

## 定量的一塩基多型解析技術の開発と医療への応用

●田平 知子<sup>1)</sup>   ◆久木田 洋児<sup>1)</sup>   ◆日笠 幸一郎<sup>1)</sup>   ◆堀内 孝彦<sup>2)</sup>

1) 九州大学生体防御医学研究所 2) 九州大学病院

### <研究の目的と進め方>

ポストシーケンシング時代のゲノム科学研究では、多因子性遺伝性疾患の原因遺伝子をゲノムワイド関連解析により網羅的に探索することが最重要課題である。その一次スクリーニングでは、ハプロタイプ構造情報に基づいてゲノムワイドに選択された多数 ( $10^5$  オーダー) の SNP について、数百から数千の被検試料群と対照群 DNA を用いた関連解析を行うことが必要とされる。これを各試料のジェノタイプング、アレルカウティングによって行うとすると膨大な ( $10^8$  オーダー) の タイピングをしなければならない。また解析の再現性検証にはこれを別の試料群で繰り返す必要がある。これはコストと労力を考慮すると、広く用いるべき方法としては非現実的である。ここで関連解析に現実に必要なのは SNP のアレル頻度情報のみであって、各試料のジェノタイプではない。従って試料 DNA をプールし、定量的 SNP アレル検出によってアレル頻度推定を行うことでタイピング数をその  $1/10^2$  以下に減らして、探索のコスト・労力を現実的なものとすることが可能である。本研究では、(1) DNA プールをもちいた SNP アレル頻度推定を行うための SNP 解析技術を検討し、具体的な実験系と情報技術を確立する。(2) 関連解析の基礎情報として必要な日本人ゲノムの多様性、地域差を解明する。(3) 日本人ハプロタイプ構造の解明とその多様性に関する情報基盤を確立する。また、(4) これらの方法論及び情報基盤を利用して、自己免疫疾患をはじめとする多因子性遺伝性疾患の候補遺伝子の大規模な関連解析を行い、疾患の要因となる遺伝的背景を解明する、これによって、多因子性遺伝性疾患の適切な診断、新治療法の開発、及び予防に寄与することを目標とする。

### <2007年度の研究の当初計画>

我々が直接決定した日本人集団での確定ハプロタイプの情報を更に高精細化し、これに基づいた新たな日本人ゲノムワイド関連解析用 DNA チップの開発を検討する (田平・久木田・日笠)。並行して、DNA チップによる pooled DNA 関連解析での情報処理技術の最適化を試みる (日笠)。一方、疾患との関連が近年数多く報告されているコピー数多型について一塩基多型定量情報をもとに検出する手法についても検討し、定量 PCR 法との比較により検証する (久木田)。また、実際に SLE 感受性候補領域の探索を pooled DNA を用いた DNA チップ・ゲノムワイド関連解析によって行い、更に高密度に配置された SNP による PLACE-SSCP 解析を行い、原因遺伝子の絞込みを行う (田平)。また、結果の再現性を得るために近縁種集団でも解析を行う必要があるため、内外研究グループとの連携によって SLE 疾患試料の収集とそれらを用いた関連解析を前年に引き続いておこなう (田平・堀内)。さらに特定された原因遺伝子について、機能解析によってその因果関係の証明を行うと共に発症機構の研究に資する。また、得られた原因遺伝子群の re-sequencing 用 DNA チップをデザインし診断に役立てる方策を検討する (堀内・田平)。

### <2007年度の成果>

1. DNA プールを用いたマイクロアレイによるゲノムワイド関連解析の先行研究として、SLE患者群・対照群のプールDNAを被

検材料としてAffymetrix社500Kアレイによる定量的SNP解析を行った。アレイの生データ (蛍光シグナル強度) から算出するアレル頻度差の指標としてシルエットスコアを含め数種類の指標の有効性を比較検討した。またノイズの影響をスライディングウィンドウ解析により排除した。二次スクリーニングには定量的PLACE-SSCP法を用い、さらに擬陽性を除去した。最終的に全サンプルのタイピングによりSLEと非常に強い関連を示す複数のSNPを同定した。このうち最も関連の強かったSNPはIkaros遺伝子の上流域にあった。Ikarosは免疫系の分化に深く関与する転写因子をコードしており、今後同遺伝子領域での多型が病態に関連する機序を解明して行く予定である。

