

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04805

研究課題名(和文)高精度日本人ゲノム参照パネルに基づいた日本人炎症性腸疾患感受性遺伝子の高密度解析

研究課題名(英文) Genome-wide association study of inflammatory bowel disease using population optimized array and reference panel in Japanese

研究代表者

角田 洋一 (Kakuta, Yoichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50509205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：高精度の東北人ゲノムリファレンスパネルと、それを活用できるカスタムジェノタイプングアレイを用いて、日本人炎症性腸疾患、特にクローン病の高密度疾患感受性多型解析を行った。その結果、クローン病では13領域が $P < 1e-6$ の候補領域として同定された。TNFSF5, MHC, ZNF365, 4p14が有意レベル($P < 5e-8$)の相関を認めた。これら13領域のうち8領域は既知の領域あるいは、その近傍であり、5領域が新規の候補領域である。新規領域のトップヒットはRAP1A遺伝子にあり、RAP1A遺伝子が日本人クローン病の新規感受性遺伝子である可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Several GWASs revealed more than 200 susceptibility loci for IBD. We built a 1KJPN panel containing genomic variations obtained by whole-genome resequencing of 1070 Japanese individuals, and developed the Japonica Array optimized for genotyping and imputing the Japanese population. To clarify the Japanese-specific genetic background of Crohn's disease (CD), we performed GWAS using a population-optimized SNP array and imputation. Genotyping data of 7,934,670 SNPs from 737 Japanese CD patients and 2188 controls were analyzed. SNPs located in three known loci, TNFSF15, MHC, and ZNF365, 4p14 showed significant associations with CD. Locus rs488200, located on an intron of RAP1A, was the top hit of novel candidate loci ($p = 8.85E-8$, $OR = 1.43$). A previous report indicated that the underexpression of the RAP1A gene increases the risk of CD because Rap1 regulates T-cell circulation, thereby preventing the onset of colitis in a mouse model. RAP1A is a novel candidate susceptibility gene for CD.

研究分野：消化器内科学

キーワード：炎症性腸疾患 クローン病 疾患感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

クローン病 (CD) と潰瘍性大腸炎 (UC) からなる炎症性腸疾患 (IBD) は、遺伝要因と環境要因の影響下に発症する多因子疾患で、若年者を中心に QOL を著しく害する難病である。その遺伝背景は欧米人を対象としたゲノムワイド相関解析 (GWAS) で感受性多型が多数報告され IBD は多くの要因からなる不均一な疾患であることが分かった。一方で CD と UC は共通の遺伝背景を共有しており、CD・UC という疾患カテゴリにとらわれず、患者ごとの遺伝背景を明らかにすることが、正確な病態の把握、個別化医療につながることも示唆している。しかし、これまでの感受性遺伝子解析には (A) アレイによる GWAS の限界 (B) 人種差の問題があり、特に日本人 IBD では解析は不十分である。2013 年東北メディカル・メガバンク機構が 1000 人を超える東北人全ゲノムリシーケンシングにより、既知の 1300 万多型に加えて新規に 1500 万もの多型を確認した。日本人の集団の全ゲノムリシーケンシングは初めてであり、1500 万多型の多くは日本人固有の多型である可能性がある。日本人炎症性腸疾患感受性遺伝子は日本人の多型地図に基づいて解析する必要がある。これまでの日本人 IBD を対象とした GWAS は日本人固有の多型はカバーできていない。日本人での GWAS、高密度解析用アレイの開発には高精度な日本人多型地図が必須であり、今回それが確定したことで、本格的な日本人の疾患感受性遺伝子解析が可能になった。

2. 研究の目的

高精度の東北人ゲノムリファレンスパネルと、それを活用できるカスタムジェノタイピングアレイを用いて、日本人炎症性腸疾患、特にクローン病の高密度疾患感受性多型解析を行い、日本人 IBD の遺伝因子解析を大きく前進させ、IBD の未知の病因を日本から発信する。

