

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670458

研究課題名(和文)ゲノム多型とトランスクリプトーム解析の連結による、膠原病「鍵分子」の探索

研究課題名(英文)An exploratory study on the key molecules in Japanese autoimmune rheumatic diseases using genome and transcriptome analyses.

研究代表者

土屋 尚之(TSUCHIYA, Naoyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60231437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：トランスクリプトーム解析は発症や病態における「鍵分子」探索の手がかりを与えるが、日本人における膠原病の検討はこれまで少数である。本研究では、日本人活動性全身性エリテマトーデス(SLE)、ANCA関連血管炎(AAV)のトランスクリプトーム解析を施行し、健常対照群と比較した。各検体は3群のクラスターに例外なく分類され、既報のSLEに加え、AAVにおいても発現変動遺伝子群における型インターフェロン関連遺伝子の有意な増加が検出された。一部では発現変化が両疾患において逆方向であり、病態の違いに関連する可能性が示唆された。AAVでは、疾患感受性領域であるHLA class IIの発現低下が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analyses reveal not only the key molecules in the pathogenesis, but also novel susceptibility genes which influence expression levels. Here we compared transcriptomes of Japanese patients with active systemic lupus erythematosus (SLE), ANCA-associated vasculitis (AAV) and healthy controls (HC). These groups were found to form distinct clusters. Significant enrichment of type I interferon related genes was detected not only in the differentially expressed genes in SLE, but also in AAV. Some of these genes exhibited opposite directions of expression change in SLE and AAV, suggesting that they might be related to the difference in the pathogenesis of these diseases. Furthermore, significant down-regulation of HLA class II genes was detected in AAV, suggesting that the molecular mechanism of association between HLA class II and AAV might involve reduced expression level. Thus, this exploratory study generated many testable hypotheses which should be validated in the future.

研究分野：膠原病学

キーワード：全身性エリテマトーデス ANCA関連血管炎 トランスクリプトーム 遺伝子発現 インターフェロン

1. 研究開始当初の背景

これまでに、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus) においては、候補遺伝子解析およびゲノムワイド関連研究 (genome-wide association study, GWAS) により、約 70 個所におよぶ疾患感受性候補領域が見出されているが、個々の領域における病因的多型部位やそれによる機能的影響まで解明されたものは少ない。さらに、これまでに見出された遺伝因子のみでは遺伝疫学的に想定される遺伝因子の寄与度の一部しか説明できないことがわかっている (“missing heritability”)。今後、病態の理解とそれに基づく臨床応用のためには、さらなる疾患関連多型とその機能的意義の解明が必要である。

一方、抗好中球細胞質抗体 (antineutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 関連血管炎 (ANCA-associated vasculitis, AAV) においては、世界的にも GWAS は 2 件のみしか報告されておらず、HLA を始め、少数の疾患感受性遺伝子が確立しているのみである。

SLE や AAV を始めとする膠原病は多因子疾患であるが、これまでに明らかになった多因子疾患関連多型の多くは、発現調節に影響する多型であることが知られている。従って、これらの疾患において、疾患発症や病態形成に重要な意義を持ち、分子標的となり得る「鍵分子」を効率的に同定する上で、末梢血のトランスクリプトーム解析は有用な情報を提供すると期待される。また、既知の疾患関連多型においては、その機能解析としての発現解析のターゲットをしぼる上で有用な知見を得ることができる。

SLE ではこれまでに多数のトランスクリプトーム解析が報告され、“type I interferon signature”、すなわち、type I interferon (type I IFN) によって誘導される遺伝子群の発現上昇が見られることが確立している。しかし、日本における報告はきわめて少数である。当研究室を含めた国内外の研究グループの研究により、疾患感受性遺伝子多型においては、ヨーロッパ系集団とアジア系集団には、ある程度の遺伝的背景の違いが存在することから、トランスクリプトーム解析においても集団差が存在する可能性が存在する。

一方、AAV においては、国内外を通じて、比較的少数のトランスクリプトーム解析の報告しか見られない。多発血管炎性肉芽腫症 (granulomatosis with polyangiitis, GPA)、proteinase 3 (PR3)-ANCA 陽性血管炎

(PR3-AAV) が大部分を占めるヨーロッパ系集団と、顕微鏡的多発血管炎 (microscopic polyangiitis, MPA)、myeloperoxidase (MPO)-ANCA 陽性血管炎 (MPO-AAV) が大部分を占めるアジア系集団において、遺伝子発現プロファイルが異なる可能性が存在する。

さらに、SLE と AAV には、種々の病態の類似性ととともに、相違点が存在する、このような病態の差違に関連する遺伝子を探索することは、それぞれの疾患の特徴的な病態を規定する遺伝子の同定のための重要な示唆を与えると期待される。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では、日本人集団における疾患活動性 SLE、AAV 患者および健常対照者 (HC) のトランスクリプトーム解析を施行し、以下の検討を行うことを目的とした。

