

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07929

研究課題名(和文)日本人の遺伝背景を考慮した免疫細胞eQTLによる炎症性腸疾患関連遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)An integrated genomic and transcriptomic analysis to reveals susceptibility genes for Crohn's disease in Japanese populations

研究代表者

木内 喜孝(Kinouchi, Yoshitaka)

東北大学・高度教養教育・学生支援機構・教授

研究者番号：20250780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：日本人炎症性腸疾患患者(20人)の腸管粘膜固有層単核球(lamina propria mononuclear cells; LPMCs)のCD4陽性Effector Memory T細胞(Tem)を採取しeQTLデータを作成し、さらに既存のeQTLデータとGWASデータを活用しtranscriptome-wide association study(TWAS)解析を行った。炎症性腸疾患患者LPMCs由来TemのeQTLデータが構築した。さらに既存のeQTLデータベースとGWASを組み合わせたTWASにより、クローン病感受性因子として全血中のTNFSF15の発現が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性腸疾患に200以上のゲノム領域に疾患感受性があることが確認されているが、相関する多型と疾患発症のメカニズムが未解明のままである。近年、eQTL解析が数多く行われ、これを活用すれば相関を示す遺伝子多型が、どの遺伝子の発現にどの程度影響しているか予測することが可能となった。本研究ではクローン病の病態に関連があると考えられる腸管粘膜固有層単核球のCD4陽性Effector Memory T細胞を採取し、eQTL解析を行い、さらに既存のeQTLデータも活用し、日本人クローン病発症にかかわる疾患感受性遺伝子の同定を行った。その結果、炎症性腸疾患の発病メカニズムを解明する有用な知見を報告した。

研究成果の概要(英文)：eQTL for the effector memory T cells (TEM) located in the lamina propria mononuclear cells (LPMCs), which play an important role in Crohn's disease (CD), are not yet available. We conducted RNA sequencing and eQTL analyses of TEM cells located in the LPMCs from IBD patients (n=20). Genome-wide association study (GWAS) was performed using genotyping data of 713 Japanese CD patients and 2,063 controls. We compared the results of GWAS and eQTL of TEM, and also performed a transcriptome-wide association study using eQTL from Genotype Tissue Expression project. By eQTL analyses of TEM, correlations of possible candidates were confirmed in 22,632 pairs and 2,463 genes. Among these candidates, 19 SNPs which showed significant correlation with tenascin-XA (TNXA) expression were significantly associated with CD in GWAS. By TWAS, TNFSF15(FDR=1.35e-13) in whole blood in lymphocytes was significantly associated with 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 潰瘍性大腸炎 eQTL 疾患感受性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症性腸疾患の遺伝背景の解析が進む一方、その多くは発病にどのように関与するのか未解明である。

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) によってこれまでに 200 以上の感受性多型が報告され、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。しかし、代表的な欧米人 IBD の感受性多型 200 か所のうち、アミノ酸置換を引き起こす多型は、よく知られている NOD2 や IL23R などを含めた 11 個 (5.5%) しかない。このように相関を示す遺伝子多型のほとんどは遺伝子をコードしていない領域に存在し、その多型がどのようにして疾患の発症に関与しているか、そのメカニズムが未解明のままである。

(2) 感受性遺伝子多型は周囲の遺伝子発現制御を介して発症に関与している可能性がある

アミノ酸置換などコードする蛋白の「質」の変化をもたらす遺伝子多型以外は、周囲の遺伝子の「量」に影響することが予想される。近年では、アレイによるゲノム・転写産物の網羅的解析手法の進歩から、様々な細胞種の遺伝子発現と SNP との関係性が eQTL 解析によりデータベース化されており、疾患感受性を示す遺伝子多型が、どの遺伝子の発現に影響しているかある程度予測可能となった。

(3) 申請者らの先行研究によって、多数の日本人固有の新規 IBD 感受性遺伝子多型が明らかにされている

欧米に比較し日本人 IBD は十分なゲノム解析が進んでいない。これは、これまでの GWAS が日本人固有の多型をカバーしていなかったためである。2014 年に高精度な日本人多型地図が確定し、それに基づいた Japonica Array が作成され Impute によって日本人固有の比較的稀な多型 (MAF>0.5%) を含む約 1000 万多型を用いた GWAS が可能となった。申請者らは、先行研究でこの手法を用い、日本人 IBD 固有の疾患感受性遺伝子多型を同定しつつある。研究の途中ではあるが感受性候補領域 ( $p < 1 \times 10^{-5}$ ) 78 領域のうち 72% は新規の領域である。これらの遺伝子多型もアミノ酸置換などの機能的な多型はほとんどなく、これらがどのような遺伝子の発現にどう影響しているかを解析することが日本人 IBD の病因の探索に必須である。

