

大規模全ゲノム関連解析によるアトピー性喘息疾患遺伝子の探索

●野口 恵美子

筑波大学大学院人間総合科学研究科・社会環境医学専攻遺伝医学分野

<研究の目的と進め方>

喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症などのアトピー性疾患は21世紀の国民病と言われており、その病態の解明と診断、治療の開発が急務である。喘息は遺伝要因と環境要因がその発症にかかわっている。本研究では一塩基置換多型 (SNP) による気管支喘息全ゲノム関連解析の結果から陽性となった SNP (一次解析) をさらに家系およびケースコントロールのサンプルを用いて関連解析 (二次解析、三次解析) を行うことにより疾患感受性遺伝子を探索することを目的とする。18年度に喘息患者、コントロールおよび喘息患者家系を用いた3段階の全ゲノム関連解析を行いによる遺伝子同定を終了し、19年度にかけて該当遺伝子の機能解析を行う。

<2007年度の研究の当初計画>

2006年度に同定された疾患感受性遺伝子候補 PEX19, CRIM1 について Taq SNP 解析、SNP の機能解析、組織における発現解析を行い、疾患感受性遺伝子がどのように喘息発症と関わっているかについて検討する。

<2007年度の成果>

一次解析で関連が認められた SNP のうち、二次解析において125SNP の遺伝子型同定を行った。これらの中で、rs373619、rs3213733、rs3771140、rs2820421、rs3732073、rs3755196 の六つの SNP において一次、二次解析ともに喘息発症との関連が認められた。関連が認められた六つの SNP はそれぞれ *optical atrophy 1 (OPA1)*、*interleukin 18 receptor 1 (IL18R1)*、*hippocalcin-like 1 (HPCAL1)*、*peroxisomal biogenesis factor 19 (PEX19)*、*cysteine-rich motor neuron 1 (CRIM1)* に存在した。三次解析では CRIM1 と PEX19 の SNP において、喘息との関連が追認された。(CRIM1, combined P value 1.4×10^{-5} , PEX19, Combine P value $P = 3.9 \times 10^{-5}$)

CRIM1 はシステインリッチ運動ニューロン 1 タンパクの前駆体であり、運動ニューロンの分化や生存に関わる成長因子と相互作用することによって、中枢神経系の発達に影響している可能性、また血管の形成と保持に関与している可能性がある。PEX19 はペルオキシソーム生合成に不可欠で、細胞質のシャペロンとして、またペルオキシソーム膜タンパクに対するレセプターとして作用する。CRIM1 と PEX19 はこれまで喘息との関連は報告されていない。

本研究ではまず、気管支喘息の SNP の全ゲノム解析により気管支喘息発症と関連する SNP として同定された PEX19 -1073C/A(rs2820421) の機能解析実験および *in silico* analysis を行った。

疾患との関連が認められた rs2820421 は 150 kb にまたがる大きな連鎖不平衡ブロックの中に存在する。連鎖ブロック内には5

つの遺伝子 (PEX19, PEA15, WDR42A, COPA, NCSTN) が存在するため、どの遺伝子が疾患発症に関わるかについて、ゲノム解析でこれ以上絞り込むことは困難である。mRNA by SNP データベースは不死化 B 細胞における遺伝子発現がどの SNP によって発現調節されているかについて解析するソフトウェアである (Dixon et al., Nat Genet, 2007)。このソフトウェアによる *in silico* analysis では rs2820421 は WDR42R (LOD 値 4.003, $P = 1.8 \times 10^{-5}$)、rs2820421 と強い連鎖不平衡 ($r^2 = 0.978$) にある rs 947496 は PEX19 遺伝子 (LOD 値 4.229, $P = 1.0 \times 10^{-5}$) の発現を調節しているという結果が示唆された。さらに rs2820421 の C アレルの転写活性は A アレルと比較して有意に高く、さらにゲルシフトアッセイでは、C アレルを含むオリゴヌクレオチドは A アレルを含むものよりも結合能が高いことが観察された。以上の結果から、rs2820421 は下流遺伝子 (PEX19 および WDR42A はいずれも rs2820421 の下流に存在する) の転写活性を上昇させる働きを有するエンハンサー配列である可能性がある。本 SNP 領域に結合する可能性のある転写因子を TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>) により解析したところ、この領域には YY 1 転写因子が結合し、C が A に変化することにより転写結合能が低下することが示唆された。YY-1 転写因子はヒストン脱アセチル化酵素もしくはヒストンアセチル基転移酵素をプロモーターに導きクロマチン構造を変化させることにより、転写活性を活性化または抑制する遺伝子発現制御機能を有していることが報告されている。

