

奨励金No.1545

iPS細胞を用いた COVID-19 重症化リスク SNP の機能検証

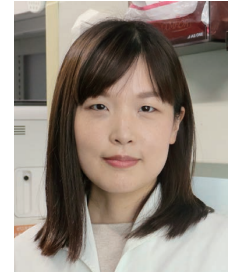
北川 瑠子

京都大学 iPS 細胞研究所 特定助教

Functional validation of COVID-19 severity-associated SNPs using iPS cells

Yohko Kitagawa,

Kyoto University, Center for iPS Cell Research and Application, Assistant Professor



本研究では、ヒト iPS 細胞由来マクロファージを用いて新型コロナウイルス感染症重症化関連 SNP の機能解析を行った。該当リスク SNP を持つドナー由来 iPS 細胞を作製し、マクロファージに分化させたところ、リスク SNP は近傍の複数のケモカイン受容体の発現を低下させることが明らかになった。また、リスク SNP は広範囲にわたる転写エピゲノム制御に影響を及ぼした。リスク SNP がマクロファージ遊走能を介して新型コロナウイルス感染症の重症化に寄与する可能性が示唆された。

The purpose of this research is to elucidate the effects of COVID-19-associated SNPs using human iPS cell-derived macrophages. We thus generated iPS cells from multiple donors carrying the risk SNPs and differentiated them into macrophages. Phenotypic analyses of macrophages revealed that the risk SNPs down-regulated nearby chemokine receptor expression. Moreover, the risk SNPs were associated with alterations in transcription factor binding and epigenetic modifications at broad genomic region. Our results show that the risk SNPs contribute to the COVID-19 severity via affecting macrophage recruitment.

1. 研究内容

1.1 研究目的

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 の影響を精査した。

1.2 新型コロナウイルス感染症重症化関連 SNP の近傍遺伝子発現への影響

本研究では、ゲノムワイド関連 (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 の一つに注目した。この SNP を持つドナー由来 iPS 細胞を各ジェノタイプ 5 クローンずつ集め、テクニカルなばらつきを最小限に抑えた独自の分化法でマクロファージ分化を行った。この SNP による近傍遺伝子の発現制御について、臨床検体を用いた eQTL (expression Quantitative Trait Loci) 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、本研究では近傍の複数の遺伝子発現を下げるのが明らかになった (図 1)。

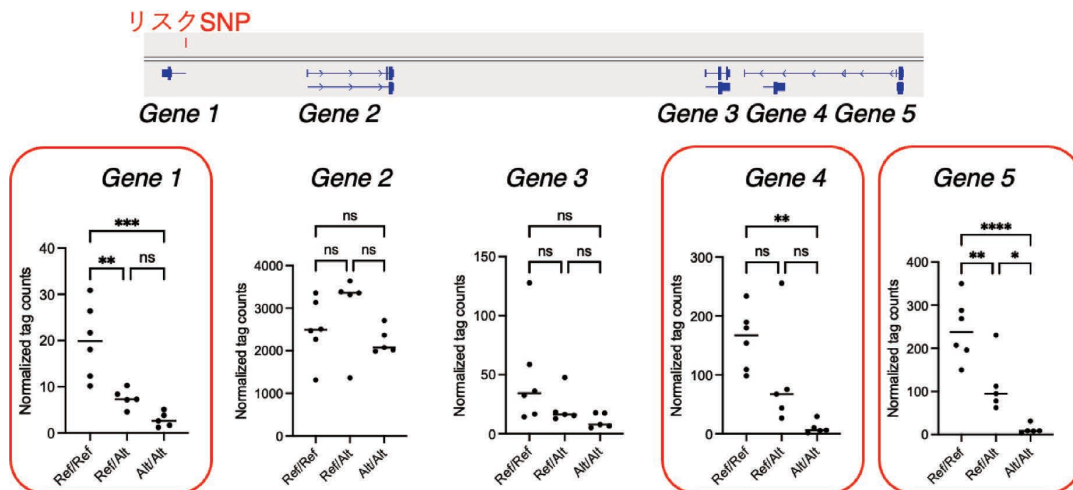


図1. リスク SNP の近傍遺伝子発現 への影響

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。(One-way ANOVA, followed by Holm-Sidak's multiple comparisons test, ns, $P \geq 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$).

