

## 気管支喘息の全ゲノム関連解析：基盤構築と情報公開

●野口 恵美子

筑波大学大学院人間総合科学研究科

### <研究の目的と進め方>

本研究では小児アトピー性喘息患者を対象に 55 万 SNP (イルミナ Human Hap550) をタイピングし、今後公開予定である日本人コントロール 1000 人 (Human Hap550 を使用) のデータとあわせて解析する。情報をウェブで公開することによりアジア人における喘息一次スクリーニングのデータを提供することが可能となり、当該分野に貢献することが可能となる。また、Human Hap550 で解析するサンプルについては末梢血単核球の RNA も取得しており、別の研究で解析予定の全遺伝子発現解析のデータと統合し、SNP による発現調節について網羅的に解析する。

### < 2008 年度の研究の当初計画 >

小児アトピー性喘息患者 150 名を対象にイルミナ社の Human Hap 550 を用いて約 55 万 SNP の遺伝子型決定を行う。申請者が既に取得している独立した 288 人の小児アトピー性喘息患者約 10 万 SNP 分のデータが使用可能であり、10 万 SNP のうち、Human Hap550 と 16810SNP が共通である。これらの共通 SNP のデータについては統合し (小児アトピー性喘息患者、計 438 人)、今後公開予定である日本人コントロール 1000 人の遺伝子型頻度をコントロールとして、 $\chi^2$  検定による統計解析を行う。関連の認められた SNP については独立した家系サンプル、および症例対照研究による関連解析 (連鎖不平衡テスト、pedigree disequilibrium test) を行う。関連が追認された遺伝子については機能解析に着手する。

### < 2008 年度の成果 >

小児アトピー性喘息患者 170 名を対象にイルミナの Human Hap 550Duo を用いて約 55 万 SNP の遺伝子型決定を行った。全サンプルの平均 Call rate は 99.7% (最も低いものは 97%) であり、良好なタイピング結果が得られた。サンプルの階層化について検討するためにこれらのタイピングデータから約 10 万 SNP について各個人の遺伝子データを抽出し、PLINK(Purcell et al, 2007) および EIGENSTRAT(Price et al, 2006) を用いて解析した。サンプル中にはクラスターから大きく外れる個人は存在しなかったが、近親者である可能性があるサンプルが 2 組検出されたため、それらのサンプルのうちの 1 名をランダムに除外した。国立成育医療センター研究所免疫アレルギー研究部、斎藤博久先生および松本健治先生との共同研究 (基盤研指定研究班) で、同じイルミナのプラットフォーム (Human Hap550) でタイピングされた小児アトピー性喘息 399 名と健康日本人成人で現時点で喘息のない 964 名のデータと統合し、 $\chi^2$  検定による解析を行った。また、公表されている日本人コントロール 934 人の遺伝子型頻度 (JSNP550typed) のアレル頻度も参考とした。

一次解析の結果 (小児アトピー性喘息患者 467 名 vs 成人コン

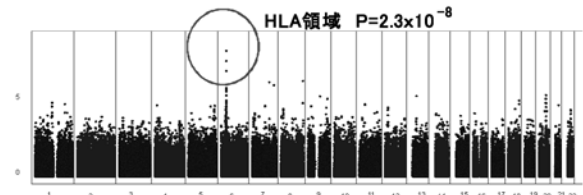


図 小児アトピー性喘息GWAS一次解析の結果

トロール 964 名の 55 万 SNP の GWAS) を図に示す。55 万 SNP のうち、minor allele frequency が 0.01 以上の SNP は 455,056 個であった。アレル頻度の比較では、6 番染色体短腕の HLA 領域で最も強い関連が認められた ( $P = 2.3 \times 10^{-8}$ )。そのほかにも私たちが過去に小児アトピー性気管支喘息全ゲノム連鎖解析で強い連鎖を報告した 5 番染色体長腕領域においても  $P < 1 \times 10^{-4}$  の関連が認められる SNP が複数認められた。そのほか 20 番染色体長腕領域の複数の SNP が  $P < 1 \times 10^{-4}$  の関連が認められたが、これは遺伝子が存在しない領域であった。

