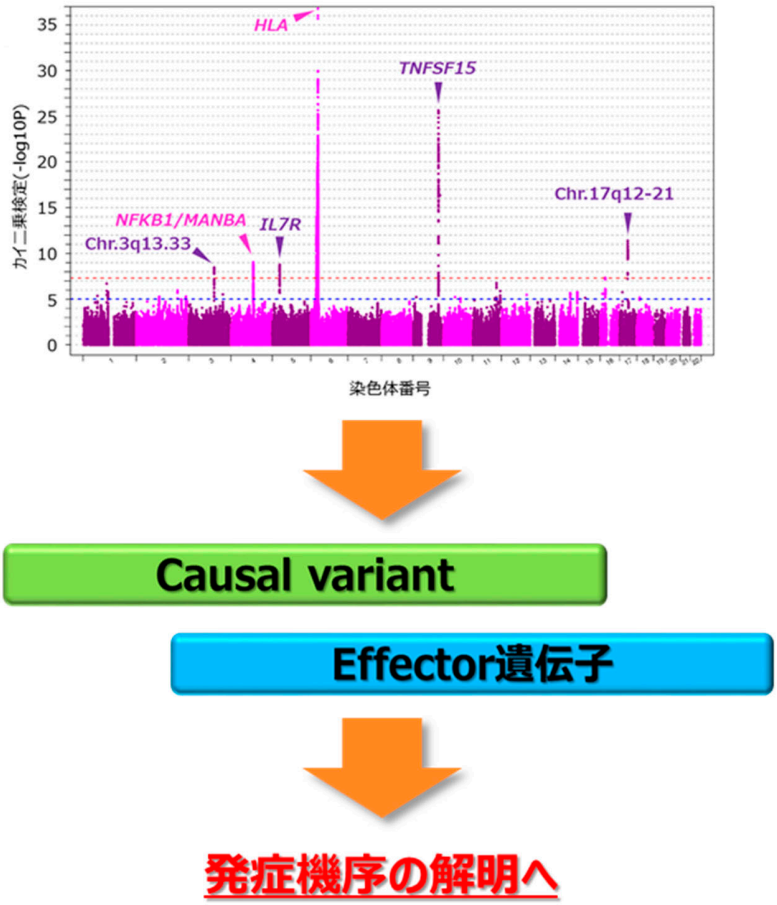
153　多因子疾患の個別化医療実現を目指すpost-GWAS解析	人見　祐基

【目的】多因子疾患の感受性遺伝子探索法であるゲノムワイド関連解析（GWAS）単独では、「発症に直接関与する機能的遺伝子多型（causal variant）」を同定し、それに起因する発症機序を解明することが困難である。近年、GWAS・全ゲノム DNA 配列データ・機能解析の三者を組み合わせる post-GWAS 研究の基盤がようやく整ったため、多因子疾患の一つである原発性胆汁性胆管炎（PBC）を対象とした post-GWAS 研究を実施した。

【方法】本研究では、PBC を対象にした GWAS データ（Kawashima M et al, 2017）と東北大学東北メディカル・メガバンク機構（ToMMo）が保有する日本人全ゲノム DNA 配列データを利用した全ゲノムインピュテーションおよび症例対照関連解析、および *in silico* / *in vitro* 機能解析を実施した。

【結果】過去の報告と本研究により、すべての日本人 PBC 感受性遺伝子領域における causal variant およびそれに起因する発症機序の解明へと至った。さらに、PBC 感受性との強い関連を示す SNPs の一部は、近傍の遺伝子ではなく、やや離れた遺伝子（エフェクター遺伝子）を制御していた。

GWAS から発症機序の解明へ



153. 多因子疾患の個別化医療実現を目指す post-GWAS 解析

人見　祐基

東京大学 大学院医学系研究科 人類遺伝学分野

Key words：ゲノムワイド関連解析（GWAS），原発性胆汁性胆管炎（PBC），遺伝子多型，インピュテーション，機能解析

緒　言

多因子疾患の疾患感受性遺伝子の網羅的探索法として、ゲノムワイド関連解析（GWAS）が世界中で実施されている［1］。ただしGWASは、一塩基多型（SNP）の約5%のみを「遺伝子多型マーカー」として解析対象とするため、疾患感受性遺伝子領域に存在する「発症に直接関与する機能的遺伝子多型（causal variant）」を同定し、それに起因する発症機序を解明することは、GWAS単独では不可能である。即ち、多因子疾患を対象としたGWASの成果を臨床へと昇華させるために、両者の架け橋となるPost-GWAS研究が必須となる。

