

## SNP 解析支援体制の確立と疾患関連遺伝子の同定

●徳永 勝士<sup>1)</sup> ◆大橋 順<sup>1) 4)</sup> ◆宮寺 浩子<sup>1)</sup> ◆本多 真<sup>2)</sup> ◆慶長 直人<sup>3)</sup>

1) 東京大学医学系研究科 2) 東京都精神医学総合研究所 3) 国立国際医療センター研究所 4) 筑波大学人間総合科学研究科

## ＜研究の目的と進め方＞

本研究は2つの主要な目的を持つ。第一に、「基盤ゲノム・ヒト SNP タイピングセンター」として、ハイスループットかつ低コストの SNP 解析システムを確立し、「応用ゲノム」班員が目指す各種疾患の発症や病態に関わる遺伝子多型の探索研究を支援する。このため、数十万種以上の SNP を用いるゲノムワイド関連分析システムを導入し、多数の疾患遺伝子候補領域を検出する。また、新たな高効率・低コストの SNP 解析システムを開発して候補領域の高密度関連分析を効率化する。

第二は個別的研究であり、免疫学的機序が発症に関与すると考えられる睡眠障害や感染症の感受性遺伝子を同定し、病態機序への理解を深め、新しい治療法や予防法の開発に貢献する。このためヒトナルコレプシーについてゲノムワイド関連分析および網羅的遺伝子発現解析を実施し、過眠症関連遺伝子を同定して、その機能を検討することにより病態機序を探る。またマラリアの臨床重症型に関して、候補遺伝子アプローチおよび候補領域アプローチを行い、重症化と関連する感受性遺伝子多型を検出する。結核についても、ゲノムワイド連鎖分析、伝達不平衡検定などを用いて感受性遺伝子を同定し、その機能を解明する。

## ＜2008年度の研究の当初計画＞

**SNP解析支援：**「応用ゲノム」班員による多系統萎縮症、パニック障害の疾患感受性遺伝子の探索研究を支援するため、ゲノムワイド関連分析後の再現性検討および絞り込みのためのSNP解析を実施する。アルツハイマー病の大規模ゲノムワイド関連分析のためのSNP解析を分担する。2型糖尿病については、これまでに検出された候補領域の絞り込みのためのSNP解析を継続する。また、独自に開発した新しいマルチプレックスSNP解析技術(DigiTag2法)を実用化し、再現性検討・絞り込みのためのSNP解析を担当する。さらに、SNP arrayデータよりゲノムワイドなCNV (copy number variation) を解析する方法を確立する。

**個別的研究：**ナルコレプシーについては、昨年度ゲノムワイド関連分析によって検出した候補領域について、再現性を確認後、絞り込みを行う。HLAと疾患感受性の関連に関して、HLA-DQのトランス型二量体が形成されるDQA1, DQB1アレルの組合せを明らかにし、疾患関連の機序を考察する。また、これまでに同定された疾患関連遺伝子について、その遺伝子多型、白血球中での遺伝子発現、血清中の濃度を組み合わせた検討を行い、過眠症の診断指標・重症度指標などとの相関を調べ過眠症の分子診断指標として臨床応用試行につなげる。マラリアについては、染色体5q3領域において、有意な関連を示すマイクロサテライトマーカーを見出した。そこで、近傍のSNPマーカーを高密度に解析し、当該領域に存在する関連変異の同定を目指す。CR1遺伝子を候補遺伝子とし、主にプロモーター領域多型およびアミノ酸置換多型とマラリア重症化との関連を検討する。結核に関しては、昨年度ゲノムワイド連鎖分析によって検出した候補領域における絞り込みを開始するとともに、患者と両親の試料を用いた候補遺伝子の伝達不平衡検定などを実施する。

## ＜2008年度の成果＞

**SNP解析支援：**ゲノムワイドな数十万種のSNPタイピングの精度管理のため、種々のパラメーターやその閾値を検討した。多

系統萎縮症、パニック障害については500K SNP arrayを用いたゲノムワイド関連分析を完了し、多数の候補領域を検出した。引き続き、パニック障害については再現性検討のSNP解析をした。また、新しい900K SNP arrayを用いたアルツハイマー病のゲノムワイド関連分析の一部を担当した。現在、規模を拡大したパニック障害のゲノムワイド関連分析を実施している。2型糖尿病については、疾患グループが進める3次スクリーニングのSNP解析を担当し、7個の感受性領域が同定され、引き続き、絞り込みのためのSNP解析を担当した結果、新たな感受性遺伝子KCNQ1が同定された。ヨーロッパ系集団で報告された感受性遺伝子が日本人にも共通するか否かの検討にも貢献した。また、500Kおよび900K SNP chipによる健常者集団試料のタイピングデータからゲノム全域のCNVを検出するための一次解析を終了した。さらに、連鎖分析から検出された候補領域 (Iwasaki *et al.* 2003) のひとつについて、プール試料を用いた第一次スクリーニング、個別試料を用いた第二次の関連分析、再現性の確認を経て、有望な新規感受性遺伝子を見出した。この遺伝子多型はやせ型(BMI<24) 糖尿病患者により強い関連を示し、mRNAレベルやインスリン分泌能とも関連した。

