

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461712

研究課題名(和文)ゲノム解析による円形脱毛症疾患感受性遺伝子同定の試み(第2段)

研究課題名(英文)An attempt to identify a gene for alopecia areata (2nd phase)

研究代表者

池田 志孝 (Ikeda, Shigaku)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40193198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：H25-27年度の研究で、マイクロサテライトを用いた円形脱毛症のGWASを行い、さらにSNPと次世代シーケンサーを用いた解析を行い下記の成果が得られた。1) HLA領域、特にHLA-C遺伝子の近傍に強い相関が得られた(OR: 3.41)。2) 28のハプロタイプが検出されたが、その内の1つのハプロタイプ上に疾患遺伝子が乗っていることが判明した。3) 5つのリスクハと3つのノンリスクハプロタイプの3.95メガベース領域について、次世代シーケンサーを用いて解析したところ、リスクハプロタイプのみ共通してみられるexon領域の遺伝子変異が1つだけ検出された。

研究成果の概要(英文)：During the fiscal year of 2013-2015, we have done genome-wide association study of alopecia areata (AA) patients by utilizing microsatellite markers. In addition, we have also examined by using SNP markers and next-generation sequencing, and have obtained below-mentioned results.

1) We have identified strongest association of AA at HLA-C locus within HLA lesion (OR: 3.41). 2) 28 haplotypes were detected, and 1 of them was found to contain responsible gene for AA. 3) 5 risk and 3 non-risk haplotypes were examined by next generation sequencer, and an exonic non-synonymous single nucleotide variant, which was common to all risk haplotype, was only detected. We are now trying to generate gene modified mouse model, and examine its phenotype.

研究分野：皮膚科学

キーワード：円形脱毛症 マイクロサテライト GWAS

1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症は若い女性に好発し、特に多発性ないし汎発性円形脱毛症では外観の変化により患者のQOLが著しく障害される。その発症機序としては自己免疫説が唱えられており、甲状腺炎や他の自己免疫疾患の合併が多く見られること、ステロイド療法や免疫療法などに反応する例が多いことが指摘されている。しかし難治例や再発を繰り返す例が多く、またステロイドの副作用などにより治療を中断せざるを得ないことが多いことも事実である。なお臨床疫学調査より、本疾患は多因子遺伝性疾患であると推定されている。

Alopecia areata registryの登録より米国・Israelの20の患者家系が選出され、MSマーカーを用いてゲノムワイドな連鎖解析が行われた。その結果、ch6p (HLA遺伝子座)、ch6q、ch10、ch16、ch18に連鎖が認められた。

またAAモデルマウス(C3H/HeJ)の解析では、マウスch8、ch9、ch15、ch17に連鎖がみられ、さらにマウスch17はMHC座であった。

平成22年度に採択された研究(ゲノム解析による円形脱毛症疾患感受性遺伝子同定の試み)を中心として、我々はpooled DNAを用いたゲノムワイドな相関解析を行い、第6番染色体短腕HLA領域HLA-Bのセントロメア側近傍に強い相関が同定された(OR: 3.21)領域を詳細に解析した結果、詳細なmicrosatellite markerやSNPを用いて2 megabaseの領域に絞りこむことが出来た(Haida Y, Ikeda S, et al: An association study of Alopecia Areata within the HLA region using microsatellite markers. Tissue Antigen, 2013; 65: 553-7)。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いて、非リスクハプロタイプ5例とリスクハプロタイプ7例におけるHLA-C領域4.97Mb (OR: 3.41を示したD6S2811と連鎖不平衡の範囲)を、次

世代シーケンサーを用いて全塩基情報を解析し、疾患感受性遺伝子の同定を試みる。

3. 研究の方法

リスクハプロタイプ1種と非リスクハプロタイプ27種は既にマイクロサテライトリピート解析、SNP解析により判明している。

次世代シーケンサーにて、非リスクハプロタイプ5例とリスクハプロタイプ7例におけるHLA-C領域4.97Mbを解読し、比較検討する。

方法は、まず non-coding 領域、intergenic 領域、promoter 領域、coding 領域全てを検討し、coding 領域の single nucleotide variant の有無につき検討する。もし coding 領域に single nucleotide variant が無ければ、promoter 領域あるいは non-coding 領域の single nucleotide variant についても解析を加える。

