

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08470

研究課題名(和文) 全身性エリテマトーデス発症と病態におけるNOX2複合体ゲノム多様性の意義

研究課題名(英文) Significance of genomic diversity of NOX2 complex in onset and pathogenesis of systemic lupus erythematosus

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NOX2複合体構成分子をコードするNCF1、NCF2遺伝子バリエーションと全身性エリテマトーデス(SLE)感受性との関連は報告されているが、遺伝子全長にわたる解析は行われていない。本研究では相同遺伝子群の存在のために特異的ゲノム解析が困難なNCF1においてロングリードシーケンシング解析を実施し、多数のNCF1バリエーションを同定するとともに、関連研究により新たなSLE関連バリエーション候補を検出した。NCF2ではアミノ酸置換を伴うバリエーションがSLEと関連することを確認した。本研究によりNOX2複合体構成分子バリエーションのSLE発症における効果量はこれまでに報告されているよりもさらに大きいことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において全身性エリテマトーデス(SLE)の発症とNOX2複合体構成遺伝子の関連を見いだした。これまで特異的なシーケンシングが困難であったNCF1に、ロングリードシーケンシングにより多数のバリエーションが検出され、一部はSLE感受性に関連していた。NCF1は現在でも東アジア集団ではHLA以上にSLE発症における効果量が高いことが知られているが、NCF1を含めたNOX2複合体構成遺伝子群全体のSLE発症における効果量は、現在考えられているよりもさらに大きい可能性が示唆され、SLEの分子機構の解明、NOX2複合体を標的としたSLE治療薬、SLE発症予測への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Association of some missense variants in NCF1 and NCF2, components of NOX2 complex, with systemic lupus erythematosus (SLE) has been reported. However, due to the difficulties in a genomic analysis of NCF1 gene caused by the presence of pseudogenes with high homology, association analysis of the variants distributed in the entire gene has not been reported. In this study, using the long-read sequencing technology, we detected many NCF1 variants, several of which showed a tendency towards association with SLE. With respect to NCF2, the association of the missense variant previously reported in East Asian populations was confirmed in the Japanese population. These findings suggested that the effect size of NOX2 complex variants in development of SLE may be substantially larger than currently recognized.

研究分野：膠原病学、ゲノム医科学

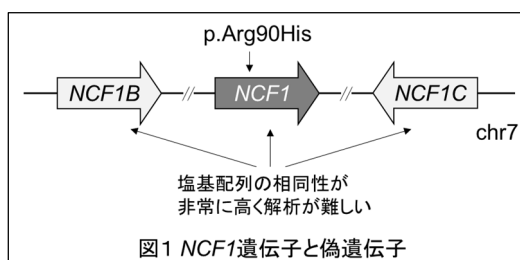
キーワード：全身性エリテマトーデス 疾患感受性遺伝子 NOX2複合体 NCF1 NCF2 ロングリードシーケンシングバリエーション

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)の発症には遺伝因子が寄与し、ゲノムワイド関連研究(GWAS)や候補遺伝子アプローチにより、100以上の疾患感受性遺伝子・領域が報告されてきた。東アジア系集団においては、活性酸素の産生に関わる NADPH oxidase 2 (NOX2) 複合体の構成遺伝子である *neutrophil cytosolic factor 1 (NCF1)* 遺伝子で *HLA* 遺伝子よりもさらに強い関連が認められる。東アジア系集団を対象とした大規模なゲノム解析により *NCF1* のミスセンスバリエーション p.Arg90His が SLE の疾患感受性バリエーションとして同定され、代表者らも *NCF1* p.Arg90His が日本人 SLE と関連することを報告した (Yokoyama et al, Sci Rep 2019)。東アジア系集団と比較して関連は弱いものの、ヨーロッパ系集団でも *NCF1* と SLE の関連が認められている。SLE の発症リスクと関連する *NCF1* His90 アリルは、活性酸素の産生低下や I 型インターフェロン経路の活性化に影響することが報告されている。

*NCF1* には、相同性が非常に高く塩基配列の大部分が一致している 2 つの偽遺伝子 *NCF1B*、*NCF1C* が存在する。そのため、*NCF1* 遺伝子領域は GWAS に用いられるマイクロアレイ解析やショートリードシーケンス解析などによるゲノム解析が非常に難しい領域となっている。*NCF1* p.Arg90His と SLE の関連は報告されたものの、*NCF1* 遺伝子全長と SLE の関連を詳細に解析した報告はなく、未同定の SLE 関連 *NCF1* バリエーションが存在する可能性が考えられる。



*NCF1* のほか、*NCF2*、*NCF4* も NOX2 複合体構成遺伝子として機能する。*NCF2* においても、ヨーロッパ系集団や東アジア系集団から SLE との関連が報告されている。これらの知見から、*NCF1* を含む NOX2 複合体構成遺伝子が SLE 発症に大きく寄与することが示唆される。