本研究により PEX19 または WDR42A が喘息発症と関連していることが見出された。WDR42A 遺伝子は7つの WD リピートドメインを持ち、いくつかのスプライスバリエントがあることが知られているが、その機能については全く未知である。PEX19 は細胞質のシャペロン、ペルオキシソーム膜たんぱく質結合のためのレセプターとして機能する。

PEX19 と喘息、またはアレルギーとの関連については過去に報告がないが、PEX19 は外的刺激に対するストレスシャペロンとして働き、生体内のタンパク質が正常な構造をとることを助ける働きがある。本研究において rs2820421 の A アレルは喘息患者において有意に高頻度に観察された。この A アレルは C アレルと比較して転写活性が低くなることが本研究から明らかとなっており、過去の報告と統合するとこの SNP により PEX19 遺伝子の発現が低下し、それにとまってストレス応答が低下することにより疾患感受性が高まっている可能性が示唆される。

<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ヨーロッパ人を対象とした解析 (ORMDL3, Moffatt et al, Nature Genet, 2007) があるのみである。本研究により新たな疾患感受性遺伝子が同定されればアジ

ア人における初めての全ゲノム関連解析による喘息疾患感受性遺伝子の同定となり、あらたな病態の解明に寄与する。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ゲルシフトアッセイとそれに続くスーパーシフトアッセイについては、SNPに結合するタンパク質の同定が困難であった。CRIM1についても機能解析を行う予定であったが、PEX19領域の機能解析に重点を置いたため、達成できなかった。

<今後の課題>

PEX19 または WDR42A がどのように喘息発症と関連しているかについて免疫ストレス応答性を中心に動物実験などを行って検討していく必要があると考えられる。

<成果公表リスト>

1. Aoki T, Hirota T, Tamari M, Ichikawa K, Takeda K, Arinami T, Shibasaki M, Noguchi E (2006) An association between asthma and TNF-308G/A polymorphism: meta-analysis. *J Hum Genet* 51:677-685. (受付番号 0702141045)
2. Nishimura F, Shibasaki M, Ichikawa K, Arinami T, Noguchi E (2006) Failure to find an association between CD14-159C/T polymorphism and asthma: a family-based association test and meta-analysis. *Allergol Int* 55:55-58. (受付番号 0705071745)
3. Noguchi E, Ohtsuki Y, Tokunaga K, Yamaoka-Sageshima M, Ichikawa K, Aoki T, Shibasaki M, Arinami T (2006) ADAM33 polymorphisms are associated with asthma susceptibility in a Japanese population. *Clin Exp Allergy* 36:602-608. (受付番号 0702141050)
4. Zhang J, Migita O, Koga M, Shibasaki M, Arinami T, Noguchi E (2006) Determination of structure and transcriptional regulation of CYSLTR1 and an association study with asthma and rhinitis. *Pediatr Allergy Immunol* 17:242-249 (受付番号 0705071751)
5. Hirota, T., Harada, M., Sakashita, M., Doi, S., Miyatake, A., Fujita, K., Enomoto, T., Ebisawa, M., Yoshihara, S., Noguchi, E. *et al.* (2007) Genetic polymorphism regulating ORMDL3 expression is associated with childhood atopic asthma in a Japanese population. *J Allergy Clin Immunol*. In press
6. Nishioka, T., Uchida, K., Meno, K., Ishii, T., Aoki, T., Imada, Y., Makino, Y., Hirata, K., Matsumoto, Y., Arinami, T. Noguchi E. (2008) Alpha-1-antitrypsin and complement component C7 are involved in asthma exacerbation. *Proteomics Clinical Applications*, 2:46-254