

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) ゲノムおよび遺伝子発現情報の統合的解析に基づく
全身性エリテマトーデスの治療標的の同定とその制御法の開発
(英語) Identification of therapeutic targets and development of
intervention strategy for systemic lupus erythematosus based
on the comprehensive analysis of genome and transcriptome.
- 研究開発担当者 (日本語) 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科
教授 山本 一彦
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Allergy and Rheumatology, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo.
Professor Kazuhiko Yamamoto
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 全身性エリテマトーデス患者 T 細胞/B 細胞/樹状細胞/単球の各サブセット
のトランスクリプトーム解析と遺伝子多型情報を用いた eQTL 解析
- 開発課題名： (英語) Expression quantitative analysis for systemic lupus erythematosus
based on the transcriptome and genotype from immune cell subsets, T
cells, B cells, dendritic cells, and monocytes.
- 研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所統合生命医科学研究センター・副センター長・久保 充明
- 所属 役職 氏名： (英語) RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Deputy director,
Michiaki Kubo

分担研究 (日本語) 全身性エリテマトーデス患者 T 細胞/B 細胞/樹状細胞/単球の各サブセットのトランスクリプトーム解析と遺伝子多型情報を用いた創薬標的の同定

開発課題名: (英語) Identification of therapeutic targets for systemic lupus erythematosus based on the transcriptome and genotype from immune cell subsets, T cells, B cells, dendritic cells, and monocytes.

研究開発分担者 (日本語) 中外製薬株式会社 創薬基盤研究部長 角田 浩行

所属 役職 氏名: (英語) Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.
Department Manager of Discovery Technology Research Dept.
Hiroyuki Tsunoda

II. 成果の概要 (総括研究報告)

・ 研究開発代表者による報告の場合

本研究の目的はヒト疾患の原因を示唆するゲノムおよび遺伝子発現情報の統合的解析による、SLE の革新的な医薬品の開発シーズの探索である。SLE 末梢血の免疫細胞サブセット毎のトランスクリプトームを次世代シーケンス (NGS) で解析、各個体の遺伝子多型情報と組み合わせ、治療標的となる遺伝子経路を同定する。また SLE 患者由来 iPS 細胞を含む患者検体で標的候補経路の機能解析を行い、治療標的の制御手段を、合成化合物、抗体製剤や TGF- β 3 を候補として探索する。

これまでに、SLE 患者 50 名、健常人 30 名および RA 25 例の末梢血の免疫担当細胞分画のトランスクリプトームおよび遺伝子多型を解析し、SLE 患者のメモリーB 細胞でミトコンドリア遺伝子を含む細胞代謝シグナル修飾が亢進していることを見出した。この SLE 患者のメモリーB 細胞の遺伝子発現修飾は、試験管内で B 細胞を TLR リガンドと I 型インターフェロンで刺激した場合の遺伝子発現に類似していることが確認された。免疫担当細胞ごとの遺伝子発現を Weighted gene coexpression network analysis (WGCNA) により変動が類似した遺伝子群 (モジュール) にまとめ、免疫担当細胞全体由来のモジュールをランダムフォレストにより順位付けをすると、SLE のメモリーB 細胞における細胞代謝修飾が上位にランク付けされ、その免疫系全体における重要性が明らかとなった。さらに久保充明 副センター長 (理化学研究所統合生命医科学研究センター) らとともに行った expression quantitative trait loci (eQTL) 解析を組み合わせることにより、SLE メモリーB 細胞の細胞代謝シグナル修飾および末梢血中の形質細胞の割合が、自然免疫シグナルと I 型インターフェロン経路上の SLE 感受性遺伝子多型と関連していることを見出した。また、強い eQTL 効果を持つ SLE 感受性多型を各免疫細胞サブセット毎に 4-8 個同定しつつ、弱い eQTL 効果を示す多型も含めて近傍配列情報からの enrichment 解析を行ったところ、免疫細胞サブセット毎に STAT1 など特定の転写因子が関わる遺伝子パスウェイが亢進していることが推定された。創薬に関しては、角田浩行部長 (中外製薬株式会社 創薬基盤研究部) らとともに SLE のメモリーB 細胞で高発現している 1300 遺伝子から細胞表面発現や B 細胞特異的発現などの条件で絞り込みを行い、絞られた少数の候補分子についてターゲットバリデーションを進めている。これらの知見による免疫病態ネットワークの解明は、今後の SLE の治療戦略の構築に大きく貢献することが期待される。

