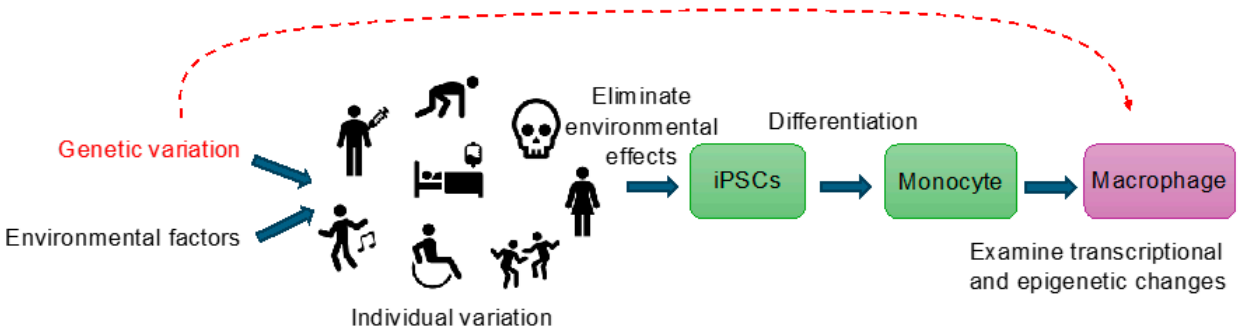
113　iPS細胞を用いたCOVID-19重症化リスクSNPの機能検証	北川　瑶子

【目的】本研究では新型コロナウイルス感染症の重症化における遺伝的リスクの作用機序解明を目的とした。昨今のパンデミックで強調されたように感染時の症状には大きな個人差があり、一塩基多型（SNP）などの遺伝的要因や環境要因が寄与する。ゲノム解析により多くの SNP について疾患発症リスクとの関連が報告されているが、機能検証はほとんど行われていない。その一因として臨床検体の環境要因によるばらつきや採取できる細胞数の制限がある。本研究ではヒト多能性幹細胞（iPS 細胞）に初期化することで環境要因を排除し、感染時に最前線で働くプレーヤーであるマクロファージに分化させることで SNP の影響を精査することを目指した。また、iPS 細胞の増殖能やゲノム編集しやすい特徴を活かして作用機序解明を行った。SNP 下流のメカニズムを明らかにすることにより、今後遺伝的リスクを克服する介入法開発につながると考えられる。さらに本研究成果により遺伝的リスクの高い個人をゲノムレベルで特定し、今後の個別化医療の基盤構築に貢献することを目標とした。

【方法】GWAS 解析により新型コロナウイルス感染により入院するケースと相関があると報告されている SNP のうち、マクロファージで発現する遺伝子近傍の SNP 2 種を対象とした。これらリスク SNP を保有するドナー由来 iPS 細胞を収集し、マクロファージに分化させた。マクロファージの表現型は RNA-seq およびエピゲノム修飾の ChIP-seq により行い、SNP ジェノタイプと相関する特徴を調べた。さらに、メカニズム解析を行うため、SNP 領域のエピゲノム修飾や結合する転写因子を ChIP-seq により明らかにした。また、SNP の機能性証明のため、野生型クローンにリスク SNP を導入し、マクロファージに分化させて表現型解析を行った。

【結果】本研究で対象とした 2 つの SNP のうち 1 つについては iPS 細胞由来マクロファージにおいて近傍遺伝子への発現変動を認めなかったが、もう 1 つの SNP は近傍の複数の遺伝子発現を低下させた。臨床検体を用いた eQTL 解析では通常数百検体必要であるのに対し、iPS 細胞由来マクロファージを用いた eQTL 解析ではわずか各群 5 検体で有意差を得ることができ、本研究アプローチの感度の高さが強調された。次に、iPS 細胞の増殖させやすい特徴を活用して、iPS 細胞由来マクロファージにおける転写エピゲノム制御を ChIP-seq により解析したところ、複数の遺伝子を含む広いゲノム領域においてエンハンサー活性が落ちていることが明らかになった。さらに、リファレンスクローンをゲノム編集してリスク SNP を導入したところ、リスクアレルを持つクローンの表現型とは逆に周辺遺伝子の発現を上昇させた。この結果から linkage disequilibrium ブロック内の SNP の複雑な相互作用とそれぞれの SNP の機能を精査することの重要性が示された。

