

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02849

研究課題名(和文) 免疫細胞におけるsplicing QTLを介した自己免疫疾患病因メカニズムの解明

研究課題名(英文) Dissecting the mechanism of autoimmune diseases using sQTL in immune cells

研究代表者

高地 雄太 (Kochi, Yuta)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：60415156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,900,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムワイド関連解析によって、これまで100を超える自己免疫疾患の候補遺伝子領域が同定されてきた。本研究では、ロングリードシーケンシング技術を用いて、29種の免疫細胞サブセットにおいてRNA-seqを行うことによって、計159,369のアイソフォーム同定を行った。これらの一部は遺伝子多型によって発現量が制御されるスプライシングQTL(sQTL)であり、関節リウマチや全身性エリテマトーデスなどの原因となっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、免疫遺伝子の多くには、選択的スプライシングによって複数のアイソフォームが存在し、その発現量は遺伝子多型によって制御されていることが明らかになった。これらのアイソフォームカタログを、公共データベースに登録予定であるが、今後、様々な多因子免疫疾患の病因解析に利用可能である。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide association studies have identified more than 100 candidate loci for autoimmune diseases. In this study, we identified a total of 159,369 isoforms by RNA-seq in 29 immune-cell subsets using long-read sequencing technology. Some of these were splicing QTLs (sQTLs) whose expression levels were regulated by gene variants, and were causal mechanisms for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.

研究分野：ゲノム医学

キーワード：自己免疫疾患 sQTL ゲノムワイド関連解析 ロングリードシーケンス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ、全身性エリテマトーデス (SLE) などの自己免疫疾患の多くは、複数の遺伝・環境因子によって発症する多因子疾患である。これまで、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) が様々な疾患で行われ、多くの疾患感受性遺伝子領域が同定されてきた。我々も、関節リウマチなどの GWAS およびそのメタ解析を行うことによって、100 を超える遺伝子領域を明らかにしている (Kochi Y et al, Nat Genet 2010, Okada et al, Nature 2014)。しかし、病因メカニズムを解明するためには、これらの候補領域において疾患の原因となっている機能性多型を同定する必要がある。重要なメカニズムとして注目されているのが、遺伝子多型が選択的スプライシングに影響を与える領域、すなわち splicing QTL (sQTL) である。sQTL では遺伝子多型が splicing を制御する配列を変化させることによって splicing に影響を与える。実際に自己免疫疾患の GWAS の候補領域の詳細な解析によって、CTLA4、IRF5、TNFR1 などの遺伝子領域が sQTL であることが明らかになっている。sQTL が重要である理由として、選択的スプライシングによってもたらされる transcript の配列の変化が、タンパク構造を大きく変える可能性があるためである。したがって、自己免疫疾患における sQTL の役割の全貌を明らかにすることによって、疾患のメカニズム解明が進むことが考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、long read sequencer を用いて、ヒト免疫細胞の各サブセットにおける isoform の網羅的なプロファイルを作成し、このプロファイルと日本人の免疫細胞サブセットの発現データを用いて精度の高い sQTL 解析を行い、ヒト免疫細胞の sQTL カタログを作成し、各種自己免疫疾患の GWAS データと統合することによって自己免疫疾患の病態解析を行うこと、を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) RNA の準備