最近、全ゲノムDNA配列データベースの構築に伴い、GWAS実施検体において、「遺伝子多型マーカー」の遺伝子型情報からの全ゲノムDNA配列の復元（インピュテーション解析）が可能となった。その結果、一般的にGWAS単独での多因子疾患発症における遺伝要因解明率は僅か10%程度だったものが、全ゲノムインピュテーションによってそれが57%に達する事例が出てきた［2］。さらに、大規模な網羅的実験データと情報解析技術の融合によって、多様な遺伝子多型機能予測データベースが構築された。それ故、GWAS・全ゲノムDNA配列データ・機能解析の三者を組み合わせるpost-GWAS研究の基盤がようやく整ってきたところである。

本研究では、多因子疾患の一つである原発性胆汁性胆管炎（PBC）を対象としたpost-GWAS研究を実施したので、その成果を報告する。

方　法

PBCを対象にしたGWASデータ［3］と、東北大学東北メディカル・メガバンク機構（ToMMo）が保有する日本人全ゲノムDNA配列データ［4］の両者を利用し、全ゲノムインピュテーションを実施した。そこから得られた、日本人PBC感受性遺伝子領域内（Chromosome 17q12-21、*NFKB1/MANBA*、Chromosome 3q13.33）のすべての遺伝子多型における遺伝子型情報を元に症例対照関連解析を実施し、ゲノムワイド有意水準（$P < 5.0\times10^{-8}$）をクリアしたSNPsを選定した。

この中から、翻訳領域・非翻訳領域・発現制御領域のいずれかに位置するSNPsを、Polyphen2，RegulomeDBなどの各種データベースを駆使した*in silico*解析にて選定し、causal variantの候補とした。

これらの候補SNPsを対象に、ヒト肝臓細胞株HepG2およびヒトT細胞株Jurkatの核タンパクを用いたelectrophoretic mobility shift assay（EMSA）およびLuciferase assayを実施し、causal variantを同定した。

また、アリル間で結合の差が生じる転写因子を、TFSEARCHを利用した*in silico*解析およびSuper-shift assayにて同定した。さらに、GTEx portalを利用したe-QTL解析を実施し、causal variantが発現量を制御する遺伝子を網羅的に探索した。

結　果

まず、Chromosome 17q12-21 の causal variant 候補 4 SNPs（rs9303277、rs113897057、rs2313430、rs12946510）のうち、転写因子 FOXO1 の結合に影響を与える rs12946510 を causal variant として同定した。この SNP は、近傍に存在する *IKZF3* ではなく、約 200 kb 離れた *ORMDL3* および *GSDMB* の発現量を制御していた（図 1）[5]。

