

## 148. オーダーメイド医療を目指した遺伝子多型の機能解析

人見 祐基

Key words: ゲノムワイド関連解析,  
原発性胆汁性肝硬変, 遺伝子多型, 機能解析,  
オーダーメイド医療

東京大学 大学院医学系研究科  
人類遺伝学教室

### 緒言

原発性胆汁性肝硬変 (Primary Biliary Cirrhosis: PBC) は、胆管の破壊による肝臓内への胆汁うっ滞を原因とする疾患で、その発症には自己免疫の関与が想定されている<sup>1)</sup>。過去に実施された双生児を用いた遺伝学的研究より、PBCの発症において遺伝要因が強く影響することが明らかになっている<sup>2)</sup>。近年のゲノム解析技術の革新的な進歩により、疾患の罹りやすさに寄与する遺伝子多型を網羅的に探索する全ゲノム DNA 解析技術として「ゲノムワイド関連解析 (Genome Wide Association Study: GWAS)」という遺伝統計学的手法が開発され、多くの疾患や形質を対象として世界中で実施されている。我々も PBC を対象とした GWAS を実施し、*HLA*, *TNFSF15*, *POU2AF1* などの疾患感受性遺伝子を同定した<sup>3)</sup>。しかしながら、疾患感受性遺伝子領域内に存在し、発症に直接寄与する遺伝子多型や、それらに起因する PBC 発症の分子メカニズムは、未だ解明されていない。本研究では、PBC 感受性遺伝子 *TNFSF15* における第一義的な一塩基多型 (SNP) を同定し、発症に関わる分子メカニズムを解明したので、報告する。

### 方法および結果

#### 1. 生物情報学的解析・症例対照関連解析を用いた *TNFSF15* 領域の候補 SNP の選定<sup>4)</sup>

*TNFSF15* の全長は約 200 kb である。まず、遺伝子多型データベースである dbSNP には、*TNFSF15* 領域にて 3,602 ヶ所の遺伝子多型が登録されていた。この中から、1) 日本人集団において 1% 以上の頻度で存在、2) 翻訳領域・非翻訳領域・発現制御領域 (DNase I 感受性領域や H3K27Ac マーカー) のいずれかに存在、3) 転写因子の結合親和性を変える、といった基準を満たす遺伝子多型を、1,000 Genomes Project・ENCODE・HaploReg v2 などのデータベースを駆使した生物情報学的解析を利用して選定し、32 ヶ所の SNPs に絞り込んだ。

次に、これらの SNPs を対象として、日本人 PBC 患者 1,274 例および健常者 1,091 例を用いた遺伝子型タイピングおよび症例対照関連解析を実施した。その結果、rs4979462 ( $P = 1.85 \times 10^{-14}$ )、rs56211063 ( $P = 2.21 \times 10^{-14}$ ) が PBC 感受性との最も強い関連を示した。これに、rs4979462 と完全な連鎖不平衡の関係にある rs55768522 を加えた 3 ヶ所の SNPs が、最終的な候補 SNPs に絞り込まれ、いずれも発現制御領域に存在していた (図 1)。