iPS 細胞を活用した遺伝的要素の評価システム



113. iPS 細胞を用いた COVID-19 重症化リスク SNP の機能検証

北川　瑶子

京都大学 iPS 細胞研究所 齋藤潤研究室

Key words：SNP，iPS 細胞，COVID-19，マクロファージ，個別化医療

緒　言

昨今の新型コロナウイルス感染症のパンデミックで強調された通り、感染症に対する免疫反応には大きな個人差がある。この個人差は遺伝的要因と環境要因が合わさって生まれ、環境要因については正確に把握することが難しい一方、遺伝的要因は近年のヒトゲノム解析により数値化できるようになった。特に、数百塩基に一つの頻度で存在する一塩基多型（SNP）が、これまで漠然と理解されてきた体質の個人差に関与していることが明らかになった。これは個別化医療を実現可能にする革新的なステップであると考えられる。しかし、ほとんどの SNP について機能検証や作用機序解明が行われていない。その原因として、臨床検体を用いた解析では食生活、加齢、感染症の有無など環境要因によるばらつきが大きいことや、採取できる細胞数に制限があることが挙げられる。そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞（iPS 細胞）に初期化した後マクロファージに分化させることで、環境要因による影響を除去し、COVID-19 重症化リスク SNP の機能および作用機序を精査することを目的とした。このアプローチにより少数の検体数でもリスク SNP が及ぼす近傍遺伝子発現調節への影響が明らかになり、詳細な分子メカニズム解析の結果、大規模な転写エピゲノム制御の変化が起きることが示された。

方　法

1. 対象 SNP の選択と細胞株

COVID-19 の GWAS 解析データベース（https://rgc-covid19.regeneron.com/）より、COVID-19 陽性かつ入院の検体と COVID-19 陽性で入院でない検体を比較した際にエンリッチされている SNP を対象とし、近傍にマクロファージで発現している遺伝子が存在するものに絞った。本研究では二つの SNP を対象とした。これらの SNP について、すでに所属研究室で保有している健常人由来 iPS 細胞のジェノタイプを調べ、ref/ref、ref/alt、alt/alt のクローンを各群 5～6 検体ずつ集めた。この際、ドナーの性別はすべて女性とした。

2. iPS 細胞の維持とマクロファージ分化

StemFit AK02N 培地で iPS 細胞の維持を行った。マクロファージ分化を行う際には、day 14 まで無血清培地を用いて中胚葉、血管内皮、血球前駆細胞を経て単球分化を行い、day 14 に CD14 陽性単球をソートした後、MCSF 添加によりマクロファージに分化させた。また、ウイルス感染環境を模倣するため、採取したマクロファージは 24 時間 IFN-α刺激を行った。

3. iPS 細胞由来マクロファージにおける eQTL（expression Quantitative Trait Loci）解析

マクロファージを採取し、RNA-seq を行った。グローバルな発現解析から、近傍遺伝子を中心に eQTL 効果のある遺伝子を検出した。

4. SNP 下流の分子メカニズム解析

リスク SNP の存在により影響を受ける分子メカニズムを同定するため、エピゲノム修飾および様々な転写因子のクロマチン免疫沈降（ChIP-seq）を行った。

5. 単一リスク SNP の導入

リスクアレルには対象リスク SNP のほかにも linkage disequilibrium により引き継がれる SNP が複数存在し、表現型に直接影響を及ぼす機能性 SNP を同定するため、野生型アレルを持つ iPS 細胞クローンに単一リスク SNP を導入した。リスク SNP を含む ssODN を用いた Crispr-Cas9 法によりゲノム編集を行い、サンガーシーケンスによりリスク SNP がノックインされたクローンを同定した。

結果および考察

1. iPS 細胞由来マクロファージを用いた SNP の eQTL 解析

まず我々が注目した一つ目の新型コロナウイルス感染症重症化関連 SNP は臨床検体を用いた解析ではリスク SNP により近傍遺伝子の発現が下がるとの結果が出ていたが、iPS 細胞由来マクロファージを用いた解析では同じ傾向が認められなかった。この結果により、この SNP が影響を及ぼす細胞はマクロファージでない可能性、あるいは iPS 細胞由来マクロファージがこのリスク SNP の影響を調べるのに適していない可能性が示唆された。一方、二つ目の SNP については、臨床検体を用いた eQTL 解析では発現が上がるという報告と下がるという報告が混在していたが［1]、本研究では近傍の複数の遺伝子発現を下げることが明らかになった（図 1）。臨床検体を用いた eQTL 解析が通常数百検体必要であるのに対し［2]、iPS 細胞由来マクロファージを用いた eQTL 解析ではわずか各群 5 検体で有意差を得ることができ、本研究アプローチの感度の高さが強調された。また、通常 SNP に一番近い遺伝子の発現に影響が及ぶことが予想されるが、この SNP は一番近い遺伝子の発現だけでなく、その隣の複数の遺伝子の発現を低下させた。

