

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791179

研究課題名（和文）

連鎖解析とキャプチャーリシーケンスによる全身性エリテマトーデスの原因遺伝子同定

研究課題名（英文）

Identification of a critical gene involved in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus by linkage analysis and exome resequencing

研究代表者

北村 明子（KITAMURA AKIKO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10448318

研究成果の概要（和文）：

全身性エリテマトーデス(SLE)は多因子疾患であることから、ゲノム関連解析によって発症に決定的に寄与する遺伝素因を解明することは困難であった。申請者らは、4名の同胞のうち3名がSLEを含む自己免疫疾患を発症した近親婚歴のある血族家系を見出した。本研究では、この血族家系を対象に、ポジショナルクローニングを行い疾患遺伝子座(FSLE-2; 1.1Mb)を同定した。さらに、エクソンキャプチャー・リシーケンス解析を行い、FSLE-2に含まれる遺伝子多型を明らかにすることによって候補遺伝子を同定した。現在、候補遺伝子産物の生化学的特徴を明らかにするとともに、変異がその分子機能を変化させるメカニズムを解明するために候補遺伝子の遺伝子改変マウスを作製している。

研究成果の概要（英文）：

Genome wide association studies have failed to identify genes that strongly contribute to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) because SLE is a multifactorial disease. We found one Japanese consanguineous SLE family which consists of 3 affected and 1 unaffected sibling. To identify the underlying gene, we performed a positional cloning analysis and revealed one homozygous region (FSLE-2; 1.1Mb). Next we carried out exome resequencing in FSLE-2 region and identified a candidate gene. We are establishing a genetically modified mouse of the candidate gene to know the association of this gene with the pathogenesis of SLE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：全身性エリテマトーデス、キャプチャー・リシーケンス

1. 研究開始当初の背景

Systemic lupus erythematosus (SLE)は罹患頻度が高く、慢性で難治性の経過をとることから、その病態解明と根本的な治療法の確立は極めて重要である。SLEは、複数の遺伝要因と環境要因が関与して発症する多因子疾患と考えられており、これまでに国内外で大規模な全ゲノム関連解析が精力的に行わ

れ、*HLA*, *CTLA4*, *FCRL3* など数多くの免疫機能分子の遺伝子多型が疾患感受性に関与していることが解明されてきた。しかし、他の多因子疾患と同様にそれらの遺伝子多型の疾患発症への効果は弱く、SLE発症に関与する遺伝要因の全貌は未解明である。

一方、家族歴が明らかな単一遺伝性疾患に対しては、ポジショナルクローニング法とし

て全ゲノム連鎖解析とホモ接合体マッピング法が確立されており、疾患発症に決定的な役割をもつ遺伝子を同定することが可能である。実際、腎臓病学領域では、これらの手法を用いて、フィンランド型先天性ネフローゼ(ネフリン)、家族性ステロイド抵抗性ネフローゼ(ポドシン)の疾患遺伝子が同定され、ネフローゼの分子病態解明に貢献してきた。SLE についても、兄弟例あるいは親子例を対象としたポジショナルクローニングが行われてきたが、疾患浸透率や家系間の遺伝子座異質性が問題となり、これまでマッピングは成功していなかった。

申請者らは、常染色体劣性遺伝形式で発症したと考えられる SLE の血族大家系を見出した。本研究では、この血族大家系に発症した家族性 SLE 症例を対象に、ポジショナルクローニング法とエクソンキャプチャー・リシークエンス解析を適用し、SLE の責任遺伝子の同定を目指す。この研究の成功は、SLE の病態解明に重要な新知見をもたらすのみならず、自己免疫性腎炎の発症機構について新たな概念を創出できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、近親婚歴を有し、遺伝要因が明白な SLE 大家系を対象に、ポジショナルクローニングおよびエクソンキャプチャー・リシークエンス解析を適用し、SLE の責任遺伝子を同定することを目的とする。本研究の成功は、免疫システムの過剰活性化に起因する SLE の病態の本質的な理解のみならず、自己免疫性腎炎の発症機構について新たな概念を創出できる可能性があり臨床医学的に高い意義があると考えられる。