2. 平成17年度より候補遺伝子アプローチとして、SLEへの関連が疑われる遺伝子上のSNPについてDNAプールのPLACE-SSCP解析によりSLEとの関連を検討してきた。その結果、転写因子IRF5、補体C3の遺伝子等のSNPが疾患との関連の強いSNPとして検出された。補体C3のSNPについてはリスクアレルの数と血中C3濃度の間の相関を検出し、このSNPを含むハプロタイプがC3の発現あるいは安定性にかかわっている可能性を示した。IRF5のSNPは欧米での先行研究と同様に、日本・韓国・台湾のアジア集団でもSLEと強い関連を示したが、両人種間でリスクハプロタイプには違いがあることをタイピングによって明らかにした。また、IRF5プロモーターの上流の転写因子Sp1結合部位の繰り返し数が4であるアレルがこの領域で最も強い関連を示すという報告がなされた (Sigurdsson et al., 2008) が、我々の日本人の結果でもこの繰り返し数が4であるアレルをホモに持つ人は3をホモに持つ人に比べリスクが3倍になることを示した。前者は後者に比べIRF5発現が高いことも確認できた。従ってIRF5の発現上昇がSLEの発症リスクと関連していると結論した。

3. D-HaploDB(我々が280K個のSNPを用いて決定した日本人確定ハプロタイプのデータベース。既にD1 phaseを公開済み)にAffymetrix社500Kアレイを用いて新たにタイピングしたSNP情報を追加し、連鎖不平衡構造及びtagSNP情報をより精細にした(D2 phaseとして公開)。D2 phaseのtagSNPにより、頻度5%以上の未知SNPの80%を $r^2>0.8$ としてキャプチャーできた。また、連鎖不平衡構造がD1、D2間で変わらない領域も多く、それらの領域では既に連鎖不平衡解析に十分なSNP密度が達成されたと考えられる。

4. SNP同定とアレル頻度推定のためのPLACE-SSCP及びシーケンシング解析プロセスを一貫して管理するWindows用ソフトウェア「QSNPLite」を改良し、各実験で得られたアレル頻度データを出力ファイルから収集する機能を追加した。

5. 家族性滲出性硝子体網膜症 (FEVR) の患者の遺伝子解析を行い、これまでにfrizzled 4 (Wntシグナルの細胞表面受容体) をコードするFDZ4、共受容体をコードするLRP5、リガンドをコードするNDPにそれぞれ複数の突然変異を同定した。我々は変異の違いにより疾患重症度の相違が見られる機構を解明するため、遺伝子変異がWntシグナル標的遺伝子の発現へ与える影響を定量化した。その結果、Wntシグナル古典的経路の阻害と表現型が相関しない場合もあり、発症要因が複合的であることを明らかにした。

6. PLACE-SSCP解析ではSNPアレルの量比を正確に決定できる。そこでこの解析法を脳腫瘍組織でのloss of heterozygosity (LOH) 解析に応用し、髄膜腫組織での高頻度LOH領域を決定した。

#### <国内外での成果の位置づけ>

DNA プールを用いたマイクロアレイによるゲノムワイド関連解析は関連解析の新たな方法として海外でも模索され始めているが、本研究はその先端をいくもので、さらにPLACE-SSCP法という独自開発技術を組み合わせることにより効率化を図っている。SLEに関しては国外で、ごく最近ゲノムワイド関連解析の報告がなされた(2008年1月、オンライン速報版)。しかし、SLEと非常に関連が高いと報告されたSNPのいくつかはHapMapで使用された日本人試料では検出されておらず、日本人集団では非常にまれであると予想される。SLEを含む自己免疫疾患ではこれまでも、欧米集団とアジア人集団とではリスクアレルが共通しないケースが多数あり、これは疾患感受性あるいは抵抗性が人種固有の環境要因(感染症など)を背景に形作られたためと考えられる。従って、日本人のSLEの関連解析およびハプロタイプ構造の解明をめざす本研究は、免疫応答に関連した疾患の研究に広く役立つものである。今回我々は新規SLE関連遺伝子を同定し、国内外に先行する成果をあげている。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Affymetrix 500Kによるプール解析では、既に我々が候補遺伝子アプローチでSLEとの関連を確認しているIRF5遺伝子との関連を検出できなかった。これは、今回使用した既製の500Kマイクロアレイにはその領域のプロープが少ないことによるものである。完全胞状奇胎DNAのコピー数多型の解析についても、アレイのプロープが設計されていない領域が多いため現在得られているデータでは不完全であることがわかった。従って、日本人ゲノムワイド関連解析用DNAアレイの開発が必要であると考えられるが、市販のアレイも高密度化していることから、まず次世代のアレイの有用性を検討することを考えている。