健康人末梢血の各免疫細胞 (29 サブセット) から total RNA を 10ng 精製した。

#### (2) long-read RNA-seq

SMART-seq2 を用いて、mRNA 全長の cDNA ライブラリーを作成した。

MinION システム (Nanopore 社) を用いて cDNA の網羅的な sequencing を行った。

#### (3) Isoform プロファイルの作成

GENCODE に登録されている isoform 情報をベースに、新規の isoform を同定するした。

各 isoform の発現比率を、細胞種ごとに明らかにし、isoform のプロファイルを作成した。

#### (4) sQTL カタログの作成

各サブセットの isoform プロファイルをもとに sQTL 解析を行った。

各 SNP の genotype と各 isoform の発現量の相関を統計学的に検定することによって、

細胞種ごとの sQTL を網羅的に明らかにし、sQTL のカタログを作成した。

#### (5) GWAS 候補領域の解析

すでに解析済みの自己免疫疾患 (関節リウマチ、SLE、筋炎、シェーグレン症候群) の

GWAS データと sQTL カタログを統合することにより、各自己免疫疾患の候補遺伝子領域

における sQTL の役割を網羅的に明らかにした。

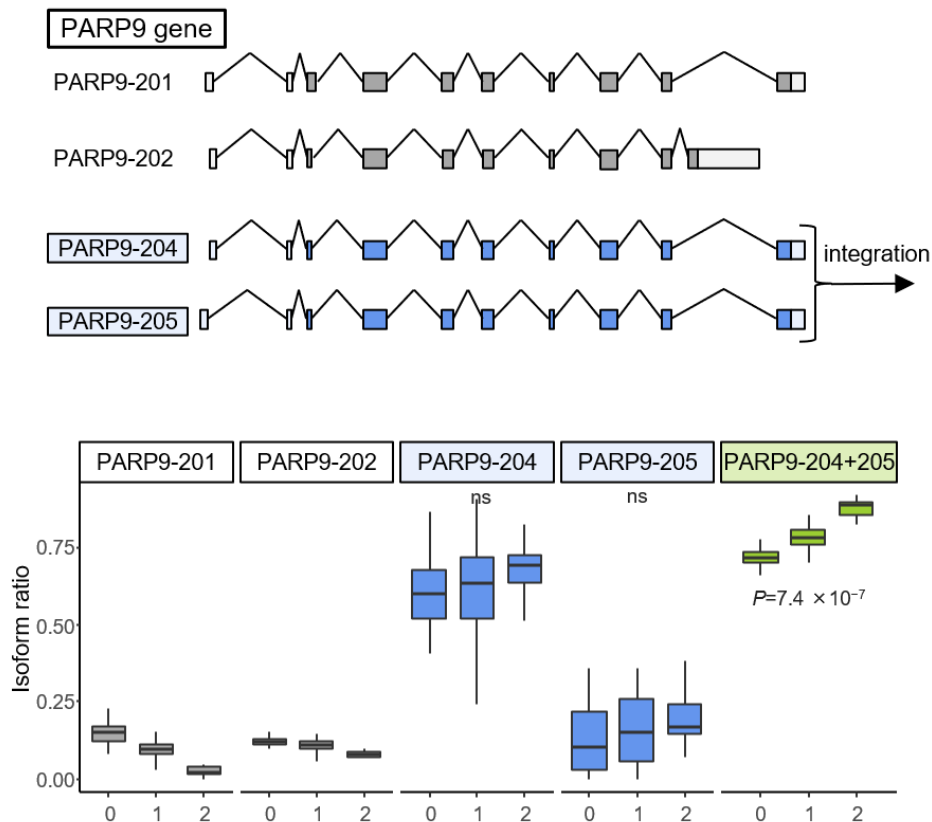
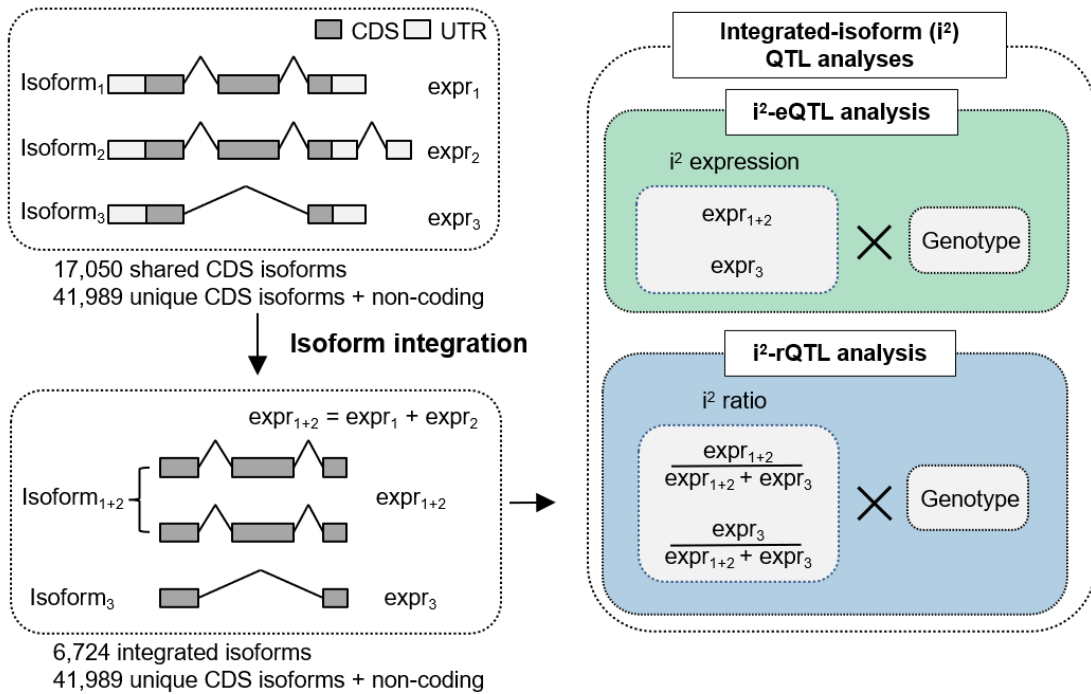
### 4. 研究成果