### 2. 研究の目的

*NCF1* 遺伝子をはじめとする NOX2 複合体構成遺伝子群を対象としたゲノム解析により SLE 感受性バリエーションを同定し、SLE 発症における NOX2 複合体構成遺伝子群の寄与を包括的に解明することを目的とした。さらに、疾患関連研究により同定される SLE 関連 NOX2 複合体構成遺伝子バリエーションの機能解析により、関連バリエーションが SLE 発症と関連する分子機序を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) *NCF1* 遺伝子ロングリードシーケンス解析

*NCF1* 遺伝子全長と SLE の関連を解析する上で、*NCF1* 遺伝子全長配列の取得は必要不可欠であり、まず初めに *NCF1* 遺伝子ロングリードシーケンス解析システムの構築を試みた。

日本人 SLE 患者 4 名のゲノム DNA を用いて *NCF1* 解析システムの構築のための予備検討を行った。ロングリードシーケンサーは PacBio 社 Sequel IIe システムを用いた。*NCF1* と偽遺伝子(*NCF1B*、*NCF1C*)間で塩基配列に違いがある部位に *NCF1* 特異的プライマーを設計し、*NCF1* 遺伝子を前半領域、後半領域に分けて PCR 増幅を行った。その後、*NCF1* 特異的に増幅された PCR 産物を用いて、SMRTbell Library 調製を行い、Sequel IIe システムにてシーケンシングを行った。シーケンス解析により得られた HiFi read を用いて、*NCF1* コンセンサス配列を取得した。さらに、解析ツールの pbmm2、DeepVariant によりマッピング、バリエーションコールを実施した。Library 調製から Sequel IIe システムによるシーケンスデータ取得までは、共同研究施設である H.U.グループ中央研究所にて行った。

で構築した手法により、SLE 患者 48 例、健常対照者 48 例のシーケンスデータ、バリエーションデータの取得を行った。SLE 患者 52 例 (+ の SLE 検体) と健常対照者 48 例の比較による case-control study (症例対照研究) を行った。

#### (2) *NCF2* 遺伝子バリエーション解析

日本人 SLE 患者 457 例のゲノム DNA を用いて、*NCF2* の 3 個のミスセンス変異の遺伝型データを取得した。遺伝型タイピングはリアルタイム PCR 法により行った。健常対照者のデータとして東北メディカル・メガバンク機構により構築された公開データベース jMorp (日本人多層オミックス参照パネル、<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/>) に登録されている 54KJPN を使用し、case-control study を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) *NCF1* 遺伝子ロングリードシーケンス解析

ヒト参照配列(hg38)とロングリードシーケンス解析により得られた *NCF1* コンセンサス配列を比較したところ、配列の大部分が一致しており *NCF1* 特異的な配列データが得られていることが確認できた。シーケンス解析にロングリードシーケンサーを用いたことで、*NCF1* と

偽遺伝子の区別が可能であった。さらにロングリードシーケンス解析で得られた HiFi read を用いて、マッピング、バリエーションコールを実施し、複数の *NCF1* バリエーションを検出した。

100 例のシーケンス解析により 103 個のバリエーションを検出した。表 1 に *NCF1* バリエーションの概要を示す。1000 Genomes Project により公開されている JPT (日本人集団) 104 例のバリエーションデータを解析したところ、日本人集団において検出されたバリエーションは 24 個のみであった。さらに、シーケンス解析で検出されたバリエーションについて、SLE 患者 52 例と健常対照者 48 例を対象とした case-control study を行ったところ、4 個のバリエーションで  $P < 0.05$  の結果が得られた。そのうちの 1 個は既報の p.Arg90His であった。

表 1 *NCF1* 遺伝子バリエーション

<i>NCF1</i> 遺伝子上のバリエーション	個数
本研究(100 例)で検出されたバリエーション	103
rs 番号が付与されていないバリエーション	4
MAF $\geq$ 5% のバリエーション	10
JPT(104 例)で検出されたバリエーション	24
本研究と JPT 間の MAF の差が 10% 以上のバリエーション	2

MAF: マイナーアレル頻度

JPT: 日本人集団 (1000 Genomes Project)

遺伝型データ: <https://www.internationalgenome.org/data> より取得(2024/05/29)

## (2) *NCF2* 遺伝子バリエーション解析

*NCF2* の 3 個のミスセンス変異について、SLE と健常対照者間でアレル頻度の比較を行ったところ、p.Arg395Trp において有意な関連が検出された ( $P = 0.00315$ , オッズ比: 1.64, 95% 信頼区間: 1.18-2.28)。p.Arg395Trp の関連は東アジア系集団の大規模解析により報告されており (Yin et al, Ann Rheum Dis 2021)、本研究により p.Arg395Trp と SLE の関連が確認された。

