

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20647

研究課題名（和文）自己免疫疾患のリスク多型の機能を制御する転写因子の探索

研究課題名（英文）Identification of transcription factor controlling autoimmunity risk allele's pathogenic function

研究代表者

石垣 和慶 (Ishigaki, Kazuyoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：00790338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：自己免疫疾患のリスク多型の機能は特定の転写因子により制御されると推定されている。そのような転写因子の機能を実証するには新しい実験システムの開発が必要である。本研究では、ATAC-seqを改良し、効率的かつ正確にリスク多型の機能を評価できる実験システムを開発した。また、ゲノム編集技術を利用し、ヒトCD4陽性T細胞にリスク多型を正確に導入することに成功した。さらに、関節リウマチの発症に關与する候補転写因子をsiRNAを用いて効率的にノックアウトする実験系も確立した。本研究で開発した実験システムを併用することで、候補転写因子がリスク多型の機能を制御することを実証できると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己免疫の新規創薬標的を求めて、マウスモデルや患者検体を用いた研究が活発に行われている。これらの研究活動によって、自己免疫疾患の病態理解は改善したが、創薬シーズの実用化の成功例は多くない。その原因として、従来の創薬標的がヒト疾患の発症原因を正確に捉えられていない可能性が考えられる。本研究の成果によって、ヒト免疫細胞を用いて、疾患発症の原因に基づいた病態解明が進み、有効性の高い新規創薬標的が同定されることが期待される。また、本研究で開発された新しい実験システムは、自己免疫疾患に限らず幅広い疾患の病態解明を加速させることも期待される。

研究成果の概要（英文）：Disease-specific transcription factors probably regulate the autoimmune diseases' risk allele function. Identification of such transcription factors requires the development of new experimental systems. In this study, we modified ATAC-seq and developed an experimental system that can efficiently and accurately evaluate the function of risk alleles. In addition, using genome editing technology, we succeeded in accurately introducing risk alleles into human CD4-positive T cells. Furthermore, we established an experimental system that can efficiently knock out candidate transcription factors involved in rheumatoid arthritis pathogenesis using siRNAs. By combining all experimental systems established in this study, we can demonstrate the pathogenic effect of candidate transcription factors on the risk allele's functions.

研究分野：免疫遺伝学

キーワード：リスク多型 GWAS ゲノム編集 転写因子

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

遺伝子多型情報の個人差をヒト集団の中で解析するゲノムワイド関連解析は、ノックアウトマウス実験と同様に疾患の原因を議論できる解析法であり、自己免疫疾患のリスク多型を多数同定している。大半のリスク多型は遺伝子発現調整領域に局在し、近傍にある遺伝子の発現調整の異常を介して疾患リスクを高めると推定されている。そして、その多型の機能は疾患特異的な転写因子により制御されると考えられている。しかし、具体的にどの転写因子がリスク多型の機能を特異的に制御しているのかを実験的に確認した例は極めて少ない。

リスク多型と遺伝子発現量との制御関係が遺伝的リスクの本体である。申請者は統合的・網羅的解析を駆使し、リスク多型の機能をコントロールする複数の転写因子（NF-kb など）を“推定”し報告している（Ishigaki et al. Nat Genet 2020; Amariuta et al. Nat Genet 2020）。しかし、この推定を実験的に“実証”した例は極めて少なく、自己免疫疾患の病態解明の障壁になっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、自己免疫疾患のリスク多型の機能（＝遺伝子発現制御）を効率的に定量評価する実験系を確立し、転写因子ノックアウトの実験を併用することで、どの転写因子がリスク多型の機能を制御しているのかを実験的に確認することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞

自己免疫疾患のリスク多型の多くはヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞の細胞種特異的な遺伝子発現制御領域に存在する。そのため、ヒト末梢血 CD4 陽性 T 細胞でリスク多型の機能を評価することが有効である。本研究では、書面による同意の得られた健康人ボランティアから末梢血を採血し、MACS によって CD4 陽性 T 細胞を分離して使用した。

