

「テラーメイド医療を目指したゲノム情報活用基盤技術」
平成15年度採択研究代表者

松田 文彦

(京都大学医学研究科 教授)

「日仏共同体制による人種間ゲノム多型の比較解析」

1. 研究実施の概要

生活習慣病の発症や進行とゲノム上の一塩基多型 (SNP) との相関を解析するには、異なるSNPパターンを持つ違う人種間で、同一疾患において個々のSNPやハプロタイプがどう病気とかかわるのかを体系的に理解することが極めて重要である。本研究では、癌と免疫系の疾患を対象を限定して病気に関連した多型の同定を目標に、日仏共同研究体制で日本人と白人のゲノムの比較解析をおこなう。免疫とDNA修復に関連した遺伝子のSNPの大部分を同定し、その情報を用いて、蛋白質の機能と発現に関係し、疾患に直結するSNPのジェノタイピングを疫学的規模で効率よく行なう。そして人種的偏差を加味した、病気のマーカーとなるSNP、機能に直結したSNPのデータベースを、最新のバイオインフォマティクスや生物統計学の手法をもちいて最小限の時間とコストで構築する。これは日本人特有の疾患・体質の遺伝的要素を特定できるという点で、単純な疾患別SNPデータよりはるかに有用なデータになると期待される。さらに、同定したSNPが遺伝子機能に与える生物学的影響について、SNPをもつDNA修復遺伝子の機能を細胞レベルで容易に判定できるニワトリ細胞株を用いたユニークな系をもちいて調べ評価する。

2. 研究実施内容

人種間ゲノム多型情報の解析システムの構築を目的として、プロジェクト初期に選定した免疫関連遺伝子群、DNA修復遺伝子群のSNP同定を進めた。現在免疫関連遺伝子については約200個の遺伝子のうち、白人では180個(1300エクソン以上)、日本人では130個(900エクソン以上)のSNP同定を終了し、現在データの最終確認を行っている。DNA修復遺伝子群に関しては、白人、日本人ともに119個の全遺伝子についてSNP同定を終了し、総解析長970キロベースの領域に4977個のSNPを同定した(松田グループ、Lathropグループ)。

また得られた結果を格納し、大規模タイピングに必要な情報を抽出可能なSNPデータベースの構築を継続して行った。Relational databaseのデータモデルを決定し、それに基づきSybase上で各テーブルを定義し、計算プログラムの開発を進めた。現在プロトタイプ構築が終了し、DNA修復遺伝子群のデータを用いて評価を行い、正常に作動することを確

認した。また、2005年度からの患者検体を用いたジェノタイピングに備え、同定したSNPの情報を統計処理し、遺伝子毎に推定したハプロタイプから、集団における推定頻度が5%のハプロタイプ全てに加え、頻度の低いハプロタイプも区別可能な最小数のマーカの組み合わせを選択するプログラムを構築し、データベースに組み込んだ。平行して情報を可視化するためのグラフィックインターフェイスの開発も進め、2005年末までに、SNP同定の情報を一般公開する計画である（松田グループ、Lathropグループ）。

多型・変異をもつヒトDNA修復遺伝子機能の迅速同定法の開発に関しては、現在、組換え遺伝子Rad51, Xrcc2, Xrcc3, Rad52について、欠損株の単離、およびSNPの単離が終了した。現在単離した変異遺伝子を欠損株に導入して、その機能を細胞感受性試験で測定中である。遺伝子導入の際に、野生型および変異を持つ遺伝子の発現を同じにして比較するため、発現の状態を緑色蛍光蛋白（GFP）の発現でモニターできるようにしている。現在Rad51の変異遺伝子をRad51条件欠損細胞に戻し、野生型Rad51非存在下でも、生存可能な変異株を得た。現在この細胞株の抗ガン剤シスプラチンに対する感受性を測定中である。XRCC2の変異遺伝子も同様にXRCC3欠損細胞に導入し、そのシスプラチン感受性を測定中である。XRCC3とRad52遺伝子については、Rad52/XRCC3の2重欠損株が致死になることを利用して、この2重欠損株に変異遺伝子を挿入し、致死性を回復できるかどうかで、変異遺伝子の機能を検討中である（園田グループ）。

