

「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

(京都大学大学院医学研究科 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

多因子型遺伝病の遺伝因子の解明のため、疾患を免疫系疾患と一部の癌に限定して、免疫関連・DNA 修復遺伝子群の SNP 解析を行なうことで、少人数低コストで短期間に効率良く、疾患の原因遺伝子または疾患マーカーとなる SNP の組み合わせを発見することを目標とする。また、日仏国際共同研究で、白人と日本人で SNP を探索し比較することで、人種特異的な SNP と疾患特異的な SNP を同定し、人種的偏差を加味した疾患別 SNP データベースを構築する。さらに SNP と臨床情報を統合したデータベースの統計解析を行い、SNP に基づく遺伝学が治療に直結した次世代の臨床遺伝学として有効であることを実証する。

現在までに免疫関連遺伝子 187 個、DNA 修復遺伝子 123 個の SNP 同定を白人、日本人で終了し、合計 7000 個以上の遺伝的多型（そのうち約 65% が新しく発見された多型）を同定した。その情報をもとに各遺伝子でハプロタイプを構築し、大規模ジェノタイピングに必要なタグマーカーを選択し、一部の疾患に関して、白人、日本人の検体でジェノタイピングを開始した。現在得られたデータの統計学的検定を行っており、有意差が見つかったマーカーに関して今後 2 次スクリーニングを経て、原因遺伝子の同定へと進めて行く予定である。また得られた結果を公開するためのデータベースの構築が終了し、現在、限定された使用者を対象として試験的に公開しており、2006 年度夏までに完全一般公開を目指す。

## 2. 研究実施内容

### 研究目的

本研究は、癌と免疫系の疾患に対象を限定して、病気に関連した多型の同定を目標として、日本人と白人のゲノムの比較解析をおこなうこととする。そのために、上記疾患に関連する免疫と DNA 修復遺伝子に関連した遺伝子座のみに限定し、遺伝子とその近傍を集中的に解析することにより、遺伝子の機能と発現に関係した、すなわち疾患に直結する SNP の同定とタイピングを試みる。また得られた結果から、マーカーとなる SNP、機能に直結した SNP を公開するための疾患別遺伝子データベースを最小限の時間とコストで構築する。

また遺伝解析で同定された疾患特異的 SNP をもった遺伝子産物（蛋白質）の機能解析技術の開発を、DNA 修復に関連した遺伝子群をモデルとしてニワトリ細胞株 DT40 で試みる。さらに、大規模ジェノタイピングにおける正確・迅速で低コスト方法の開発を目的とした、マイクロアレイ DNA チップ技術をプラットホームに用いた高精度ハイスループット SNP 解析技術の開発を行う。特に、核酸検出技術の高感度化により、臨床検体の微量量化、低コスト化を実現し、今後のゲノム臨床研究に必須な網羅的ゲノム解析の技術基盤を提供する。

## 結果及び考察

### 1) SNP 同定

本年度は、プロジェクト当初に選定した候補遺伝子（免疫関連遺伝子 187 個、DNA 修復遺伝子 123 個）の SNP 同定を白人、日本人（に加え一部遺伝子については黒人）で終了し、合計 7000 個以上の遺伝的多型（そのうち約 6.5% が新しく発見された多型）を同定した。遺伝子ごと、人種ごとにハプロタイプを推定し、まずより多くの多型が検出された DNA 修復遺伝子群において、人種間での多型の差を比較検討した。その結果、

1. 120 の DNA 修復遺伝子内の SNP 検索を 4 人種を用いて行った結果、総計 5180 の SNP が検出された。SNP の密度に関して、3 人種で多少異なるものの（黒人：1 SNP/284bps から タイ人：1 SNP/431bps）、いずれの人種においてもエクソンよりインtron の SNP 密度が高かった（白人 1 SNP/488bps : 1 SNP/377bps、黒人 1 SNP/391bps : 1 SNP/222bps、日本人 1 SNP/438bps : 1 SNP/346bps）。
2. 人種毎のマイナーアレル頻度は、頻度が小さくなるにつれ検出数が増加し、多型の一般的傾向と合致した。この傾向はいずれの人種も同様であった。人種間共通 SNP および特異的 SNP の検討において、人種特異的 SNP は黒人で最も多く見られた。また、2 人種間では、黒人・白人共通の SNP が最も多かった。
3. 遺伝子毎のハプロタイプ数は SNP 数に依存しない傾向が見られた。このことから、ハプロタイプタグ SNP の同定を行うことで、多型数の多い遺伝子も限定された数の SNP によって解析可能であることを示していると考えられる。