**個別的研究：**ナルコレプシーに関しては、500K SNP arrayを用いたゲノムワイド関連分析、再現性確認、絞り込みを経て1つのSNPとLDブロック内にある2つの新規疾患関連遺伝子CPT1B、CHKBを同定し、その遺伝子発現量がSNP型特異的発現変化を示すこと、さらに疾患特異的な発現変化も示すことを見出した。CPT1Bは脂肪酸β酸化の律速酵素である。血清中のアシカルニチンがナルコレプシー症例の21%で異常低値を示すこと(対照群は0%)、低値はSNP型によらないことを見出し、過眠症の病態に脂肪酸代謝経路の異常が関わることを発見した。またこのSNPについて韓国人試料でも有意な関連を確認し、ヨーロッパ系およびアフリカ系集団においても頻度は低いながら同様の傾向を観察した。一方、ナルコレプシーと極めて強く関連する主要なHLA-DQA1, DQB1間の二量体形成能を測定し、各二量体の発現時における安定性を、測定・比較した。これは、HLAクラスIIの安定性を、主要なすべてのアレル間で定量的に比較した初めての報告である。この結果を踏まえ、ナルコレプシー抵抗性の機構を推測した。網羅的遺伝子発現解析から同定した新規関連遺伝子IGFBP3がin vitroレポーターアッセイ系、in vivoの過剰発現マウス系とともにオレキシンを減少させることを見出し、さらに行動レベルで覚醒が減少することを証明した。マラリアに関しては、5q31領域の高密度解析から、重症マラリアと関連する第一義的多型がIL13のプロモーター領域を含む連鎖不平衡ブロック内に存在することを見出した。また、TIM1遺伝子プロモーター領域多型が遺伝子発現レベルと脳性マラリアに関連すること、CR1遺伝子プロモーター多型が脳性マラリア抵抗性と関連するとともに、赤血球表面上のCR1分子の発現量とも関連することを見出した。結核に関しては、ゲノムワイド連鎖分析によって感受性との連鎖が示唆される領域を一箇所検出したほか、若年発症同胞対から二箇所連鎖領域を検出した。アジア系とアフリカ系では結核の遺伝要因に違いがあり、若年患者には成人患者とは異なる遺伝要因が関与すると考えられた。

### <国内外での成果の位置づけ>

**SNP解析支援**：2型糖尿病について、先の特定領域「ゲノム医学」で実施されたGWASによって検出された候補領域の再現性検証と絞り込みが進展し、アジア系集団の新規感受性遺伝子KCNQ1が特定された意義は大きい（Nature Genetics誌発表）。また、数十万種のSNPsを用いたゲノムワイド関連分析法は最も先進的な疾患遺伝子探索法である。本年度の対象とした多系統萎縮症グループおよびパニック障害グループは国内、国外で最大規模の試料収集を実現しており、その成果は世界の先頭を切る。さらに、連鎖分析によって検出された候補領域から、やせ型2型糖尿病の新規疾患感受性遺伝子を同定することができた。

**個別研究**：ナルコレプシーについては、国内最大、世界でも有数の試料を収集し、世界に先駆けてSNPsを用いたGWASを実施して新しい疾患感受性領域を同定した。これまで睡眠との関連についてほとんど研究されていなかった脂肪酸代謝経路の異常が見出されたことにより、睡眠制御機構の本質、および過眠症の病態への関与についてあらたな研究分野を拓くものとなった（Nature Genetics誌発表）。さらに、HLAアリルと関連した血中遺伝子発現変化の発見は、HLAアリルがMX2など他の免疫関連遺伝子発現変化を介して病態に関わる可能性を示す。マラリアについて、これまでヒトの遺伝子多型とマラリア重症化との関連研究はアフリカ集団を対象に行われてきた。本研究の対象はタイ人マラリア患者であり、アジア系集団に特異的な新規重症化関連多型が見出されることが期待されることから、本研究の成果は高い注目を受けている。結核についても、ベトナム人、タイ人などからアジアで最大規模の試料収集（家系試料を含む）を行い、まずゲノムワイド連鎖解析を実施して、これまでに報告のない候補領域を検出した。結核の感受性遺伝子研究はまだ数少なく、その結果が一定していないため、また将来我が国の結核患者にも裨益するため、多くのアジア系集団における大規模な関連分析を行う必要がある。

**達成できなかったこと、予想外の困難、その理由**  
**SNP解析支援**：計画に添って順調に進行しており、予想外の困難もない。ただし、数十万種のSNPsを用いるGWASは本特定ゲノム領域が発足した当時に存在しなかったため、当初予想できなかった技術的検証作業やタイピング作業のための人員と予算を必要としている。  
**個別研究**：計画に従って順調に進行している。ただ、ナルコレプシーについては、年齢性別に加え、遺伝子型を統制した疾患群と対照群の選択を行ったが、BMI、服薬の有無、食事時刻、合併症まで含めて一致させることは困難であった。様々な臨床症状についての解析と、臨床応用試行は来年度以降の課題となった。