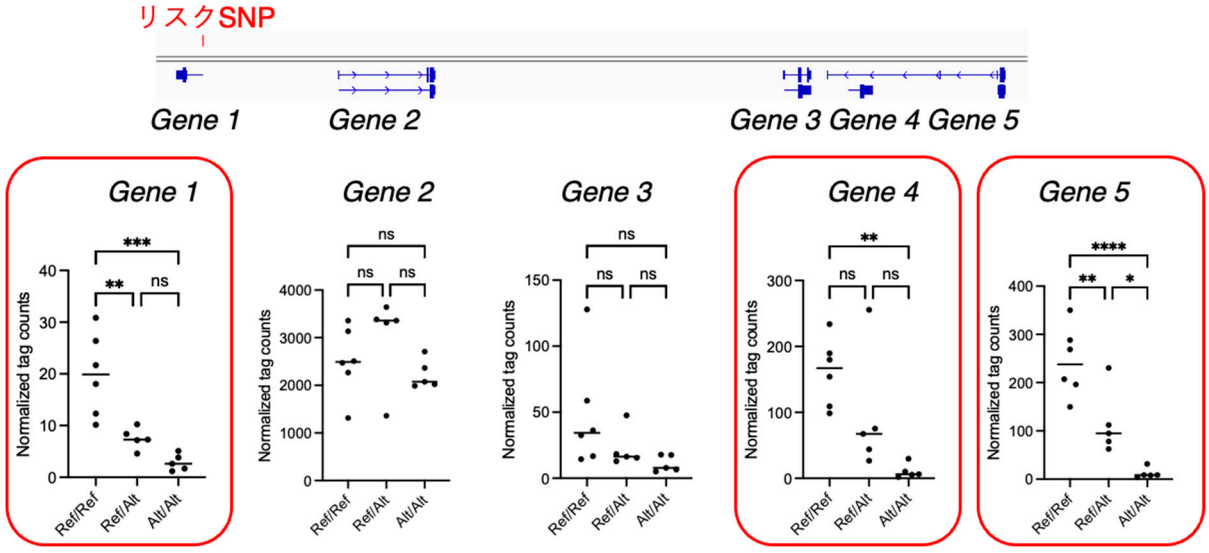


図 1. リスク SNP の近傍遺伝子発現への影響

iPS 細胞由来マクロファージにおいて、リスク SNP の有無により近傍遺伝子の発現を調べた結果、最も近傍の遺伝子のみでなく、離れた遺伝子の発現も低下させた。ns： $P \geqq 0.05$、* $P < 0.05$、** $P < 0.01$、*** $P < 0.001$、**** $P < 0.0001$（One-way ANOVA, followed by Holm–Sidak's multiple comparisons test）。

2. リスク SNP による大規模なエピゲノム修飾変動

次に、リスク SNP が引き起こす発現変動の分子メカニズムを調べた。活性化したエンハンサー状態を示すヒストン修飾 H3K27ac の ChIP-seq を行ったところ、SNP 領域では活性の変化がなかったものの、離れた複数の領域で H3K27ac シグナルの低下を認めた。これらの領域は既報でリスク SNP 領域とのクロマチン相互作用が報告されている領域であり、SNP により塩基が変わることで、結合できる転写因子が変わり、クロマチン相互作用を示す領域のエンハンサー活性が落ちたというシナリオが考えられた。そこで、マクロファージで発現する転写因子の ChIP-seq を行ったところ、エピゲノム修飾変動領域全体に及んで複数の転写因子の結合が変わることが明らかになった（図 2)。