3. 研究の方法

(1) 解析対象

遺伝子解析を含む研究に同意を文書で取得した以下の症例を対象とする。東北大学病院消化器内科を受診した炎症性腸疾患患者 1000 名 (UC500 例、CD500 例) 疾患対照群は、東北大学東北メディカルメガバンク機構が収集した東北在住の健常人ボランティア 1000 例。

(2) 臨床情報の収集

登録された患者については、以下の臨床表現型データを収集・更新する

- 診断時年齢
- パリ分類に基づく疾患の情報 (病型・罹患範囲など)
- 腸管外合併症の有無とその内容
- 治療歴 (薬剤ごとの開始日および転帰)

薬剤の有害事象歴

再燃・寛解歴

骨密度

(3) ゲノムワイド SNP タイピングを行う。使用する array は Affymetrix Axiom® myDesign™ Human Genotyping Arrays を用いた、東北大学東北メディカルメガバンクが設計した日本人用カスタムアレイ (Japonica Array V1) で、読み取りおよび解析は Affymetrix 社 GeneChip Scanner 3000 7G で、Affymetrix 社のマニュアルに従って行う。

(4) ジェノタイピングデータの Quality Control として、ハーディワインバーク平衡、ジェノタイピング失敗率などをもとに SNP およびサンプルの精査を行う。

(5) カスタムアレイに搭載されるプローブは約 67 万多型であるが、東北大学東北メディカルメガバンクが解析した 1000 人東北人ゲノムリファレンスパネルデータのハプロタイプデータを基に Genomic Imputing 法で約 1000 万多型のデータを予測する。

(6) Imputing によって作成された日本人炎症性腸疾患 700 例のデータおよび、東北メディカルメガバンク東北人ゲノムリファレンスパネルデータ 1000 例でのゲノムワイド相関解析を行う。解析には PLINK ソフトウェアを使用し、Population Stratification のため上位 4 主成分を共変数とした、ロジスティック回帰分析を行う。

(7) 疾患の有無を表現型とした一般的なゲノムワイド解析のほか、相関が認められた多型については臨床表現型との相関を確認する。

(8) 相関が認められた多型は、別サンプルセットでの相関を確認する。

4. 研究成果

クローン病患者 737 人、健常人コントロール 2188 人について、日本人用の SNP ジェノタイピングカスタムアレイである Japonica Array を使用し、約 67 万多型の Genotyping を行った。日本人リファレンスパネルデータ (1 KJPN) を使用して約 986 万多型を impute し、それらを用いたゲノムワイド相関解析を開始した。この結果、クローン病では 13 領域が $P < 1e-6$ の候補領域として同定された。(図 1、表 1)

図 1 マンハッタンプロット

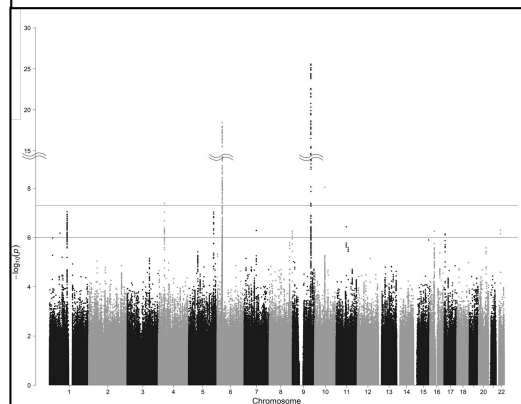
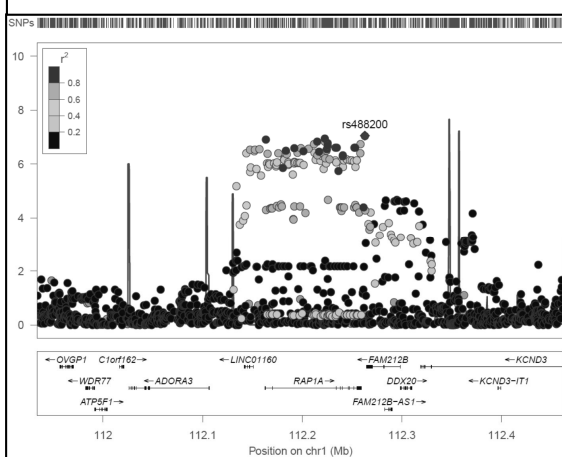


