

喘息の感受性遺伝子の多変量解析的アプローチ

●鈴木洋一

千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学（旧：東北大学大学院医学研究科遺伝病学分野）

＜研究の目的と進め方＞

本研究の目的は、小児並びに成人の喘息の疾患感受性遺伝子の同定と同定された複数の遺伝子多型から、喘息発症のリスクをどの程度まで推定できるのかを明らかにすることである。

申請期間中に日本人のコントロール、小児喘息、成人喘息(アトピー型)の各群300例以上の検体を用い、これまで喘息と関連があると報告された、またはこの期間中に報告されるであろう新たな遺伝子を含め、約50遺伝子多型を目標に解析を行う。個人ごとに複数の喘息感受性遺伝子の一塩基多型(SNP)と繰り返し多型等を決定し、多変量解析の手法を用いて、喘息発症リスクの予測に有用な遺伝子多型の組み合わせと相互作用を明らかにし、その遺伝子多型組み合わせから、リスク予想がどの程度まで可能か評価する。

＜研究開始時の研究計画＞

(1) 12番染色体における連鎖解析からの新規喘息感受性遺伝子同定

12番染色体上、特に12q14から12q24.1の領域の遺伝子が、日本人小児の喘息とアトピー素因の病態に関与しているか否かを明らかにする。そのために、日本人小児の喘息患者とその家族、両親の12番染色体上のマイクロサテライトマーカーと候補遺伝子内の一塩基置換多型(SNP)を調べ、疾患と有意の連鎖または関連を示すかを調べる。15才未満発症の喘息またはアトピーを示す患者を対象発端者とし、本人と家族の末梢血を採取する。喘息の病型としてはアトピー型を対象にする。関連研究の対照には小児期の喘息、アトピー性皮膚炎の既往のない成人ボランティアを用いる。アトピー素因の確認と血清IgE値と遺伝子領域との量的形質遺伝子座マッピング法による連鎖解析のため、非特異的IgEとヤケヒョウダニ、猫のふけ、カンジダなどに対する特異的IgEを測定する。候補遺伝子アプローチとしてインターフェロン γ 、STAT6、ステムセルファクター、アセチルCoAカルボキシラーゼなどSNPまたはマイクロサテライトマーカーを利用し連鎖、相関が疾患との間に存在するかの検定を行う。12番染色体をカバーするResearch Genetics社のプライマーセットを用いて、これまで報告された領域が本研究の対象患者でも有意の連鎖を示すかを確認する。

(2) 候補遺伝子アプローチによる、新規喘息感受性遺伝子の同定

大阪地区の症例(小児喘息約400例、成人喘息約500例、成人コントロール約600例)を利用し、自然免疫系に関係する遺伝子を中心にSNPについての症例対照研究を行う。候補遺伝子としては、補体(C3、C5、C3R、C5ARなど11遺伝子)、Toll-like receptors (TLRs: 7遺伝子)、TLRとサイトカインのシグナル伝達系の分子(Myd88、RIP2、IRAKM、TRAFなど15遺伝子)、IgE受容体、サイトカイン・ケモカインとその受容体(22遺伝子)、炎症のメディエーターとその受容体

(CYSLT1、CYSLT2など7遺伝子)、プロテアーゼ(Serpna1、MMP9など4遺伝子)のSNPなどのタイピングを行い、単独SNP、ハプロタイプレベルの相関解析を行う。

(3) 複数感受性遺伝子の遺伝子相互作用の検討

(2)で検討した遺伝子について、SNP、ハプロタイプレベルでの、相互作用のスクリーニングを行う。相互作用の検出には、2つの遺伝子のペアについて、一方の遺伝子の多型(SNPまたはハプロタイプ)による層化をする前後の遺伝子多型テーブルの分布を χ^2 乗適合度検定を行い、 $P<0.001$ のものを相互作用ありと判断することとした。

(4) 複数感受性遺伝子による喘息リスクの評価

(2)で検討した遺伝子について、疾患との有意の相関を示した遺伝子、並びに(3)で見出された相互作用をロジスティック回帰式に取り込み、複数の遺伝子多型の組み合わせから、大阪のコホートにおける、疾患発症のリスクをどの程度予測可能なか検討を行う。

