

令和元年5月29日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09886

研究課題名(和文) 網羅的発現解析を応用した膠原病の疾患関連パスウェイおよびlncRNAの探索

研究課題名(英文) Exploration of disease associated pathway and lncRNA in connective tissue diseases by a comprehensive expression analysis

研究代表者

川崎 綾 (Kawasaki, Aya)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30532816

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)：ANCA関連血管炎(AAV)や全身性エリテマトーデス(SLE)の発症には多数の遺伝要因が寄与するが、その大部分は未解明である。本研究では、新規のAAV、SLE疾患感受性遺伝子の同定を目的とし、特に遺伝子の発現を変化させうる一塩基バリエーション(SNV)に着目して解析を行った。網羅的発現解析では、インターフェロンパスウェイやlong non-coding RNA (lncRNA)がAAV、SLEと関連することが見出された。さらにlncRNAの発現関連SNVの関連解析により、lncRNAであるATP6V0E2-AS1がAAVの疾患感受性に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疾患であるANCA関連血管炎(AAV)は、罹患率の低さから他の膠原病と比較しても疾患発症に寄与する遺伝要因の解明は遅れている。本研究で見出されたlong non-coding RNAであるATP6V0E2-AS1は、AAVにおいて発現が減少しており、さらに転写調節領域に位置するバリエーションがAAVの疾患感受性と関連することから、疾患発症や病態形成に寄与する可能性が高く、ATP6V0E2-AS1をターゲットとした治療薬の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It is likely that multiple genetic factors contribute to the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis (AAV) and systemic lupus erythematosus (SLE). However, actual genetic variants that play a role in the pathogenesis have not fully determined. In this study, we tried to find new susceptibility genes by focusing on single nucleotide variant (SNV) which may potentially affect gene expression. Initially, we searched for disease-associated pathway genes and long non-coding RNA (lncRNA) by a comprehensive expression analysis. This analysis suggested that interferon pathway and lncRNA are substantially involved in the pathogenesis of AAV and SLE. Subsequent association study targeted to SNVs of the differentially expressed lncRNAs in the diseases identified ATP6V0E2-AS1 as a potential susceptibility gene to AAV.

研究分野：ゲノム医科学、膠原病学

キーワード：ANCA関連血管炎 long non-coding RNA 疾患感受性遺伝子

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

1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)や抗好中球細胞質抗体(ANCA)関連血管炎(AAV)をはじめとする膠原病の発症には多数の遺伝要因が寄与している。これまでに、複数のグループからゲノムワイド関連研究(GWAS)が報告されてきたが、まだ未同定の疾患感受性遺伝子が多く残されている。特に AAV に関しては、アジア系集団からの GWAS の報告はなく、確立した疾患感受性遺伝子は *HLA*, *SERPINA1*, *PRTN3* のみである。

GWAS により見出される疾患関連バリエーションの多くが非コード領域に存在し、遺伝子発現と関連することが報告されていることから、遺伝子発現と関連する一塩基バリエーション(eQTL SNV)が疾患感受性バリエーションの候補になると考えた。研究開始時点ですでに取得していた SLE、AAV、健常者の末梢血のマイクロアレイ発現データを用いて、疾患と関連するパスウェイ遺伝子やタンパク質に翻訳されない long non-coding RNA (lncRNA) を同定し、それらのパスウェイや lncRNA をターゲットとした eQTL SNV の疾患関連解析を施行することとした。

2. 研究の目的

(1) インターフェロンパスウェイ

SLE の病態にはインターフェロン(IFN)パスウェイが寄与することが知られており、SLE の末梢血において IFN signature (IFN 関連遺伝子の発現増加)が観察される。さらに IFN パスウェイ遺伝子は SLE の疾患感受性とも関連しており、われわれも、*IRF5*, *STAT4*, *TLR7*, *IRF2* 遺伝子が日本人 SLE と関連することを見出し報告してきた(Kawasaki et al., 2008, Kawasaki et al., 2008, Kawasaki et al., 2011, Kawasaki et al., 2014)。本研究では、日本人 SLE における IFN signature を確認するとともに、IFN パスウェイが AAV の病態とも関連するか否かを検討する。