こういった知見をもとに、多人種におけるハプロタイプ構造の多様性に着目しながら、DNA 修復遺伝子群、免疫関連遺伝子群の関連解析をより効率的に行う SNP の同定および選別法を確立し、大規模ジェノタイピングに反映させた。

### 2) SNP ジェノタイピング

SNP 同定で得られた情報をもとにタックマン法、イルミナ法での大規模ジェノタイピングを開始した。DNA 修復遺伝子群、免疫関連遺伝子群についてまず 1536 個のマーカータグ からなるパネルを構築し、収集した検体の一部を用いた一次スクリーニングを進めている。

#### DNA 修復遺伝子

膀胱癌 白人（約 300 検体）終了、日本人（約 250 検体）進行中

肺癌 白人（約 400 検体）終了

造血器腫瘍（約 1200 検体）進行中、日本人（約 300 検体）一部の SNP で終了、残りは進行中

成人性 T 細胞白血病 日本人（約 200 検体）進行中

健常者対照群 白人（約 400 検体）終了、日本人（91 検体）進行中

#### 免疫関連遺伝子

慢性関節リウマチ 白人（91 検体）終了、日本人（91 検体）進行中

全身性エリテマトーデス 白人（91 検体）終了

甲状腺機能高進症 白人（91 検体）終了、日本人（91 検体）終了

喘息 白人（91 検体）終了、日本人（91 検体）進行中

成人性 T 細胞白血病 日本人（約 200 検体）終了

健常者対照群 白人（91 検体）終了、日本人（91 検体）終了

現在、得られた結果をデータベースに取り込み、有意差に関する検定を SNP 毎、ハプロタイプ毎に行なっており、その結果を利用して 2 次スクリーニングの必要な遺伝子・SNP に関しては、さらに検体数を増やし結果の確認を行なう予定である。

#### 3) SNP データベースの構築

疾患と解析領域を絞り込むとはいへ、既に臨床情報とともに収集された 8,000 検体の DNA に対し数千個のマーカーでジェノタイピングを疫学的スケールで行ったデータは膨大な量となる。また、解析結果に加え、日々アップデートされる公開データも取り込むには、よく吟味されたデータモデルに基づいた優れたリレーショナル・データベースの構築が不可欠である。これらの点を念頭に置いて、以下の特徴・機能を備えたデータベースシステムを構築した。

1. 複数のプロジェクトを管理する、ユーザー認証を導入したセキュリティーシステム
2. 異なる方法で得られるジェノタイプ情報を、それぞれの解析結果ファイルより直接取り込む
3. 公共データベースから得られる情報と実験結果の融合
4. 得られた実験結果を用いた統計遺伝学的解析（有意差の検定など）のプログラムの組込み
5. 患者の臨床情報、人種などを指標に統計解析が自動で行えること
6. 各種情報の確認と検索のための Web インターフェースによる検索ページの構築

このデータベースは間もなくインターネット上で広く一般に公開される予定である。公開にあたりセキュリティーや信頼性を重視しているため十分な検証作業を行っている。

#### 4) 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方法

修復遺伝子の中で、相同組換えに関与する XRCC2, XRCC3, RAD51 の Caucasian にみられる SNP を選び、発現ベクター(CMV promoter-ires-GFP)にクローニングし、それぞれ XRCC2<sup>-/-</sup>, XRCC3<sup>-/-</sup>, RAD51<sup>-/-</sup> DT40 細胞に導入した。まず GFP の発現で発現陽性株をスクリーニングしたのち、RT-PCR または Western blot 法により、野生型と同程度の遺伝子または蛋白発現株を複数樹立し、細胞増殖を液体培地で、また抗癌剤シスプラチニンに対する感受性を半固体培地中で測定し、野生型のそれと比較した。

#### 結果および考察

遺伝子	変異	頻度(%)	増殖能	シスプラチニン感受性
XRCC2	188Arg to 188His	8.6	野生型と同じ	野生型より耐性
XRCC3	241Thr to 241Met	31.7	野生型と同じ	野生型と同じ
RAD51	56Pro to 56Ser	1.7	野生型と同じ	野生型と同じ
	5'UT G to T	22.5	野生型と同じ	野生型と同じ

今回調べた 3 種類の相同組換えに関する遺伝子の SNP は、細胞増殖・抗癌剤感受性（シスプラチニン）に関して野生型とほぼ同様な機能を示した。興味深いことに、XRCC2 の SNP (188His) は正常な機能を回復するのみならず、シスプラチニンに対して野生型よりさらに耐性を示した。これら変異を持つ個人は、シスプラチニンによる化学療法に耐性を示す可能性があり、より高濃度での薬剤使用が可能ではないかと考えられた。現在発現量などの詳細な比較を Real time PCR 法でおこなっている。