(4) eQTL は機能解析に有用だが、遺伝子の発現は条件・細胞種、遺伝的背景は人種によって異なる

しかし、疾患感受性遺伝子多型の eQTL での解析には限界がある。過去に申請者らは「日本人固有」のクローン病の感受性遺伝子である TNFSF15 遺伝子において、そのリスクアレルは非リスクアレルよりも「刺激下」において「T 細胞特異的」に転写活性が高いことをアレル特異的転写産物の測定によって証明した (Human Mol Genet, 2009)。一般的な eQTL データベースは、特定の細胞種の特定の条件下での解析で、しかもその多くは欧米人由来のものであるため、TNFSF15 のような例では予測に用いることができない。また、IBD の病変の首座である腸管の免疫担当細胞の eQTL は、欧米・日本人のいずれも存在せず、IBD 固有の条件 (腸内細菌など) を反映したデータベースは皆無である。さらに、eQTL 解析で必須である遺伝子多型のデータが欧米人用プラットフォームで解析されたものであれば、日本人固有の遺伝子多型についての情報が得られず、日本人の疾患感受性遺伝子の機能解析にはあまり有用ではない。

## 2. 研究の目的

本研究では日本人 IBD 患者の腸管の免疫細胞を採取し日本人固有の遺伝的背景を考慮した eQTL データベースを作成し、さらに日本人 CD 患者の腸管炎症部位由来の T 細胞のトランスクリプトーム解析データおよび既存のデータベースの eQTL データを活用し、日本人 CD の発病にかかわる疾患感受性遺伝子を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 解析対象

Tem のトランスクリプトーム解析については、2015 年 7 月から 2018 年 7 月の間に東北大学病院に入院した IBD 患者のうち、腸管切除を伴う外科手術を受け、遺伝子解析を含む研究に同意を文書で取得した活動期 CD18 例、活動期 UC9 例を対象とした。GWAS の対象として、先行する GWAS で解析可能であった東北大学病院もしくは九州大学病院通院中の日本人 CD 患者 713 例 (東北大 379 例、九州大 334 例)、東北在住及び九州在住の健康人コントロール 2063 例 (東北 1621 例、九州 462 例) を対象とした。いずれも診断は臨床症状、内視鏡所見、X 線写真所見、組織所見を基に UC・CD 診断基準・治療指針 (平成 27 年度改訂版) に従った。対象は全員日本人である。この研究は、厚生労働省「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」及び「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて施行され、東北大学医学部倫理委員会の承認 (現在の倫理承認番号: 2017-1-253、2019-1-161) のもと、遺伝子解析である旨を対象者に説明し文書で同意を得た上で行った。

## (2) LPMCs の分離

手術により摘出した炎症部位の小腸もしくは大腸から、Fiocchi らの方法により LPMCs を分離した。

## (3) Tem の分離と DNA・RNA の抽出

分離した炎症部位の LPMCs から、Easy Sep Magnet (STEMCELL Technology, Vancouver, Canada) で、Easy Sep Human CD4+ T cell Enrichment (STEMCELL Technology) を使用した negative selection を行い、CD4 陽性 T 細胞を分離した。さらに、分離した CD4 陽性 T 細胞を抗 CD3-FITC、CD4-PE、CD45RO-APC、CD197 (CCR7) -BV421、7ADD-Cell Viability Solution (BD Biosciences) で染色後、FACS aria II セルソーター (BD Biosciences) を使用して Tem を分離した。ソーティング効率は常に 98%以上であった。分離した Tem から AllPrep DNA/RNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用し DNA および total RNA を抽出した。

## (4) ジェノタイピング

トランスクリプトーム解析の対象症例のゲノム DNA については、ジャポニカアレイ V1 (ThermoFisher Scientific Inc, Waltham, MA) による解析を (株) 東芝 (Tokyo, Japan) に受託して行った。ジェノタイピングは Affymetrix Power Tools (ThermoFisher Scientific Inc) を用いた。アレイでタイピングされていない SNP のジェノタイプは IMPUTE2 (Version 2.3.2)(Center for Statistical Genetics, University of Michigan, USA) によって東北人ゲノムリファレンスパネル (2KJPN) を用いたインピュテーションを行った。GWAS に用いるジェノタイピングデータについては、先行研究において、ジャポニカアレイ V1 で解析、1KJPN パネルでインピュテーションされ、Quality control (QC) 済みのデータを使用した。

