

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¹⁾ ◆久木田 洋児¹⁾ ◆堀内 孝彦²⁾ ◆林 健志¹⁾

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>

ヒトゲノム科学の現在の最大課題は、ゲノムワイド関連解析により種々の多因子性疾患の遺伝要因を網羅的に探索し、同定することである。これを効率的に行うためには、対象ヒト集団のゲノム多型情報の基盤整備、及び現実的コストでの関連解析手段の確立が不可欠である。本研究では、(1)日本人ゲノムのハプロタイプ構造及び多型分布の特徴を解明し、これをデータベース化して公開する。(2)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を疾患要因遺伝子の一次スクリーニングの基盤技術として確立する。また、(3)これらの方法論及び情報基盤を利用した先行研究として、自己免疫疾患の遺伝要因の探索をゲノムワイド関連解析によって行う。これらによって、多因子性遺伝性形質の要因遺伝子同定の有効かつ現実的方法論を確立すると共に自己免疫疾患の適切な診断、新治療法の開発、及び予防に寄与することを目標とする。

<2008年度の研究の当初計画>

1. 単一精子由来全胎状奇胎 DNA について、ゲノムワイドアレイによりコピー数多型 (CNV) プローブ約 95 万個を含む約 180 万個のマーカについてタイピングした結果を D-Haplo データベースに公開し、既に公開している日本人ゲノムのハプロタイプ構造をより精細にし、CNV と SNP の連鎖不平衡構造を明らかにする。また、この情報を疾患の関連解析に利用し、有用性を確認する。
2. 日本人集団内での人種内不均一性の有無、またその指標となる遺伝子領域を検索するため、国内 7 地域 7 群の DNA プールを用い後述のマイクロアレイによるゲノムワイド解析を行い、得られた結果を PLACE-SSCP 法等で確認する。
3. DNA プールを用いた関連解析では、疾患群・対照群のプールを最新のゲノムワイドアレイで解析し、その生データ (蛍光シグナル強度) からアレル頻度差の指標を求める。それらの妥当性を検証するために、各方法で上位にランクされた SNP について PLACE-SSCP 法で解析することにより関連の有無を実験的に評価し、より擬陽性率が低く検出力の高い計算方法を検討する。
4. 上記手法で、全身性エリテマトーデス (SLE) 疾患感受性遺伝子の領域を検索し、独自開発した dbQSNP 実験管理システムを利用して定量的 PLACE-SSCP 解析を行うことにより原因遺伝子領域をより詳細に解析し、最終的に各検体をタイピングすることによって確定する。同定された遺伝子について、その病態への関与がどのような生物学的活性によるものかを文献情報、発現情報、パスウェイ解析等を駆使して検討し、検証するための実験を行う。

<2008年度の成果>

1. 単一精子由来全胎状奇胎 DNA について Affymetrix SNP Array 6.0 によりコピー数多型を含む約 180 万個のマーカについてタイピングした。このうち約 90 万個の SNP タイピングの結果は D-Haplo データベースに公開しており、既に公開している日本人ゲノムのハプロタイプ構造をより精細にした。さらに約 95

万個の CNV プローブを含めた解析により日本人ゲノムの CNV 領域を探索し、新規 CNV 領域と推定される領域を多数見出した。これらにより日本人ゲノムの CNV マップを構築した。

2. 全胎状奇胎 DNA による日本人確定ハプロタイプ構造 (D-HaploDB) と国際 HapMap 計画による日本人推定ハプロタイプ構造とを比較した結果、大部分の領域では類似の構造であるが、HLA 領域をはじめ、多くの領域で推定ハプロタイプの誤りの頻度が高くなっており、またこのような領域の多くがこれまでの遺伝学的解析で自然選択を受けた領域として報告されたものと一致することを見出した。

3. プール DNA を用いたゲノムワイド関連解析 (P-GWAS) により全身性エリテマトーデス (SLE) 感受性遺伝子の探索を行った。昨年度より 500K アレイによる定量的 SNP 解析により疾患関連 SNP の一次スクリーニング、定量的 PLACE-SSCP 法を用いた二次スクリーニングを行っており、これら 2 段階の検討で非常に強い関連が示された複数の SNP について個別タイピングによっても疾患との関連を確認した。さらに、追加のサンプルで関連を確認することができ、これらの複数のサンプルをメタアナリシスした場合の有意差はマーカー数での多重検定の補正を行っても十分に有意であった (投稿準備中)。これらの中には欧米のグループにより SLE 関連遺伝子として同定された複数の SNP に加え新規なものも含まれており、この手法の有用性を示した。

4. マイクロアレイデータの定量的解析を発展させて、脳腫瘍 DNA のヘテロ接合性欠失 (LOH) の解析を行った。レーザーマイクロダイセクション法により切り出した腫瘍細胞から抽出したゲノム DNA のマイクロアレイ解析によりコピー数が変化しないタイプの LOH、つまり片側のアレルが倍加しているものを高頻度に検出した。これらをマイクロサテライト解析および染色体 FISH 解析により確認し、このような特異な染色体変化が癌化に関わっていることを証明した。

<国内外での成果の位置づけ>

単一精子由来全胎状奇胎 DNA による確定ハプロタイプ構造の決定は国内外でも例がなく、我々はハプロイドゲノムを対象とする独自の情報処理技術を開発しつつ解析を行っている。日本人ゲノムの CNV 領域については最近 McCarroll らが HapMap サンプルを詳細に解析した結果を報告した。彼らの検出した CNV 領域の一部は我々が検出したものとよく一致しており、われわれの解析手法の正当性を示すとともにハプロイドゲノムでの検出がより感度が良いことを証明した。