## 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまで、*NCF1* p.Arg90His と SLE の関連が報告されたが、*NCF1* 遺伝子全長と SLE の関連は十分解析されてこなかった。本研究により p.Arg90His 以外の SLE 関連 *NCF1* バリエーションが存在する可能性が示唆された。*NCF2* では、東アジア系集団において p.Arg395Trp が SLE と関連することが確認された。これらの知見から、NOX2 複合体構成遺伝子バリエーションの SLE 発症における効果量は現在考えられているよりも大きいことが示唆された。また SLE リスクアレルである *NCF1* p.His90、*NCF2* p.Trp395 の両アレルにおいて活性酸素の産生低下との関連が報告されており、活性酸素の低下が SLE 病態に寄与することが示唆された。

jMorp の 54KJPN (日本人約 54000 人) のデータでは、*NCF1* 遺伝子上に 1172 個のバリエーションが検出されているが、quality filtering をパスし、頻度が 1% 以上のバリエーションは 2 個のみであった。1000 Genomes Project の JPT では、表 1 に示す通り、24 個のバリエーションしか検出されておらず、また偽遺伝子である *NCF1B*、*NCF1C* のバリエーションと完全に区別できているかは不明である。したがって、*NCF1* のバリエーション情報は十分網羅されていないのが現状である。本研究では、*NCF1* 遺伝子を特異的に PCR 増幅したプロダクトを用いてロングリードシーケンス解析を行い、日本人集団における *NCF1* 遺伝子全長のバリエーションデータを取得した。本データは、今後日本人集団において *NCF1* を対象とした疾患関連研究を行う上で非常に有用である。

## 今後の展望

本研究において、SLE 患者 52 例と健常対照者 48 例を対象に case-control study を実施し、SLE 関連バリエーション候補を検出した。今後、今回と同様の手法によりシーケンス解析を実施し、SLE、健常対照者各 200 例までサンプル数を増やす予定である。さらなる *NCF1* 関連バリエーション候補の検出、バリエーション候補を対象とした再現研究により、SLE 関連 *NCF1* バリエーションの同定を試みる。当初の計画では *NCF2*、*NCF4* 遺伝子全長のシーケンス解析も予定しており、現在 *NCF2*、*NCF4* についても解析を進めている。これらの解析を通じて NOX2 複合体構成遺伝子群の SLE 発症における遺伝学的寄与を解明する。また代表者らは、全身性強皮症と *NCF1* p.Arg90His の関連も報告していることから (Yokoyama et al, Sci Rep 2019)、全身性強皮症においても、*NCF1*、*NCF2*、*NCF4* を対象とした関連研究を実施することで NOX2 複合体構成遺伝子と全身性強皮症の関連を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Aya Kawasaki, Premita Ari Kusumawati, Yuka Kawamura, Yuya Kondo, Makio Kusaoi, Hirofumi Amano, Yasuyoshi Kusanagi, Kenji Itoh, Takashi Fujimoto, Naoto Tamura, Hiroshi Hashimoto, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Naoyuki Tsuchiya	4. 巻 9
2. 論文標題 Genetic dissection of HLA-DRB1*15:01 and XL9 region variants in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: primary role for HLA-DRB1*15:01	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RMD Open	6. 最初と最後の頁 e003214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/rmdopen-2023-003214	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Aya Kawasaki, Premita Ari Kusumawati, Yuka Kawamura, Yuya Kondo, Makio Kusaoi, Hirofumi Amano, Yasuyoshi Kusanagi, Kenji Itoh, Takashi Fujimoto, Naoto Tamura, Hiroshi Hashimoto, Isao Matsumoto, Takayuki Sumida, Naoyuki Tsuchiya	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic dissection of HLA-DRB1*15:01 and XL9 region variants in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: Primary role for HLA-DRB1*15:01	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 medRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2023.04.05.23288103	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 川崎綾, 近藤裕也, 藤本隆, 草生真規雄, 天野浩文, 田村直人, 草薙恭圭, 伊藤健司, 松本功, 住田孝之, 土屋尚之
2. 発表標題 全身性エリテマトーデスにおけるXL9領域バリエーションの関連解析およびHLA-DRB1との独立性の検討
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第67回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川崎綾, 近藤裕也, 藤本隆, 松本功, 草生真規雄, 天野浩文, 田村直人, 草薙恭圭, 伊藤健司, 住田孝之, 土屋尚之
2. 発表標題 日本人集団におけるXL9領域バリエーションおよびHLA-DRB1*15:01と全身性エリテマトーデスの関連解析
3. 学会等名 第66回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

全身性エリテマトーデスの発症に関する遺伝因子を特定  
<https://www.tsukuba.ac.jp/journal/medicine-health/20230613140000.html>  
筑波大学医学医療系 分子遺伝疫学研究室  
<https://www.md.tsukuba.ac.jp/community-med/publicmd/GE/>

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	河野 肇  (Kono Hajime)  (60585074)	帝京大学・医学部・教授    (32643)	

	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
研究協力者	土屋 尚之  (Tsuchiya Naoyuki)  (60231437)	筑波大学・医学医療系・教授    (12102)	

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
---------	---------