#### (1) 免疫細胞サブセットにおける sQTL カタログの作成

29 種の免疫細胞サブセットの long-read RNA-seq を行い、14,942 遺伝子において、計 159,369 isoform の同定を行った。細胞種特異的発現を認めた isoform は、main isoform と比較して、異なった転写開始点を利用したものや、ポリアデニル化の部位の異なったものが多かった。既存の eQTL データの再解析によって、新たに同定された isoform の一部は遺伝子多型によって発現量が制御される sQTL であり、関節リウマチや全身性エリテマトーデスの候補遺伝子領域と co-localize することから、疾患の原因となっていることが示唆された。また、一部の isoform は、他の免疫疾患 (COVID-19 の重症化など) に関わる sQTL であることも明らかになった。これらのデータを整備したうえで、公共データベースで公開予定である。

(2) タンパク質構造を変化させる sQTL の同定

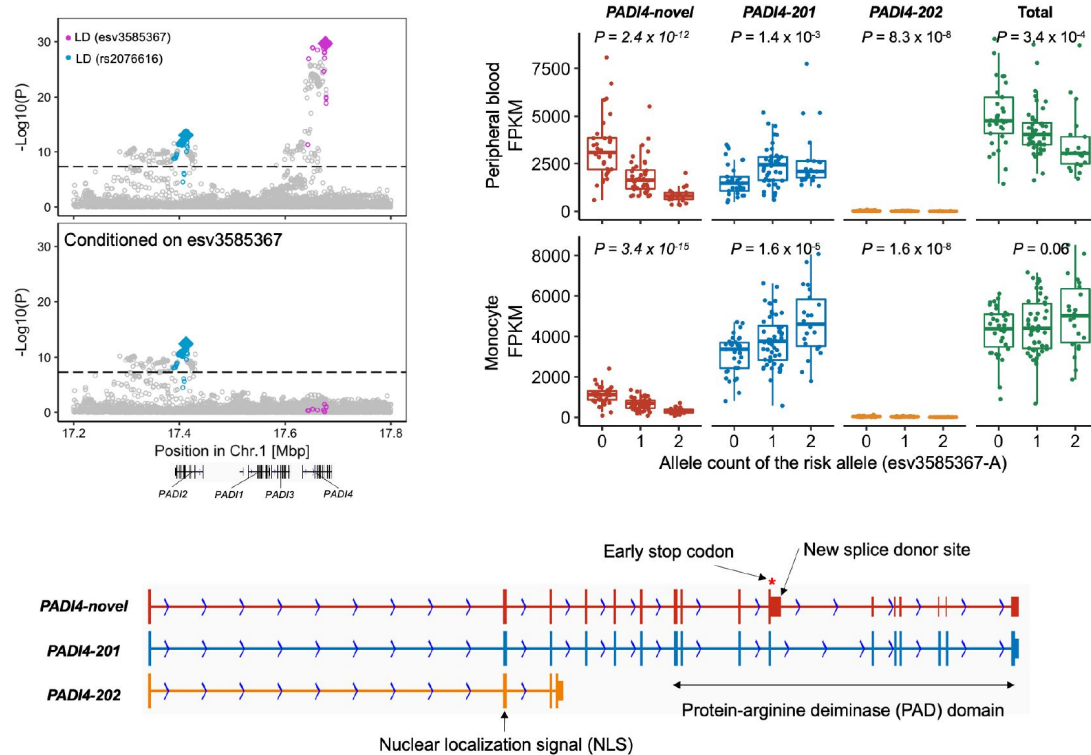
疾患と関連する sQTL のうち、特にタンパク質構造を変化させるものを解析する手法として、Integrated-isoform QTL analysis ( $I^2$ -QTL analysis) を開発した (Yamaguchi K et al, Nat Commun in press)。これは、同じ遺伝子内で共通の coding sequence (CDS) を有する isoform を集約したうえで、sQTL 解析を行う手法であり、既存の sQTL 解析と比較して、統計学的に検出力が高く、より効率的にタンパク質機能を変化させる sQTL を同定することが可能であった (下図)。この手法を用いて各免疫サブセットの sQTL データの再解析を行ったところ、各サブセットごとに 300 ~ 600 個の  $I^2$ -QTL が同定された。



### (3) 疾患と関連する sQTL の同定

既存の疾患 GWAS データと、本研究で明らかにした sQTL を統合解析することによって、自己免疫疾患の病因メカニズムを網羅的に明らかにした。

例えば、関節リウマチの関連遺伝子である PADI4 遺伝子は、これまで遺伝子発現量に影響をあたえる eQTL SNP が疾患の原因メカニズムであると考えられてきていたが、本研究において PADI4 遺伝子領域を再解析することによって、新規に同定された isoform (PADI4 novel : 下図) が疾患に関与していることが明らかになった (Ishigaki K et al, Nat Genet in press)。この isoform は、早期終止コドンを生じるため、酵素活性部位を欠くタンパク質を翻訳する可能性があり、この isoform の発現量が低下することが疾患発症に関わっていることが考えられた。



