

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09806

研究課題名(和文)HLAリスク因子陰性のベーチェット病患者を対象としたゲノムワイド関連解析

研究課題名(英文)Genome-wide association study of Behcet's disease in HLA-B\*51/-A\*26 negative patients

研究代表者

山根 敬浩(YAMANE, Takahiro)

横浜市立大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：30714448

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)：ベーチェット病は複数の遺伝要因と環境要因が複合的に作用して発症する多因子疾患であり、ベーチェット病の主要な遺伝要因としてHLA-B\*51とHLA-A\*26が報告されている。一方、ベーチェット病の発症にはこれらHLAリスク因子以外の遺伝要因も関与していることが示唆されている。したがって本研究では、HLAリスク因子陰性のベーチェット病患者および健常者を対象にゲノムワイド関連解析を実行し、HLA領域外においてベーチェット病と有意な相関を示すSNPを複数同定した。機能解析の結果、同定したSNPのリスクアレルに起因する疾患感受性遺伝子の発現量の変動がベーチェット病の発症に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で同定された遺伝情報は、ベーチェット病の発症メカニズムのさらなる解明に大きく貢献すると考えられる。また、同定された遺伝情報は、ベーチェット病感受性遺伝子(分子)の機能を制御・抑制する分子標的薬の新規開発につながり、その臨床的意義は極めて大きいといえる。

研究成果の概要(英文)：Behcet's disease (BD) is a multifactorial disease involving both genetic and environmental factors. HLA-B\*51 and HLA-A\*26 are reportedly associated with BD and are major genetic factors for Behcet's disease. On the other hand, it has been suggested that genetic factors other than these HLA risk alleles are also involved in the pathogenesis of Behcet's disease. Therefore, in this study, we performed a genome-wide association study in HLA-B\*51/-A\*26 negative BD patients and identified several SNPs outside the HLA region that are significantly associated with BD. Functional analyses suggested that altered expressions of susceptibility genes caused by the risk alleles of the identified SNPs are involved in the development of BD.

研究分野：眼科学

キーワード：ベーチェット病 ゲノムワイド関連解析 HLA 疾患感受性遺伝子 SNP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ベーチェット病は全身の諸臓器に急性の炎症を繰り返す原因不明の難治性炎症性疾患であり、口腔内アフタ性潰瘍、眼症状、皮膚症状、外陰部潰瘍を主症状とする。ベーチェット病は長期間に渡って再発と寛解を繰り返すため、ベーチェット病により重度の視力障害を来す患者は少なくなく、今なお失明率の高い疾患である。ベーチェット病は地中海沿岸から中近東、東アジアに至るシルクロード沿いの地域で多く発症する疾患であり、日本はベーチェット病の最多発国である。

(2) ベーチェット病は複数の遺伝要因と環境要因が複合的に作用して発症する多因子疾患であると考えられている。ベーチェット病は HLA-B 遺伝子の特定のタイプである HLA-B\*51 と人種を超えて顕著な相関を示すことから (目黒ら. あたらしい眼科 2006;23:1521-1527.) HLA-B\*51 はベーチェット病の最も重要な遺伝要因であると考えられる。また、私達はベーチェット病を対象に HLA 領域の詳細な遺伝子解析を実行し、HLA-B\*51 に次ぐベーチェット病の第 2 の遺伝要因として HLA-A\*26 を同定している (Meguro A, et al. Ann Rheum Dis 2010;69:747-754.)。HLA-B\*51 と HLA-A\*26 の両方または一方を保有するベーチェット病患者は日本人患者全体の 70%~80%にまで上ると推定される。

(3) 一方、ベーチェット病患者の約 20~30%は HLA リスク因子 (HLA-B\*51 および HLA-A\*26) を保有していないため、ベーチェット病の発症には HLA リスク因子以外の遺伝要因も関与していることが示唆されている。