＜研究期間の成果＞

(1) 12番染色体における連鎖解析からの新規喘息感受性遺伝子同定

罹患同胞対解析の結果1、12番染色体短腕テロメアからの距離が135cMから160cMまでの領域でMaximum LOD score (MLS)が1.5を超えた。140cMと150cMの間に2つのピークが観察され、後者のピークはMLSが2.8に達していた。本研究から、12番染色体12q24.32-33の領域(144cMから155cMまで)と日本人小児喘息との連鎖が示唆された。総IgE値をlog10変換した値について、量的形質遺伝子座(QTL)解析を行った結果、有意な領域は見出されなかった。Nonparametric QTL分析にても、同様の結果であった。これらの結果から、12番染色体の遺伝子がQTLとして総IgE値に影響をあたえているという証拠は得られなかった。

12番染色体の候補遺伝子のSTAT6のエクソン1にあるGTの繰り返し多型については、4タイプのアレルが同定された。アレル頻度の分布において、小児喘息群とコントロール群の間に有意差が認められた。患者群ではアレル3の頻度が有意に低かった($P_c=0.0044$)。遺伝子型の頻度分布においても、患者群とコントロール群の間に有意差が認められた($P=0.0054$)。これらの結果より、STAT6は喘息感受性遺伝子と考えられた。

もう一つの候補遺伝子NOS1のイントロン2にあるGT繰り返し多型については、6種類のアレルが見出された。アレル頻度の分布において、小児喘息群とコントロール群の間に有意差が認められた($P=0.0082$)。患者群では、アレル3の頻度が有意に低かった($P_c=0.049$)。遺伝子型としては、11種類の存在が認められた。遺伝子型の頻度分布に関しても、患者群とコントロール群の間で、有意差が認められた($P=0.0019$)。アレル3のホモの個人は他の遺伝子型と比して、喘息のリスクが有

意に低かった ($P_c=0.030$)。この多型が他の人種集団においても、疾病と相関しているとの報告があり、NOS1は人種をこえた喘息感受性遺伝子であると思われる。本研究から、日本人の集団において、STAT6とNOS1遺伝子座の小児喘息との相関と、12q24.23から12q24.33までの領域と喘息との連鎖が示唆された。

(2) 候補遺伝子アプローチによる、新規喘息感受性遺伝子の同定

これまで70を超える候補遺伝子を調べたが、10遺伝子は小児喘息との相関を示し、9遺伝子は成人喘息との相関を示した。以下に論文として発表したものを中心に要約する。

喘息モデルマウスにおいて、Ca²⁺依存性Cl⁻チャネルファミリーに属するgob-5遺伝子が喘息の病態に関与していることが報告されている。ヒトのgob-5ホモログと考えられているhCLCA1 (human chloride channel, calcium activated, family member 1)遺伝子の検討を行った²。日本人におけるhCLCA1遺伝子の一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism: SNP)のスクリーニングにおいて見つかったSNPの中から8つのSNPを選び、相関研究を行った。その結果、ハプロタイプ解析において、コントロール群と小児喘息群、コントロール群と成人喘息群それぞれにおいて、ハプロタイプ全体の頻度分布の偏りを認めた (それぞれ $P<0.0001$, $P=0.0031$)。また、小児喘息となるリスクを下げるハプロタイプ ($P=0.00010$)と、小児喘息となるリスクを上げるハプロタイプ ($P=0.0014$)を認めた。

気道の過敏性を中心とする喘息の病態にC3、C3a受容体、C5などの補体系が関与していることが示唆されている。我々は、これらの遺伝子の多型が喘息発症のリスクに関係しているかどうかを明らかにするため、C3、C5、C3a受容体 (C3AR1)、C5a受容体 (C5R1)の遺伝子の一塩基多型 (SNP)を検索し、喘息発症に与える影響について検討した³。SNP単独では、C3 4896C/Tとアトピー性小児喘息 ($P=0.0078$)、成人喘息 ($P=0.010$)との相関が認められた。そして、喘息群を高IgE群に絞った場合に、C3 4896C/Tと成人喘息 ($P=0.0016$)との相関がより明らかに認められた。また、喘息群のみを用いた相関研究において、C3AR1 1526G/Aと小児喘息の重症度との相関も認められた ($P=0.0057$)。C3では、小児喘息 ($P=0.0021$)、成人喘息 ($P=0.0058$)の発症リスクを上げるハプロタイプの存在が明らかになり、成人喘息 ($P=0.00011$)の発症リスクを下げるハプロタイプの存在が明らかになった。C5では、小児喘息 ($P=1.40\times 10^{-6}$)、成人喘息 ($P=0.00063$)の発症リスクを下げるハプロタイプの存在が明らかになった小児喘息の発症時期に関与していることを認めた ($P=0.019$)。