#### <今後の課題>

DNA プールを用いたマイクロアレイによるゲノムワイド関連解析において、より検出力を高め偽陽性を減らす手法を開発する。またSLEで同定されたリスクアレルの生物活性を検討する。D-HaploDBをもとに疾患原因遺伝子同定の効率を飛躍的に高めるためのtagSNPを用いたDNAプールの関連解析法を開発する。

#### <成果公表リスト>

- 1) 論文/プロシーディング(査読付きのものに限る)
  1. 0710182010  
Miyagawa H, Yamai M, Sakaguchi D, Kiyohara C, Tsukamoto H, Kimoto Y, Nakamura T, Lee J-H, Tsai C-Y, Chiang B-L, Nagasawa K, Harada M, Tahira T, Hayashi K, Horiuchi T. Association of polymorphisms in complement component C3 gene with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (in press)
  2. 0710182005  
Guan Y, Hata N, Kuga D, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Shono T, Suzuki S, Tahira T, Kukita Y, Higasa K, Yokoyama N, Nagata S, Iwaki T, Sasaki T, Hayashi K. Narrowing the regions of allelic losses of chromosome 1p36 in meningioma tissues by an improved SSCP analysis. *Int. J. Cancer* (in press)
  3. 0710182002  
Qin M, Kondo H, Tahira T, Hayashi K.(2008) Moderate

reduction of Norrin signaling activity associated with the causative missense mutations identified in patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Human Genetics* 122:615-623.

4. 0801231543  
Kondo H, Qin M, Tahira T, Hayashi K. (2007) Severe Form of Familial Exudative Vitreoretinopathy Caused by Homozygous R417Q Mutation in Frizzled-4 Gene. *Ophthalmic Genetics* 28:220-223.
  5. 0608071243  
Mitsuyasu H, Kawasaki H, Ninomiya H, Kinukawa N, Yamanaka T, Tahira T, Stanton VP, Springett GM, Hayashi K, Tashiro N, Kanba S (2007) Genetic structure of the dopamine receptor D4 gene (DRD4) and lack of association with schizophrenia in Japanese patients. *J. Psychiatric Research* 41: 763-775.
  6. 0801231727  
Yanaru-Fujisawa R, Matsumoto T, Kukita Y, Nakamura S, Yao T, Hayashi K, Iida M. (2007) Impact of Phospholipase A2 group IIa gene polymorphism on phenotypic features of patients with familial adenomatous polyposis Dis Colon Rectum. 50: 223-231.
  7. 0701291716  
Kondo H, Qin M, Kusaka S, Tahira T, Hasebe H, Hayashi H, Uchio E, Hayashi K (2007) Novel Mutations in Norrie Disease Gene in Japanese Patients with Norrie Disease and Familial Exudative Vitreoretinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48: 1276-1282.
  8. 0612191638  
Higasa K, Miyatake K, Kukita Y, Tahira T, Hayashi K. (2007) D-HaploDB: a database of definitive haplotypes determined by genotyping complete hydatidiform mole samples. *Nucleic Acids Res.* 35: D685-689.
  9. 0701191537  
Horiuchi T, Kiyohara C, Tsukamoto H, Sawabe T, Furugo I, Yoshizawa S, Ueda A, Tada Y, Nakamura T, Kimoto Y, Mitoma H, Harashima S, Yoshizawa S, Shimoda T, Okamura S, Nagasawa K, Harada M. (2007) A functional M196R polymorphism of tumor necrosis factor receptor type 2 is associated with systemic lupus erythematosus: a case-control study and a meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* 66, 320-324.
- 2)データベース/ソフトウェア
1. 0602202030  
「dbQSNP public」(<http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp>)  
ゲノムの遺伝子発現制御ゲノム領域に存在するSNPを検索し、そのアレル頻度を決定した結果に関する公開データベース。
  2. 0602202024  
「D-Haplo-DB」(<http://orca.gen.kyushu-u.ac.jp>)  
完全胞状奇胎を用いて直接決定した日本人ゲノムのハプロタイプに関する公開データベース。
  3. 0612191657  
「QSNP-lite」(<http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp/placeSSCP/qsnplite/>)  
シーケンシング及びDNAプールのPLACE-SSCP法を行い、それらの結果を統合してSNPを同定し、且つアレル頻度を決定するためのWindows上で稼動する解析ソフトウェア  
本研究には九州大学 林 健志が研究協力者として参加している。