

疾患関連変異探索のための遺伝統計学的解析法の開発と Dengue 出血熱関連解析への応用

●大橋 順
東京大学医学部

<研究の目的と進め方>

本研究は、ゲノムワイド関連分析または候補遺伝子アプローチに基づく疾患関連遺伝子探索のための、遺伝統計学的解析手法の開発を主目的とし、以下の5点を検討課題とした。

課題(1) 解析対象ゲノム領域の連鎖不平衡の程度を SNP マーカーに基づいて計算し、その結果に基づいて疾患感受性変異が存在するゲノム領域を最尤法によって予測する新規統計学的手法の開発を行う。

課題(2) もっとも小さいP値を示したSNPが必ずしも疾患関連変異であるわけではない。着目するSNPよりも周辺SNPの方がより小さいP値を示す確率（これが低いほど着目するSNPが疾患関連変異である可能性が高い）を評価するアルゴリズムの開発を行う。

課題(3)ゲノムワイド関連分析に利用されるタイピングプラットフォームのタイピング精度を検証する。特に、Affymetrix社の GeneChip® Human Mapping 500K Array Setの遺伝子型を決定するためのBRLMMアルゴリズムの妥当性を評価するとともに、適切な使用方法を提案する

課題(4) HapMapデータベースを利用して選択したタグSNPが、HapMap集団以外の集団でもタグSNPとして働かうか否か（タグSNPの転用性）を、実データをもとに検討する。

全世界で年間2000万人が Dengue ウイルス感染し、24000人が死亡する。特に、Dengue 出血熱の死亡率は5%にも達する。Dengue 熱および Dengue 出血熱の治療は基本的には対症療法しかなく、Dengue 熱から出血熱への移行を予測するのは困難である。また、Dengue 出血熱の発症メカニズムについて様々な機序が仮説として提唱はされているが、その原因はいまだ不明である。そこで、課題(5) Dengue 出血熱発症のヒト側の原因因子解明を目的として、タイ人集団（約800名）を対象に、本研究で開発した遺伝統計学的解析手法を用いて、Dengue 出血熱関連遺伝子変異の探索を行う。

<2007年度の研究の当初計画>

2006年度中に課題(1)および課題(2)を解決し、課題(5)については、TNFA 遺伝子プロモーター多型、TNFR2 多型、IL1B 遺伝子プロモーター多型、IL1RA 遺伝子 VNTR 多型、CD209 遺伝子プロモーター領域多型の解析を完了したが、有意差を示すような変異は観察されなかった。2007年度は課題(3)、課題(4)、課題(5)について次のような研究を計画した。

課題(3) 同一サンプルを複数回解析し、BRLMM アルゴリズムによってミスタイピングが生じる条件の検討を行い、ミスタイピングを防ぐためのパラメタ設定の条件を検討する。

課題(4) タイ・バンコクに居住する健康タイ人96名を対象に、5q31-33領域(522kb)に存在する77個のSNPを調べ、タイ人集団における当該ゲノム領域のハプロタイプブロック構造を解明する。さらに、HapMap 集団におけるハプロタイプブロック構造

と比較し、HapMap 集団のデータをもとに選択したタグSNPのタイ人集団（東南アジア人集団）への転用可能性を検討する。

課題(5) ヒト5番染色体のインターロイキン遺伝子群が存在する領域(5q31-33)の約50個のSNPに対して関連解析を行う。また、関連する遺伝子変異が同定されれば、本研究で開発した手法（課題(1)）を用いて、その周辺領域配列を詳細に解析し、一義的な変異の同定を目指す。

<2007年度の成果>

課題(3) 12サンプルを2度解析し、BRLMM アルゴリズムの閾値Tによってコールの一致率を比較した。閾値Tを高く設定すると、コール率は上がるが、一致率が下がる（エラーが起こることが確認された（図1））。この結果から、Affymetrix社が推奨するT=0.5の閾値を採用した場合には、各検体について1%弱のタイピングエラーが起こる可能性があることがわかる。そのため、ゲノムワイドSNP解析において、正確なタイピング結果が必要なのか、それとも単なるスクリーニングとして利用するのか、といった研究デザインに応じて、個々の研究の性格に応じて閾値を決定すべきであろう。