喘息の罹患同胞対解析で、最も連鎖が強く、再現性の高い結果を示しているのが、5q31-33領域である。この領域はIL-4、IL-13などのサイトカインクラスターや、喘息の病態に関連しそうな遺伝子が集積している。IL-12B遺伝子はこの領域にあり、IL-12がT細胞の分化に関係する重要なサイトカインであることから、候補遺伝子として検討を行った。IL-12B遺伝子とそのプロモーター領域から、13個の遺伝子多型を同定した。それらの多型について、小児喘息、成人喘息との相関を検討したところ、3'非翻訳領域の10841C>A多型が小児喘息との相関があった ($P=0.00062$)。また-6415CTCTAA/GCは、単独では、小児喘息との相関は弱かったが ($P=0.051$)、これら2つの多型で形成され

るハプロタイプは疾患との強い相関を示した ($P=0.00078$)。10841C>AはmRNAの安定性に、-6415CTCTAA/GCは転写活性に影響を与えることが、実験的に証明され、この2つの機能的多型は小児喘息の発症と関わっていることが示唆された。

TLRsの検討では、小児喘息と強い相関を示すものが見つかるが、現在、多型の機能に与える影響を検討中である。TLRのシグナル伝達系分子の遺伝子IRAKMとSIGIRRについて、小児喘息ないし成人喘息との相関を検討したが、有意な相関はなかった⁴。RIP2についても、喘息発症との強い相関見出せなかった⁵。

(3) 複数感受性遺伝子の遺伝子相互作用の検討

これまで検討してきた、複数の遺伝子間の相互作用があるかどうかを検討したところ、IL-4とKIF3の強い相互作用が示唆されたが、これは、機能的な相互作用ではなく、遺伝子座が近く、同じLDブロック内に存在し、ある特定のハプロタイプが疾患と相関を示しているためであった。機能的な相互作用 ($P<0.001$)としては、小児喘息との相関を示すものとして ($P<0.01$)、SERPNA1とIL12RB、STAT1とTSLP、MyD88とIRAKM、MD1とIFNA、IFNBとCYSLT2が見つかった。成人喘息との相関を示すものとしては、SERPNA1とCYSLT2、IL12BRとTRIF、STAT1とFCERB、SOCS1とSTAT1などが見つかった。全喘息では、IL10RBとIFNAR2またはIFNAR1との相互作用が示唆された。これらの結果は、多重比較の結果得られたものであるため、他の独立サンプルによる有意性の検定が必要であると考えられた。

(4) 複数感受性遺伝子による喘息リスクの評価

小児喘息発症については、単独での疾患との相関 $P<0.05$ の遺伝子、10遺伝子 (ハプロタイプ又はSNP)を独立変数に含むロジスティック回帰式についてArea under ROC curve (AUC)の値として、0.861が得られた。(3)で見出した、遺伝子相互作用の2項を加えると、AUCは0.887が得られた。成人喘息では、8遺伝子のハプロタイプと1遺伝子内の2つのLDの弱いSNPがそれぞれ単独で疾患との相関を示したため、回帰式に投入した。AUCは0.712で小児喘息の成績に及ばなかった。(3)で見出した遺伝子相互作用の最も強い1項を加えた結果は、0.724であり改善は見られなかった。

〈国内外での成果の位置づけ〉

研究期間中に他の研究者からの候補遺伝子の相関研究の数は増え、喘息との関連を検討した報告は100遺伝子を超えている。本研究から報告した、補体C3の喘息発症に与える影響は、これまで報告されている遺伝子の中でも、最も大きいものの一つであると考えられる。複数遺伝子からの疾患発症のリスク算定の試みについての画期的な成果報告は見られていない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

複数遺伝子からの疾患発症予測の試みは、いまだ確実に疾患発症に結びついている遺伝子が少ないため、十分な成果を上げているとは言えない。本研究期間中に70を上回る候補遺伝子のスクリーニングを行ったが、オッズ比で2を超えている遺伝子のハプロタイプ (又はSNP)は数個しかなく、再現性も高くない。遺伝子多型の疾患発症に与えるインパクトが当初の予想より低いことが原因の一つであると考えられる。