表 1 相関を示した領域

Chr	Genes	dbSNP	GWAS			
			MAF		P	OR
			Ctrl	CD		
9	TNFSF15, TNFSF8	rs78898421	47.0%	63.1%	2.59E-26	2.10
6	HLA-DQB1	rs184950714	15.6%	27.7%	3.56E-19	2.05
10	ZNF365	rs224136	29.7%	21.9%	9.04E-09	0.63
4		rs73243351	20.3%	27.7%	4.04E-08	1.53
1	RAP1A, FAM212B	rs488200	44.5%	50.9%	8.85E-08	1.43
5	IL12B	rs56167332	38.1%	46.0%	9.24E-08	1.43
11	SYVN1, CAPN1	rs11227126	5.6%	9.4%	3.65E-07	1.88
22	TTC28	rs145542314	0.2%	1.1%	4.99E-07	9.69
7	GSAP, FGL2	rs4727354	4.1%	7.1%	5.17E-07	1.99
8	ZNF517, RPL8	rs142559664	1.1%	2.8%	5.45E-07	3.16
16	IL27	rs56354901	12.2%	16.6%	5.61E-07	1.59
1	IL23R	rs76418789	7.7%	3.6%	6.59E-07	0.43
17	DLG4, ACADVL	rs2521985	39.3%	32.0%	7.23E-07	0.70

このうち最も強い相関が認められた領域は TNFSF15 遺伝子を含む領域で、最も有意な相関を認めたのは rs78898421 ($p=2.59E-26$, OR = 2.10)であった。ほか、HLA-DQB1(rs184950714, $P=3.56E-19$, OR=2.05), ZNF365, 4p14 が有意レベル ($P<5e-8$) の相関を認めた。これら 13 領域のうち 8 領域は既知の領域あるいは、その近傍であり、5 領域が新規の候補領域である。5 つの新規領域について、別の検体としてクローン病 28 例、健常人 25 例の DNA を用いて Replication Study を行ったところ、RAP1A 遺伝子の下流に存在する rs488200 が有意な相関を示した ($p=1.98E-8$, OR 1.39)。

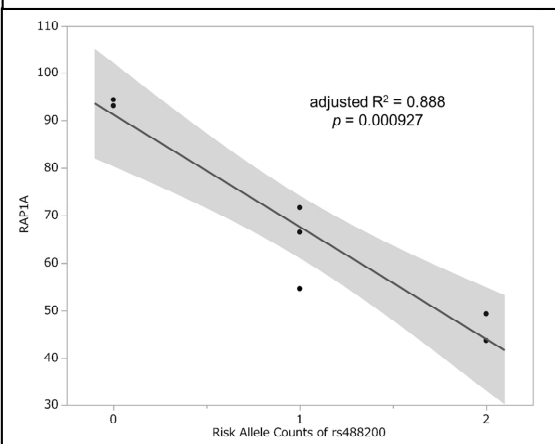
図 2 rs488200 近傍の相関



クローン病患者の外科手術標本における腸管粘膜において rs488200 の遺伝子型毎の RAP1A の発現を比較したところ、クローン病リスクアリルと RAP1A の発現低下に相関があった ($p=0.000927$)。

RAP1A はリンパ球の腸管へのホーミングにかかわる蛋白であり、Rap1 のノックアウトマウスで腸炎が確認されており、今回の結果と矛盾しない。以上から、RAP1A が日本人クローン病の新規疾患感受性遺伝子として同定された。

図 3 RAP1A の Genotype 別発現量



5. 主な発表論文等

(研究代表者、究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(4件)

Chiba H, Kakuta Y, Kinouchi Y, Kawai Y, Watanabe K, Nagao M, Naito T, Onodera M, Moroi R, Kuroha M, Kanazawa Y, Kimura T, Shiga H, Endo K, Negoro K, Nagasaki M, Unno M, Shimosegawa T. Allele-specific DNA methylation of disease susceptibility genes in Japanese patients with inflammatory bowel disease. PLoS One. 2018 Mar 16;13(3):e0194036. 査読あり
doi: 10.1371/journal.pone.0194036

Naito T, Yokoyama N, Kakuta Y, Ueno K, Kawai Y, Onodera M, Moroi R, Kuroha M, Kanazawa Y, Kimura T, Shiga H, Endo K, Nagasaki M, Masamune A, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Clinical and genetic risk factors for decreased bone mineral density in Japanese patients with inflammatory bowel disease. J Gastroenterol Hepatol. 2018 Mar 30. 査読あり
doi: 10.1111/jgh.14149.