(4) 近年、私達のグループは、国内外の研究グループと共同でベーチェット病を対象としたゲノムワイド関連解析 (genome-wide association study: GWAS) を実行し、HLA 領域外において、新たな疾患感受性遺伝子を多数同定している (Mizuki N, et al. Nat Genet 2010;42:703-706. Kirino Y, et al. Nat Genet 2013;45:202-207. Kirino Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2013;110:8134-8139. Lee YJ, et al. Ann Rheum Dis 2013;72:1510-1516. Takeuchi M, et al. Nat Genet 2017;49:438-443.)。これら遺伝学的成果は、ベーチェット病の病態の理解のみならず、ベーチェット病のよりの確な診断、有効な治療法・予防法の確立を可能にし、非常に意義深いといえる。

(5) ベーチェット病の同胞相対危険度 ( $\lambda_s$ ) はトルコ人において 11.4~52.5 であり (Gül A, et al. Ann Rheum Dis 2000;59:622-625.) ベーチェット病は遺伝要因の関与が比較的強い疾患といえる。しかしながらこれまでに同定された遺伝子はベーチェット病の遺伝要因全体の 20~30%程度であると推測されており、依然として未同定の遺伝要因が多く存在すると考えられている。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究は、既に取得しているベーチェット病患者のゲノム全域に渡る遺伝子解析データ (GWAS データ) を活用して GWAS の再解析を実行し、ベーチェット病の発症に関与する HLA リスク遺伝子以外の遺伝要因 (疾患感受性遺伝子) の網羅的なスクリーニングを行うことを目的とする。

(2) さらに本研究では、GWAS の再解析で同定した遺伝要因の情報を基に、疾患感受性遺伝子の機能解析を系統的に実行し、遺伝要因が関与するベーチェット病の発症メカニズムの解明を試みる。

### 3. 研究の方法

(1) 私達のグループは、日本人集団 (ベーチェット病患者 611 例、健常者 737 例) において、ゲノム全域を網羅するように設定された 50 万個以上の SNP (single nucleotide polymorphism: 一塩基多型) のデータ (GWAS データ) を既に取得している (Mizuki N, et al. Nat Genet 2010;42:703-706.)。

(2) 本「GWAS データ」を対象とした imputation 解析も完了しており、日本人集団におけるゲノム全域をより高密度に網羅する 500 万個以上の SNP のデータ (Imputed GWAS データ) を取得している (論文未発表) imputation 解析では、オープンソースである Michigan Imputation Server (Das S, et al. Nat Genet 2016;48:1284-1287. <https://imputationserver.sph.umich.edu>) を使用し、imputation のリファレンスデータとして、1000 人ゲノムプロジェクト (1000 Genomes

Project Consortium, et al. Nature 2015;526:68-74. <http://www.1000genomes.org/>) の東アジア人集団のデータ (Phase 3 データセット) を使用した。本 imputation 解析では、マイナーアリル頻度>1.0%、R-squared>0.70 の Quality control 基準を採用し、この Quality control 基準をクリアする 500 万個以上の SNP のデータを「Imputed GWAS データ」として本研究に用いた。

(3) 本研究では、上記の「Imputed GWAS データ」から、HLA リスク因子 (HLA-B\*51、HLA-A\*26) 陰性のベーチェット病患者および健常者を下記の ~ の 3 パターンで抽出して GWAS の関連解析を再度実行し、ベーチェット病と有意な相関を示す候補 SNP の網羅的なスクリーニングを実行した。

「HLA-B\*51 陰性患者」(314 例) vs. 「HLA-B\*51 陰性健常者」(601 例)

「HLA-A\*26 陰性患者」(428 例) vs. 「HLA-A\*26 陰性健常者」(602 例)

「両 HLA 因子陰性患者」(190 例) vs. 「両 HLA 因子陰性健常者」(490 例)

本 GWAS 解析では、ベーチェット病患者と健常者の間における各 SNP のアリル頻度差を統計学的に評価し、ベーチェット病患者と有意に相関を示す候補 SNP の網羅的なスクリーニングを行った。本統計解析は、SNP & Variation Suite ソフトウェア (Golden Helix 社) を用いて実行した。