また多型機能解析のプラットフォームとして、これまでに SLE 姉妹例から iPS 細胞株 2 株を樹立し、単球様、myeloid dendritic cell 様、plasmacytoid dendritic cell 様の細胞の分化誘導系を確立した。さらに全エクソーム解析により、この 2 株にはミトコンドリア経路に関連する rare variant が集積して

いる可能性を見出した。この知見も SLE における細胞代謝修飾の重要性を示唆するものである。抑制性サイトカイン TGF- β 3 については、B 細胞刺激時のミトコンドリア遺伝子を含む細胞代謝シグナル修飾および I 型インターフェロンシグナルを、mTOR 抑制を介して制御する活性を持つことを見出した。これは SLE における異常な細胞代謝修飾を TGF- β 3 が抑制する可能性を示しており、今後の創薬の有力な候補になると考えられる。

これらの結果から、本研究では SLE におけるゲノムおよび遺伝子発現情報の統合的解析により、有力な治療標的の選定が進んでいるといえる。

The aim of this study is identification of therapeutic targets for systemic lupus erythematosus based on the transcriptome and genotype from immune cell subsets, T cells, B cells, dendritic cells, and monocytes. The biological functions of candidate pathways are examined using patients cells including iPS cells. Intervention strategies are explored from chemical compounds, antibodies, and a suppressive cytokine, TGF-beta3.

We picked up 50 SLE patients, 25 RA patients and 30 healthy controls. Each immune cell subset in PBMCs was sorted with multicolor flow cytometry and followed by RNA-seq. Interferon signature upregulation was detected in all subsets from SLE patients. The number of differentially expressed genes (DEGs) varied between subsets and showed remarkable increase in memory B cell subset compared to naïve B cell subset. Pathway analysis revealed cell metabolism-related genes were highly included in the memory B cell DEGs. When gene expressions are classified using weighted gene coexpression network analysis (WGCNA) to generate gene modules, random forest analysis of gene modules from all immune subsets revealed the importance of cell metabolism signature from memory B cells. Moreover, we performed expression quantitative trait locus (eQTL) analysis in collaboration with Dr. Kubo from RIKEN (Center for Integrative Medical Sciences, Deputy director). The eQTL analysis revealed a significant association between cell metabolism signature/plasmablast differentiation and SLE GWAS SNPs related to type I IFN signaling/innate immune signals. We also identified several pathways with increased activity using joint eQTL analysis. With regard to drug development, we have identified several candidate genes from thousands of DEGs of memory B cells from SLE to perform target validation in collaboration with Dr. Tsunoda (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd, Department Manager of Discovery Technology Research Dept.). These achievements will contribute to the construction of therapeutic strategies based on the understanding of the immunopathological network.

We also established iPS cells from two sister SLE cases as a platform to analyze the function of genetic polymorphisms. We have successfully induced monocytes and dendritic cells from these iPS cells. Whole exome sequence of iPS cells revealed an accumulation of cell metabolism-related variants suggesting the importance of cell metabolism in SLE. For the application of regulatory cytokines, we have found that TGF-beta3 inhibit B cells functions through the suppression of mTOR signal and cell metabolism. This observation suggests the potential of TGF-beta3 to treat SLE-specific abnormality.

Collectively, these findings indicate significant progresses in the identification of therapeutic targets in SLE based on the comprehensive analysis of genome and transcriptome.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 件、国際誌 件）
なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 自己免疫疾患における免疫細胞の統合的解析の試み. シンポジウム発表 藤尾圭志、竹島雄介、太田峰人、石垣和慶、土田優美、土屋遥香、住友秀次、岩崎由希子、岡村僚久、永渕泰雄、庄田宏文、鈴木亜香里、高地雄太、山本一彦 第 44 回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム 2 「Human Immunology への新技術の応用」 2016 年 9 月 8 日 東京
2. Cell-type-specific transcriptome analysis of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) revealed B cell contribution to systemic lupus erythematosus pathogenesis. Oral presentation Yusuke Takeshima, Yukiko Iwasaki, Mineto Ota, Kazuyoshi Ishigaki, Shuji Sumitomo, Yuta Kochi, Tomohisa Okamura, Keishi Fujio, Kazuhiko Yamamoto. The 45th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. December 5, 2016. Okinawa (Japan)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし

(4) 特許出願
なし