

令和 2 年 4 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16140

研究課題名（和文）eQTLデータベースを活用した新規関節リウマチ治療戦略の検討：CD83を焦点に

研究課題名（英文）Utilizing eQTL Databases to Identify New Potential Targets in Rheumatoid Arthritis Therapy

研究代表者

土田 優美（Tsuchida, Yumi）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90793597

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：ゲノムワイド関連解析（genome wide association study：GWAS）によって同定された関節リウマチ（rheumatoid arthritis：RA）に関連する多型の多くは、expression quantitative trait locus（eQTL）として働き、遺伝子発現に影響を与えることによって疾患の発症に寄与していると考えられており、本研究では、eQTLカタログとGWASの結果を統合することにより、RAの新たな治療ターゲットの候補を同定し、その機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のゲノムワイド関連解析では、疾患と関連する遺伝子の同定が可能であっても、その遺伝子がどの細胞で、どのような状況で機能を発揮することにより疾患の発症に寄与しているのが同定が難しいことも多々あった。今回の研究では、eQTLカタログの情報も併せて解析することにより、GWAS遺伝子が病態の発症に寄与する細胞種・条件を推測することにより、より効率的に疾患の治療ターゲットを模索することができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Genome wide association studies (GWAS) has identified many single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the risk of rheumatoid arthritis (RA). Many of them do not change amino acid sequences and are presumed to contribute to the pathogenesis of RA by acting as expression quantitative trait locus (eQTL) and by influencing gene expression in certain cell types under certain conditions. In this study, the results of an eQTL study of peripheral blood immune cells recently published from our group were analyzed along with results from previously published GWAS studies to identify new potential targets for RA therapy, and their function was analyzed in vitro.

研究分野：膠原病学

キーワード：関節リウマチ ゲノムワイド関連解析 eQTL CD83

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 (rheumatoid arthritis : RA) は、多関節炎をきたす自己免疫疾患の一つであり、その発症には遺伝因子と環境因子の両方が関わるとされている。RA の発症に関わる遺伝因子に関しては、ゲノムワイド関連解析 (genome wide association study : GWAS) が複数行われており、RA に関連する遺伝子多型は 100 以上報告されている (Okada et al. Nature 2014;506:376.)。しかし、これらの多型の多くは、タンパク質のアミノ酸配列を変化させず、リスク多型の同定のみでは、病態生理への関与が不明であることが多い。このようなリスク多型の多くは、遺伝子発現の調節に関わるエンハンサー (enhancer) 領域に存在し (Farth et al. Nature 2015;518:337) 遺伝子発現に影響を与えることにより、疾患の発症に寄与していると考えられている。

遺伝子発現に影響を与える遺伝子多型は expression quantitative trait locus (eQTL) と呼ばれ、その効果は、細胞の種類や細胞の状態によって異なることが知られている。様々な細胞種、細胞の状態の eQTL カタログの情報を GWAS の結果と統合して解析することにより、GWAS で同定されたリスク多型が、どの細胞で、どのような状態の場合に、どの遺伝子の発現に影響を与えているか推測することが可能となり、関節リウマチの病態生理の理解を進め、新たな治療戦略につなげることができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究開始前に、理化学研究所との共同研究で、申請者らは、健康人末梢血から、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B 細胞、単球、NK 細胞を分取し、RNA-Seq による遺伝子発現解析を行い、eQTL カタログを作成した (Ishigaki et al. Nat Genet 2017;49:1120)。本研究においては、この eQTL カタログと GWAS の既報の情報を組み合わせて解析することにより、RA の治療ターゲットとなり得る候補分子を同定し、その機能解析を行うことを目的として行った。

また、同じ細胞種であっても、細胞の刺激条件により eQTL 効果が異なり、本研究と並行して、刺激した CD4 陽性 T 細胞の eQTL データベースの構築も進めており、その eQTL データベースも活用することにより、さらに他の候補分子も同定、今後の RA の治療戦略につなげることを目的として行った。