#### 5) 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

今年度は、

- (1) SNP 領域の Multiplex PCR 増幅: 至適プライマーのデザインを行うプログラムの構築。
- (2) 既に確立されている国際標準 DNA チップに関して、上記要素技術を用いて更に改良し微量臨床検体の解析のための更なる高感度、高精度化、低コスト化を検討、を行った。その結果、

(1) SNP 領域の Multiplex PCR 増幅: 至適プライマーのデザインを行うプログラムの改善を行い、約 70 % の成功率で 10 の multiplex が可能となった。

(2) 高感度 DNA チップ開発を企業と共同で開始し、新たなマイクロアレイ基盤の開発に成功した。新型チップは従来の DNA チップと比べて約 100 倍の高感度であることが確認された。

今後、松田プロジェクトリーダーが既に確認している SNP 部位につき具体的に検討し、その精度、価格などを検討する。

### 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、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

「Lathrop」 グループ

①研究分担グループ長：Lathrop, Mark (CNG、Director)

②研究項目：多因子型遺伝病の多人種間の比較解析

「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、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、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、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

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

#### (1) 論文（原著論文）発表

- Dizier, M.H., Bouzigon, E., Guilloud-Bataille, M., Betard, C., Bousquet, J., Charpin, D., Gormand, F., Hochez, J., Just, J., Lemainque, A., Le Moual, N., Matran, R., Neukirch, F., Oryszczyn, M.P., Paty, E., Pin, I., Vervloet, D., Kauffmann, F., Lathrop, M., Demenais, F. and Annesi-Maesano, I., Genome screen in the French EGEA study: detection of linked regions shared or not shared by allergic rhinitis and asthma. *Genes Immun*, 2005. 6 (2): p. 95–102.
- Ohmura, K., Johnsen, A., Ortiz-Lopez, A., Desany, P., Roy, M., Besse, W., Rogus, J., Bogue, M., Puech, A., Lathrop, M., Mathis, D. and Benoist, C., Variation in IL-1 $\beta$  gene expression is a major determinant of genetic differences in arthritis aggressivity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102 (35): p. 12489–94.
- Spanagel, R., Pendyala, G., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Magnone, M.C., Lascorz, J., Depner, M., Holzberg, D., Soyka, M., Schreiber, S., Matsuda, F., Lathrop, M., Schumann, G. and Albrecht, U., The clock gene Per2 influences the glutamatergic

system and modulates alcohol consumption. Nat Med, 2005. 11 (1): p. 35–42.

- Yamazaki, K., McGovern, D., Ragoussis, J., Paolucci, M., Butler, H., Jewell, D., Cardon, L., Takazoe, M., Tanaka, T., Ichimori, T., Saito, S., Sekine, A., Iida, A., Takahashi, A., Tsunoda, T., Lathrop, M. and Nakamura, Y., Single nucleotide polymorphisms in TNFSF15 confer susceptibility to Crohn's disease. Hum Mol Genet, 2005, 14(22): p. 3499–506.
- Diop, G., Spadoni, J. L., Do, H., Hirtzig, T., Coulonges, C., Labib, T., Issing, W., Rappaport, J., Therwath, A., Lathrop, M., Matsuda, F. and Zagury J. F. Genomic approach of AIDS pathogenesis: exhaustive genotyping of the TNFR1 gene in a French AIDS cohort. Biomed Pharmacother. 2005 59, 474–80.
- Adachi T, Okuno Y, Takenaka S, Matsuda K, Ohta N, Takashima K, Yamazaki K, Nishimura D, Miyatake K, Mori C, Tsujimoto G. Comprehensive analysis of the effect of phytoestrogen, daidzein, on a testicular cell line, using mRNA and protein expression profile. Food Chem. Toxicol. 2005 43: 529–535
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagons-like peptide\_1 secretion through GPR120. Nat. Med. 2005 11: 90–94
- Ami Y, Shimazui T, Akaza H, Uematsu N, Yano Y, Tsujimoto G, Uchida K. Gene expression profiles correlate with the morphology and metastasis characteristics of renal cell carcinoma cells. Oncol. Rep. 2005 13: 75–80"
- Zhu S, Okuno Y, Tsujimoto G, Mamitsuka H. A probabilistic model for mining implicit 'Chemical Compound–Gene' relations from literature. Bioinformatics. 2005 21: ii245–ii251

## (2) 特許出願

H17 年度出願件数： 1 件 (CREST 研究期間累積件数： 1 件)