DNA プールを用いたマイクロアレイによる解析はこれまでで不可避とされてきたゲノムワイド関連解析の莫大な費用、労力を大幅に削減する新たな方法として期待されているが、海外での報告も限られていた。これは、1. 個人ジェノタイプ情報がプーリングによって失われるために被検集団の階層化 (stratification) の可能性が検出不可能となることにより、関連解析での擬陽性を除去することが困難となる、2. アレイ解析でのシグナル強度からアレル頻度を推定するが、これは必然的に S/N 比の低い実験系

であり、擬陰性、擬陽性の率が上昇する、の2点を解決する必要があるのであった。

本研究では、定量的PLACE-SSCP法という独自開発技術によりマイクロアレイでの定量性を確認し個別タイピングの対象とするSNPを選別することと、複数の独立な日本人患者対照群集団を確認実験に用いることによってこの問題を解決した。即ち、非常に効率的に新規および既知のSLE感受性領域を検出することができた。SLEに関しては西欧人でのゲノムワイド関連解析はいくつか報告されているが、アジア人に関しては本研究が最初である。自己免疫疾患の感受性遺伝子の多くは人種間で共通でないため、我々の先行する成果は重要である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

国内7地域7群のDNAプールを用いた日本人集団内での人種内不均一性の有無、またその指標となる遺伝子領域を検索する実験は行わなかった。これは、これらのサンプルが過去に収集されたものでありサンプルの独立性についての情報が現状では不十分であるためである。これらの情報は現在確認中であるので、それが得られたのちに実験を行う。

<今後の課題>

全胎状奇胎DNAについては前述の約180万個のマーカーでのタイピング結果に加え、別のセットの高密度マーカーでもタイピングを行い、CNVとSNPの連鎖不平衡構造を明らかにする。また、この情報を疾患の関連解析に利用し、有用性を確認する。さらに、他の人種集団のハプロタイプ構造と比較し、日本人集団における自然選択の痕跡を遺伝情報から明らかにする。自己免疫疾患の遺伝要因の探索に関してはプールDNAの定量的SSCP解析を利用してさらに感受性領域を精査するとともに、それらの病態への関与を生物学的パスウェイの解析により検討する。これらにより疾患の予防・治療の手掛かりとなる知見を得る。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. 0811061603
Kuga D, Mizoguchi M, Guan Y, Hata N, Yoshimoto K, Shono T, Suzuki SO, Kukita Y, Tahira T, Nagata S, Sasaki T, Hayashi K. Prevalence of copy number neutral LOH in glioblastomas revealed by genome-wide analysis of laser-microdissected tissues. *Neuro Oncl.* 10:995-1003 (2008)

2. 0811061612
Kozawa M, Kondo H, Tahira T, Hayashi K, Uchio E. Novel mutation in PAX3 gene in Waardenburg syndrome accompanied by unilateral macular degeneration. *Eye in press*

3. 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* 47:158-164 (2008)

4. 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* 122:1820-1826 (2008)

5. 0710182002
Qin M, Kondo H, Tahira T, Hayashi K. Moderate reduction of Norrin signaling activity associated with the causative missense mutations identified in patients with familial exudative vitreoretinopathy. *Human Genetics* 122:615-623 (2008)

6. 0901131327
Kikuchi Y, Koarada S, Nakamura S, Yonemitsu N, Tada Y, Haruta Y, Morito F, Ohta A, Miyake K, Horiuchi T, Nagasawa K. Increase of RP105-lacking activated B cells in the peripheral blood and salivary glands in patients with Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 26: 5-12 (2008)

7. 0901131330
Tamimoto Y, Horiuchi T, Tsukamoto H, Otsuka J, Mitoma H, Kimoto Y, Nakashima H, Muta K, Abe Y, Kiyohara C, Ueda A, Nagasawa K, Yoshizawa S, Shimoda T, Harada M. A dose-escalation study of rituximab for treatment of systemic lupus erythematosus and Evans' syndrome: Immunological analysis of B cells, T cells and cytokines. *Rheumatology* 47: 821-827 (2008)

8. 0901131334
Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Tamimoto Y, Kimoto Y, Uchino A, To K, Harashima S, Hatta N, Harada M. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-TNF agents on transmembrane TNF-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept and adalimumab. *Arthritis Rheum* 58: 1248-1257 (2008)

9. 0901131337
Kobayashi S, Ikari K, Kochi Y, Inoue H, Kaneko H, Yamamoto K, Shimane K, Nakamura Y, Itakura M, Hamada D, Yasui N, Tao K, Yasutomo K, Horiuchi T, Toyama Y, Mochizuki T, Tsukahara S, Kawaguchi Y, Terai C, Hara M, Tomatsu T, Yamanaka H, Okamoto H, Kamatani N, Momohara S. Association of STAT4 with susceptibility to rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in Japanese. *Arthritis Rheum* 58: 1940-1946 (2008)

10. 0901131341
Harashima SI, Kondo H, Nabeshima A, Shimoda M, Yamaji K, Horiuchi T, Shimono N, Ikematsu H. The relationship between the daily dosage of the carbapenem MEPM and MEPM-resistant *P. aeruginosa*. *J Infect Chemother* 14: 219-222 (2008)

2) データベース/ソフトウェア

1. 0602202024
[D-Haplo-DB] (<http://orca.gen.kyushu-u.ac.jp>)
全胎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。

2. 0602202030
[dbQSNP public] (<http://qsnp.gen.kyushu-u.ac.jp>)
遺伝子発現制御ゲノム領域等に存在するSNPを探索しアレル頻度を決定した結果に関する公開データベース。

3. 0612191657
[QSNPlite] <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