(2) アレル特異的解析

本研究では効率的に多型機能を評価するためアレル特異的解析を用いた。アレル特異的解析はリスク多型の機能を“アレル比”というシンプルな指標で評価する効率的な実験系である。通常、多型機能解析では 100 名程度のドナーを対象に実験する必要があり、多彩な細胞条件で多型機能を評価することは難しい。一方、アレル特異的解析では 1 名のドナーでもアレル機能の評価が可能であり、多彩な細胞条件を容易に扱うことができる。

(3) ゲノム編集

アレル特異的解析を更に効率的に実施するため、ゲノム編集実験を併用した。通常、ゲノム研究は我々が生まれながらに有する多型（自然多型）を用いる。遺伝子型を操作することができないため、適切な遺伝子型のドナーを集めるのが時に困難となる。例えば、日本人集団でアレル頻度の低い多型の機能評価は難しい。一方、ゲノム編集で導入する多型（人工多型）を用いれば、遺伝子型を自由自在に調整することが可能となり、実験効率を高めることができる。

(4) siRNA による転写因子機能の抑制

転写因子の機能を抑制するために、siRNA を用いた。1 つの遺伝子に対して 3 ヶ所に siRNA を設計し、エレクトロポレーションによって CD4 陽性 T 細胞内に投入した。

(5) エピゲノム解析

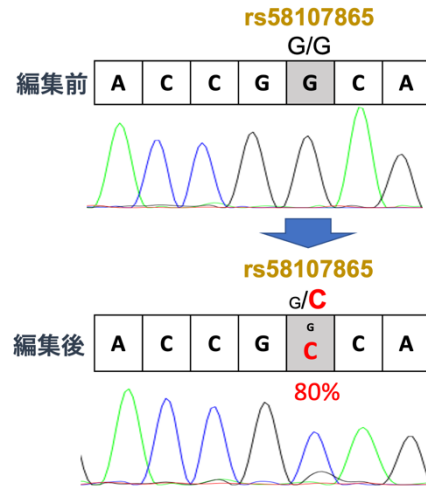
本研究では申請者らが独自に改良した ATAC-seq の実験システムを用いて、CD4 陽性 T 細胞のエピゲノム解析を実施した。イルミナ社のシーケンサーを用いてデータを取得した。

(6) トランスクリプトーム解析

本研究では Smart-seq 法を用いて CD4 陽性 T 細胞のトランスクリプトーム解析を実施した。イルミナ社のシーケンサーを用いてデータを取得した。

4. 研究成果

(1) 本研究では、申請者らが参加した国際コンソーシアムによる関節リウマチの大規模ゲノム研究において最も高い精度でマッピングされたリスク多型である rs58107865 に注目した解析を行なった (Ishigaki et al. Nat Genet 2022)。最近の技術である、base editor、prime editor を用いて CD4 陽性 T 細胞に rs58107865 を導入するゲノム編集実験を行なった。Base editor では近傍の標的外の塩基にも編集が観測された (bystander mutation)。一方、prime editor は実験条件を調整することで高い効率での編集が可能となり、bystander mutation の出現頻度は十分に低かった。右図は CD4 陽性 T 細胞に rs58107865 を導入するゲノム編集実験の 1 例であり、サンガー法によりゲノム編集前後で rs58107865 の C アレルを人工的に導入できたことが確認された。



(2) 関節リウマチの発症に関与する候補転写因子を、CD4 陽性 T 細胞において、siRNA を用いて効率的にノックアウトすることに成功した。その細胞状態で、網羅的にエピゲノム・トランスクリプトームを評価した。この結果は現在解析中であるが、アレル機能解析を併用することで、候補転写因子がリスク多型の機能を制御することを実証できると期待される。

(3) 申請者らは独自に ATAC-seq を改良し、評価対象の領域だけを増幅してシーケンス実験の標的とし、正確にアレル比を定量評価できる実験システムを開発した。この実験システムにゲノム編集実験を併用することで、rs58107865 に有意なアレル比を検出することに成功した。この実験システムは多型機能解析の実験効率を大幅に改善するものであり、幅広い疾患の病因解明に役立つことが期待される。