3. 研究の方法

前述の日本人末梢血免疫担当細胞の eQTL データベース、刺激した CD4 陽性 T 細胞の eQTL データベースと RA の GWAS の既報を参照し、まずは候補分子を模索した。CD83 近傍の多型が RA の発症と関連することは既に報告されており (Okada et al. Nat Genet 2012;44:511.) eQTL データベースを参照すると、RA リスク多型は B 細胞で CD83 の発現を低下させることが判明したため、まずは B 細胞上の CD83 に着目した。公共のエピゲノム・データベースを活用することなどにより、GWAS 多型が CD83 の発現に影響を与えるメカニズムについて検討を行い、また CD83 が B 細胞の分化に与える影響について検討を行った。また、刺激された CD4 陽性 T 細胞の eQTL カタログを参照することにより、他の候補分子を同定し、siRNA などを用いて試験管内で機能解析も行った。

4 . 研究成果

まず、着目した B 細胞における CD83 の eQTL 効果のメカニズムについて、Roadmap (Kundaje et al. Nature 2015;518:317.) などの公共のエピゲノム・データベースを参照して検討した。他の細胞種において、NF- κ B は CD83 の発現に重要であると報告されており (Breloer et al. Trends Immunol 2008;29:186.) RA の GWAS SNP 近傍の多型は、NF- κ B の結合モチーフを変化させることから、リスク多型は NF- κ B の結合に影響を与えることにより、CD83 の発現を低下させている可能性が示唆された。またこのリスク多型の近傍の領域は、B 細胞では DNase hypersensitive site に存在し、クロマチン構造が開いていると推測されるものの、他の免疫担当細胞では DNase hypersensitive site ではないことから、B 細胞でのみ eQTL 効果を発揮していると推測された。

健康人末梢血のフローサイトメトリー解析から、RA リスク多型を有する健康人では、CD27-IgD- double negative B 細胞の比率が高いことが判明した。この変化は RA 患者でも見られる変化であり、本研究により、RA 患者における CD27-IgD- double negative B 細胞比率の増多は、疾患やその治療による二次的な変化ではなく、RA 患者の遺伝的背景によるものであることが示唆された。つまり、RA のリスク多型は、B 細胞上で CD83 の発現を低下させることにより、B 細胞の分化に影響を与え、疾患の発症に寄与している可能性が考えられた (図 1)。

次に、刺激された CD4 陽性 T 細胞の eQTL カタログを参照し、他の候補分子を模索した。今まで滑膜線維芽細胞などの他の細胞種で着目されていた GWAS 遺伝子の一部は、RA のリスク多型によって、活性化された CD4 陽性 T 細胞で発現量が変化することから、CD4 陽性 T 細胞でも機能を発揮し RA の病態生理に関与している可能性が示唆された。一部の分子に関しては、siRNA を用いてヒト CD4 陽性 T 細胞でノックダウンを行い、CD4 陽性 T 細胞の活性化や分化への影響を検討した。これらの結果は、今後 RA の新たな治療戦略につながる可能性が期待される。



図 1. CD83 の RA リスク多型が RA 発症に寄与するメカニズムの仮説

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tsuchida Yumi, Sumitomo Shuji, Ota Mineto, Tsuchiya Haruka, Nagafuchi Yasuo, Shoda Hirofumi, Fujio Keishi, Ishigaki Kazuyoshi, Yamaguchi Kensuke, Suzuki Akari, Kochi Yuta, Yamamoto Kazuhiko	4. 巻 70
2. 論文標題 Reduction of CD83 Expression on B Cells and the Genetic Basis for Rheumatoid Arthritis: Comment on the Article by Thalayasingam et al	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1695 ~ 1696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.40652	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土田 優美、太田 峰人、石垣 和慶、住友 秀次、山口 健介、永淵 泰雄、土屋 遥香、庄田 宏文、鈴木 亜香里、山本 一彦、高地 雄太、藤尾 圭志
2. 発表標題 刺激下でのCD4陽性T細胞における Expression Quantitative Trait Locusの検討
3. 学会等名 日本臨床免疫学会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Yumi Tsuchida, Mineto Ota, Kazuyoshi Ishigaki, Shuji Sumitomo, Kensuke Yamaguchi, Yasuo Nagafuchi, Haruka Tsuchiya, Hirofumi Shoda, Akari Suzuki, Kazuhiko Yamamoto, Yuta Kochi, Keishi Fujio
2. 発表標題 Genetic perturbation of immunological gene expression in T cells under different polarizing conditions
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----