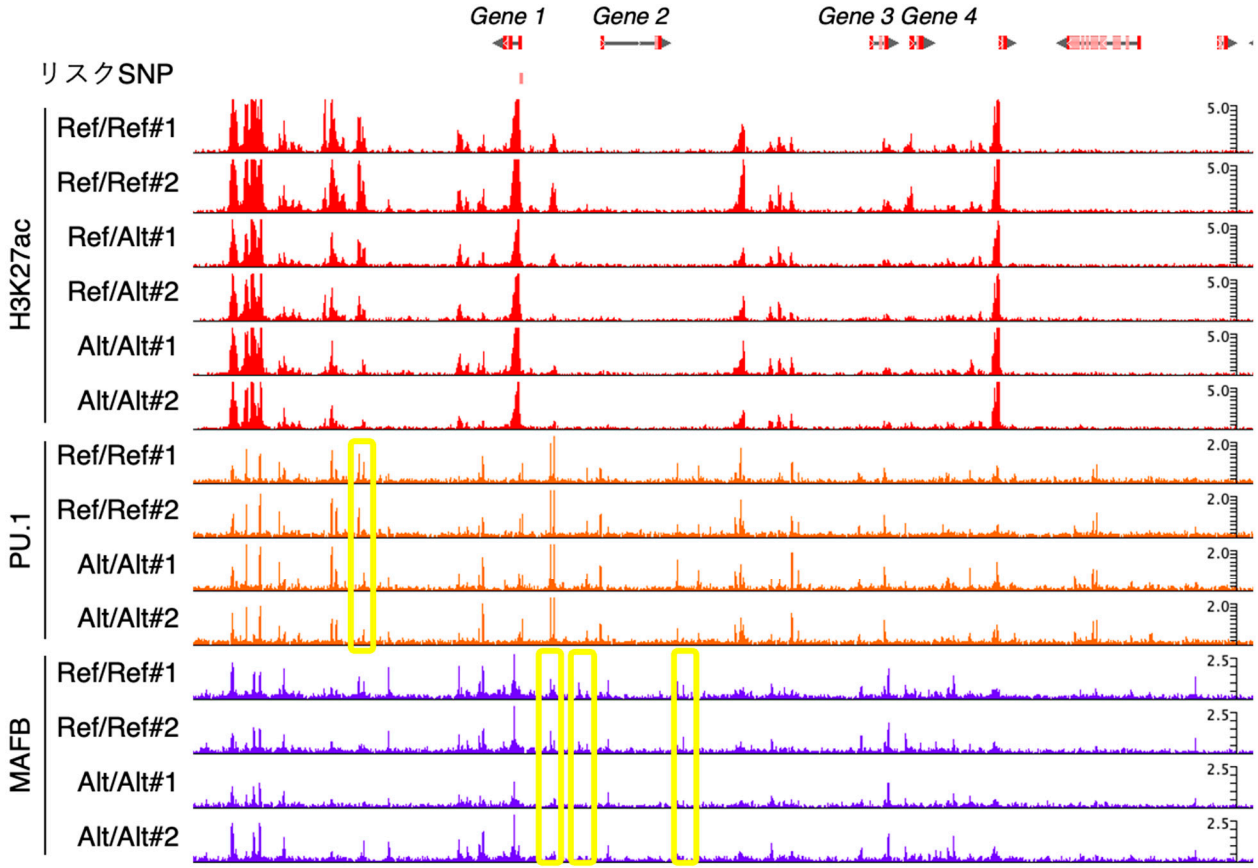


図 2. リスク SNP の近傍エピゲノム修飾および転写因子結合への影響
iPS 細胞由来マクロファージにおいて、リスク SNP の有無により近傍ゲノム領域のエンハンサー活性および転写因子結合を調べた結果、大規模なエピゲノム変動と転写因子の結合変化が起こっていることが明らかになった。

3. リスク SNP の導入

GWAS 解析で機能性 SNP と推測された SNP が単一で上記の表現型をもたらすかを検証するため、リファレンスアレルを持つクローンにリスク SNP を単独で導入した。リファレンスクローンと同様にマクロファージに分化させ表現型解析を RNA-seq により行ったところ、予想外に近傍遺伝子の発現を上昇させた。リスクアレルを持つクローンでは周辺遺伝子の発現が低下していたことから、リスク SNP 単体の影響は真逆であり、この上昇を無効にするより強い SNP が近傍に存在する可能性が考えられた。また、この結果により、LD ブロック内に位置する SNP の複雑な相互作用が明らかになり、本研究のような詳細な機能解析の重要性が強調されたと考える。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行にご協力いただいた京都大学 iPS 細胞研究所齋藤潤研究室の皆様ならびに、本研究のご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Stikker BS, Stik G, van Ouwerkerk AF, Trap L, Spicuglia S, Hendriks RW, Stadhouders R. Severe COVID-19-associated variants linked to chemokine receptor gene control in monocytes and macrophages. Genome Biol. 2022 Apr 14;23(1):96. doi: 10.1186/s13059-022-02669-z. PMID: 35421995; PMCID: PMC9009160.

2） Westra HJ, Franke L. From genome to function by studying eQTLs. Biochim Biophys Acta. 2014 Oct;1842(10):1896-1902. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.024. Epub 2014 May 4. PMID: 24798236.