多型のカタログを作成した。またIFN- γ 刺激したB細胞株のロングリードRNA-seqを行い、163,747種のRNAカタログを作製した。約8割は新規のRNAであり、一部はレトロエレメントを含む未知の遺伝子領域から転写されるものであった。また、これらのRNAの発現に影響する遺伝子多型を網羅的に明らかにし、ゲノムワイド関連解析データと統合解析することによって、自己免疫疾患に関わるものを網羅的に同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、いまだ全貌が明らかになっていない自己免疫疾患の病因メカニズムについて、ゲノム上の未開拓領域であるレトロエレメントから迫るものである。本研究では、自己免疫疾患に関わるレトロエレメント由来のRNAを網羅的に明らかにしたが、これらの解析によって整備されたRNAカタログは、自己免疫疾患以外の様々な疾患の病因解明につながる貴重なリソースになると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to clarify the role of retroelements in autoimmune diseases. First, we catalogued retroelement variations by long-read whole genome sequencing of Japanese B cell lines (n=27). We also performed Long-read RNA-seq of IFN- γ -stimulated B cell lines and generated a catalog of 163,747 RNAs. Approximately 80% were novel RNAs, some of which were transcribed from unannotated loci including retroelements. We also identified genetic variations affecting the expression of these RNAs. We then integrated these data with genome-wide association study data and comprehensively identified those involved in autoimmune diseases.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：自己免疫疾患 ゲノムワイド関連解析 ロングリードシーケンシング レトロエレメント

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

ゲノムワイド関連解析 (GWAS) によって、多くの自己免疫疾患感受性領域が同定されたが、これらによって説明される遺伝性は 50%にも満たないとの推計もある。残された遺伝因子として有力なのがヒトゲノム配列の約半分をしめる、反復配列に存在する多型である。反復配列は、これまでの GWAS では十分な解析がなされてこなかったが、中でも LINE、SINE などの散在反復配列 (レトロエレメント) は、自然免疫刺激下において RNA を転写することが知られている。これらの RNA の中には RNA 認識受容体のリガンドとなり自然免疫をさらに活性化するものもある (Grandi N, *Front Immunol* 2018)。また、これらの RNA の転写には負の制御機構も備わっているが、なんらかの要因によってこの制御機構が破綻すると、免疫システムが暴走して自己免疫疾患などの発症につながる事が考えられている。

2. 研究の目的

本研究では自己免疫疾患の遺伝因子として内在性レトロエレメント配列の遺伝子多型やレトロエレメント由来の RNA に注目する。すなわち、ロングリード・シーケンサー (LRS) で日本人の全ゲノムシーケンスを行うことにより、レトロエレメント多型のカタログを作成し、同時に自然免疫シグナルで刺激した免疫細胞を用いて、レトロエレメント由来の RNA の網羅的発現解析を行う。これらのデータおよび既存の発現量的形質遺伝子座 (eQTL) データを解析することにより、遺伝子多型によって発現量に個人差をみとめるレトロエレメント RNA を網羅的に明らかにする。また、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、炎症性筋炎などの自己免疫疾患発症に関わるレトロエレメントを同定する。

3. 研究の方法

(1) 日本人におけるレトロエレメント配列多型のカタログを作成

本研究では、1000 Genomes Project に用いた日本人 DNA の一部を用いて (n=27) LRS (Nanopore 社、PromethION) を用いたロングリード全ゲノムシーケンスを行った。多型解析には研究協力者である三橋らがツール (tandem-genotypes) を使い、日本人における反復配列・レトロエレメント多型のカタログを作成した。

(2) レトロエレメント由来の RNA の網羅的発現解析

(1) で WG-seq を行った検体由来の不死化 B 細胞株を IFN- 刺激し、RNA-seq を行った。また、一部のサンプルは LRS によるロングリード RNA-seq データも取得し、レトロエレメント RNA のレファレンスマップを作成した。このマップと で作成したレトロエレメントカタログをレファレンスとして用いて、RNA-seq のデータからレトロエレメント RNA の発現解析を行った。