(2) long non-coding RNA

近年、タンパク質に翻訳されず RNA として機能する non-coding RNA が多数存在することが明らかになってきた。200 塩基以上のものは lncRNA に分類され、生体内において重要な役割を担っている。SLE において、lncRNA の 1 つである NEAT1 の発現増加が報告されているものの、膠原病と lncRNA の関連については、十分な解析は行われていない。本研究では、lncRNA 発現と SLE、AAV の関連を網羅的に解析するとともに、発現解析により発現変動が認められた lncRNA に着目して、lncRNA の発現と関連する eQTL SNV と SLE、AAV の疾患感受性との関連を解析する。

(3) ETS1

ETS proto-oncogene 1, transcription factor (ETS1)は免疫系において重要な役割をもつ転写因子である。B 細胞においては、形質細胞への分化を抑制的に制御している。また *ETS1* は SLE の疾患感受性遺伝子の 1 つとして知られている。膠原病に共通の疾患感受性遺伝子が数多く見出されていることから、*ETS1* が AAV と関連する可能性が考えられる。本研究では、発現解析により *ETS1* 発現と疾患の関連を解析するとともに、*ETS1* 遺伝子の SNV と AAV の関連について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ発現解析

AAV 8 例 (顕微鏡的多発血管炎[MPA] 6 例、多発血管炎性肉芽腫症[GPA] 2 例)、SLE 8 例、健常者 14 例の全血から PAXgene キットを用いて total RNA を抽出し、Agilent SurePrint G3 Human GE microarray により発現データを取得した。

(2) IFN パスウェイ解析

(1)のデータから、IFN signature gene (392 プローブ) (Ramos et al., 2011)を抽出し、クラスター解析を行った。さらに Welch の t 検定により MPA、SLE、健常者間での発現量の比較を行った。

(3) long non-coding RNA

マイクロアレイ発現データを用いて統計解析(Welch の t 検定)を行い、AAV、SLE について、 $|\text{fold change}[FC]| > 2$ 、 $P_{\text{FDR}} < 0.01$ の基準を満たす発現変動 lncRNA を抽出した。これらの lncRNA の発現と関連する eQTL SNV および lncRNA の転写調節領域に位置する SNV に着目し、各疾患 96 個の SNV を選択した。選択した 96 SNV について、AAV 453 例、SLE 382 例を対象として関連解析を施行した。対照群には、東北メディカル・メガバンク機構に登録されている 3554 例のアリルデータを用いた (Nagasaki et al., 2015)。SNV の遺伝型タイピングには DigiTag2 法を用いた。統計解析により $P_{\text{FDR}} < 0.2$ の関連を示した SNV について、AAV 73 例、健常者 851 例のサンプルを用いて replication study を行った。遺伝型タイピングは TaqMan 法により行った。

(4) ETS1

ETS1 の 3' 非翻訳領域(UTR)に位置し SLE との関連が報告されている SNV rs1128334 について、AAV 466 例、健常者 1099 例を対象とした疾患関連研究を施行した。遺伝型タイピングは TaqMan

法により行った。さらに、マイクロアレイ発現データを用いて AAV と健常者間で *ETS1* 遺伝子発現の比較を行った。

4. 研究成果

(1) IFN パスウェイ解析

クラスター解析では、MPA、SLE、健常者間で、IFN signature gene の発現パターンの相違が認められた。SLE 群では 159 プローブ(40.6%)で発現増加($FC \geq 1.5$, $P_{FDR} < 0.05$)が認められ、日本人 SLE においても IFN signature が確認された。MPA では 68 プローブ(17.3%)で発現増加が観察された。MPA と SLE で共通するプローブは 35 個、SLE のみで増加していたプローブは 124 個、MPA のみで増加していたプローブは 30 個であった。SLE では、IFN signature 遺伝子の増加プローブ数、FC とともに、MPA よりも高かったものの、MPA でも複数の IFN 関連遺伝子の発現増加が認められ、MPA 病態に IFN パスウェイが寄与する可能性が示唆された。