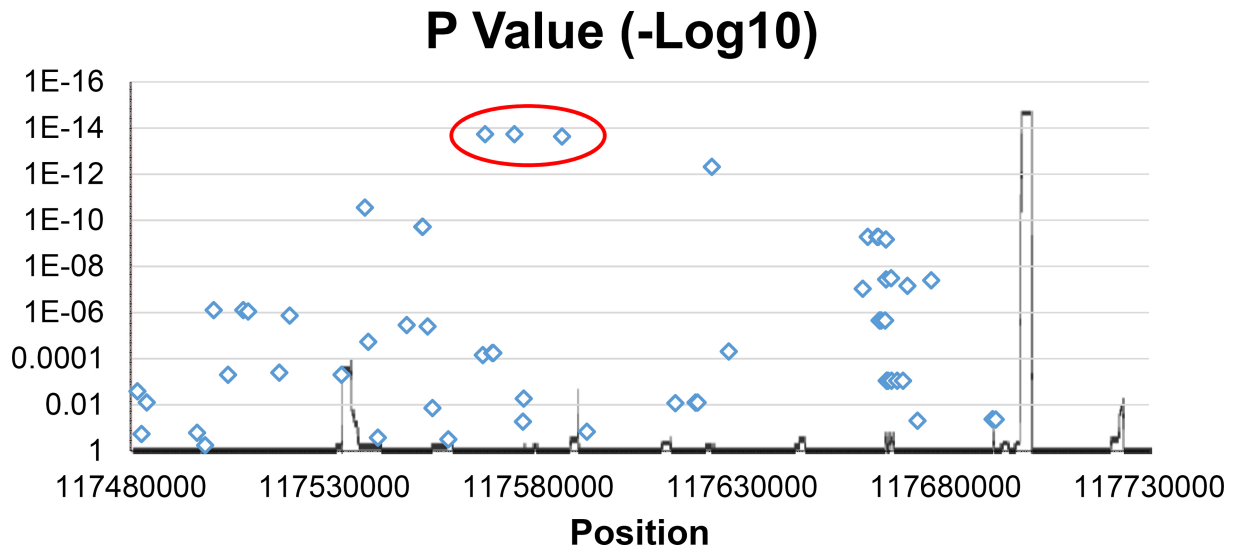


図1. *TNFSF15*領域の候補 SNP を対象とした症例対照関連解析.

生物情報学的解析を利用して選定した候補 SNPs について、日本人 PBC 患者 1,274 例・健常者 1,091 例を対象とした遺伝子型タイピングを実施し、それぞれの SNPs におけるアリル頻度を患者群・健常群で比較して  $\chi^2$  検定を実施した。縦軸が P 値（対数值）、横軸が第 9 染色体上の各 SNPs の位置を示し、各点が各 SNPs の P 値を示す。赤線で囲んだ 3 ヶ所の SNPs (rs4979462, rs56211063, rs55768522) が、最終候補の機能的 SNPs である。

## 2. *In vitro* 機能解析を用いた第一義的 SNP の同定<sup>4)</sup>

最終候補 SNPs によって転写因子との結合に差が出るか否かを、ヒト肝臓細胞腫 HepG2 の核タンパクを用いた Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) にて検討したところ、rs4979462 および rs56211063 にて、野生型アリルと PBC リスクアリルとの間でバンドシフトに差が生じた（図 2）。

さらに、これらの SNPs が転写制御に関与するか否かを、ヒト T 細胞腫 Jurkat およびヒト胆管細胞腫 HuCCT1 を利用した Luciferase assay にて検討したところ、唯一 rs4979462 においてのみ、野生型アリルと PBC リスクアリルとの間で転写活性に有意差が見られた（図 2）。以上より、*TNFSF15* の rs4979462 が、PBC の感受性に直接寄与する機能的な遺伝子多型であることが示唆された。