3. 研究の方法

申請者らは、両親が近親婚の 4 名の同胞のうち 3 名が自己免疫疾患(SLE など)と精神疾患を発症した極めて稀な血族大家系(図 1)を見いだした。同一家系内で発症しているため疾患遺伝子座異質性を考慮する必要がなく、疾患発症に決定的に寄与する原因遺伝子の同定が可能と思われる。

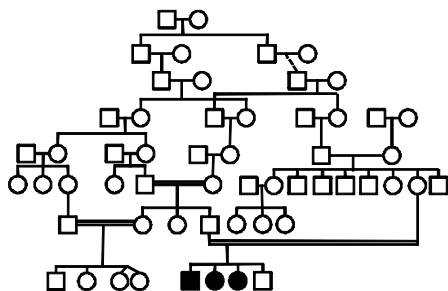


図 1) SLE を発症した血族大家系
両親が近親婚の 4 名の同胞のうち 3 名が、自己免疫性疾患 (SLE) を発症

申請者らは、すでに SNP マイクロアレイを用いた全ゲノム連鎖解析とホモ接合体マッピングを行い、疾患遺伝子座(FSLE-2、LOD 値 2.5)の同定に成功している(図 2)。

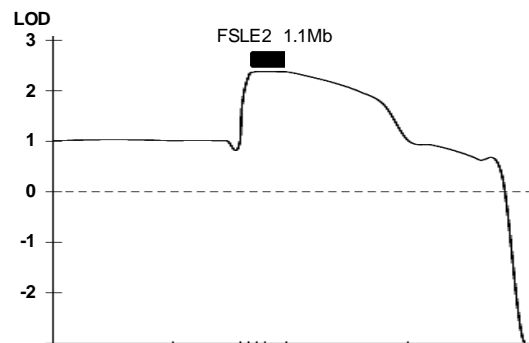


図 2) 疾患遺伝子座 FSLE-2
ホモ接合体領域 FSLE-2 に一致して、LOD 値は 2.5 と連鎖を示唆している。

(計画・方法 1)

候補遺伝子座 FSLE-2 は 1.1Mb の領域であり、転写調節因子、シグナル伝達分子など 40 個の候補遺伝子が含まれていた。全エクソンをキャプチャー後、高速シーケンサーを用いて網羅的に変異検索を行い、FSLE-2 領域に含まれる遺伝子変異を検出することにより、この家系の疾患発症を規定している単一遺伝子変異を同定することを第一の目標とする。

(1) エクソンキャプチャー・リシークエンス解析:

Agilent 社の SureSelect Target Enrichment System を用いて全エクソン領域をキャプチャーする。

(2) 高速シーケンサー解析を行う:

- ① イルミナ社の HiSeq 2000 を用いてシーケンサー解析を行う。
- ② トリミングを行い、シーケンサーの質の高いリードを選択する。
- ③ リファレンスとなるゲノムシーケンサーにリードをマップする。
- ④ リファレンスゲノムシーケンサーと異なる多型を抽出する。
- ⑤ 多型にアノテーション情報(depth、アレル頻度、既知の SNP か否か、エクソン内外の位置情報、アミノ酸変異の有無)を付加し、多型リストを作成する。

(3) データの抽出:

- 多型リストから、
- ① depth 20 以上の多型
 - ② 変異アレルの頻度が 0.8 以上のホモ接

合体である多型

- ③ SNP データベースに登録のない新規の多型
- ④ エクソン内に存在しアミノ酸変異を伴う多型あるいはエクソン・イントロン境界領域に存在するスプライシング異常を伴う多型

を条件に、候補となる多型を抽出する。

(4) 罹患同胞、非罹患同胞で比較：

4名の同胞それぞれから候補となる多型を抽出し、罹患同胞が共有し、非罹患同胞が共有しない多型を同定する。

(5) ホモ接合体領域との比較：

ホモ接合体領域 FSLE-2 に含まれる多型を選別する。

(6) 日本人健常コントロールにおけるアレル頻度を検討する：

選別した多型の、日本人健常コントロールにおけるアレル頻度を確認する。

(計画・方法2)

ゲノム解析により同定した候補遺伝子について、遺伝子破壊マウス、機能変異体トランスジェニックマウスを樹立して、遺伝子機能を個体レベルで検討し、病因となる遺伝子であるかどうかを明らかにする。