### <引用文献>

- 1) Yamaguchi K et al, Splicing QTL analysis focusing on coding sequences reveals pathogenicity of disease susceptibility loci. Nat Commun in press.
- 2) Ishigaki K et al, Trans-ancestry genome-wide association study identifies novel genetic mechanisms in rheumatoid arthritis. Nat Genet in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Takeshima Yusuke, Iwasaki Yukiko, Nakano Masahiro, Narushima Yuta, Ota Mineto, Nagafuchi Yasuo, Sumitomo Shuji, Okamura Tomohisa, Elkon Keith, Ishigaki Kazuyoshi, Suzuki Akari, Kochi Yuta, Yamamoto Kazuhiko, Fujio Keishi | 4. 巻<br>81              |
| 2. 論文標題<br>Immune cell multiomics analysis reveals contribution of oxidative phosphorylation to B-cell functions and organ damage of lupus   | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Annals of the Rheumatic Diseases   | 6. 最初と最後の頁<br>845 ~ 853 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1136/annrheumdis-2021-221464  | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Ota Mineto, Nagafuchi Yasuo, Hatano Hiroaki, Ishigaki Kazuyoshi, et al                 | 4. 巻<br>184                   |
| 2. 論文標題<br>Dynamic landscape of immune cell-specific gene regulation in immune-mediated diseases | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Cell   | 6. 最初と最後の頁<br>3006 ~ 3021.e17 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.cell.2021.03.056   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                     |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Bing Nan, Zhou Huanyu, Chen Xing, Hirose Tomohiro, Kochi Yuta, Tsuchida Yumi, Ishigaki Kazuyoshi, Sumitomo Shuji, Fujio Keishi, Zhang Baohong, Valdez Hernan, Vincent Michael S., Martin David, Clark James D.               | 4. 巻<br>73                |
| 2. 論文標題<br>Contribution of a European Prevalent Variant near <i>CD83</i> and an East Asian?Prevalent Variant near <i>IL17RB</i> to Herpes Zoster Risk in Tofacitinib Treatment: Results of Genome Wide Association Study Meta Analyses | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>Arthritis & Rheumatology   | 6. 最初と最後の頁<br>1155 ~ 1166 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/art.41655  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>該当する              |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Motegi Tomoki, Kochi Yuta, Matsuda Koichi, Kubo Michiaki, Yamamoto Kazuhiko, Momozawa Yukihide  | 4. 巻<br>78                |
| 2. 論文標題<br>Identification of rare coding variants in TYK2 protective for rheumatoid arthritis in the Japanese population and their effects on cytokine signalling | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Annals of the Rheumatic Diseases  | 6. 最初と最後の頁<br>1062 ~ 1069 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1136/annrheumdis-2019-215062   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Akizuki Shuji, Ishigaki Kazuyoshi, Kochi Yuta, Law Sze-Ming, Matsuo Keitaro, Ohmura Koichiro, Suzuki Akari, Nakayama Manabu, Iizuka Yusuke, Koseki Haruhiko, Ohara Osamu, Hirata Jun, Kamatani Yoichiro, Matsuda Fumihiko, Sumida Takayuki, Yamamoto Kazuhiko, Okada Yukinori, Mimori Tsuneyo, Terao Chikashi | 4. 巻<br>78              |
| 2. 論文標題<br>PLD4 is a genetic determinant to systemic lupus erythematosus and involved in murine autoimmune phenotypes   | 5. 発行年<br>2019年         |
| 3. 雑誌名<br>Annals of the Rheumatic Diseases  | 6. 最初と最後の頁<br>509 ~ 518 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1136/annrheumdis-2018-214116   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Yuta Kochi   |
| 2. 発表標題<br>What can we learn from eQTL studies in disease genetics?                                   |
| 3. 学会等名<br>The 4th Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山口 健介, 高地 雄太, 石垣 和慶, 太田 峰人, 竹島 雄介, 土田 優美, 土屋 遥香, 住友 秀次, 櫻井 恵一, 仲地 真一郎, 永淵 泰雄, 庄田 宏文, 藤尾 圭志, 山本 一彦 |
| 2. 発表標題<br>自己免疫疾患感受性多型のsplicing QTL effectを介したtrans-eQTL effectの網羅的評価  |
| 3. 学会等名<br>日本リウマチ学会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関                |  |  |  |
|---------|------------------------|--|--|--|
| 米国      | Harvard Medical School |  |  |  |