高精度ハイスループットSNP解析技術によるSNP部位の確認については、臨床ゲノム試料の網羅的発現解析並びに体系的多型解析のための新たな高感度マイクロアレイDNAチップを開発した。素材は従来のガラスではなくプラスチックであり、形状を容易に造形できるメリットがある。この利点を生かし、エンボス形状のマイクロアレイを作製し、その台の上に各種発現量の異なる種々の（高発現のハウスキーピング遺伝子から低発現の細胞膜受容体など）遺伝子cDNAを固相化し、その感度の検討を従来のガラス板方式のマイクロアレイDNAチップと比較検討するとともに、RT-PCR方で定量性を評価した。結果として、新型チップは高いS/N比を持ち、従来型のチップに比して約100倍の感度増強を示した。更に、RT-PCR法と同程度の定量精度を有することが明らかとなった。この新型チップ技術は高感度性から微量臨床検体の体系的多型解析にも有効であることが示唆され、来年度その可能性を検討する（辻本グループ）。

大規模ジェノタイピングに関わるDNA検体の収集に関しては、

- ① 非アトピー性の喘息の発症機序の解明に用いるサンプル収集を行なった。これまで非アトピー性喘息の遺伝子解析の報告はほとんどなく、解析の態勢整備がおこなわれて、サンプル収集が開始され、患者158例、健常者98例を収集した。2005年度中には200症例が収集される予定であり、解析が可能となる（白川グループ）
- ② 免疫系疾患に関しては、白人検体に関しては、自己免疫性糖尿病（I型糖尿病）約160例を新たに収集した。また、現在リウマチ患者の検体の収集を日本人、白人で継続しており、2005年後半までに日本人約250例、白人約400例が集まる

見込みである（松田グループ）。

- ③ DNA修復遺伝子の遺伝解析に関連するがん患者の検体収集に関しては、造血器腫瘍（多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病、MDS等）の新たな日本人検体約300例が2005年夏までに収集可能となった（松田グループ）。

3. 研究実施体制

松田グループ

- ① 研究分担グループ長： 松田 文彦（京都大学 医学研究科、教授）
② 研究項目：人種間ゲノム多型情報の解析システムの構築

園田グループ

- ① 研究分担グループ長： 園田 英一朗（京都大学 医学研究科、助教授）
② 研究項目：多型・変異をもつヒトDNA修復遺伝子機能の迅速同定法の開発

辻本グループ

- ① 研究分担グループ長： 辻本 豪三（京都大学 薬学研究科、教授）
② 研究項目：高精度ハイスループットSNP解析技術によるSNP部位の確認

白川グループ

- ① 研究分担グループ長： 白川 太郎（京都大学 医学研究科、教授）
② 研究項目：アレルギー疾患関連遺伝子項目の相互作用ネットワークの構築と機能解析

Lathropグループ

- ① 研究分担グループ長： Mark Lathrop（フランス国立ジェノタイピングセンター General Director）
② 研究項目：多因子型遺伝病の多人種間の比較解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casademont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanarooj SM, Tangnararatchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S, Chaiyaratana W, Yenchitsomanus PT, Suriyaphol P, Avirutnan P, Chokephaibulkit K, Matsuda F, Yoksan S, Jacob Y, Lathrop GM, Malasit P, Despres P, Julier C. (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. Nat Genet. 37, 507-513.
- Abbas A, Vasilescu A, Do H, Hendel H, Maachi M, Goutalier FX, Regulier EG,

