研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 日仏共同体制による人種間ゲノム多型の比較解析
2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名 (研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者： 松田 文彦 (京都大学大学院医学研究科 教授)

主たる共同研究者：

園田 英一朗 (京都大学大学院医学研究科 准教授) (～平成 19 年 3 月)

辻本 豪三 (京都大学大学院薬学研究科 教授) (～平成 19 年 3 月)

白川 太郎 (京都大学大学院医学研究科 教授) (～平成 18 年 3 月)

Mark Lathrop (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain Scientific Director)

3. 研究内容及び成果

ヒトゲノム計画の成果により、一塩基多型 (SNP) のゲノムワイド関連解析 (GWAS) を用いたヒトの複合遺伝性疾患の遺伝因子の同定が盛んに行われている。しかしながら解析には詳細な臨床情報をとまなう多数の検体 (1,000 人規模) と高出力のタイピング設備に加え、最先端の統計遺伝学的手法の適用が必須である。本課題では、日仏国際共同研究で、解析対象疾患を免疫系疾患と一部の癌に限定して、白人と日本人で SNP を探索し比較することで、人種を超えて病気と関連する遺伝子・多型を同定し、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により、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ことを目的とした。また、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し、疾患の分子レベルでの予知、診断および、将来の個人に合った治療や予後の予測 (テーラーメイド医療) のための情報の基盤を確立することを目的とした。

研究期間の前半は、候補遺伝子アプローチで、免疫関連遺伝子と DNA 修復関連遺伝子の SNP 同定から患者検体を用いた遺伝解析までを一貫して行なった。研究期間の後半は全ゲノムスキニングを取り入れ、免疫系疾患は関節リウマチ (RA) に限定して白人、日本人間で疾患感受性遺伝子を同定することとした。また、中間評価時に多数の検体収集の終了していた肺がんについても、同様の方法で感受性遺伝子検索を試みた。

SNP データベースの構築

研究室で生産される大量のジェノタイプング結果を格納し、また、解析結果に加え、検体の臨床情報、日々更新される公開データを、遺伝解析を標準化して取り込むには、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、リレーショナル・データベースシステム “MESHMD” を構築した。現在このデータベースの中には、本研究に関連するジェノタイプング結果 20 億データポイント以上が蓄積されている。また、一部のデータを一般公開した。さらに、GWAS で得られた日本人の健常者対照群の個人のジェノタイプ情報も、近々制限を設けた上で公開が予定されており、異なる疾患で GWAS を試みる研究者にとって有用なデータとなると考えられる。

候補遺伝子解析

免疫系疾患と DNA 修復が関与する疾患を解析ターゲットにし、生物学的機能に基づいて選択した免疫関連遺伝子 169 個および、DNA 修復関連遺伝子 123 個について、フランス人 (白人) および日本人検体を用いて、遺伝子のエクソンと周辺領域およびプロモーター領域の塩基配列の再決定による SNP 同定を試みた。短期間で効率よく頻度の比較的高い SNP を同定するために、2 検体ずつを同じコピー数混合して、16 プールとし、免疫

関連遺伝子からは2,830個、DNA修復遺伝子からは4,026個の多型(SNP、挿入・欠失)を同定した。そして、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、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。

Illumina社 Goldengate法により、免疫関連遺伝子群から1,536個のマーカータグからなるパネルを構築し、日本人、ドイツ人のRA患者、健常者検体(日本人:患者238例、対照群184例、ドイツ人:患者184例、健常者273例)を用いたジェノタイピングを試みた。結果を人種ごとにプールして関連解析をおこない、さらにメタアナリシスの手法を用いて(DerSimonian-Laird法)多人種間での関連の強さを検討したところ、*FCGR2A* 遺伝子(rs7551957: $DLp=8.58 \times 10^{-5}$)、*DPYD* 遺伝子(rs6685859: $DLp=1.30 \times 10^{-4}$ 、rs7550959: $DLp=1.47 \times 10^{-4}$ 、rs7531138: $DLp=1.71 \times 10^{-4}$)、*SPTB* 遺伝子(rs2269310: $DLp=7.89 \times 10^{-4}$)で、有意な関連が得られた。

RAのゲノムワイド比較解析

RAのGWASによる多人種間比較解析を、日本人、白人検体を用いて行った。まず日本人患者674例、対照群934例に対し、約30万SNPに対してゲノムスキャンを行い、加えて約55万SNPに対し、患者317例、対照群298例を追加解析した。その結果、*HLA* 遺伝子座に極めて強い疾患との相関が得られ($p < 10^{-10}$)、用いた集団の有効性が示された。*HLA*以外の領域に関しては、二度の解析で有意差が再現されたSNPマーカーを順に選び、患者933例、対照群855例で再現性の検証をおこなった。

その結果、3個のマーカーで再現性よく有意な結果が得られ、メタアナリシスのp値もそれぞれ $MHp=3.1 \times 10^{-6}$ 、 4.3×10^{-6} 、 3.4×10^{-5} が得られたため、現在最大の検体数で最終確認が行われている。

白人については、ドイツ人患者192例、対照群839例を用いて、30万SNPをスキャンした。日本人と同じく*HLA*領域にきわめて強い関連が観察され、その他にも $p < 10^{-5}$ のマーカーが一個発見された。また、兩人種の結果を用いてメタアナリシスを行ったところ、 $MHp < 10^{-5}$ のマーカーが11個得られ、そのうち一個は日本人で $p=0.001$ 、ドイツ人で $p=2.7 \times 10^{-4}$ と、有意差を保っており、現在検体数を増やして検証を行っている。今後は、候補領域のファインマッピングによる疾患感受性遺伝子/多型の同定、*HLA* やバイオマーカーを指標とするサブグループ解析、他のグループが施行したGWASの結果との比較によるメタアナリシス等を行ない、疾患と関連の強いマーカーを同定後、RA感受性遺伝子の同定を試みる予定である。