参考文献：

- Ishigaki K, et al. Large-scale genome-wide association study in a Japanese population identifies novel susceptibility loci across different diseases. Nat Genet. 2020 Jul;52(7):669-679.
- Amariuta T, Ishigaki K, et al. Improving the trans-ancestry portability of polygenic risk scores by prioritizing variants in predicted cell-type-specific regulatory elements. Nat Genet. 2020 Dec;52(12):1346-1354.
- Ishigaki K, et al. Multi-ancestry genome-wide association analyses identify novel genetic mechanisms in rheumatoid arthritis. Nat Genet. 2022 Nov;54(11):1640-1651.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hatano Hiroaki, Ishigaki Kazuyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Functional Genetics to Understand the Etiology of Autoimmunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 572 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14030572	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 Akiyama Masato, Sakaue Saori, Takahashi Atsushi, Ishigaki Kazuyoshi, Hirata Makoto, Matsuda Koichi, Momozawa Yukihide, Okada Yukinori, Ninomiya Toshiharu, Koido Masaru, Morisaki Takayuki, Nagai Akiko, Sagiya Yoji, Terao Chikashi, Murakami Yoshinori, Kubo Michiaki, Kamatani Yoichiro, The Biobank Japan project	4. 巻 6
2. 論文標題 Genome-wide association study reveals BET1L associated with survival time in the 137,693 Japanese individuals	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04491-0	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 Koido Masaru, Hon Chung-Chau, Koyama Satoshi, Kawaji Hideya, Murakawa Yasuhiro, Ishigaki Kazuyoshi, Ito Kaoru, Sese Jun, Parrish Nicholas F., Kamatani Yoichiro, Carninci Piero, Terao Chikashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Prediction of the cell-type-specific transcription of non-coding RNAs from genome sequences via machine learning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41551-022-00961-8	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 -
1. 著者名 Ishigaki Kazuyoshi, ら	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

1. 著者名 Nagafuchi Yasuo, Ota Mineto, Hatano Hiroaki, Inoue Mariko, Kobayashi Satomi, Okubo Mai, Sugimori Yusuke, Nakano Masahiro, Yamada Saeko, Yoshida Ryochi, Tsuchida Yumi, Iwasaki Yukiko, Shoda Hirofumi, Okada Yukinori, Yamamoto Kazuhiko, Ishigaki Kazuyoshi, Okamura Tomohisa, Fujio Keishi	4. 巻 133
2. 論文標題 Control of naive and effector CD4 T cell receptor repertoires by rheumatoid-arthritis-risk HLA alleles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Autoimmunity	6. 最初と最後の頁 102907 ~ 102907
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaut.2022.102907	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 -

1. 著者名 Yamaguchi Kensuke, Ishigaki Kazuyoshi, Suzuki Akari, Tsuchida Yumi, Tsuchiya Haruka, Sumitomo Shuji, Nagafuchi Yasuo, Miya Fuyuki, Tsunoda Tatsuhiko, 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 -
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 Nakano Masahiro, Ishigaki Kazuyoshi, ら	4. 巻 185
2. 論文標題 Distinct transcriptome architectures underlying lupus establishment and exacerbation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 3375 ~ 3389.e21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2022.07.021	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

1. 著者名 Nathan Aparna, Asgari Samira, Ishigaki Kazuyoshi, Valencia Cristian, Amariuta Tiffany, Luo Yang, Beynor Jessica I., Baglaenko Yuriy, Suliman Sara, Price Alkes L., Lecca Leonid, Murray Megan B., Moody D. Branch, Raychaudhuri Soumya	4. 巻 606
2. 論文標題 Single-cell eQTL models reveal dynamic T cell state dependence of disease loci	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 120 ~ 128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04713-1	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

1. 著者名 Ishigaki Kazuyoshi, Lagattuta Kaitlyn A., Luo Yang, James Eddie A., Buckner Jane H., Raychaudhuri Soumya	4. 巻 54
2. 論文標題 HLA autoimmune risk alleles restrict the hypervariable region of T cell receptors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 393 ~ 402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-022-01032-z	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 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hiroaki Hatano, Kazuyoshi Ishigaki, ら
2. 発表標題 Actively transcribed regulatory regions explain the genetic risk of rheumatoid arthritis
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
---------	---------