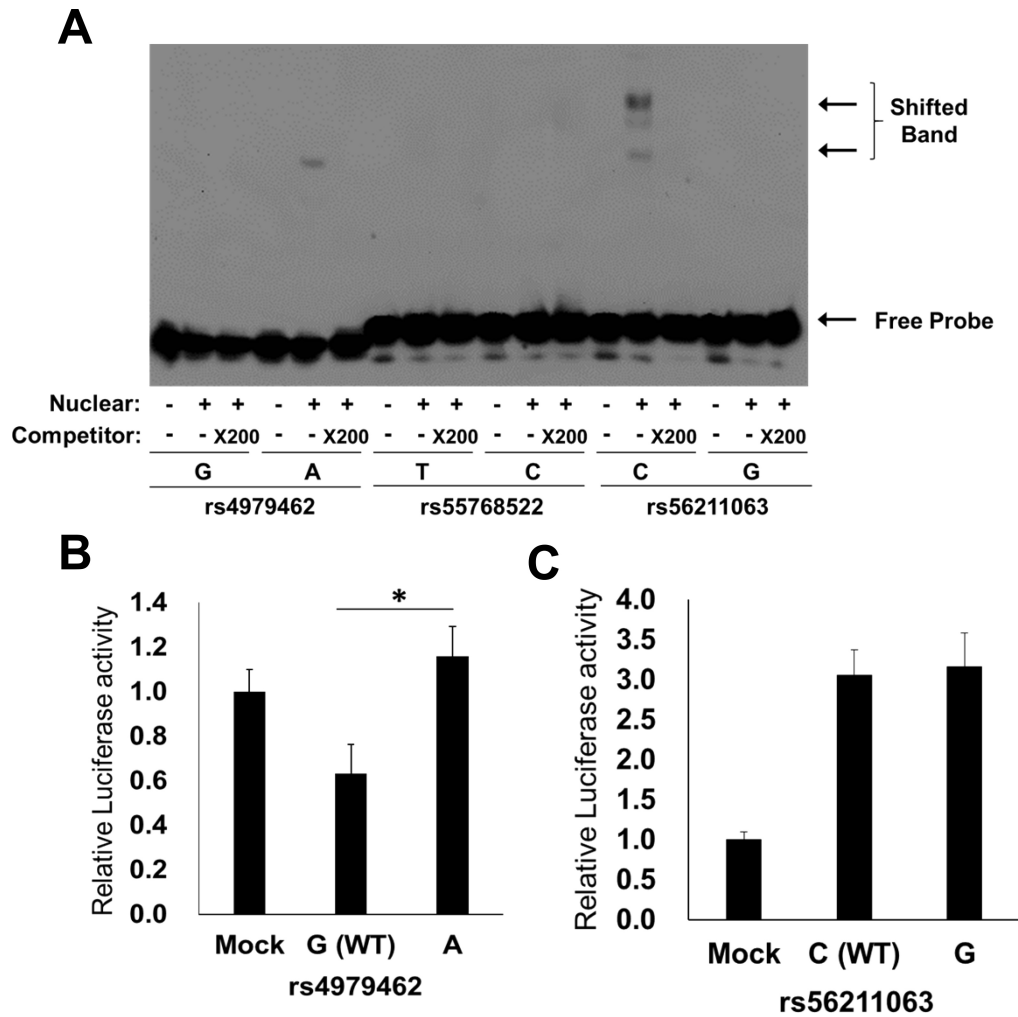


図2. rs4979462 が PBC 感受性に直接寄与する機能的 SNP である.

A) 最終候補の 3 ヶ所の SNPs を対象に, EMSA を実施した. rs4979462 および rs56211063 において, 野生型アリルと PBC リスクアリルとの間でバンドシフトの差が見られた. B, C) rs4979462 (B) および rs56211063 (C) を対象にした Luciferase assay. rs4979462 のみ, PBC リスクアリルによる Luciferase 活性の上昇が見られた. \* $P < 0.05$  (student's t-test).

### 3. PBC 感受性における rs4979462 の寄与<sup>4)</sup>

rs4979462 に起因する PBC 感受性への影響を分子レベルで明らかにするため, 更なる解析を実施した. まず, TFSEARCH を利用した生物情報学的解析によって, rs4979462 に結合している転写因子が NF-1 だと予想された. そこで, 抗 NF-1 抗体を用いた Super-shift assay を実施したところ, 前項の EMSA にてリスクアリルに生じていたシフトバンドが消失した (図 3). このことから, rs4979462 のリスクアリルによる NF-1 結合部位の形成が示唆された.

さらに, 生体内での *TNFSF15* 産生量と rs4979462 遺伝子型との相関を検討するため, GENEVAR を利用した e-QTL 解析を実施したところ, PBC リスクアリルを有する健常者の B 細胞において *TNFSF15* mRNA 発現レベルの有意な上昇が確認された (図 3).

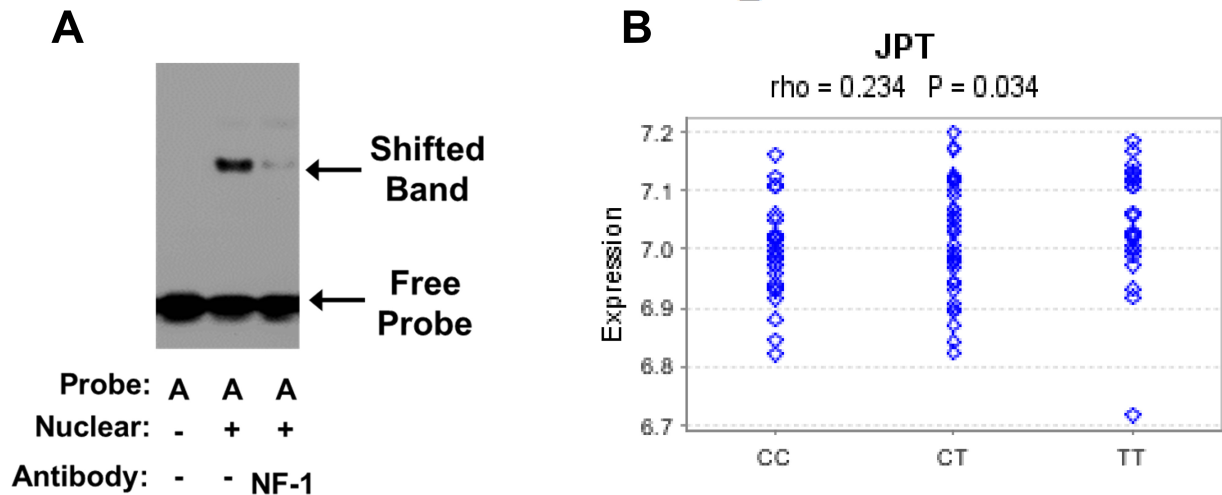


図3. rs4979462によりNF-1結合部位が生じ、*TNFSF15*発現のエンハンサー活性を亢進させる。

A) rs4979462を対象にしたSuper-shift assay. 抗NF-1抗体により、PBCリスクアリルによって生じたシフトバンドの消失が見られた。B) GENEVARを利用したe-QTL解析。PBCリスクアリル(T)を有する健常者のB細胞において*TNFSF15*mRNA発現レベルの有意な上昇が確認された。

