

令和元年6月21日現在

機関番号：32620
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K10177
 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3段)

研究課題名(英文) Identification of alopecia areata gene by GWAS (3rd stage)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：4 MbのHLA-C領域のリスクと非リスクハプロタイプを次世代シーケンサーで解析し、5つのリスクハプロタイプの中に共通する唯一のnon-synonymous single nucleotide variant (NSSNV)を同定した。ゲノム編集技術により、このvariantのマウスカウンターパートをマウスに導入したところ、約55%のマウスが生後8カ月で円形脱毛症(AA)に類似する脱毛巣を生じた。また本variantが検出された遺伝子のノックアウトマウスを作成したところ、water avoidance stress testにより、27%のマウスにおいてAA類似の脱毛巣が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これら研究により、1)多因子性疾患の遺伝子解析にマイクロサテライトマーカー法が有用であること、2)本遺伝子とそのSNSNVによりAAの18%が惹起されることが判明したこと、3)本variantを有する患者群の解析によりAAのサブタイプが判明すること、4)そのタイプ特異的治療法の開発が可能となること、5)そのタイプ以外のAAサブタイプを同定し、更なる遺伝子同定に寄与し得る点、が有意義と思われる。

研究成果の概要(英文)：By next-generation sequencing of 4 Mb interval at HLA-C locus on risk and non-risk haplotypes of alopecia areata (AA), we have identified only one non-synonymous single nucleotide variant (NSSNV) which is common among 5 risk haplotype. Then we have generated genome-edited mice by Crisper Cas9 system which is carrying mouse counterpart of this SNSNV. Surprisingly, 55% mice showed AA like patchy alopecia. Next we have generated knock-out mouse by Cre/lox p system of the gene, in which this SNSNV was identified. By water avoidance stress test, 27% of the knock-out mice showed AA like lesions.

研究分野：分子遺伝学、皮膚科学

キーワード：円形脱毛症 遺伝子解析 マイクロサテライトマーカー 次世代シーケンサー 遺伝子同定 ゲノム編集 ノックアウトマウス マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

円形脱毛症(AA)は若い女性に好発し、特に多発性ないし汎発性 AA 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ある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。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

本研究では、HLA-C 近傍に位置する AA の遺伝子を同定する。また HLA 領域以外の領域についても、再度相関解析を行い、疾患感受性遺伝子の存在の有無につき、統計解析を行う。

3. 研究の方法

- a)マイクロサテライトマーカーを用いて、同定された HLA 領域の解析を行う。
- b)次世代シーケンサーを用いて risk 並びに非 risk haplotype のシーケンスを行う。
- c)CRISPR/Cas9 system を用いてヒトで同定された variant をマウスに導入し、観察を行う。

4. 研究成果

a)pooled DNA を用いたゲノムワイドな相関解析

我々は第 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。またその解析により、約 28 のハプロタイプが同定され、その内のどのハプロタイプに疾患感受性遺伝子が乗っているか、判明した。

b)次世代シーケンサーを用いた risk haplotype 4.97Mb 領域の全塩基情報解読

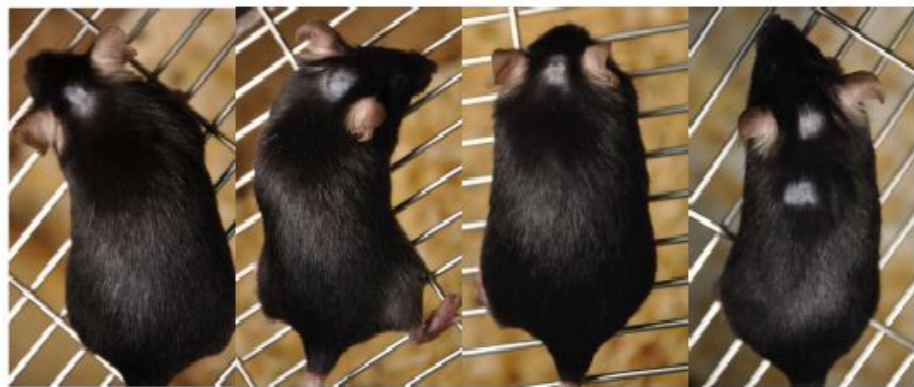
平成 25 に採択された研究(ゲノム解析による円形脱毛症疾患感受性遺伝子同定の試み(第 2 段))により、非 risk haplotype 5 例と risk haplotype 7 例における HLA-C 領域 4.97Mb (OR:3.25 を示した D6S2811 と連鎖不平衡の範囲)を、次世代シーケンサーを用いて全塩基情報を解析した。その結果、16 のコーディング領域の variant が同定され、そのうち risk haplotype のみに共通した non-synonymous single nucleotide variant (NSSNV, コーディング領域のアミノ酸置換を伴う多型)が 1 つだけ同定された。この variant は、Coiled-Coil Alpha-Helical Rod Protein 1 (CCHCR1)のロッ