(3) レトロエレメント eQTL 解析

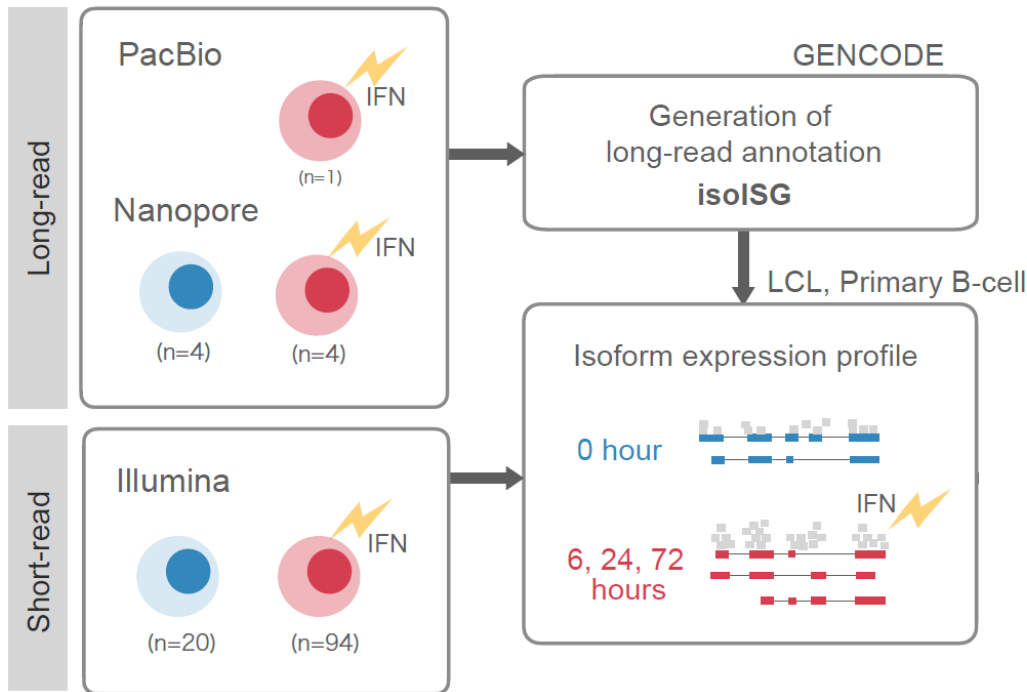
(1) の多型情報、(2) のレトロエレメント RNA の情報を用いて、ジェノタイプと発現量の相関解析をし、遺伝子多型によって発現制御されるレトロエレメント RNA の網羅的同定を行った。

(4) 自己免疫疾患 GWAS との統合解析

レトロエレメント RNA の eQTL 解析データと、自己免疫疾患の GWAS データを統合解析することによって、疾患に関連するレトロエレメント RNA の網羅的同定を行った。

