

[課程一 2]

審査の結果の要旨

氏名 山口 健介

本研究は、ゲノムワイド関連解析 (GWAS; genome wide association study)により同定された自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子座位における選択的スプライシングの役割を明らかにすることを目的としたものである。日本人の健常人末梢血免疫細胞 (B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性細胞、Monocyte、NK 細胞、PBL)について、RNA シーケンシング (RNA-seq) の手法を用いた sQTL (splicing quantitative trait locus)解析と eQTL (expression quantitative trait locus)解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. trQTL (transcript ratio QTL)解析と LeafCutter を統合した sQTL 解析により、B 細胞 307; CD4 陽性 T 細胞 343; CD8 陽性 T 細胞 268; Monocyte 475; NK 細胞 325; PBL 465 遺伝子が有意な sQTL と判定された。
2. gene eQTL 解析により、B 細胞 2,570; CD4 陽性 T 細胞 2,796; CD8 陽性 T 細胞 2,280; Monocyte 3,634; NK 細胞 2,573; PBL 3,196 遺伝子が有意な gene eQTL と判定された (FDR \leq 0.05)。
3. isoform eQTL 解析により、B 細胞 2,574; CD4 陽性 T 細胞 2,776; CD8 陽性 T 細胞 2,227; Monocyte 3,423; NK 細胞 2,526; PBL 3,247 遺伝子が有意な isoform eQTL と判定された (FDR \leq 0.05)。
4. 全細胞種、全サンプルで発現している遺伝子の遺伝子発現量、isoform 発現量、isoform ratio についてクラスタリングを行ない、遺伝子発現量や isoform 発現量と比較して isoform ratio は細胞種ごとのクラスター化はされにくいものの、Monocyte では一部クラスター化され、細胞種特異的なスプライシングの存在が示唆された。さらに、CD300A 遺伝子など一部の遺伝子では、細胞種特異的な sQTL effect が確認された。
5. eQTL/sQTL effect を示す SNP を解析したところ、いずれも TSS (transcription start site)を中心に分布するが、gene body との位置関係では異なる分布を示した。eQTL は TSS 付近に大きなピークと gene body の 3' 側に小さなピークの 2 峰性に分布した。一方の sQTL は TSS 付近に小さなピークと gene body の 3' 側に大きなピークの 2 峰性に分布した。
6. sQTL 解析と GWAS 結果の統合として、ImmunoBase に登録されている GWAS SNP と強い連鎖不平衡 ($r^2 > 0.8$)にある多型の sQTL effect を評価したところ、B 細胞 30; CD4 陽性 T 細胞 31; CD8 陽性 T 細胞 17; Monocyte 31; NK 細胞 26; PBL 39 遺伝子で有意な sQTL effect がみられた (FDR \leq 0.05)。
7. 個別の GWAS 候補領域として、全身性エリテマトーデス (SLE)の疾患感受性遺伝子領域に位置する SNRPC 遺伝子は、GWAS SNP (rs2764208)のリスクアレルの存在により、

機能的な SNRPC isoform の発現量を増やすことが示された。

8. 関節リウマチおよび強直性脊椎炎の感受性遺伝子である IL6R 遺伝子は、GWAS SNP (rs2228145) のリスクアレルの存在により、可溶性 IL6R の mRNA 発現量が減少することが示された。遺伝子多型による可溶性 IL6R 発現への影響として、これまで一般的に想定されていたタンパクレベルでの制御だけでなく、スプライシングを介した mRNA レベルでの制御が確認された。
9. SLE などの疾患感受性遺伝子である HLA-DQB1 遺伝子は、リスクアレルの存在により可溶性 HLA-DQB1 isoform の発現量が減少していた。さらに、splice site に存在する rs28688207 のアレルにより、エクソン 5 (cytoplasmic tail) の有無が決定することが知られているが、このエクソン 5 を持つ isoform とそれ以外の isoform とは排他的な発現様式を示すことが示された。

本研究は、日本人の健常人末梢血白血球各分画を用いた sQTL 解析によって、自己免疫疾患の GWAS 候補領域における選択的スプライシングの役割を明らかにし、さらに sQTL と eQTL が持つ細胞種特異性の違いについての評価を行なった。本研究は、アジア人集団における初めての RNA-seq を用いた sQTL 解析であり、アジア人における自己免疫疾患の病態理解に寄与することが期待されるものである。さらに、isoform の ORF (open reading frame) 配列に着目し、遺伝子機能を質的に変化させる sQTL に注目した点にも新規性があり、同定されたタンパクの機能解析により、自己免疫疾患の本質に迫ることが可能であると考えられる。以上より、本研究は、学位の授与に値するものと考えられる。