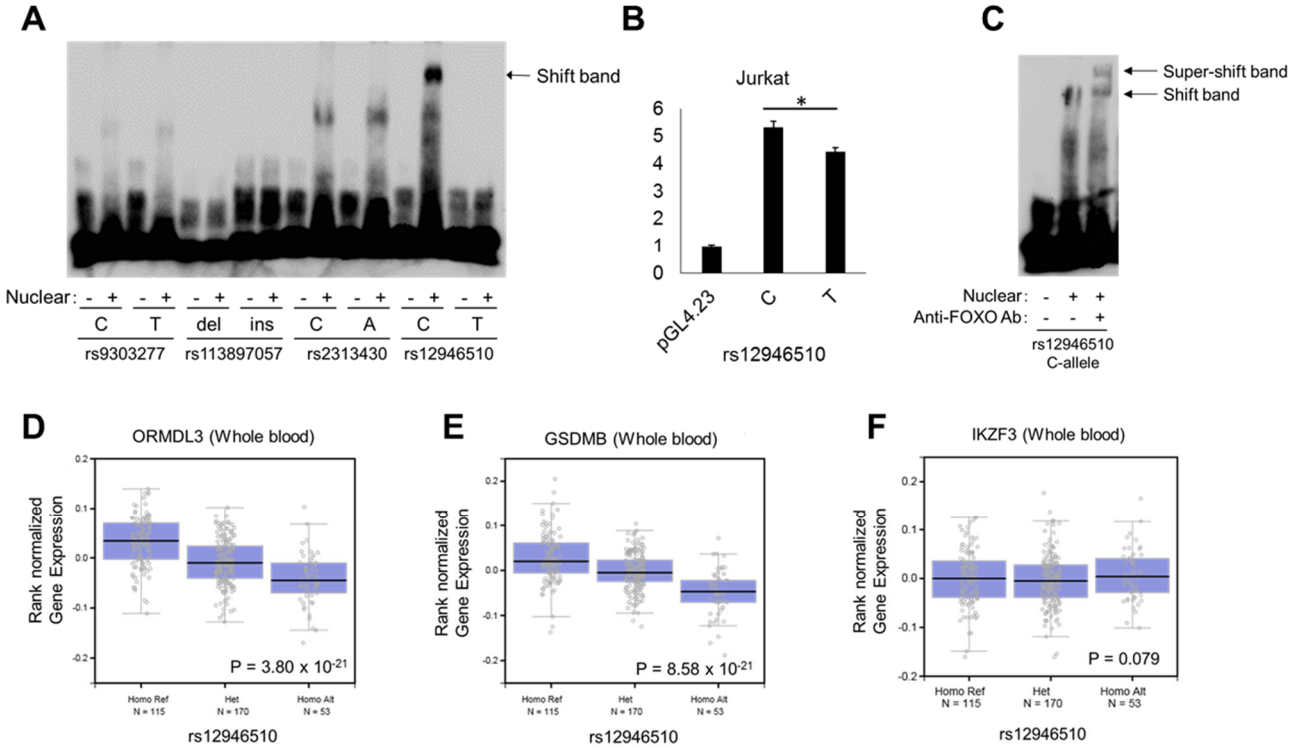


図 1.　Chromosome 17q12-21 における rs12946510 の寄与

（A）causal variant 候補 4 SNPs を対象とした EMSA。（B）rs12946510 の Luciferase assay。*P < 0.05（Student's t-test）。（C）rs12946510 の Super-shift assay。転写因子 FOXO1 を同定。（D～F）rs12946510 の eQTL 解析。rs12946510 は *ORMDL3* および *GSDMB* の発現量に強い相関が見られるが、最も近傍にある *IKZF3* 発現量との相関は見られない。

次に、*NFKB1/MANBA* の causal variant 候補 7 SNPs（rs230534、rs2272676、rs230504、rs17032850、rs3774959、rs7678055、rs227361）のうち、転写因子 LEF1 および RXR α の結合に影響を与える rs17032850 および rs227361 を causal variants として同定した。これらの SNPs は、近傍に位置する多数の遺伝子発現量を制御していた（図 2）[1]。

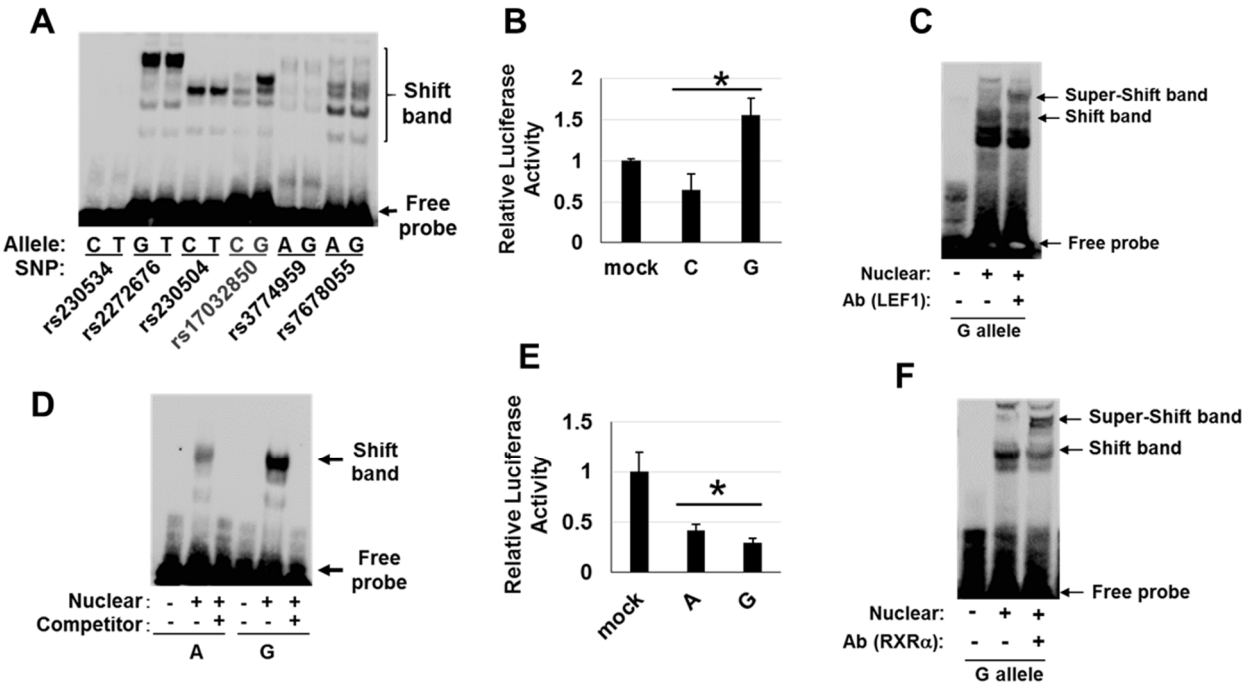


図 2. *NFKB1/MANBA* における rs17032850 および rs227361 の寄与

(A) *NFKB1* 側の causal variant 候補 6 SNPs を対象とした EMSA。(B) rs17032850 の Luciferase assay。*P < 0.05。(C) rs17032850 の Super-shift assay。転写因子 LEF1 を同定。(D) *MANBA* rs227361 を対象とした EMSA。(E) rs227361 の Luciferase assay。*P < 0.05 (Student's t-test)。(F) rs227361 の Super-shift assay。転写因子 RXRα を同定。