〈今後の課題〉

更なる疾患感受性遺伝子の発掘が必要であるが、症例対照研究においては、患者や対照の環境要因を解析に含めることが感度と疾患発症予想の成績を上げるため必要であると考えられ、環境要因、中間表現型などの情報をもった新たなサンプルの収集が望まれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Shao, C., Suzuki, Y., Kamada, F., Kanno, K., Tamari, M., Hasegawa, K., Aoki, Y., Kure, S., Yang, X., Endo, H., Takayanagi, R., Nakazawa, C., Morikawa, T., Morikawa, M., Miyabayashi, S., Chiba, Y., Karahashi, M., Saito, S., Tamura, G., Shirakawa, T. & Matsubara, Y., Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes, *J Hum Genet*, 49, 115-122 (2004).
2. Kamada, F., Suzuki, Y., Shao, C., Tamari, M., Hasegawa, K., Hirota, T., Shimizu, M., Takahashi, N., Mao, X.Q., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Chiba, Y., Aoki, Y., Kure, S., Tamura, G., Shirakawa, T. & Matsubara, Y., Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma, *Genes Immun*, 5, 540-547 (2004).
3. Hasegawa, K., Tamari, M., Shao, C., Shimizu, M., Takahashi, N., Mao, X.Q., Yamasaki, A., Kamada, F., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Tamura, G., Matsubara, Y., Shirakawa, T. & Suzuki, Y., Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility to bronchial asthma, *Hum Genet*, 115, 295-301 (2004).
4. Nakashima, K., Hirota, T., Obara, K., Shimizu, M., Jodo, A., Kameda, M., Doi, S., Fujita, K., Shirakawa, T., Enomoto, T., Kishi, F., Yoshihara, S., Matsumoto, K., Saito, H., Suzuki, Y., Nakamura, Y. & Tamari, M., An association study of asthma and related phenotypes with polymorphisms in negative regulator molecules of the TLR signaling pathway, *J Hum Genet*, in press (2006).
5. Nakashima, K., Hirota, T., Suzuki, Y., Matsuda, A., Akahoshi, M., Shimizu, M., Hasegawa, K., Jodo, A., Doi, S., Fujita, K., Ebisawa, M., Yoshihara, S., Enomoto, T., Shirakawa, T., Obara, K., Kishi, F., Nakamura, Y. & Tamari, M., Association of the RIP2 gene with childhood atopic asthma, *Allergology International*, in press, (2006).
6. Tamari, M., Hirota, T., Hasegawa, K., Obara, K., Matsuda, A., Akahoshi, M., Nakashima, K., Doi, S., Fujita, K., Suzuki, Y., Nakamura, Y. & Shirakawa, T., Association between ADAM33 polymorphisms and adult asthma in the Japanese population, *Clin Exp Allergy*, in press, (2006).
7. Hirota, T., Suzuki, Y., Hasegawa, K., Obara, K., Matsuda, A., Akahoshi, M., Nakashima, K., Cheng, L., Takahashi, N., Shimizu, M., Doi, S., Fujita, K., Enomoto, T., Ebisawa, M., Yoshihara, S., Nakamura, Y., Kishi, F., Shirakawa, T. & Tamari, M., Functional haplotypes of IL-12B are associated with childhood atopic asthma, *J Allergy Clin Immunol*, 116, 789-795 (2005).
8. Tomita, Y., Tomida, S., Hasegawa, Y., Suzuki, Y., Shirakawa, T., Kobayashi, T. & Honda, H., Artificial neural network approach for selection of susceptible single nucleotide polymorphisms and construction of prediction model on childhood allergic asthma, *BMC Bioinformatics*, 5, 120 (2004).
9. Hirota, T., Obara, K., Matsuda, A., Akahoshi, M., Nakashima, K., Hasegawa, K., Takahashi, N., Shimizu, M., Sekiguchi, H., Kokubo, M., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Enomoto, T., Kishi, F., Suzuki, Y., Saito, H., Nakamura, Y., Shirakawa, T. & Tamari, M., Association between genetic variation in the gene for death-associated protein-3 (DAP3) and adult asthma, *J Hum Genet*, 49, 370-375 (2004).
10. Tomida, S., Hanai, T., Koma, N., Honda, H., Suzuki, Y. & Kobayashi, T., Artificial Neural Network predictive model for allergic disease using single nucleotide polymorphisms data, *J Biosci Bioeng*, 93, 470-478 (2002).