- Rappaport J, Matsuda F, Therwath A, Aucouturier P, Zagury JF. (2005) Analysis of IGG and IGG4 in HIV-1 seropositive patients and correlation with biological and genetic markers. *Biomed Pharmacother.* 59, 38-46.
- Do H, Vasilescu A, Diop G, Hirtzig T, Heath SC, Coulonges C, Rappaport J, Therwath A, Lathrop M, Matsuda F, Zagury JF. (2005) Exhaustive genotyping of the CEM15 (APOBEC3G) gene and absence of association with AIDS progression in a French cohort. *J Infect Dis.* 191, 159-63.
 - Vasilescu A, Heath SC, Diop G, Do H, Hirtzig T, Hendel H, Bertin-Maghit S, Rappaport J, Therwath A, Lathrop GM, Matsuda F, Zagury JF. (2004) Genomic analysis of Fas and FasL genes and absence of correlation with disease progression in AIDS. *Immunogenetics.* 56, 56-60
 - Yamazoe M, Sonoda E, Helfrid Hochegger H, Takeda S. (2004) Reverse genetic studies of the DNA damage response in the chicken Blyphocyte line DT40” DNA Repair 3, 1175-1185.
 - Mizutani A, Okada T, Shibutani S, Sonoda E, Hochegger H, Nishigori C, Miyachi Y, Takeda S, Yamazoe M. (2004) Extensive Chromosomal Breaks Are Induced by Tamoxifen and Estrogen in DNA Repair-Deficient Cells. *Cancer Res.* 64, 3144-3147.
 - Hatanaka A, Yamazoe M, Sale JE, Takata M, Yamamoto K, Kitano H, Sonoda E, Kikuchi K, Yonetani, Takeda S. (2004) Similar Effects of Brca2 Truncation and Rad51 Paralog Deficiency on Immunoglobulin V gene Diversification in DT40 Cells Support an Early Role Fole for rad51 paralogs in Homologous Recombination. *Mol. Cellular Biol.*, 25: 1124-1134.
 - Tomita Y, Tomida S, Hasegawa Y, Suzuki Y, Shirakawa T, Kobayashi T, Honda H. (2004) Artificial meural network approach for selection of susceptible single nucleotide polymorphisms and construction of prediction model on chilehood allergic asthma. *BMC Bioinformatics.* 5, 120.
 - Kamada F, Suzuki Y, Shao C, Tamari M, Hasegawa K, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Chiba Y, Aoki Y, Kure S, Tamura G, Shirakawa T, Maysubara Y. (2004) Association of the hCLCA1 gene with childhood and adult asthma. *Genes Immun.* 5, 540-7.
 - Cheng L, Enomoto T, Hirota T, Shimizu M, Takahashi N, Akahoshi M, Matsuda A, Dake Y, Doi S, Enomoto K, Yamasaki A, Fukuda S, Mao XQ, Hopkin JM, Tamari M, Shirakawa T. (2004) Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese ceder pollen. *Clin. Exp. Allergy.* 34, 1192-201.
 - Hasegawa K, Tamari M, Shao C, Shimizu M, Takahashi N, Mao XQ, Yamasaki A, Kameda F, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Tamura G, Matsubara Y,

- Shirakawa T, Suzuki Y (2004) Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility bronchial asthma. *Hum. Genet.* 115, 295-301.
- Hirota T, Obara K, Matsuda A, Akahoshi M, Nakashima K, Hasegawa K, Takahashi N, Shimizu M, Sekiguchi H, Kokubo M, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Enomoto T, Kishi F, Suzuki Y, Saito H, Nakamura Y, Shirakawa T, Tamari M. (2004) Association between genetic variation in the gene for death-associated protein-3(DAP3) and adult asthma. *J. Hum. Genet.* 49, 370-5.
 - Shao C, Suzuki Y, Kamada F, Kanno K, Tamari M, Hasegawa K, Aoki Y, Kure S, Yang X, Endo H, Takayanagi R, Nakazawa C, Morikawa T, Morikawa M, Miyabayashi S, Chiba Y, Karahashi M, Saito S, Tamura G, Shirakawa T, Matsubara Y (2004) Linkage and association of childhood asthma with the chromosome 12 genes. *J. Hum. Genet.* 49, 115-22
 - Peisong G, Mao XQ, Enomoto T, Feng Z, Gloria-Bottini F, Bottini E, Shirakawa T, Sun D, Hopkin JM (2004) An asthma-associated genetic variant of STAT6 predicts low burden of ascaris worm infestation. *Genes Immun.* 5, 58-62.