(1) 候補遺伝子の遺伝子破壊マウス、機能変異体トランスジェニックマウスの樹立：定法に従い、候補遺伝子の遺伝子改変マウスを作製する。遺伝子改変マウスを樹立し、SLE 関連表現型の有無を免疫学的、組織学的に検討する予定である。

4. 研究成果

(結果1)

4名の同胞について、Agilent社のSureSelect Target Enrichment System (Agilent SureSelect 50Mb)を用いて全エクソン領域をキャプチャーし、イルミナ社のHiSeq 2000を用いてペアエンド法でシーケンス解析を行った。その後トリミングを行いシーケンスの質の高いリードを選択し、それぞれ約20億のリードが得られた。Bwaソフトウェアを用いて得られたリードをリファレンスゲノムシーケンス(hg19)にマップした。97%のリードがマップされ、マッピングは良好であった。また、sure select probeにおける平均カバレッジは178~200であった。次に、samtoolsソフトウェアにより、リファレンスゲノムシーケンスと異なる多型を抽出し、アノテーション情報(depth、アレル頻度、既知のSNPか否か、エクソン内外の位置情報、アミノ酸変異の有無)を付加して多型リスト

を作成した。

この多型リストから、

- (1) depth 20以上の多型、
- (2) 変異アレルの頻度が0.8以上のホモ接合体である多型、
- (3) データベース(dbSNP build 134, 1000 genomes projectなど)に登録のない新規の多型、
- (4) エクソン内に存在しアミノ酸変異を伴う多型あるいはエクソン・イントロン境界領域に存在するスプライシング異常を伴う多型、

を条件に候補となる多型を抽出した。

さらに、罹患同胞が共有し、非罹患同胞が共有しない多型で、ホモ接合体領域 FSLE-2 に含まれる多型を選別したところ、1つの候補遺伝子多型が同定された。この遺伝子多型について、日本人健常コントロールにおけるアレル頻度を解析したところ、97名中2名(2%)がヘテロ接合体でこの遺伝子多型を有していた。この結果は、SLEの発症頻度が比較的高いことと矛盾しないと考えられた。さらに、この多型は候補遺伝子の機能ドメインに位置しており、アミノ酸置換を伴う多型であった。また、ミスセンス変異を生じたアミノ酸は種を超えて保存されていることから、候補遺伝子の機能において重要なアミノ酸であることが示唆された。

(結果2)

現在、候補遺伝子産物の生化学的特徴を明らかにするとともに、変異がその分子機能を変化させるメカニズムを解明するために候補遺伝子の遺伝子改変マウスを作製している。このマウスが樹立できれば、遺伝子機能を個体レベルで検討することで、候補遺伝子がどのようにSLEの病態に寄与しているかについて明らかにできると期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

全て査読有

1. Lian G, Arimochi H, Kitamura A, Nishida J, Li S, Kishihara K, Maekawa Y, Yasutomo K. Manipulation of CD98 resolves type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 188: 2227-2234 (2012) doi: 10.4049/jimmunol.1102586.
2. Iwahashi S, Maekawa Y, Nishida J, Ishifune C, Kitamura A, Arimochi H, Kataoka K, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 regulates the development of marginal zone B cells through Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 418: 701-707

(2012)doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.082.

3. Kitamura A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kawachi I, Nishizawa M, Toyoshima Y, Takahashi H, Standley DM, Tanaka K, Hamazaki J, Murata S, Obara K, Toyoshima I, Yasutomo K. A mutation in the immunoproteasome subunit PSMB8 causes autoinflammation and lipodystrophy in humans. *J Clin Invest* 121: 4150-4160 (2011) doi: 10.1172/JCI58414.

〔学会発表〕(計2件)

1. 北村明子、安友康二 反復性発熱・結節性紅斑・脂肪萎縮を特徴とする新規自己炎症性症候群の原因遺伝子同定 第114回小児科学会総会、2011年8月14日、グランドプリンスホテル高輪(東京都)
2. Akiko Kitamura, Koji Yasutomo, Candidate genetic variations in an autosomal-dominant selective immunodeficiency syndrome, International Symposium on Genome Science “Expanding Frontiers of Genome Science” January 9-10, 2013, The University of Tokyo, Ito International Research Center, (東京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 明子 (KITAMURA AKIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 10448318