自己免疫疾患の病因研究としてのゲノム研究

* はじめに

自己免疫疾患は障害臓器特異性の高低や抗原特異性の高低、男女比、年齢分布、有病率など、様々な点で多彩な疾患の集まりであるが、その多様性を決めている要因の中には遺伝要因がある。本稿では、SNPタイピングによるGWAS(ゲノムワイドアソシエーションスタディ)までの遺伝因子解析による自己免疫疾患の遺伝因子研究の成果を概観したのち、次世代シークエンシング技術をはじめとする技術発展が可能にしつつあるゲノム解析技術が、病因遺伝因子のさらなる解明に向けてどのような役割を果たしつつあるかを解説する。

* 自己免疫疾患の遺伝因子解析の成果
  + 成果のリスト

自己免疫疾患の遺伝性の存在は特定の自己免疫性疾患の家系内集簇や、複数の自己免疫疾患の同一家系内集簇などから疑われてきた。その遺伝因子解析は、他の疾患のそれと同じく、双生児・家系内発症研究による遺伝率の推定に始まり、HLA型を含む標的遺伝子アプローチによる関連遺伝子の同定、家系例・罹患同胞対解析による関連遺伝子座位の検出を経た後、SNPタイピングによるGWAS手法が2000年代半ばから多くの複合遺伝性疾患に適用され、数多くの疾患リスクバリアントが同定された。代表的な自己免疫疾患の解析成果のまとめを表1(…より改変)に引用として示す。なお、表の値は成果の採用基準により、かなり変動することに注意することが必要である。その理由は条件の異なる複数の解析がなされており、それらを統合すること自体がゲノム疫学分野の主要な課題の一つであるという事実とも関係する。実際、遺伝因子解析の成果は日々追加され、その統合も単純ではないため、遺伝因子解析の成果は、データベース化した上で、利用者が用途に応じて使用することが望ましいという考え方に立っていると言える。表に掲載されていない疾患や異なる基準での集計等の用には、GWAS catalog (GWASの成果の検索サイト <https://www.ebi.ac.uk/gwas/home>) OMIM (Online Mendelian Inheritance in Men)(単一遺伝性疾患から複合遺伝性疾患までの遺伝因子解析の成果の概説サイト <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> ) Public Health Genomics Knowledge Base(v1.0) (疾患・健康関連のゲノム成果の検索サイト <https://phgkb.cdc.gov/GAPPKB/> )などが利用できる。

表１

From Autoimmune diseases — connecting risk alleles with molecular traits of the immune system Maria Gutierrez-Arcelus, Stephen S. Rich & Soumya Raychaudhuri　Nature Reviews Genetics 17, 160–174 (2016) doi:10.1038/nrg.2015.33

* + 成果の特徴と解釈
    - 免疫系遺伝子・薬剤標的候補遺伝子

リスクバリアントを有する遺伝子として挙がったものの中には自然免疫系・獲得免疫系の遺伝子が数多く含まれており、特定の免疫機能のパスウェイ上に複数の関連遺伝子が見出されることもあった。最も大きな存在はHLA領域である。この領域にあるHLA分子をコードする遺伝子には、多くの自己免疫疾患に疾患特異的リスクハプロタイプが見出されている。また、同領域にはHLA分子遺伝子以外にも多数の免疫関連の遺伝子がコードされており、それらに認められる関連もある。非HLA領域にも多数のリスクバリアントが見出されている。表２は商業的遺伝子バリアント情報提供サービスがその会社の定めた採用基準で自己免疫疾患リスク用として提供している遺伝子バリアントと自己免疫疾患のリストである(<http://www.eupedia.com/genetics/autoimmune_diseases_snp.shtml>)。

また多数の疾患リスク関連遺伝子とそのバリアントの同定により、病因的メカニズムの解明が進むだけでなく、治療薬の作用機序や既存治療薬の適用拡大の可能性などについての示唆も得られると考えられている(Y Okada, D Wu, G Trynka, T Raj, C Terao, K Ikari, Y Kochi, K Ohmura, ...Nature 506 (7488), 376-381)。

* + - 多疾患に関与するバリアントの存在 Pleiotropy

表２を見るといくつかの遺伝子が複数の疾患のリスクバリアントを有していることがわかる(ABCB1,CTLA4,FCRL3,IL1B,IL23R,IL2R,IRF5,PTPN2,PTPN22,RSBN1,SH2B3,STAT4,TNF)。このように、単一の遺伝子のバリアントが複数の疾患に影響することをPleiotropy(多面発現性)と言う。自己免疫疾患が発病機構や免疫異常を共有していることを表していると考えられる。また、このことから、遺伝因子との関連研究の標的として、疾患そのものだけでなく、in vivo, ex vivoな免疫系細胞・免疫反応を標的とすることの有用性が期待され、実際、各種オミクス実験結果とゲノム解析との統合解析という形で研究が進められている。

http://www.nature.com/ng/journal/v40/n2/full/ng0208-131.html

* + - アミノ酸置換型バリアントとそれ以外のバリアント

表２には、特定の遺伝子名ではなく” intergenic”とされるバリアントも多数ある。これは、タンパク質をコードするコーディング遺伝子構造ではないところに存在することを意味する。実際、遺伝子名が付与されたリスクバリアントであってもアミノ酸置換を伴うバリアントは少なく、遺伝子の発現効率やオールターナティブ・スプライシングに影響するなど、コードするタンパク質の1次構造以外への影響を介して疾患リスクを上げていると考えられている。このように自己免疫疾患リスクバリアントの大多数はコードタンパク質の質的変化ではない。そして、遺伝子バリアントがアミノ酸配列に及ぼす影響はコドン表により明快だが、それ以外の機能影響のメカニズムはそうではない。列挙すれば、発現調節にかかわるDNA配列(プロモータやエンハンサー、スプライシングサイトのDNA配列)、ノンコーディングRNA遺伝子配列、ヒストン修飾等エピジェネティック状態に影響を与えるDNA配列などが挙げられるが、いずれも、その全容は未解明であり、疾患へのゲノム影響の解明には、基本的な分子遺伝学的な研究の進展が重要となっている。

図１　遺伝子バリアントとゲノム・エピゲノム・ncRNA・スプライシング・アミノ酸置換

* + - 遺伝率はまだ一部しか説明がついていない Missing heritability

双生児研究などから推定された遺伝率が表1に示されているが、これまでに検出された疾患遺伝子座位が説明できる遺伝率はこの値と比べてかなり小さい。この不足分をMissing heritabilityと言う。そもそも双生児研究などから算出した遺伝率の値が高い側にぶれている可能性や、これまでに見出された座位のアレルの相互作用を見積もらないなど遺伝率の算出方法が不足の理由となっている可能性も否定はできないが、やはり、未検出の座位がある可能性は高い。GWASの網にかからなかった座位があるということを意味するが、それには、リスクが強くなくGWASの検出力の弱さに起因するもの、GWASが用いたSNPよりもアレル頻度が低く、結果として連鎖不平衡マッピングで検出されなかったようなレアバリアントに起因するもの、構造バリアントのようにGWASで検出しにくいタイプの遺伝子バリアントに起因するものなどがある。

Eskin, Eleazar (2015): Discovering Genes Involved in Disease and the Mystery of Missing Heritability. In: Commun. ACM, 58 (10), pp. 80-87, 2015, ISSN: 0001-0782.

* ゲノム研究の変化～単純な構図から複雑な世界へ
  + 次世代シークエンサーの登場
    - レアバリアント

GWASが既知SNPを効率的にタイピングする技術を基盤にしていたのに対して、次世代シークエンサー(NGS)は全ゲノムやエクソン領域を網羅的にシークエンシングすることで、未知のバリアントを検出しながらリスクバリアントの探索ができる点が大きく違う。既知SNP方式では、どうしても集団におけるアレル頻度が一定以上あるバリアントのみが対象とならざるを得ないが、NGSを用いた解析では、世界中である個人のみが持つバリアントまでもが対象となる。

* + - De novo バリアント

世界に１つだけのバリアントが検出できるということは、親子をシークエンシングすれば、親は持たず、親の配偶子に起きた突然変異が子に伝わったようなバリアントの検出が可能となる。これをde novo 変異と言う。De novo変異がゲノムワイドに検出できるようになったため、家族歴がない単一遺伝子疾患患者の原因バリアントの同定などが容易となった。実際、家系例による連鎖解析からSNPによるGWASへと比重が移動し、疾患リスク・原因バリアント解析の中心が複合遺伝性疾患となっていたものが、NGSの登場により単一遺伝子疾患研究の成果が再び目立つようになっている。

* + - １細胞シークエンシング

NGSは個々の細胞を試料としてシークエンシングすることもできる。疾患が親から子へ遺伝することに着目し、親から子へ遺伝するのは、個人の全細胞が共有するゲノムであると考えれば、１細胞シークエンシング技術は疾患のゲノム解析に資することはない。しかしながら、NGSはDNA配列を読むだけでなく、エピゲノム・トランスクリプトームの解析も行うこと、自己免疫疾患における体細胞変異の役割を研究するためには強力な技術となる。そのことは後述する。

* + 遺伝子の変化

遺伝子とは親から子へ伝達される物質で、機能的なユニットとなっているもののことを指す概念的なものである。しかしながらDNAからmRNAが転写され、さらにタンパク質に翻訳されるという仕組みがあり、タンパク質には酵素をはじめとする多様な機能性分子と構造分子とがそろっていることから、遺伝子と言えばタンパク質をコードするDNAセグメント(コーディング遺伝子)のことであるかのように錯覚しがちである。そして疾患に関わるバリアントはタンパク質のアミノ酸置換を起こすものか、コーディング遺伝子の発現調節領域のDNA配列のバリアントのいずれかであるように思いこみがちである。しかしながら、DNA配列上の機能的なユニット(遺伝子)はそれだけではないことが明らかになってきている。この遺伝子の拡大に大きな役割を果たしているのがNGSである。

NGSにより、トランスクリプトーム解析が進むに従い、多様かつ長短さまざまなノン・コーディングRNA遺伝子の存在が判明し、その数は少なくともコーディング遺伝子と同程度はあるがどれほど多いかはまだわからない。また転写されるRNA分子には機能性分子としてタンパク質に負けないほどの役割があることも明らかとなってきた。またNGSをエピゲノム解析に用いることでRNA遺伝子が細胞の分化・活動状態の制御においても主要な役割を果たしていることがわかってきた。さらにこのノンコーディングRNAとエピジェネティック状態とは1細胞ごとに多彩なバリエーションがあることがNGSの１細胞シークエンシングで解明されつつある。このように、ゲノムに刻まれる遺伝子はコーディング遺伝子主体であった段階から、RNA遺伝子を含めた、数も機能も飛躍的に増えた段階に変わりつつあり、その全容の解明はこれからである。したがってそれらが自己免疫疾患において果たす役割の解明もまだまだこれからであることがわかる。

図１

* + 遺伝性(Hereditary)と遺伝子性(Genetic)

１細胞シークエンシングは個々の細胞のゲノム配列の違いを区別できる。それを利用して癌細胞が1細胞から多数の細胞の塊になるまでの遺伝子変異の蓄積の様相を解析することが可能となっている。これはいわゆる遺伝する変異が生殖細胞系列変異の研究であるのに対して、体細胞系列変異の研究に相当する。しかしながら体細胞系列変異は癌にのみ認められるものではない。癌の場合はたまたま体細胞変異により増殖性が獲得されたが、特別な機能を獲得した細胞が数は少ないながら機能的に病的振る舞いをする可能性はあるだろう。また、体細胞系列変異が自己免疫源となることもある　http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101093

その他に、発生の途中で生じた体細胞系列変異のため、個体がその変異に関するモザイクになることもある。実際、そのようなモザイクによる遺伝性疾患の発症についても研究されている。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4276927/>　また、T細胞受容体、Ｂ細胞受容体に見られるように生理的にゲノムDNA配列を変化させる機構もあり、それらの配列解析も１細胞シークエンシングが可能にする。

を持った細胞マルチ・オミクス技術である。したがって、血球や免疫系細胞、様々な疾患関連組織臓器のエピゲノム・トランスクリプトーム解析をし、そのパターンによって病因を解明したり、それらとゲノム配列との関係を研究するためにはNGSの1細胞シークエンシング技術は大きな可能性を開いている。http://www.cell.com/trends/genetics/fulltext/S0168-9525(15)00066-9

* + ヒトゲノムレファレンス配列の変化(グラフ化)　固定していない！
  + Phenome PheWAS HER

ゲノムと遺伝子

遺伝子バリアント、構造バリアント、染色体異型

生殖細胞系列変異・体細胞系列変異・モザイク

遺伝因子が起こす疾患フェノタイプ

生殖細胞系列変異としてのバリアント・異型が起こす疾患フェノタイプ

体細胞系列変異・モザイクが起こす疾患フェノタイプ

研究手法の現在

実験

解析

特記項目

ゲノム研究の成果

HLA

フェノーム・アプローチ

ゲノム上にあるもの

遺伝子・機能性エレメント

コーディング遺伝子とその発現制御

ノン・コーディング遺伝子

エンハンサーがnon-coding enhancer RNAsをコードするらしい

　Inter-regulation between enhancers and promoters

Non-coding regulatory elements (DNA and RNA)の数はcoding genesよりfa-outnumberだ

Regulatory DNA regions

Transcription unit

Non-coding RNAs(ncRNAs) regulates coding genes /DNA配列依存性に、もしくは非依存性に

エンハンサーの役割

Cell-type specific, state-specific

eRNAは機能性？？

Cit/trans

ゲノムの理解にエピゲノム・トランスクリプトーム

　ゲノムの機能性領域がエピゲノム解析・トランスクリプトーム解析でわかるから

Spatiotemporal

遺伝子バリアント・構造バリアント・染色体異型

シングルセルシークエンシングが可能にすること

体細胞変異・モザイク

ゲノム・エピゲノム・トランスクリプトームをつなぐNGS

ゲノム解析の成果リスト

今後

病因

ゲノム全般

遺伝子、コーディング、ノンコーディング、リピート

Functional elementの考え方

http://www.nature.com/nrg/journal/vaop/ncurrent/abs/nrg.2016.4.html

シングルセルシークエンシング

http://www.nature.com/nrg/journal/v17/n3/abs/nrg.2015.16.html

ゲノム構造異常

http://www.nature.com/nrg/journal/vaop/ncurrent/abs/nrg.2015.25.html

ゲノムの考え方。体細胞変異。モザイク。

フェノームアプローチ

http://www.nature.com/nrg/journal/v17/n3/abs/nrg.2015.36.html

自己免疫疾患と免疫系とリスクアレル

http://www.nature.com/nrg/journal/v17/n3/abs/nrg.2015.33.html

ゲノム(エピジェネティクスは除く)

ゲノム研究はどうやっているか

HLA

スタディのデザイン

実験の現状

解析

公共データ

民族差

ファインディング

伝達されるバリアント　vs. de novo

Pleiotropy = cross-phenotype association

Phenome PheWAS

EHR Biobank

今後

HLA

次世代シークエンスのせいで成果は遺伝病にシフト

http://www.cdc.gov/genomics/public/features/autoimmune.htm