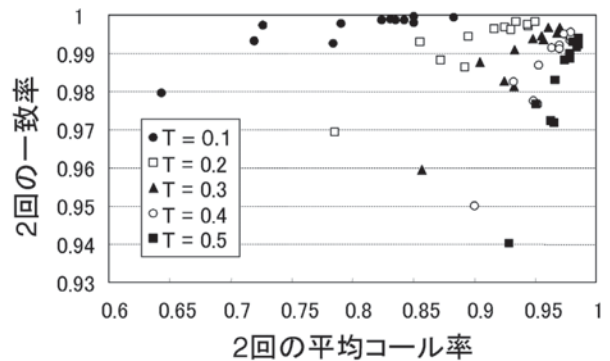


図1 同一サンプルに対して2度タイピングした場合の平均コール率とコール一致率との関係

課題(4) タイ人集団においてタイピングした77個のSNPのうち、49個がHapMapの4集団でも解析されていた。そこで、これらのSNP遺伝子型情報をもとに、ハプロタイプブロック構造をHaploviewソフトウェアを利用して決定した（図2）。なお、CHBとJPT集団との間に大きな差がみられなかったため、図2では、これら2集団をあわせてCHB+JPT集団として解析を行った。東南アジア人であるタイ人集団のペアワイズ連鎖不平衡値(r^2)およびハプロタイプブロック構造は、北東アジア人であるCHB+JPT集団と極めて似ていることが確認された。

また、TAGGERを用いてCHB+JPT集団をもとに13個のタグSNPを選択したところ（各パラメタはデフォルト値を使用）、タグSNPとして選択されなかった36個のSNPのうち32個が

タイ人集団でもタグできることが確認された。残りの4個の SNP においても、平均の $\max r^2$ 値は 0.679 であり、CHB+JPT 集団のデータを用いて、タイ人集団でも十分有用なタグ SNP を選択可能なこと（タグ SNP の転用効率がよいこと）が明らかとなった。この結果は、タイ人集団に限らず、東南アジア人集団の関連解析において、HapMap の北東アジア人集団（CHB+JPT）のデータが有用であることを示唆している。

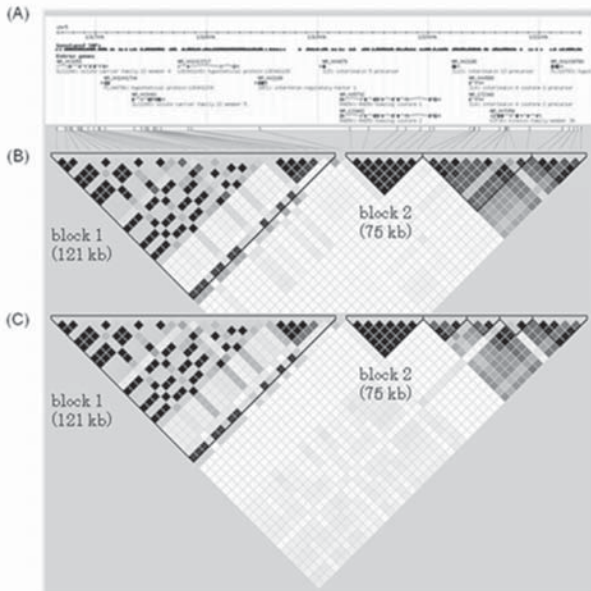


図2 5q31-33領域のハプロタイプブロック構造 (A)49個のSNPの物理位置、(B)CHB+JPT集団、(C)タイ人集団

課題(5) インターロイキン遺伝子群が存在する領域(5q31-33)の47個のSNPに対して関連解析を行った。対立遺伝子頻度をデング熱患者とデング出血熱患者との間で比較した結果を図3に示す。なお、この図は2つのタイ人地域集団に対して行った結果を統合したP値である。強い連鎖不平衡のため、単独のSNPを絞り込むことはできないが、IL4遺伝子とIL13遺伝子との間にデング出血熱感受性と有意 ($P < 0.05$) に関連するSNPが複数存在していた。