## (5) トランスクリプトーム解析および eQTL 解析

IBD27 例 (CD18 例、UC9 例) の腸管から採取した total RNA について、QC、ライブラリ作成、RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析を (株) MacroGen Japan (Kyoto, Japan) に受託して行った。QC には TapeStation HighSensitivity RNA ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) を使用し、基準を RNA integrity number (RIN) 7 以上に設定した。RNA 増幅は SMART Seq V4 Ultra Low Input RNA Kit (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を使用し、キット添付のプロトコールに従って行った。ライブラリ調整には TruSeq Stranded mRNA Library Prep (Illumina, San Diego, USA) を使用した。RNA シーケンスには NovaSeq 6000 (Illumina) を使用した。RNA シーケンスによって得られた FASTQ データは、東北メディカル・メガバンク機構のスーパーコンピュータシステムにて、TOPMed RNA-seq pipeline ([https://github.com/broadinstitute/gtxpipeline/blob/master/TOPMed\\_RNAseq\\_pipeline.md](https://github.com/broadinstitute/gtxpipeline/blob/master/TOPMed_RNAseq_pipeline.md)) (Github inc, San Francisco, USA) に従い STAR および Picard を用いてアライメントから後処理までを行った。RNA シーケンスデータと、ゲノム DNA の遺伝子型との比較により RNA/DNA 検体の整合性を確認した。DNA と RNA の検体での一致率が低い 3 検体、ピアリード比が低い (15%以下) 4 検体については除外を行い、最終的に活動期クローン病 15 例、活動期潰瘍性大腸炎 5 例の検体について発現解析に進んだ。各転写産物のリード数は、featureCount (Ver 1.6.4) (Walter and Eliza Hall, Melbourne, Australia) を用いて算出し、edgeR (Ver 3.20.9) (Bioconductor) により全体での標準化を行った。eQTL 解析は、FastQTL (Ver 2.184) (UNIGE School of Medicine FunPopGen, Geneva, Switzerland) を用い、--normal オプションによって遺伝子レベルでの標準化を行った。

## (6) GWAS

GWAS は線形混合モデル (linear mixed model) による解析を行った。解析には Genome-wide Complex Trait Analysis (GCTA) ソフトウェア

(<http://cnsgenomics.com/software/gcta/#Download>) (Ver1.91.7b1) を用い、Impute されている 16,919,636 多型のうち、マイナーアレル頻度 0.5%以上の 7,424,691 多型を対象とした。

## (7) TWAS

TWAS には FUSION software ([https://github.com/gusevlab/fusion\\_twas](https://github.com/gusevlab/fusion_twas)) を用い、対象とするデータは、GTEEx で公開されている GTEEx V7 データのうち、IBD と関連が高いと考えられる全血、Epstein-Barr virus (EBV) 不死化 B 細胞、横行結腸、S 状結腸、小腸 (回腸末端) の RNA シーケンスデータを用いた。

## (8) 統計解析

eQTL 解析では、 $p < 1e-04$  を候補、 $p < 1e-06$  を有意な相関としてその後の解析に用いた。GWAS では線形混合モデルで  $p < 5e-08$  の遺伝子多型を有意とし、 $p < 1e-05$  の遺伝子多型を候補多型とした。相関を示した多型の前後 500kbp 内に相関がある場合を同一領域の相関とした。TWAS については、対象遺伝子数による多重検定補正のため False Discovery Rate (FDR)  $< 0.1$  を有意とした。各解析から得られたデータは、R software Ver 3.4.4 を用いて解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) eQTL 解析

解析フローチャートを図 1 に示す。発現解析に進んだ IBD 患者 20 例 (CD15 例、UC5 例) の Tem について行った RNA シーケンスによって、32,363 遺伝子の発現が確認された。eQTL 解析により、遺伝子多型と遺伝子発現との関連について、候補 ( $p < 1e-04$ ) となる相関が 22,632 ペア、2,463 遺伝子が確認され、そのうち 2,000 ペア、220 遺伝子が有意 ( $p < 1e-06$ ) な相関を