肺がんのゲノムワイド比較解析

肺がんのGWASによる多人種比較解析を試みた。白人患者1,989例、対照群2,625例に対しIllumina社300Kチップを用いてGWASを施行し、染色体15番にきわめて強い関連を示すマーカーを2個(rs1051730: $p=5 \times 10^{-9}$ 、rs8034191: $p=9 \times 10^{-10}$) 検出した。rs8034191では、アレルの比較ではオッズ比1.32(CI:1.21-1.45)、野生型ホモ接合体と変異型ホモ接合体のジェノタイプ比較では、1.80(CI:1.49-2.18)であった。またその結果は、患者2,513例、対照群4,752例を用いて、再現性が確認された。

これらのマーカーを含む182kbの連鎖不平衡ブロック内には、3個のニコチン様アセチルコリン受容体遺伝子(*CHRNA3*、*CHRNA4*、*CHRNA5*)、DNA修復に関係する*PSMA4* 遺伝子に加え、*IREB2*(iron responsive element binding protein 2)と機能不明な遺伝子LOC123688が存在していた。現在のところ、疾患感受性多型を特定するには至っていないが、*CHRNA5* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う変異(D398N)が存在し、当該アミノ酸残基は種内、種間比較においても高度に保存されていることから、何らかの生理的役割を担っているのではないかと考えられる。

また、サブグループ解析により、1) 腺がん、扁平上皮がん、小細胞がんの間には、大きなリスクの差はない、2) 喫煙者、非喫煙者の両方で有意なリスクの上昇がある、3) 頭頸部がんおよびニコチン依存症との関連はなさそうなことが明らかになった。また、当該領域は、日本人集団では肺がんとの関連は見いだされなかった。現在、日本人検体(患者719例、対照群1,494例)を用いたGWASが進んでおり、結果が判明し次第比較解析を試み、

RAと同様の手法を用いた感受性遺伝子の同定を進める予定である。

本課題が成功し、これらの疾患の感受性遺伝子の全貌を明らかにできれば、病態、人種における個々の感受性遺伝子の相対的貢献度が明確になり、疾患の多様な病態を分子レベルで説明することが可能となる。本研究が発展して、複数の遺伝因子と環境因子や生活習慣との関連が明らかにされると、1) 疾患の発症リスクの予測が可能で、予防医療に大きく貢献、2) 疾患のより客観的な診断(分子診断)や予後予測が可能となることで、治療の方針決定を迅速におこなえる、3) 治療中の投薬にともなう有害事象の事前予測が可能となる、4) 疾患の発症の分子基盤の解明により、新薬の開発につながるなど、社会的インパクトもきわめて大きく、21世紀の医療の中心となる「予防」に対する大きな貢献が期待され、「テーラーメイド医療」のよきモデルケースとなると考えられる。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

本研究では、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を同定して、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とともに、SNPと臨床情報を統合したデータベース統計解析を行い、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ことを目的とした。

解析対象疾患は関節リウマチ(RA)と肺癌とした。RAの候補遺伝子解析では、免疫関連の169遺伝子で同定したSNPのうち、1,536個のSNPでマーカーパネルを構築し、日本人、ドイツ人のRA患者、健常者検体をタイピングしたところ、*FCGR2A*、*DPYD*、*SPTB*遺伝子で二人種において有意な関連が得られた。また、日本人、ドイツ人検体を用いたゲノムワイド関連解析(GWAS)では、ミエリン塩基性蛋白遺伝子領域に、 $p=6.9 \times 10^{-8}$ という強い関連を日本人で見出すとともに、両人種に共通してRAに関連する複数の多型を見出した。肺癌で行ったGWASでは、白人の解析において、15番染色体のアセチルコリン受容体遺伝子群を含む領域に、 $p=5 \times 10^{-20}$ という極めて強い関連を見出した。また、5番染色体では、白人、日本人で共通して肺癌と関連する領域を同定した。

これらの研究成果は、18編の原著論文(及び6件の口頭及びポスター発表)として発表されている。また、本研究で得られる膨大なジェノタイプング結果は、解析結果、検体の臨床情報とともに、データベースシステム“MESHMD”に格納されており、一部のデータは既に一般公開されている。日仏の共同研究を前提としたユニークな取り組みであり、興味深い成果が得られつつある。本研究が進展すれば、目標とするテーラーメイド医療への早期の貢献が達成されるであろう。

4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

関節リウマチは、発症の機序が不明で予後予測も難しく、発病期間が長く治療も難しい、患者に大きな肉体的、精神的苦痛を強いる疾患である。一方、肺癌はがん死の1位を占め、その数は増加の一途をたどっている。

本研究はRAと肺癌の発症に関わる遺伝因子を、質の高い臨床情報を伴う多数の検体を用いてGWASにより網羅的に探索するに当たり、日本人と白人の大規模GWASを比較解析するという独創的な手法を用いていることは評価できる。GWASの結果は出始めたばかりであるが、既に強い関連を示す複数の領域が特定されており、人種による違いの有無も明らかにされつつある。解析が進んで、これらの疾患感受性遺伝子の全貌が明らかになり、環境因子や生活習慣との関連が解明されれば、21世紀の医療の中心となるであろう「予防医療」に大きく貢献するであろうと期待している。

4-3. その他の特記事項(受賞歴など)

本研究の最大の特徴は、日仏共同研究体制にある。共同研究のデータの解析からオリジナリティーに富んだ成果が出ることを期待する。また、研究目標の達成には更に時間と努力を要するものと思われるが、テーラーメイド医療の実現に向けて研究を推進してもらいたい。

以上