- (1) 日本人 SLE および AAV 群のトランスクリプトームを HC 群と比較する。
- (2) SLE 群および AAV 群のトランスクリプトームの異同について検討する。
- (3) 疾患感受性遺伝子多型とトランスクリプトームの関連との解析のモデルとして、日本人集団における AAV における *HLA class II* 遺伝子の関連を解析し、トランスクリプトームとの関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 疾患活動性 (強力な免疫抑制療法導入あるいは強化前) SLE 8 例、AAV 8 例 (うち 6 例が MPO-ANCA 陽性)、健常対照群 (HC) 15 例の全血から total RNA を抽出し、SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K (Agilent) を用いたトランスクリプトーム解析を施行し、パスウェイ解析を施行した。

(2) 日本人 AAV 356 例、健常対照群 596 例について、*HLA-DRB1*、*DPB1* のアリルタイピングを施行した。

本研究は、筑波大学および研究協力施設の倫理審査委員会において審議・承認された研究計画に基づき、被験者のインフォームド・コンセントを得て施行した。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトームのクラスター解析の結果、SLE 群、AAV 群、HC 群が明確に識別され、すべての検体が例外なく該当するクラスターに群分けされた。

次に、発現変動遺伝子のパスウェイについて検討した。AAV 群では、サブセット間の病

態の違いの可能性を考慮し、PR3-AAV は 2 例のみであったため、MPO-AAV 群を解析対象とした。

SLE 群、MPO-AAV 群それぞれにおいて、HC 群と比較して、false discovery rate (FDR)法による補正後の $P_{FDR} < 0.05$ および fold change > 1.5 あるいは < -1.5 を示す遺伝子群を有意な発現変化が見られた遺伝子として抽出し、Ramos et al (Arthritis Rheum 2011)の方法に従い、過去の文献および NCBI, IPA データベースを利用して収集された IFN 関連遺伝子リストを利用して、IFN 関連遺伝子群における enrichment を検討した。

SLE と HC いずれにおいても 2 検体以上で発現が検出された全遺伝子 17,448 のうち、有意な発現変化が観察されたものは 4,315 遺伝子 (24.7%)であった。IFN 関連遺伝子群の中では、発現が検出された遺伝子 1,780 中、有意な発現変化が認められたのは 481 遺伝子 (27.0%)であり、IFN 関連遺伝子群では、それ以外の遺伝子と比較して、有意な発現変化が見られたものが増加していた ($P=0.018$)。

同様に、MPO-AAV においては、発現が確認された全遺伝子 17,427 のうち、有意な発現の変化が観察されたものは 3,182 (18.3%)、IFN 関連遺伝子群の中では 1,753 遺伝子中 426 遺伝子 (24.3%)であり、MPO-AAV においても、IFN 関連遺伝子群に有意な発現変化を示す遺伝子が顕著に増加していた ($P=5.0 \times 10^{-12}$)。

次に、IFN 関連遺伝子群リストの中で、SLE, MPO-AAV, HC の 3 群いずれにおいても 3 検体以上において発現が検出された 1,694 遺伝子中、分散分析により 3 群間の発現の有意差 ($P_{FDR} < 0.05$)が検出された 1,114 遺伝子において、SLE と HC、MPO-AAV と HC というそれぞれ 2 群間の比較を行い、発現変動の方向性を比較した (図 1)。

	MPO up	MPO ns	MPO down
SLE up	159	326	28
SLE ns	233	130	233
SLE down	14	152	37

図 1 SLE および MPO-AAV 群における IFN 関連遺伝子群の発現変化。それぞれのセルは、SLE と健常対照群、MPO と健常対照群との比較により、有意な上昇(up)、低下(down)が見られた、あるいは有意差が見られなかった(ns) IFN 関連遺伝子数を示す。

図 1 に示したように、同様に type I IFN 関連遺伝子の増加が認められる SLE と

MPO-AAV においても、個々の遺伝子に注目すると、逆方向の発現変化が見られるもの、一方のみで発現変化が見られるものが多数存在することが明らかになり、これらの遺伝子が、それぞれの疾患における病態上の差の決定に寄与している可能性が示唆された。

過去の AAV のトランスクリプトーム解析で、type I IFN signature が明確に示された研究は見られない。そこで、本研究における知見を確認するため、解析したプローブの中から GO term に "type I IFN" が含まれている遺伝子を抽出して type I IFN 関連遺伝子リストとし、本研究により得られた発現データを用いて、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) により検討したところ、有意な関連が確認された ($P=0.007$) (図 2)。