認めた。

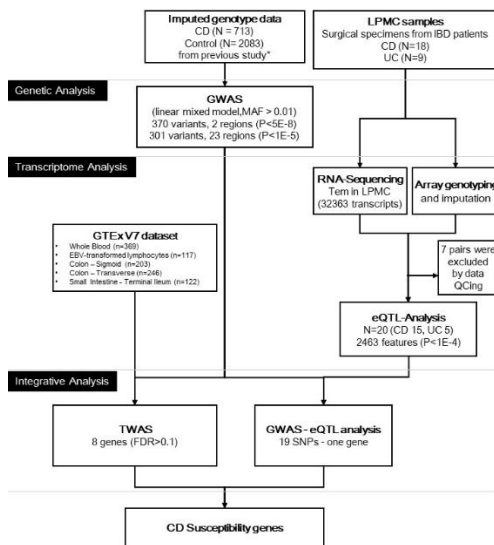


図 1

## (2) GWAS

混合線形モデルを用いた CD の GWAS の結果をもとにマンハッタンプロットを作成した。370 SNPs の有意 ( $p < 5e-08$ ) な相関が認められ、これらの SNPs は 6 番染色体の human leukocyte antigen (HLA) 領域 ( $rs184950714$ ,  $p = 1.07e-17$ ) と、9 番染色体の tumor necrosis factor superfamily member 15 (TNFSF15) 遺伝子上流 ( $rs55951892$ ,  $p = 1.76e-23$ ) の 2 領域に存在した。また、候補レベルの相関 ( $p < 1e-05$ ) を示した 301 SNPs は上記の 2 領域以外には 23 領域に存在した。有意な相関を示した SNPs のうち、アミノ酸置換を伴うものが 3 SNPs 認められた ( $rs76418789$ ,  $p = 4.22e-07$ ,  $rs181206$ ,  $p = 3.28e-05$ ,  $rs1059491$ ,  $p = 4.38e-05$ )。

## (3) GWAS と eQTL の統合解析

GWAS での候補多型のうち、本研究で確認された eQTL データから、6 番染色体の 19 SNPs が、腸管の Tem における tenascin-XA (TNXA) 遺伝子の発現と

有意 (PGWAS =  $6.34e-09$ , PeQTL =  $3.49e-05$ ) な相関を示した。遺伝子型が GG となるものは 1 例のみであるため、CC と G carrier の 2 群での解析も行ったが、こちらでも相関傾向が認められた。 ( $p = 1.60e-03$ , Wilcoxon の順位和検定)。

## (4) TWAS

TWAS では、HLA 領域と、それ以外で解析を分けて行った。解析したすべての細胞種において、HLA-DQ, DR などの複数の遺伝子発現と CD との関係を確認したが、ほぼすべての相関が GWAS における  $rs9271170$  の相関に関連していた。HLA 領域以外には、全血で TNFSF15 (TWAS.  $p = 2.28e-17$ , FDR =  $1.35e-13$ )、apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic subunit 3A (APOBEC3A) (TWAS.  $p = 9.66e-05$ , FDR =  $6.79e-02$ ) の 2 遺伝子、EBV 不死化リンパ球で endogenous retrovirus group 3 member 1 (ERV3-1) 遺伝子 (TWAS.  $p = 4.79e-05$ , FDR =  $2.20e-02$ ) および ras-related protein Rap-1A (RAP1A) 遺伝子 (TWAS.  $p = 2.42e-04$ , FDR =  $9.45e-02$ )、横行結腸で nuclear pore complex interacting protein family member B9 (NPIP9) 遺伝子 (TWAS.  $p = 8.74e-05$ , FDR =  $7.66e-02$ ) および immunoglobulin lambda variable 3-29 (IGLV3-29) 遺伝子 ( $p = 1.29e-04$ , FDR =  $9.70e-02$ )、S 状結腸で zinc finger protein 713 (ZNF713) 遺伝子 (TWAS.  $p = 4.41e-05$ , FDR =  $3.03e-02$ )、WD repeat domain 31 (WDR31) 遺伝子 (TWAS.  $p = 1.34e-04$ , FDR =  $8.07e-02$ ) が有意に相関を示した。このうち、ERV3-1、RAP1A、ZNF713 などについては、その予測される遺伝子発現量で補正した場合は、その領域の SNP の相関がほぼ消失するが、TNFSF15 などは、予測される遺伝子発現量による補正後においても複数の遺伝子多型が強い相関を示していた。

## 5. 考察

本研究で新たに得られた知見として、小規模ではあるものの、初めて日本人 IBD 患者の腸管 LPMC 由来 Tem の eQTL データを構築したこと、日本人 CD の GWAS で相関を示した多型が、腸管 LPMC 由来の Tem において TNXA 遺伝子発現と相関を認めていること、日本人 CD を対象とした初めての TWAS によるアプローチで、全血における TNFSF15 遺伝子、リンパ球における RAP1A 遺伝子が疾患感受性遺伝子であることが確認されたこと、TWAS から、新たに 8 つの遺伝子の相関が示されたことがあげられる。

## 6. 結論

遺伝子多型情報とトランスクリプトーム関連解析のデータを統合的に解析することで、日本人クローン病の発症にかかわる遺伝子転写産物を複数確認し、特に血球細胞中の TNFSF15 の発現がもっとも日本人 CD の発症と関連することが示された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kakuta Yoichi, Ichikawa Ryo, et al	4. 巻 10
2. 論文標題 An Integrated Genomic and Transcriptomic Analysis Reveals Candidates of Susceptibility Genes for Crohn's Disease in Japanese Populations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10236-10236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-66951-5	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	角田 洋一  (Kakuta Yoichi)  (50509205)	東北大学・大学病院・助教     (11301)	

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