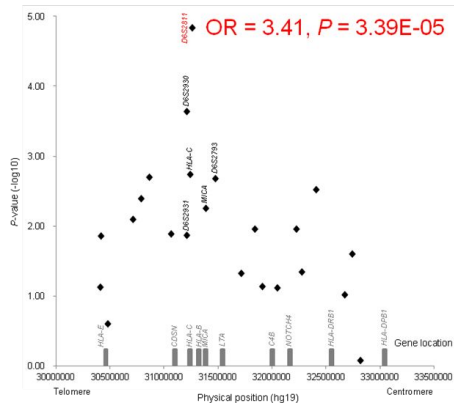
もし single nucleotide variant が得られたら、coding 領域の場合はソフトウェアを用いてアミノ酸置換の有無を検討する。更にアミノ酸置換が推定された場合はソフトウェアを用いて3次元構造の変化の有無を検討する。

promoter 領域あるいは non-coding 領域の single nucleotide variant が検出されたら、同部位の構造と転写因子の結合様式について、変異ありなしの配列につき、ソフトウェアを用いて解析する。

4. 研究成果

1) 171例の円形脱毛症患者と560例の健常者から得られたDNAを用いて、マイクロサテライト法による genome-wide association study を行い、1) HLA 領域 (HLA-E から HLA-DPB1 まで約5メガベース領域)、特に HLA-C 遺伝子の近傍に AA の強い相関が得られた (OR: 3.41、D6S2811)。

Allelic association and gene location



同領域では、最低 1.8×10^{-5} 、最高 4.5×10^{-5} の p-value が得られており、また OR からみて、D6S2811 に最も強い相関がみられたものの、HLA 領域全域にわたり相関がみられたので、D6S2811 あるいはその近傍の遺伝子が原因遺伝子ではなく、HLA 全域の遺伝子が候補遺伝子と考えられた。そのため、ハプロタイプ解析とリスクハプロタイプの同定が必要となった。

2) 同部位は強い連鎖不平衡の中にあるため、SNP とマイクロサテライトマーカーの多種アレル情報を元に解析を試みた。その結果、リスクハプロタイプを含む 28 のハプロタイプが検出された。リスクハプロタイプとは、そのハプロタイプ上に疾患遺伝子が乗っているといういみである。

そこで、5 本のリスクハプロタイプと 7 本のノンリスクハプロタイプを次世代シーケンサーで解析した。

Haplotype association

Haplotype # ID	Haplotype			Haplotype frequency		Haplotype association		
	D6S2930	HLA-C	D6S2811	Case	Control	OR	(95% CI)	P
MShap01	441	C*04:01	208	0.0614	0.0179	3.78	2.00 - 7.16	6.57E-05
MShap02	433	C*07:02	192	0.0117	0.0009	13.4	1.49 - 121	7.24E-03
MShap03	437	C*07:02	192	0.0292	0.0125	2.42	1.06 - 5.56	4.37E-02
MShap04	441	C*15:02	192	0.0175	0.0018	10.2	2.03 - 50.7	1.91E-03



We sequenced 5 risk (MShap01) and 7 non-risk haplotypes in the 4.97 megabases (Mb) of the extended MHC region by next generation sequencer (NGS).

3) その結果、12 本のハプロタイプにおいて 77,040 個の single nucleotide variant が検出され、その内 3,895 が heterozygote の single nucleotide variant であった。さらにそれらを 5 本のリスクハプロタイプにおいて解析すると、5 本ともに共通する single nucleotide variant は、15 個の intergenic または intronic 領域のもの、であり、5 または 3' UTR 領域では 0 であった。大変興味深いことに、coding 領域では、nonsense 変異を起こす single nucleotide variant は 0、synonymous 変異を起こす single nucleotide variant も 0 であったが、Non-synonymous 変異を起こす変異が 1 つのみ検出された。

即ち、次世代シーケンサーを用いて 5 本のリスクハプロタイプと 7 本のノンリスクハプロタイプを検討した結果、coding 領域における non-synonymous 変異を生じる single nucleotide variant がたった 1 つのみ検出されたわけである。

Sequencing by NGS

The total 77,040 variants identified among the 12 individuals.



We extracted 3,895 heterozygous variants in individuals with the risk haplotype.



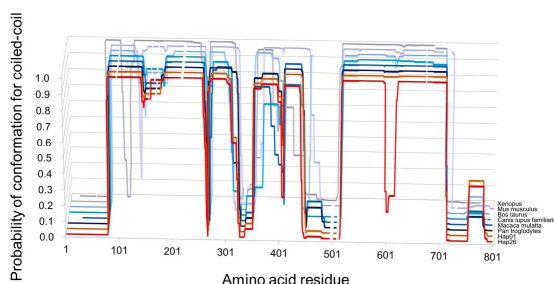
Variant type	Number of individual with risk haplotype				
	≥ 1	≥ 2	≥ 3	≥ 4	= 5
Intergenic or intronic	3,736	298	65	29	15
5' or 3' UTR	64	5	2	1	0
Nonsense	4	0	0	0	0
Non-synonymous	51	5	1	1	1
Synonymous	40	3	0	0	0
Total	3,895	311	68	31	16

同遺伝子にはリスクハプロタイプとノンリスクハプロタイプ全体合せて 24 の single nucleotide variant が検出されたが、残りのリスクハプロタイプの本変異の有無について検討では、全てのリスクハプロタイプにおいて本変異が検出され、他の single nucleotide variant は検出されなかったため、遺伝統計学的にも本変異が円

形脱毛症の原因遺伝子変異と考えられた (OR: 3.75)。

4) 次に、次世代シーケンサーを用いて5本のリスクハプロタイプと7本のノンリスクハプロタイプを検討した結果たった1つのみ検出された coding 領域における non-synonymous 変異を生じる single nucleotide variant につき、ソフトウェアを用いて構造変化の有無につき検討した。

その結果、本 non-synonymous 変異を生じる single nucleotide variant は、同遺伝子産物の種を越えて保存されている領域の3次元構造を変化させる変異であることが判明した。



【今後の研究】

1) 本遺伝子ノックアウトマウス作成

同じく平成25年に採択された研究において、乗法通り本遺伝子の全身ならびに毛包特異的ノックアウトマウスを相同組み換え法ならびにCre/lox P系により作成した(平成27年度済み)。現在これらマウスを解析中であるが、予想した如く、全身ノックアウトマウスは胎生致死ではなく、また胎生期ならびに第一期毛成長は正常であった。

2) 平成28年度からの研究は、

a) CRISPR/Cas9 system を用いて本変異のノックインマウスを作成する。b) 患者および正常人毛包における本遺伝子産物の発現を検討する。

c) 本遺伝子のプロモーター領域の解析も行う(ゲルシフト、ルシフェラーゼ発現法やChipアッセイ)。d) pooled患者末梢血DNAサンプルを用いたゲノム解析により、ch10、ch16、ch18の円形脱毛症の疾患感受性遺伝子候補領域と遺伝子の同定を試みる。

e) また多発性家系のエクソム解析(全エクソンシーケンス)により、疾患感受性遺伝子の同定を試みる。

5. 主な発表論文

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Mabuchi T, Ota T, Manabe Y, Ikoma N, Ozawa A, Terui T, Ikeda S, Inoko H, Oka A: HLA-C*12:02 is a susceptibility factor in late-onset type of psoriasis in Japanese. J Dermatol. 2014; 41: 697-704.

Oka A, Mabuchi T, Ikeda S, Terui T, Haida Y, Ozawa A, Yatsu K, Kulski JK, Inoko H: IL12B and IL23R gene SNPs in Japanese psoriasis. Immunogenetics. 2013 Nov;65(11):823-8.

Haida Y, Ikeda S, Takagi A, Komiyama E, Mabuchi T, Ozawa A, Kulski JK, Inoko H, Oka A: Association analysis of the HLA-C gene in Japanese alopecia areata. Immunogenetics. 2013; 65: 553-7.

[学会発表](計1件)

Ikeda S, Komiyama E, Oka A: MHC risk haplotype sequencing identifies a gene as susceptibility gene for alopecia areata, World Congress of Dermatology, Vancouver, Canada, June 8 to 12, 2015.

[図書](計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

池田 志孝 (IKEDA, Shigaku)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40193198

(2)研究分担者

岡 晃 (OKA, Akira)

東海大学医科学研究所 講師

研究者番号：80384866

(3)連携研究者

なし

研究者番号：