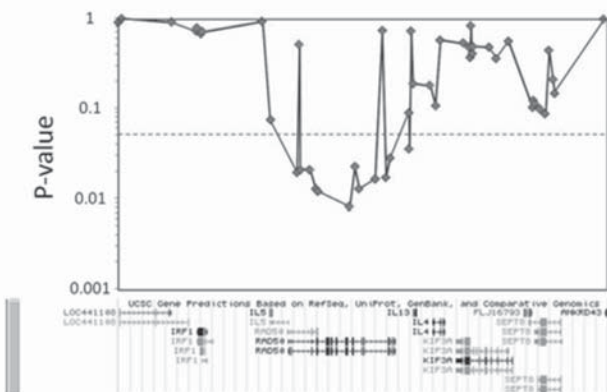


図3 47個のSNPにおける統合P値（デング熱患者とデング出血熱患者との比較）

<国内外での成果の位置づけ>

大規模な全ゲノム関連解析が可能になり、統計解析手法によってどこまで疾患感受性変異を絞り込むことができるかに注目が集

まっている。本研究によって開発を目指す統計解析手法は疾患を問わず使用することができ、国内外を問わずに、多くの研究で利用されることを期待している。デング出血熱と関連するヒト遺伝子多型の研究はほとんど行われていない。本研究ほど多くの患者検体を解析しているグループは世界的にもなく、本研究の果たすべき役割は極めて大きい。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

デング出血熱関連変異探索においては、インターロイキン遺伝子群中のSNP連鎖不平衡が強く、デング出血熱と一義的に関連するSNPを検出するには至らなかった。

<今後の課題>

遺伝統計学的解析手法の開発については、HapMapデータベース情報をもとに、未タイピングSNPにおける関連を予測し、無駄なタイピングを避けて研究コストを削減できるアルゴリズムの開発を目指す。また、新たなデング出血熱関連変異を探索するため、ツール様受容体遺伝子群などの免疫関連遺伝子を候補遺伝子として解析を続けていく。

<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. 801092012（論文）

Nuchnoi P, Ohashi J et al. Significant association between TIM1 promoter polymorphisms and protection against cerebral malaria in Thailand, *Annals of Human Genetics*, in press

2. 710171803（論文）

Ohashi J et al. FTO polymorphisms in Oceanic populations, *Journal of Human Genetics*, 52: 1031-1035 (2007)

3. 0801271714（論文）

Kimura R, Fujimoto A, Tokunaga K, Ohashi J, A practical genome scan for population-specific strong selective sweeps that have reached fixation, *PLoS One*, 2, e286 (2007)

4. 702041605（論文）

Ohashi J et al. Strong linkage disequilibrium of a HbE variant with the (AT)9(T)5 repeat in the BP1 binding site upstream of the beta-globin gene in the Thai population., *J Hum Genet*, 2005;50(1):7-11.

5. 705042021（論文）

Naka I, Ohashi J et al. The genotypes of GYPA and GYPB carrying the MNSs antigens are not associated with cerebral malaria, *Journal of Human Genetics*, 52(5), 476-479 (2007)

6. 801271647（論文）

Hirayasu K, Ohashi J et al. Long-term persistence of both functional and non-functional alleles at the leukocyte immunoglobulin-like receptor A3 (LILRA3) locus suggests balancing selection, *Human Genetics*, 119, 436-443 (2006)

7. 702041643（論文）

Ohashi J et al. A functional polymorphism in the IL1B gene promoter, IL1B -31C>T, is not associated with cerebral malaria in Thailand., *Malar J.*, 2005 Aug 14;4:38

2) データベース/ソフトウェア

なし