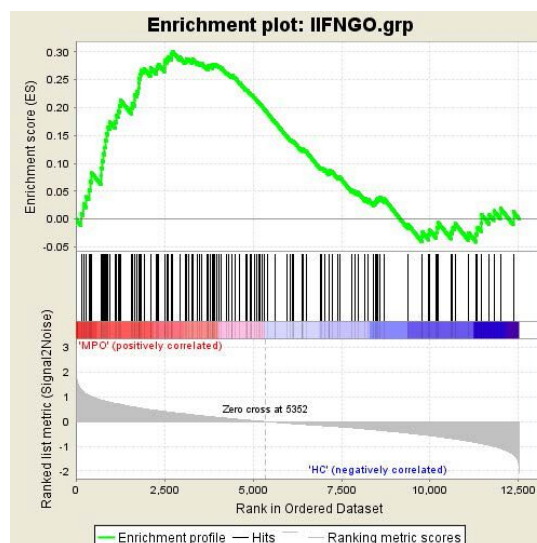


図 2 MPO-AAV における type I IFN 関連遺伝子群の Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)。 $P=0.007$ で有意な enrichment が検出された。

これまでの AAV のトランスクリプトーム研究の多くは、PR3-AAV が大部分を占めるヨーロッパ系集団を対象としたものであることから、今回の研究で type I IFN 経路の寄与が検出されたことは、MPO-AAV が大部分を占める日本の AAV では、あるいは、そのような臨床病型の違いをもたらす日本人集団の遺伝的背景においては、type I IFN 経路が病態形成上重要である可能性を示唆するものと考えられる。

(2) 疾患感受性遺伝子多型とトランスクリプトームの関連を検討するためのモデルとして、当研究グループの少数例の先行研究において MPO-AAV との関連が検出された

HLA-DRB1*09:01 と、欧米において GPA, PR3-AAV との関連が報告されている HLA-DPB1*04:01 との関連を検討した。MPO-AAV において、先行研究において報告した DRB1*09:01 と疾患感受性との関連が確認される ($P=3.0 \times 10^{-4}$, オッズ比 1.67) とともに、DRB1*13:02 が抵抗性であることが見出された ($P=3.3 \times 10^{-3}$, オッズ比 0.49)。DPB1*04:01 は MPO-AAV 群において有意な抵抗性を示したが、これは DRB1*13:02 との連鎖不平衡による二次的な関連であった。

そこで、MPO-AAV における HLA-class II 領域の遺伝子発現を検討したところ、DRA, DRB1, DQB1, DPA1, DPB1 のいずれにおいても、健常対照群と比較して、mRNA 発現レベルが有意に低下していることが見出された。このことから、MPO-AAV における HLA-class II 領域と疾患感受性との関連の分子機構の一つの仮説として、リスクハプロタイプである DRB1*09:01-DQB1*03:03 が HLA-class II 遺伝子群の低発現に関連する可能性が示唆された。

以上を総括すると、

日本人活動性 SLE、AAV、健常対照群のトランスクリプトームは、3 群のクラスターに例外なく分類された。

MPO-AAV における発現変動遺伝子において、国内外を通じて初めて、type I IFN 関連遺伝子群の有意な集積が検出された。

SLE、MPO-AAV いずれの発現変動遺伝子においても、type I IFN 関連遺伝子の増加が検出されたが、一部の遺伝子では、発現変化の方向性（上昇、低下）が両群において逆方向であり、両疾患の病態の違いに関連する可能性が示唆された。

日本人 MPO-AAV における疾患感受性遺伝子領域である HLA-class II 遺伝子群において、MPO-AAV 群における発現低下が検出された。

挑戦的萌芽研究である本研究により得られたトランスクリプトーム解析のデータにより、上記を含め、多くの検証可能な仮説が生成された。今後、発現解析結果の多数検体における確認を行うとともに、それぞれの仮説の検証、さらには、type I IFN 関連遺伝子群に限らず、遺伝子発現変化が検出された遺伝子群において、その原因となる可能性のある遺伝子多型の解析等を、複数の新規研究課題として進めていく計画である。

5. 主な発表論文等

(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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Tsuchiya N, Hasebe N, Hidaka M, Sada K-e, Kobayashi S, Yamada H, Furukawa H, Yamagata K, Sumida T, Miyasaka N, Tohma S, Ozaki S, Matsuo S, Hashimoto H, Makino H, Arimura Y, Harigai M, Kawasaki A. Genetic background of ANCA-associated vasculitis in the Japanese population (英語シンポジウム指定演者). 第 59 回日本リウマチ学会、2015 年 4 月 23 日-25 日、名古屋。

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/publiccmd/GE/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 尚之 (TSUCHIYA, Naoyuki)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60231437

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

古川 宏 (FURUKAWA, Hiroshi)

国立病院機構相模原病院・臨床研究センター・室長

研究者番号：00372293

大橋 順 (OHASHI, Jun)

東京大学・理学系研究科・准教授

研究者番号：80301141

(4) 研究協力者

川崎 綾 (KAWASAKI, Aya)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30532816

八谷 有紀(HACHIYA, Yuki)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・大学
院生