ドメインに存在しており、この変異は産物の種を越えて保存されているロッド領域の構造を大きく変化させる変異であった。

c)ゲノム編集マウスの作成

平成 28 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(第 3 段))により、CRISPR/Cas9 system を用いて本 NSSNV のマウス版 variant をマウスに導入したところ、AA 類似の phenotype が観察された(論文投稿中)。おどろいたことに、下記にしめず脱毛症状の出現消退や、他部位への拡大など、ヒト円形脱毛症患者においてみられる脱毛巣に極めて類似した変動が見られた。現在本マウスの皮膚遺伝子発現と本 variant を有するヒト患者の毛包の遺伝子発現につき、解析を行っている。

Mutant.114
(TGG/TGG)



Mutant.123
(TGG/TGG)



2016/08/19

2016/08/23

2016/08/30

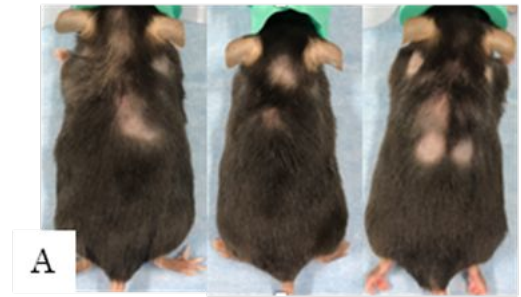
2016/09/06

d)本遺伝子ノックアウト (KO) マウス作成

同じく平成28に採択された研究において、常法通り本遺伝子の全身ならびに毛包表皮特異的KO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。予想した如く、全身KOは胎生致死ではなく、また全身ならびに毛包表皮特異的KOマウスともに胎生期ならびに第一期毛成長は正常であった。そこでwater avoidance stress testにより本マウスに負荷をかけたところ、AA類似のphenotypeが見られた(論文作成中)。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

Fig.5. (A) Recovery from localized hair loss in eighteen weeks after WAS test, but prognosis was variable and repeated. (B) Thinner and white hair were observed under dermoscopy examination.



5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

S. Ikeda, A. Takagi, E. Komiyama, N. Yoshihara, T. Mabuchi, A. Otomo, M. Ohtsuka, A. Oka: MHC risk haplotype sequencing and allele-specific genome editing by CRISPR/Cas9 system reveal *cchr1* as susceptibility gene for alopecia areata. 11th World Congress for Hair Research, Sitges, Barcelona, Spain, April 24-27, 2019

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 変異型蛋白質、及び該変異型蛋白質を発現し円形脱毛を発症する遺伝子改変マウス

発明者: 池田志孝、岡 晃

権利者: 池田志孝、岡 晃

種類:

番号: 2017-182249

出願年: 2017

国内外の別: 日本、米国、中国

○取得状況(計1件)

名称: 変異型蛋白質、及び該変異型蛋白質を発現し円形脱毛を発症する遺伝子改変マウス

発明者: 池田志孝、岡 晃

権利者: 池田志孝、岡 晃

種類:

番号: 2017-182249

出願年: 2017

国内外の別: 日本、米国、中国

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab0/hihu/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 岡 晃

ローマ字氏名: OKA, Akira

所属研究機関名: 東海大学

部局名: 総合医学研究所

職名: 講師

研究者番号(8桁): 80384866

(2)研究協力者:

研究協力者氏名:

ローマ字氏名: