

マルホ皮膚科セミナー

2018年3月8日放送

「第66回日本アレルギー学会

シンポジウム4-1 アトピー性皮膚炎の遺伝要因の探索」

東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター 分子遺伝学
教授 玉利 真由美

ゲノムの解析

本日はアトピー性皮膚炎の遺伝要因の探索についてお話をさせていただきます。

ゲノムは生命の設計図であり、ヒトの場合、約30億のAGCTという遺伝暗号として情報が蓄えられ、親から子へと伝えられています。ヒトゲノムの解読が進み、近年、ゲノム配列の多様性つまり遺伝バリエーションを利用した大規模な疾患ゲノム解析が世界中で行われるようになってきました。その結果、ゲノム上にアトピー性皮膚炎や乾癬など、多数の疾患および関連形質の感受性領域が同定されてきています。

ゲノムワイド関連解析、略してGWASはヒトゲノム上に存在する数100万~の遺伝バリエーションにつき症例対照関連解析を行い、疾患に関連するゲノム領域を同定

ゲノム~生命の設計図
ヒトの場合、約30億のAGCTの遺伝暗号文字として情報が蓄えられ、親から子へと伝えられる 2003年 ヒトゲノム全配列決定

ゲノム配列の多様性 最も頻度が高い

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 1塩基多型
Genome-wide association study (GWAS)
網羅的に配置している~100万個のSNPsを
タイピングして症例対照関連解析
GWASカタログ=<http://www.ebi.ac.uk/gwas/>

全ゲノムを対象とした包括的なバイアスのかからない関連遺伝子の検索手法

遺伝バリエーションの影響	Zhang X et al. Trends Genet. 2014; 30: 140-149.
タンパクコード領域	1) アミノ酸変化 2) 翻訳効率の変化・タンパク質立体構造への影響 3) スプライシングへの影響 4) コード領域に転写因子が結合
タンパク非コード領域	1) プロモーターメチル化 2) エンハンサーの転写因子結合 3) ループ構造の変化 4) miRNAとRISK(RNA-induced silencing degradation) 5) lncRNAによる核タンパクの誘導

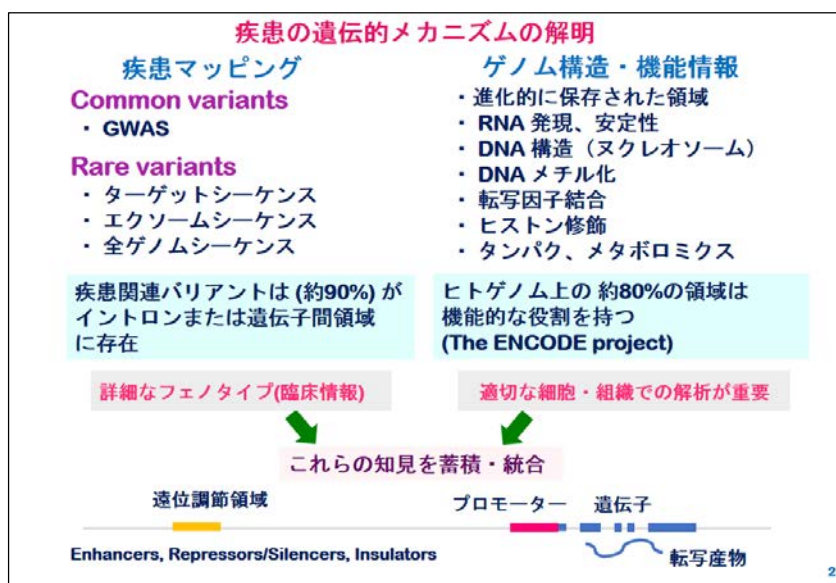
1

する手法です。GWAS は事前に仮説を設定しない疾患関連遺伝子の同定法であり、様々な疾患において病態解明に大きく貢献してきています。アトピー性皮膚炎をはじめとする様々な疾患の GWAS の結果は GWAS カタログというウェブサイトで検索が可能です。

最近では遺伝バリエントが生物学的にどのような影響を及ぼすのかも解明が進んでいます。例えばタンパクコード領域に存在する遺伝バリエントは、1) アミノ酸変化 2) 翻訳効率の変化やタンパク質立体構造への影響 3) スプライシングへの影響 4) コード領域に転写因子が結合する、などに影響することがあります。また、タンパク非コード領域に存在する遺伝バリエントは、1) プロモーターのメチル化 2) エンハンサーへの転写因子の結合 3) ループ構造の変化 4) miRNA と RISK (RNA-induced silencing degradation) 5) lncRNA による核タンパクの誘導などに関わる可能性があることが示唆されています。

疾患の遺伝的メカニズムの解明

現在、疾患の遺伝的メカニズムの解明は、マッピングとアノテーションが両輪となり進められています。GWAS などでマッピングされた疾患関連バリエントの約 90% はイントロンまたは遺伝子間領域に存在すること、そしてゲノム構造や機能情報の拡充により、ヒトゲノム上の約 80% の領域は機能的な役割を持つことが明らかとなっています。詳細な臨床情報を有する症例を GWAS 等でマッピングし、そのデータを適切な細胞、組織で得られた機能情報と統合していくことは疾患の科学的メカニズムの解明にとっても重要です。



2013 年までのアトピー性皮膚炎の GWAS

次にこれまでに行われたアトピー性皮膚炎の GWAS についてお話いたします。アトピー性皮膚炎については、2013 年までに 4 つの GWAS および 1 つの Immunochip 解析が行われています。それらにより同定された疾患関連領域には皮膚のバリア機能に関する遺伝子群、制御性 T 細胞や Th2 免疫応答に関連する遺伝子群、ビタミン D 代謝に関わる遺伝子などが含まれていました。

~2013

アトピー性皮膚炎のGWAS

	19ヶ所	領域に存在する遺伝子	近傍に存在する遺伝子
European Esparza-Gordillo J. et al. Nat gen. 41. 596 (2009)	11q13.5	C11ORF30/LRRC32(GARP)	
Chinese Sun LG. et al. Nat gen. 43. 690 (2010)	1p21.3	FLG	
	5q11.1	TMEM232/SLC25A46	TSLP
	20q13.3	TNFRSF6B/ZGPAT	
European Meta Paternoster L. et al. Nat gen. 44. 187 (2011)	11q13	OVOL1	
	19p13.2	ACTL9	
	5q31	KIF3A/IL4 /IL13	
Japanese Hirota T. et al. Nat gen. 44. 1222 (2012)	2q12	IL1RL1/IL18R1/IL18RAP	
	3p21.33	GLB1	CCR4
	3q13.2	CCDC80	
	6p21.3	the MHC region	
	7p22	CARD11	
	10q21.2	ZNF365/EGR2	
	11p15.4	OR10A3/NLRP10	
	20q13	CYP24A1/PFDN4	
	4q27	IL2/IL21	
European Ellinghaus D. et al. Nat gen. 45. 808 (2013)	11p13	PRR5L	TRAF6, RAG1, RAG2
	16p13.13	CLEC16A/DEXI	SOCS1
	17q21.32	ZNF652	NGFR

治療
 ・ バリア保持
 ・ 抗炎症治療

皮膚のバリア
 免疫応答関連
 制御性T細胞
 ビタミンD代謝
 かゆみ

2015年のアトピー性皮膚炎 GWAS メタ解析

2015年にはヨーロッパ、アフリカ、日本、ラテンの人種において 21,399 人のケースと 95,464 人のコントロールを用いた大規模な GWAS メタ解析が行われ、最終的には 11ヶ所の新規アトピー性皮膚炎関連領域が同定されました。多人種におけるメタ解析では、人種に特有な関連領域の存在も明らかとなり、CCDC80 領域および NLRP10 領域は日本人に特異的なアトピー性皮膚炎関連領域である可能性が示唆されています。この GWAS メタ解析で新たに同定された関連領域には自己免疫制御、特に自然免疫と T 細胞の活性化と分化に関わる遺伝子が多数含まれていました。IL7R, ETS1, PPP2R3C は自己免疫機構を調節することが報告されています。STAT3 を含む領域も新規領域として同定されましたが、STAT3 のドミナントネガティブ遺伝子変異は、原発性免疫不全症候群のひとつである I 型高 IgE 症候群の原因として報告されています。I 型高 IgE 症候群は、臨床上、血清 IgE 高値、繰り返す皮膚の黄色ブドウ球菌感染症、重度のアトピー性皮膚炎症状を示し、免疫学的には Th17 細胞の分化およびイフェクター機能の障害を認める疾患です。この研究では STAT3 のイントロンに存在する頻度の高い遺伝バリエーションとアトピー性皮膚炎発症との関連が認められ、大変興味深い結果となっています。Langerin をコードする CD207 を含む領域はヨーロッパ集団においても日本人の集団においても強い関連が認められました。

Langerin はC型レクチンでランゲルハンス細胞および一部の真皮樹状細胞に発現し、カンジダやマラセチアなどの皮膚感染症において抗原提示に重要な役割を果たしています。さらにこの報告では ENCODE/Roadmap 計画のデータを活用し、より多くの関連バリエーションが Th17、Th2、B 細胞での DNaseI 感受性領域、すなわち遺伝子の転写が盛んに行われている領域に存在することが示されました。

2015

アトピー性皮膚炎のGWAS 多人種におけるメタ解析

EAGLE Eczema Consortium. Nat Genet. 2015;47:1449-56.

16 領域	近傍遺伝子	P-value
1q21.3	<i>CRCT1/LCE3E (FLG)</i>	5.6E-29
11q13.1	<i>OVOL1</i>	2.1E-19
5q31.1	<i>RAD50/IL13</i>	4.0E-17
2q12.1	<i>IL18R1/IL18RAP</i>	1.5E-13
11q13.5	<i>C11orf30/LRRC32</i>	4.6E-13
20q13.33	<i>RTEL1-TNFRSF6B</i>	7.0E-13
19p13.2	<i>ADAMTS10/ACTL9</i>	4.6E-12
16p13.13	<i>CLEC16A</i>	2.5E-11
1q21.3	<i>IL6R</i>	6.1E-11
4q27	<i>KIAA109 (IL2)</i>	4.2E-9
6p21.32	<i>HLA-DRB1/HLA-DQA1</i>	5.4E-9
10q21.2	<i>ZNF365</i>	1.2E-6
6p21.33	<i>MICB</i>	1.5E-6
11p15.4	<i>OR10A3/NLRP10</i>	0.744
3q13.2	<i>CCDC80/CD200R1L</i>	0.137
11p13	<i>PRR5L</i>	8.7E-7
11 領域 (新規)		
14q13.2	<i>PPP2R3C</i>	1.8E-10
11q24.3	<i>-FETS1</i>	3.9E-10
1q21.2	<i>C1orf51/MRPS21</i>	9.1E-10
8q21.13	<i>MIR5708/ZBTB10</i>	1.4E-9
10p15.1	<i>IL15RA/IL2RA</i>	1.5E-9
5p13.2	<i>IL7R/CAPSL</i>	2.9E-8
2p25.1	<i>LINC00299-</i>	3.4E-8
2p16.1	<i>PUS10</i>	3.5E-8
17q21.2	<i>STAT3</i>	4.1E-8
3p21.1	<i>SFMBT1/RFT1</i>	4.9E-8
2p13.3	<i>CD207/VAX2</i>	1.4E-7

10万人以上のGWASメタ解析 検出力 ↑
(21000ケース & 95000 コントロール)
150万箇所を調べた

IL-2:

タクロリムス軟膏の標的分子
PPP2R3C, ETS1, IL7R:
自己免疫機構を調節

I型高IgE症候群

原発性免疫不全症候群
重症のアトピー性皮膚炎
STAT3の遺伝子変異が原因
Th17 への分化が障害
Nature 2007; 448:1058

6 領域はヨーロッパ集団のみでは
有意な関連が認められなかった
2領域は日本人特異的な関連領域
OR10A3/NLRP10, CCDC80

4

2017 年のアトピー性皮膚炎 GWAS メタ解析

2017 年には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎のいずれかひとつ以上を有する 180,129 人のケース、そして 3 疾患いずれももたない 180,709 人のコントロールについて大規模な GWAS メタ解析が行われました。ヨーロッパで行われた計 13 個の GWAS の結果が統合され、73 個の新規バリエーションを含む、136 個の独立したリスクバリエーションが同定されました。それらの近傍に 132 個のアレルギー疾患関連の候補遺伝子が同定され、それらは血液と肺組織に有意に強く発現していました。上記 3 つの疾患のうち 1 つの疾患に特異的に関連していたのは 6 つのバリエーションのみで、ほとんどは 2 疾患以上に共通していました。この報告では eQTL やエピジェネティクス情報を用いた関連領域や関連遺伝子の機能解析も行われています。その結果、Th17、Th1、Th2、制御性 T 細胞、CD4+CD8+ memory T 細胞、NK 細胞、B 細胞

胞に特異的な調節領域に関連バリエーションが多く存在していました。また、6つの候補遺伝子 (CD86, CCR7, F11R, PHF5A, RGS14, TARS2) については薬剤のリポジショニングの可能性が示唆されました。

132のアレルギー疾患関連候補遺伝子のうち、36遺伝子のCpGメチル化は遺伝バリエーションによる影響とは独立に遺伝子発現に影響する可能性が指摘されました。これらについては、そのメチル化に関与する環境要因がわかれば、その環境要因を制御することにより、アレルギー発症の予防に繋がられる可能性があります。この36遺伝子のうち、PITPNM2 遺伝子領域のメチル化は喫煙と有意な関連があることがわかりました。PITPNM2 は好中球機能に関連する遺伝子です。

2017

**気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎に
共通する遺伝要因によるアレルギー疾患生物学の解明**

Ferreira MA et al. Nat Genet. 2017;47:1449-56.

8,307,659 遺伝バリエーションでGWAS (Quality Control 後)

180,129 ケース (気管支喘息and/orアレルギー性鼻炎and/orアトピー性皮膚炎)

180,709 コントロール (いずれの3疾患ではない)

ヨーロッパの集団 13のGWASの結果をメタ解析で統合

136個 (73個は新規) の独立のリスクバリエーションを同定 ($P < 3 \times 10^{-8}$)

近傍に132のアレルギー疾患関連の候補遺伝子あり(血液と肺組織に強く発現)

上記3つのうち1つの疾患に特異的に関連=6バリエーション

→ほとんどは2疾患以上に共通



**eQTL情報とエピジェネティクス情報を用いた
GWASで同定された領域の機能解析**

リンパ球を介した免疫応答に関連

Th17, Th1, Th2, Treg, CD4+CD8+ memory T, NK cells, B cells

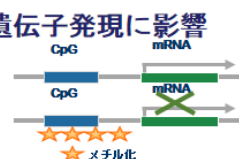
6つの候補遺伝子は薬剤のリポジショニングの可能性あり

CD86, CCR7, F11R, PHF5A, RGS14, TARS2

36の候補遺伝子のCpGメチル化は遺伝バリエーションとは独立に遺伝子発現に影響

喫煙とメチル化との有意な関連

PITPNM2 (PYK2-binding protein) 好中球機能に関連



今後の展望

今後、ゲノム多様性の機能に及ぼす影響の解析は、得られた知見の臨床への応用に必要です。QTL (Quantitative trait locus 量的形質座位) は遺伝子発現に影響を及ぼす遺伝バリエーションが存在するゲノム上の領域であり、様々な組織や細胞でのQTLのデータベースの拡充が進んでいます。ゲノム上における転写制御機構やエピゲノム (DNAメチル化やヒストンのアセチル・メチル化、クロマチン高次構造など) についてデータベースの拡充も進んでいます。ENCODE計画はヒト培養細胞において、遺伝子のエピゲノム制御領域を明らかとし、カタログ化することを目的とし

ていましたが、最近の米国のエピゲノミクスロードマップ計画は、ENCODE のデータを基盤とし、胚から成人に至るまで様々なヒト組織や細胞の遺伝子発現を制御する機能的領域に関する参照データ（ヒストン修飾、DNA アクセシビリティ、DNA メチル化、RNA 発現等）を整備するものです。

さらにオミックス技術により免疫応答の多様性を解明し、病態解明につなげる試みも行われています（The Human Functional Genomics Project (HFGP) , <http://www.humanfunctionalgenomics.org>）。

今後、ゲノム情報に、疾患に関連する組織や細胞での発現情報、エピゲノム情報、さらにはマイクロバイオームの情報を加味し、科学的な病態解明が進み、治療の最適化、個別化医療が進むことが期待されます。

ゲノム多様性の機能に及ぼす影響の解析＝臨床への応用に必須

eQTL (Expression Quantitative Trait Locus)

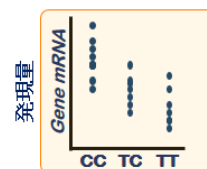
遺伝子発現量を調節するゲノム領域

疾患関連バリエーションはGWAS領域の多くがeQTL

The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project

<https://www.gtexportal.org/home/>

ヒトの体組織の遺伝子発現と遺伝子多型との関連を網羅的に解析



SNPが影響

エピジェネティクス（DNA配列の変化を伴わない、後天的な遺伝子制御の仕組み）

- ・ヌクレオソーム中のヒストンの翻訳後修飾（メチル化、アセチル化、リン酸化等）
- ・DNAのメチル化・脱メチル化



ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) <https://www.encodeproject.org>

Roadmap Epigenomics Consortium <http://www.roadmapepigenomics.org>

エピゲノム情報の大規模データ

オミックス 'omics' で健常人と患者の免疫応答を綿密な機能的な形質の情報と統合

臨床情報、免疫の形質（細胞免疫、液性免疫）ゲノムデータ、
マイクロバイオーム、メタボローム

免疫関連疾患へのかかりやすさ、免疫療法への応答性の違いに関連するような
免疫応答の多様性を理解する (2013~) Netea MG. et al., Nature Medicine 2016;22:831-3.

The Human Functional Genomics Project <http://www.humanfunctionalgenomics.org>