(4) 上記(3)「HLA リスク因子 (HLA-B\*51、HLA-A\*26) 陰性者を対象とした GWAS 解析」で網羅的にスクリーニングした候補 SNP を対象に、新たな日本人集団 (ベーチェット病患者 300 例、健常者 900 例)、トルコ人集団 (ベーチェット病患者 1,900 例、健常者 1,700 例) とイラン人集団 (ベーチェット病患者 850 例、健常者 850 例) を用いて追認試験 (再現性の検討) を行った。上記(3)の GWAS 解析と同様に、~ の 3 パターンを用いてベーチェット病患者と健常者の間の関連解析を実行した。本解析では、Thermo Fisher Scientific 社のプライマー・プローブセットを用いた TaqMan アッセイ法により候補 SNP のジェノタイピングを行った。TaqMan アッセイは、Thermo Fisher Scientific 社のプロトコルに準拠して実行した。PCR 反応およびプローブの蛍光シグナルは StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) を用いて検出した。

(5) その後、GWAS 解析と追認試験を対象としたメタ解析を実行し、ベーチェット病の発症リスクとゲノムワイドレベルの有意な相関 (genome-wide significant association:  $P < 1 \times 10^{-8}$ ) を示す SNP の同定を行った。統計解析は、SNP & Variation Suite ソフトウェアを用いて実行した。

(6) さらに、同定した SNP が疾患感受性遺伝子に与える影響を評価するため、疾患感受性遺伝子の立体構造解析および遺伝子発現解析を行った。立体構造解析は、Modeller ソフトウェア (<http://salilab.org/modeller/>) を用いて、SNP のアリルの置換によるタンパク質の構造および分子動力の比較を実行した。遺伝子発現解析では、リアルタイム PCR による TaqMan アッセイ法 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、SNP の遺伝子型の違いが疾患感受性遺伝子の発現量に影響を与えるかを評価した。

(7) 本研究では、すべての血液検体提供者 (ベーチェット病患者、健常者) に対して、研究の目的、研究の期間と方法、研究参加により予測される効果及び危険性、研究に協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分に説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加していただいた。すべての血液検体提供者の個人情報 は連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者によって厳重に管理されている。

(8) 本研究に参加するすべての検体提供施設は、各々の施設の倫理委員会より本遺伝子研究への参加を承認されている。

#### 4. 研究成果

(1) 日本人集団を対象としたベーチェット病の Imputed GWAS データから HLA リスク因子 (HLA-B\*51、HLA-A\*26) 陰性のベーチェット病患者群および健常者群を選択・抽出して、HLA リスク因子陰性者を対象とした GWAS 解析を実行し、HLA リスク因子陰性のベーチェット病患者と有意な相関を示す疾患感受性候補 SNP を網羅的に検出した。

(2) 次に、GWAS 解析において網羅的に検出した疾患感受性候補 SNP を対象に、日本人の追加集団および海外人種集団 (トルコ人集団、イラン人集団) を用いて追認試験の SNP ジェノタイピングを実行した。その後、GWAS 解析の結果と追認試験の結果を対象としたメタ解析を実行した結

果、人種を超えてベーチェット病の発症リスクとゲノムワイドレベルの有意な相関( $P < 1 \times 10^{-8}$ )を示す SNP を HLA 領域 (6 番染色体 : 28,000,000 - 34,000,000bp) 以外の遺伝子領域で複数同定した。

(3) 同定した SNP が位置する遺伝子領域を対象とした機能解析 (遺伝子発現解析および立体構造解析) を実行した結果、同定した SNP の複数が遺伝子型の違いにより近傍の疾患感受性遺伝子の発現量の変動に有意な影響を与えていた。したがって、これら SNP のリスクアレルに起因する疾患感受性遺伝子の発現量の変動がベーチェット病の発症や病態に関与していることが示唆された。

(4) 本研究で同定された遺伝情報は、ベーチェット病の発症メカニズムのさらなる解明に大きく貢献すると考えられる。また、同定された遺伝情報は、ベーチェット病感受性遺伝子 (分子) の機能を制御・抑制する分子標的薬の新規開発につながり、その臨床的意義は極めて大きいといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	目黒 明  (MEGURO Akira)  (60508802)	横浜市立大学・医学研究科・特任教授   (22701)	
研究分担者	水木 信久  (MIZUKI Nobuhisa)  (90336579)	横浜市立大学・医学研究科・教授   (22701)	

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	National Institutes of Health			
トルコ	Istanbul University			
イラン	University of Tehran			