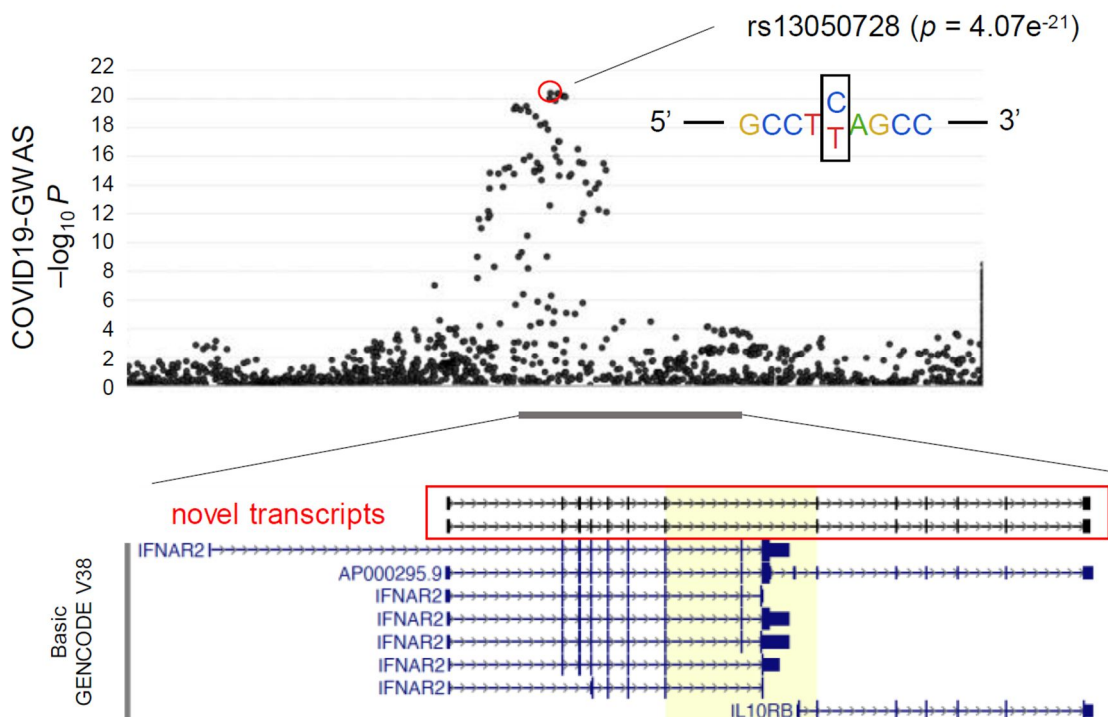
4. 研究成果

日本人の不死化 B 細胞株 (n=27) のロングリード全ゲノムシーケンスを行うことにより、レトロエレメント多型のカタログを作成した。また自然免疫刺激した細胞 (IFN- 刺激、6 時間) を用いて、ロングリードシーケンスによる RNA の網羅的解析を行い、163,747 種の RNA isoforms カタログを作製した (isoISG)。これらの RNA は既知の遺伝子から転写され、選択的スプライシングによって配列が変化したものも含むが、その多くはレトロエレメントを配列に含んでいた。また、約 8 割は既存の GENCODE に登録されていない新規のものであり、一部はレトロエレメントを含む未知の遺伝子領域から転写されるものであった (次ページ図)。



追加で、不死化 B 細胞株 (n=94) のショートリード RNA-seq を行い、isoISG にマッピングすることにより、新規に同定されたレトロエレメント RNA およびレトロエレメントを含む RNA の定量を行った。また、全ゲノムシーケンズデータより得られた多型のジェノタイプとの相関を決定することにより、これらの RNA の発現に影響する遺伝子多型を網羅的に明らかにした。さらに、GWAS カタログなどに登録されている自己免疫疾患のゲノムワイド関連解析データと統合解析することによって、3000 を超える新規の RNA が自己免疫疾患の発症と関連することを明らかにした。本解析結果については、論文投稿中である。

また、本研究で得られたロングリードシーケンズデータを用いて、COVID19 の重症化に関わる RNA の検索を行ったところ、*IFNAR2-IL10RB* 領域における read-through transcript (二つの遺伝子にまたがる RNA transcript) の同定に至った(下図: Mitsui et al, *Immunity* in press)。同様に、自己免疫疾患と関わる RNA transcript の機能解析を行うことで、自己免疫疾患の病因メカニズムの解析を進める予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Kensuke, Ishigaki Kazuyoshi, Suzuki Akari, Tsuchida Yumi, Tsuchiya Haruka, Sumitomo Shuji, Nagafuchi Yasuo, Miya Fuyuki, Tsunoda Tatsuhiro, Shoda Hirofumi, Fujio Keishi, Yamamoto Kazuhiko, Kochi Yuta	4. 巻 13
2. 論文標題 Splicing QTL analysis focusing on coding sequences reveals mechanisms for disease susceptibility loci	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-32358-1	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 -

1. 著者名 Ishigaki Kazuyoshi, Sakaue Saori, Terao Chikashi, Luo Yang, et al.	4. 巻 54
2. 論文標題 Multi-ancestry genome-wide association analyses identify novel genetic mechanisms in rheumatoid arthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 1640 ~ 1651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41588-022-01213-w	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高地 雄太
2. 発表標題 eQTL/sQTLから明らかにする多因子疾患の病態
3. 学会等名 日本オミックス医学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------