最後に、Chromosome 3q13.33 の causal variant 候補 2 SNPs (rs2293370、rs56008261) のうち、転写因子 RUNX1 の結合に影響を与える rs2293370 を causal variant として同定した。この SNP は、近傍に存在する *TIMMDC1* や *CD80* ではなく、*POGLUT1* の発現量を制御していた (図 3) [2]。

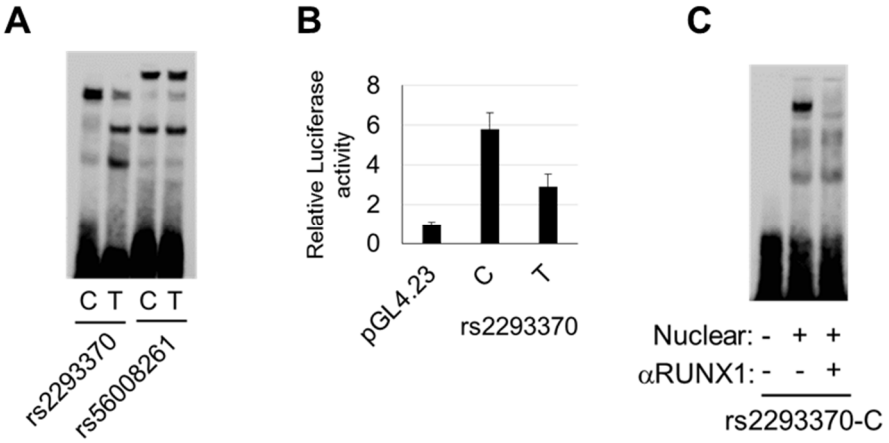


図 3. Chromosome 3q13.33 における rs2293370 の寄与

(A) causal variant 候補 2 SNPs を対象とした EMSA。(B) rs2293370 の Luciferase assay。*P < 0.05 (Student's t-test)。(C) rs2293370 の Super-shift assay。転写因子 RUNX1 を同定。

考　察

本研究および *TNFSF15*［6］、*IL7R*［7］を対象とした研究により、ハプロタイプによる寄与が強いと想定される *HLA* を除いたすべての日本人 PBC 感受性遺伝子において、causal variant およびそれに起因する発症機序の解明に加え、発現量が制御される遺伝子（エフェクター遺伝子）の同定へと至った。たいへん興味深いことに、PBC 感受性との強い関連を示す SNPs が、必ずしも近傍の遺伝子だけではなく、やや離れた遺伝子も制御しうる実例が示された。即ち、GWAS の成果を臨床へ応用するためには、GWAS 単独では不十分であり、各疾患感受性遺伝子を対象とする post-GWAS 研究にて causal variant およびエフェクター遺伝子を同定することが重要である。

今後は、GWAS の成果を臨床へと昇華させるために、それぞれのエフェクター遺伝子による相互作用からの発症機序探索など、GWAS からさらに発展した研究が期待される。さらに、大規模な国際共同研究にて未知の遺伝要因を探索することにより、遺伝子多型を利用した「PBC 発症予測キット」の開発など「個別化医療」への展開を見据えた研究も同様に期待される。

共同研究者・謝辞

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、長崎医療センターの中村稔、東北大学東北メディカル・メガバンク機構の長崎正朗である。

文　献

1） A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies (https://www.genome.gov/gwastudies/).

2） Yang J, *et al.* Genetic variance estimation with imputed variants finds negligible missing heritability for human height and body mass index. Nat Genet 47: 1114-1120, 2015. DOI: 10.1038/ng.3390.

3） Kawashima M, *et al.* Genome-wide association studies identify *PRKCB* as a novel genetic susceptibility locus for primary biliary cholangitis in the Japanese population. Hum Mol Genet 26: 650-659, 2017. DOI: 10.1093/hmg/ddw406.

4） Nagasaki M, *et al.* Rare variant discovery by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals. Nat Commun 6: 8018, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9018.

5） Hitomi Y, *et al.* Identification of the functional variant driving *ORMDL3* and *GSDMB* expression in human chromosome 17q12-21 in primary biliary cholangitis. Sci Rep 7: 2904, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-03067-3.

6） Hitomi Y, *et al.* Human primary biliary cirrhosis-susceptible allele of rs4979462 enhances *TNFSF15* expression by binding NF-1. Hum Genet 134: 737-747, 2015. DOI: 10.1007/s00439-015-1556-3.

7） Gregory SG, *et al.* Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. Nat Genet 39: 1083-1091, 2007. DOI: 10.1038/ng2103.