### <今後の課題>

**SNP解析支援**：引き続き、パニック障害、IgA腎症などを対象としてゲノムワイド関連・連鎖解析を進める。また、新しい900K SNP arrayを用い、大規模な集団試料を解析することにより、日本人におけるCNV（copy number variation）の種類と頻度分布を明らかにし、疾患との関連についても解析を開始する。さらに、GWAS後の再現性検証、絞り込みの効率化を目指し、DigiTag2法によるタイピングから統計解析に至るシステムを改善する。

**個別研究**：ナルコレプシーについては、GWASによって検出された多数の候補領域の再現性検証を進め、順次絞り込み作業を行う。また、今後脂肪酸代謝異常の存在を生物学的指標として診断応用すること、末梢血液中での脂肪酸代謝が睡眠覚醒中枢、特に視床下部オレキシン細胞の活性変化とどのように関連するのか、今後も検討する。マラリアの臨床亜型については、領域ワイドもしくはゲノムワイド関連分析を実施する。また、TLR遺伝子群を候補遺伝子とした関連解析を行う。結核についても、可能であればタイ人などの試料を用いたGWASにより、アジア系集団における結核感受性遺伝子の同定を進める。

### <成果公表リスト>

（おもな原著論文のみ示す）

- 1.0806161857  
Nuchnoi P, Ohashi J, Kimura R, Hananantachai H, Naka I, Krudsood S, Looareesuwan S, Tokunaga K, Patarapotikul J. Significant association between TIM1 promoter polymorphisms and protection against cerebral malaria in Thailand, *Ann. Hum. Genet.* 72, 327-336, 2008.
- 2.0806161926  
Horikawa Y, Miyake K, Yasuda K, Enya M, Hirota Y, Yamagata K, Hinokio Y, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Yamamoto K, Tokunaga K, Takeda J, and Kasuga M: Replication of genome-wide association studies of type 2 diabetes susceptibility in Japan. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93(8) : 3136-3141, 2008.
- 3.0901161203  
Miyagawa T, Nishida N, Kimura R, Fujimoto A, Kawashima M, Sasaki T, Tani H, Otowa T, Momose Y, Nakahara Y, Okazaki Y, Tsuji S, and Tokunaga K: Appropriate data cleaning method for genome-wide association study. *J. Hum. Genet.* 53(10) : 886-893, 2008.
- 4.0901161212  
Shiota S, Tochigi M, Ohashi J, Kasai K, Kato N, Tokunaga K, and Sasaki T: Association and interaction analyses of NRH1 and FRBB4 genes with schizophrenia in a Japanese population. *J. Hum. Genet.* 53(10) : 929-935, 2008.
- 5.0901161231  
Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y, Yamagata K, Hinokio Y, Wang HY, Tanahashi T, Nakamura N, Oka Y, Iwasaki N, Iwamoto Y, Yamada Y, Seino Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Takeda J, Maeda E, Shin HD, Cho YM, Park KS, Lee HK, Ng MCY, Ma RCW, So WY, Chan JCN, Lysenko V, Tuomi T, Nilsson P, Groop L, Kamatani N, Sekine A, Nakamura Y, Yamamoto K, Yoshida T, Tokunaga K, Itakura M, Makino H, Nanjo K, Kadowaki T, and Kasuga M: Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat. Genet.* 40(9) : 1092-1097, 2008.
- 6.0901161235  
Nishida N, Koike A, Tajima A, Ogasawara Y, Ishibashi Y, Uehara Y, Inoue I, and Tokunaga K: Evaluating the performance of Affymetrix SNP Array 6.0 platform with 400 Japanese individuals. *BMC Genomics* 9: 431, 2008.
- 7.0901161248  
Miyagawa T, Kawashima M, Nishida N, Ohashi J, Kimura R, Fujimoto A, Shimada M, Morishita S, Shigetani T, Lin L, Hong SC, Faraco J, Shin YK, Jeong JH, Okazaki Y, Tsuji S, Honda M, Honda Y, Mignot E, and Tokunaga K: Variant between CPT1B and CHKB associated with susceptibility to narcolepsy. *Nat. Genet.* 40(11) : 1324-1328, 2008.
- 8.0901161250  
Teeranaipong P, Ohashi J, Patarapotikul J, Kimura R, Nuchnoi P, Hananantachai H, Naka I, Putaporntip C, Jongwutiwes S, and Tokunaga K: A functional SNP in the CRI promoter region contributes to protection against cerebral Malaria. *J. Infect Dis.* 198(12) : 1880-1891, 2008.
- 9.091161256  
Mahasirimongkol S, Yanai H, Nishida N, Ridruechai C, Matsushita I, Ohashi J, Summanapan S, Yamada N, Moolphate S, Chuchotaworn C, Chapraser A, Manosuthi W, Kantipong P, Kantiwattaya S, Sura T, Khusmith S, Tokunaga K, Sawanpanyaleert P, and Kicho N: Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais. *Genes Immun.* (Oct. 2008, E pub ahead of publication)