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。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。

1.3 リスク SNP の作用機序解明

次に、リスク SNP の作用メカニズムを明らかにするため、iPS細胞由来マクロファージにおいて転写エピゲノム制御解析を行った。エピゲノム修飾やマクロファージで発現する転写因子の ChIP-seq により、リスク SNP は広範囲にわたるエンハンサー活性や転写因子の結合能に影響を及ぼすことが明らかになった (図2)。既報でこの領域ではクロマチン相互作用が起きることが知られており、リスク SNP により特定の転写因子結合に変化が起き、転写因子コンプレックスの構成因子が変わることで周辺に存在する複数のエンハンサーの活性が落ちたと考えられた。

1.4 機能的 SNP の同定

さらに、ゲノム編集を行いやすい iPS細胞の特長を活かして、同一遺伝的背景におけるリスク SNP の機能的性を検証した。具体的にはリファレンスアレルを持つクローン二種にリスク SNP を導入し、マクロファージに分化させて発現制御への影響を調べた。その結果、既報で機能的 SNP と示唆されていた SNP は周辺の遺伝子発現に影響を与えず、その近傍の SNP は近傍遺伝子の発現を上昇させることがわかった。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、この結果は真逆であり、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。本研究成果により、LD (連鎖不均衡) 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、こ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。

1.5 今後の展望

本研究では、iPS細胞由来マクロファージを用いることで、感度の高い SNP の eQTL 解析および作用メカニズム解析が可能であることを示した。このように SNP 下流のメカニズムを明らかにする

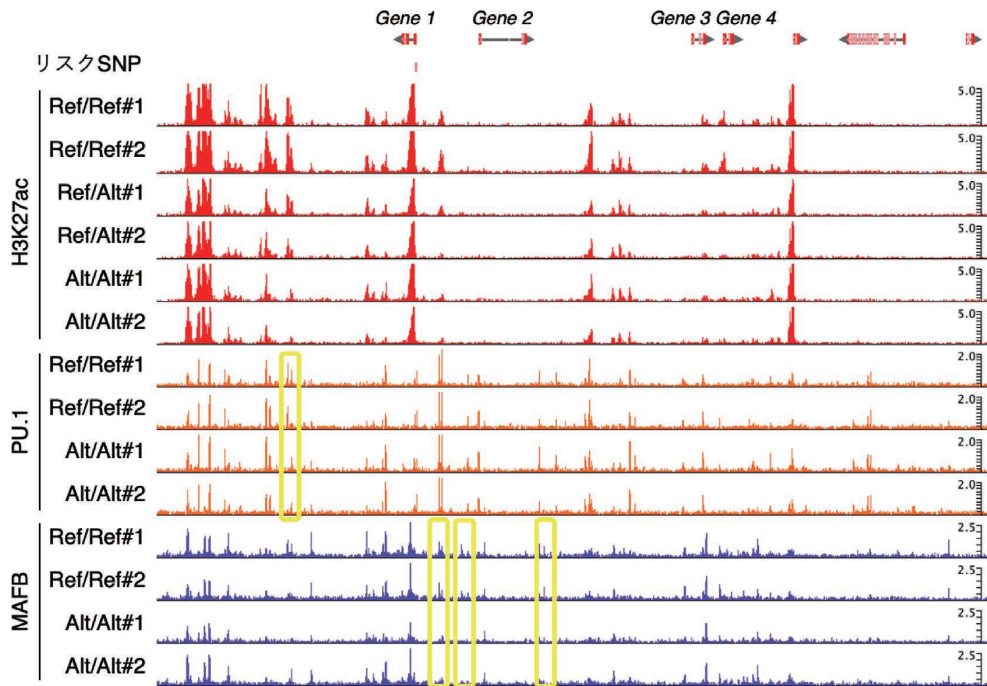


図2. リスク SNP の近傍エピゲノム修飾および転写因子結合への影響

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。

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、臨床検体を用いた eQTL 解析と相互補完的な立ち位置で iPS 細胞を活用した SNP 解析を行うことで遺伝的リスクの機能が正確に評価され、今後の個別化医療の基盤構築に貢献できると期待される。

2. 発表（研究成果の発表）

北川瑤子、iPS細胞由来マクロファージを用いた COVID-19 重症化リスク SNP の作用機序解明、第2回新型コロナウイルス研究集会、品川、2024