Kakuta Y, Kmura T, Negoro K, Kuroha M, Shiga H, Endo K, Kinouchi Y, Shimosegawa T. Increased expression of IL12B mRNA transcribed from the risk haplotype for Crohn's disease is a risk factor for disease relapse in Japanese patients. J Gastroenterol. 2017 Dec;52(12):1230-1239 査読あり

Liu TC, Nait T, Liu Z, VanDussen KL, Haritunians T, Li D, Endo K, Kawai Y, Nagasaki M, Kinouchi Y, McGovern DP, Shimosegawa T, Kakuta Y, Stappenbeck TS. LRRK2 but not ATG16L1 is associated with Paneth cell defect in Japanese Crohn's disease patients. JCI Insight. 2017 Mar 23;2(6):e91917 査読あり

〔学会発表〕

(計7件)

臨床医が知っておくべき遺伝子異常のレクチャー「個人ゲノム情報から考えるIBD診療の将来像」角田洋一、木内喜孝、下瀬川徹、第8回日本炎症性腸疾患学会学術集会(2017/12/1) 東京、口演

Kakuta Y, Kawai Y, Naito T, Hirano A, Umeno J, Hiramoto K, Kuroha M, Kanazawa Y, Kimura T, Endo K, Kinouchi Y, Esaki M, Nagasaki M, Shimosegawa T, Population-optimized SNP array reveals RAP1A as a novel candidate susceptibility gene for Crohn's disease in Japanese individuals, Digestive Disease Week 2017 May, シカゴ(米国) 口演

Naito T, Liu TC, Kakuta Y, Head R, Liu Z, Haritunians T, Li D, Endo K, Kinouchi Y, McGovern D, Stappenbeck Tm Shimosegawa T, Paneth Cell Phenotype Is Associated with Novel Genetic Determinants and Clinical Outcome in Japanese Crohn's Disease Patients, The 5th annual meeting of AOCC, 2017 June, ソウル(韓国) ポスター

Yokoyama N, Kakuta Y, Hiramoto K, Kuroha M, Kimura T, Kanazawa Y, Endo K, Kinouchi Y, Shimosegawa T, Genetic Risk Factors of Low Bone Mineral Density in Japanese Patients with IBD, The 5th annual meeting of AOCC, 2017 June, ソウル(韓国) ポスター

Yokoyama N, Kakuta Y, Kuroha M, Kimura T, Kanazawa Y, Endo K, Kinouchi Y, Shimosegawa T, ROR Alpha Gene may be Associated with Bone Mineral Density in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease, The 4th annual meeting of AOCC, 2016 July, 京都、ポスター

Naito T, Liu TC, Kakuta Y, Head R, Liu Z, Haritunians T, Li D, Endo K, Kinouchi Y, McGovern D, Stappenbeck Tm Shimosegawa T, Paneth Cell Phenotype is Associated With Novel Genetic Determinants and Clinical Outcome in Japanese Crohn's Disease Patients, Digestive Disease Week

2016 May, サンディエゴ(米国) 口演

角田洋一、木内喜孝、内藤健夫、黒羽正剛、木村智哉、遠藤克哉、下瀬川徹。人種最適化ジェノタイプングアレイによるゲノム解析から見えた日本人炎症性腸疾患の病因・病態にかかわる新たな Disease Pathway, G-PLUS, 2015.12 東京、口演

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田 洋一 (KAKUTA, Yoichi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50509205

(2) 研究分担者

木内 喜孝 (KINOUCHI, Yositaka)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・

教授

研究者番号：20250780

黒羽 正剛 (KUROHA, Masatake)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70709469