## 考 察

本研究により、PBC感受性遺伝子*TNFSF15*に存在し発症に直接寄与する遺伝子多型として、rs4979462を同定した。さらに、rs4979462のPBCリスクアリルが新たなNF-1結合部位を形成し、*TNFSF15*発現のエンハンサーとして機能することにより、過剰な*TNFSF15*産生、さらには、炎症惹起およびPBC発症へと導かれる可能性が示唆された。既に同定されているほかのPBC感受性遺伝子に対しても同様の解析を実施することで、新たな創薬標的分子が見出されるばかりか、遺伝子多型を利用した「PBC発症予測キット」の開発など、個々の遺伝要因に基づき最適な医療を選択する「オーダーメイド医療」へと展開する可能性がある。

その一方で、GWASを用いた網羅的解析をもってしても、多因子疾患の遺伝要因の大部分は未解明だとされている<sup>5)</sup>。今後は、さらに大規模なGWASに加え、次世代シーケンサーを利用する全ゲノムシーケンス解析やエクソーム解析により、疾患発症に対し高リスクな稀少変異の網羅的探索や、1,000人規模の健常者全ゲノムシーケンス配列を利用したインピュテーション解析なども適用され、遺伝要因の解明がよりいっそう進展することが予想される。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野の徳永勝士および長崎医療センター臨床研究センターの中村 稔である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Kaplan, M. M. & Gershwin, M. E. : Primary biliary cirrhosis. *New Engl. J. Med.*, **353** : 1261-1273, 2005.
- 2) Selmi, C., Mayo, M. J., Bach, N., Ishibashi, H., Invernizzi, P., Gish, R. G., Gordon, S. C., Wright, H. I., Zweiban, B., Podda, M. & Gershwin, M. E. : Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: Genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology*, **127** : 485-492, 2004.
- 3) Nakamura, M., Nishida, N., Kawashima, M., Aiba, Y., Tanaka, A., Yasunami, M., Nakamura, H., Komori, A., Nakamuta, M., Zeniya, M., Hashimoto, E., Ohira, H., Yamamoto, K., Onji, M., Kaneko, S., Honda, M., Yamagiwa, S., Nakao, K., Ichida, T., Takikawa, H., Seike, M., Umemura, T., Ueno, Y., Sakisaka, S., Kikuchi, K., Ebinuma, H., Yamashiki, N., Tamura, S., Sugawara, Y., Mori, A., Yagi, S., Shirabe, K., Taketomi, A., Arai, K., Monoe, K., Ichikawa, T., Tani, M., Miyake, Y., Kumagi, T., Abe, M., Yoshizawa, K., Joshita, S., Shimoda, S., Honda, K., Takahashi, H., Hirano, K., Takeyama, Y., Harada, K., Migita, K., Ito, M., Yatsushashi, H., Fukushima, N., Ota, H., Komatsu, T., Saoshiro, T., Ishida, J., Kouno, H., Kouno, H., Yagura, M., Kobayashi, M.,

- Muro, T., Masaki, N., Hirata, K., Watanabe, Y., Nakamura, Y., Shimada, M., Hirashima, N., Komeda, T., Sugi, K., Koga, M., Ario, K., Takesaki, E., Maehara, Y., Uemoto, S., Kokudo, N., Tsubouchi, H., Mizokami, M., Nakanuma, Y., Tokunaga, K. & Ishibashi, H. : Genome-wide association study identifies *TNFSF15* and *POU2AF1* as susceptibility loci for primary biliary cirrhosis in the Japanese population. *Am. J. Hum. Genet.*, **91** : 721-728, 2012.
- 4) Hitomi, Y., Kawashima, M., Aiba, Y., Nishida, N., Matsushashi, M., Okazaki, H., Nakamura, M. & Tokunaga, K. : Human primary biliary cirrhosis susceptible allele of rs4979462 enhances TNFSF15 expression by binding NF-1. *Hum. Genet.*, **134** : 737-747, 2015.
- 5) Manolio, T. A., Collins, F. S., Cox, N. J., Goldstein, D. B., Hindorff, L. A., Hunter, D. J., McCarthy, M. I., Ramos, E. M., Cardon, L. R., Chakravarti, A., Cho, J. H., Guttmacher, A. E., Kong, A., Kruglyak, L., Mardis, E., Rotimi, C. N., Slatkin, M., Valle, D., Whittemore, A. S., Boehnke, M., Clark, A. G., Eichler, E. E., Gibson, G., Haines, J. L., Mackay, T. F., McCarroll, S. A. & Visscher, P. M. : Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*, **461** : 747-753, 2009.