### <国内外での成果の位置づけ>

気管支喘息の全ゲノム関連解析は 2007 年に白人サンプルを用いた解析で Orm1-like protein 3 (ORMDL3, Moffatt et al, Nature 2007) が、2008 年に総 IgE 値に関連する遺伝子として Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for, alpha subunit FCER1A (Wedinger et al, PLoS Genet, 2008) がそれぞれ報告されたのみで、他のアトピー性疾患や白人以外のサンプルを用いた報告はない。

ORMDL3 が存在する 17q21 の遺伝子多型のリスクアレルは 4 歳以下の発症の場合には喘息発症の可能性を高めるが、発症年齢が高い場合にはそのような関連が認められないことが報告されている。さらに 17q21 の遺伝子多型のリスクアレルが乳幼児に与える喘息発症の影響はタバコの煙による暴露でさらに増加する (Bouzigon E et al, NEJM, 2008)。本邦においても ORMDL3 の遺伝子多型が小児アトピー性喘息と関連することが理化学研究所の玉利らのグループ (本研究代表者 (野口) も共同研究により参加) により報告されている (Hirota et al., J Allergy Clin Immunol, 2008)。

### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

今年度中に一次解析で関連の認められた SNP をさらに二次解析において追認することについては達成できなかった。本研究代表者は複数の研究機関と共同研究をおこなっており、サンプル採取に時間がかかったことが理由としてあげられる。サンプルについては現在、順調に採取がすすんでいるため、平成 21 年度には二次解析が可能と考えられる。

当初は研究代表者が既に取得している小児アトピー性喘息患者

288人約10万SNP分のデータとHuman Hap550で共通する16810SNPのデータを使用する予定であったが、国立成育医療センターとの共同研究が可能となったため、当初の予定を変更して、Human Hap550のデータのみの解析とした。

2)データベース/ソフトウェア  
該当なし

#### <今後の課題>

平成21年度の研究計画として、現在取集中の1000例の小児アトピー性喘息患者とIgE陰性のスーパーコントロール1000例を用いた二次解析により結果を追認する予定である。症例およびコントロールともに平成21年3月に収集が完了する予定である。

タイピングについてはTaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems)を使用する。

追認されたSNPについては、共同研究先であるドイツフライブルグ小児病院のDr Andrea Heinzmannにドイツ人小児喘息症例およびコントロールを用いた追認研究を依頼する。

関連が追認されたSNPについてはルシフェラーゼアッセイ、遺伝子型別、細胞別 (CD4+細胞、好塩基球、monocyte) の発現量解析、遺伝子についてはモデル動物による動物実験により疾患との関連について解析を行う。

#### <成果公表リスト>

##### 1)論文/プロシーディング

##### 1. 受付番号 0806261350

Nishioka T, Uchida K, Meno K, Ishii T, Aoki T, Imada Y, Makino Y, Hirata K, Matsumoto Y, Arinami T, Noguchi E: Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation. *Proteomics Clin Appl* 2008, 2:46-54.

##### 2. 受付番号: 0901141024

Enomoto H, Hirata K, Otsuka K, Kawai T, Takahashi T, Hirota T, Suzuki Y, Tamari M, Otsuka F, Fujieda S, Arinami T, Noguchi E: Filaggrin null mutations are associated with atopic dermatitis and elevated levels of IgE in the Japanese population, family and case-control study. *J Hum Genet* 2008. *J Hum Genet*. 2008;53:615-21

##### 3. 受付番号: 0901141026

Harada M, Hirota T, Jodo AI, Doi S, Kameda M, Fujita K, Miyatake A, Enomoto T, Noguchi E, Yoshihara S, Ebisawa M, Saito H, Matsumoto K, Nakamura Y, Ziegler SF, Tamari M: Functional analysis of the Thymic Stromal Lymphopoietin Variants in Human Bronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008.

##### 4. 受付番号 0806261400

Hirota T, Harada M, Sakashita M, Doi S, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Ebisawa M, Yoshihara S, Noguchi E, Saito H, Nakamura Y, Tamari M: Genetic polymorphism regulating ORM1-like 3 (*Saccharomyces cerevisiae*) expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol* 2008, 121:769-770.

##### 5. 受付番号: 0901141025

Aoki T, Matsumoto Y, Hirata K, Ochiai K, Okada M, Ichikawa K, Shibasaki M, Arinami T, Sumazaki R, Noguchi E: Expression profiling of genes related to asthma exacerbations. *Clin Exp Allergy* 2009 in press