(2) long non-coding RNA

AAV および SLE について、それぞれ lncRNA 発現関連 SNV を 96 個選択し関連解析を行ったところ、AAV では、4 SNV について $P_{FDR} < 0.2$ を満たす関連が検出された。これらの 4 SNV について独立のサンプルセットを用いて replication study を行ったところ、*ATP6V0E2-AS1* の近傍に存在し、転写調節領域に位置する SNV において有意な関連が検出された。*ATP6V0E2-AS1* の発現量は、MPA 群において有意に減少していた($FC = -4.4$, $P_{FDR} = 0.003$)。*ATP6V0E2-AS1* SNV 解析では、MPA ($P_{FDR} = 0.010$, オッズ比[OR] 1.36)および MPO-ANCA 陽性血管炎 ($P_{FDR} = 0.0029$, OR 1.41)において、有意な関連が認められた。一方 SLE において、96 SNV の関連解析後、 $P_{FDR} < 0.2$ を満たす SNV は検出されなかった。

(3) *ETS1*

ETS1 の 3' UTR に位置する rs1128334A は、GPA および PR3-ANCA 陽性 AAV 群で有意に増加していた(GPA: $P = 0.0060$, OR 1.54, PR3-AAV: $P = 0.0042$, OR 1.72)。rs1128334A アリルは、SLE の疾患感受性と関連し、*ETS1* の発現低下との関連も報告されている(Yang et al, 2010)。発現解析では、AAV 群において、*ETS1* 発現の低下が認められた($P = 0.0024$)。これらの知見から、*ETS1* 遺伝子が AAV と SLE に共通の疾患感受性遺伝子であることが示された。

< 引用文献 >

Kawasaki et al., Arthritis Rheum. 2008;58:826-34, Kawasaki et al., Arthritis Res Ther. 2008;10:R113, Kawasaki et al., Arthritis Res Ther. 2011;13:R41, Kawasaki et al., PLoS One. 2014;9:e109764. Ramos et al., Arthritis Rheum. 2011;63:2049-57. Nagasaki et al., Nat Commun. 2015;6:8018. Yang et al., PLoS Genet. 2010;6:e1000841.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Aya Kawasaki, Keita Yamashita, Fumio Hirano, Ken-ei Sada, Daisuke Tsukui, Yuya Kondo, Yoshitaka Kimura, Kurumi Asako, Shigeto Kobayashi, Hidehiro Yamada, Hiroshi Furukawa, Kenji Nagasaka, Takahiko Sugihara, Kunihiro Yamagata, Takayuki Sumida, Shigeto Tohma, Hajime Kono, Shoichi Ozaki, Seiichi Matsuo, Hiroshi Hashimoto, Hirofumi Makino, Yoshihiro Arimura, Masayoshi Harigai, Naoyuki Tsuchiya: Association of *ETS1* polymorphism with granulomatosis with polyangiitis and proteinase 3-anti-neutrophil cytoplasmic antibody positive vasculitis in a Japanese population. J Hum Genet. 査読有, Vol.63, No.1, 2018, pp.55-62
DOI: 10.1038/s10038-017-0362-2

[学会発表](計 6件)

Yuka Iwahashi, Aya Kawasaki et al., Detection of Association of Long Noncoding RNA *ATP6V0E2-AS1* Single Nucleotide Polymorphism with Susceptibility to Myeloperoxidase-ANCA Associated Vasculitis Based on Transcriptome Analysis. 2018 ACR/ARHP Annual Meeting, 2018/10/23, Chicago, USA.

川崎 綾 他、*ETS1* 多型と ANCA 関連血管炎の関連、日本人類遺伝学会第 62 回大会、2017/11/16、兵庫県神戸市

Aya Kawasaki et al., Association of *ETS1* Polymorphism in 3' Untranslated Region with Susceptibility to Granulomatosis with Polyangiitis and Proteinase 3-ANCA Positive Vasculitis in a Japanese Population. 2017 ACR/ARHP Annual Meeting, 2017/11/4, San Diego, USA.

川崎 綾 他、IFN signature 遺伝子発現における顕微鏡的多発血管炎と全身性エリテマトーデスの相違、第 61 回日本リウマチ学会総会・学術集会、2017/4/20、福岡県福岡市

Aya Kawasaki et al., Association of *ETS1* polymorphism in 3' untranslated region with granulomatosis with polyangiitis and PR3-ANCA-positive vasculitis in a Japanese

population. The 18th International Vasculitis and ANCA Workshop, 2017/3/27, Tokyo, Japan

Aya Kawasaki et al., Interferon signature genes are differentially expressed between microscopic polyangiitis and systemic lupus erythematosus peripheral blood transcriptomes. 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, 2016/11/14, Washington DC, USA

〔その他〕

ホームページ等

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