

「テー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

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、人種を超えて病気と関連する遺伝子・多型を同定し、人種的偏差を加味した疾患別 SNP データベース構築を目的とする。解析対象疾患を免疫系疾患と一部の癌に限定して、免疫関連・DNA 修復遺伝子群にターゲットを絞り多型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、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。

上記のマーカーセットで各種疾患に対してケース・コントロール解析を行ったところ、リウマチにおいて、2人種で疾患感受性が示唆される遺伝子が一個同定された。そこで疾患をリウマチに限定してさらに多くの検体で結果のバリデーションを行なっている。また検体収集も順調に進み現在2人種合わせて約 2600 検体が得られている。そこで本年度後半からこれらを用いた全ゲノムスキマニングを開始した。これら2つのアプローチでプロジェクト終了までにリウマチ感受性遺伝子の同定を目指している。

2. 研究実施内容

1. ジェノタイピング

昨年度までに蓄積した SNP 同定情報を用いた各遺伝子のハプロタイプ予測の結果より、集団内で5%以上の頻度で出現するハプロタイプについて、それらを識別可能な最少数の SNP をマーカーとして選択し、それらに HapMap プロジェクトのマーカーのうち本プロジェクトで同定されなかったマーカーを加えて、Illumina 法を用いてジェノタイピングを行った。基本的には、各疾患に対して人種毎にまず 96 検体の患者と健常者の DNA 検体を用いたジェノタイピング(一次スクリーニング)を行なった。そして、正常人と患者から得られた個々の SNP 及びハプロタイプを比較して統計処理し、疾患と関連がある SNP または原因遺伝子座を直接同定することを目的に、以下のステップで結果の統計解析を行った。

1) アッセイ成功率の低い(85%以下)マーカーに関しては、統計解析から除外した。

- 2) 各サンプルセットについて、ジェノタイプの結果がハーディー・ワインバーグ平衡を満たすか否かを検定し、p 値が 0.05 を下回るマーカーは統計解析からはずした。
 - 3) 各疾患の患者集団と健常者の間で、アレル頻度の差を検定した。
 - 4) 同様に、遺伝子ごとに疾患別のハプロタイプ推定を行い、ハプロタイプ頻度の差を検定した。
- そして、有意差が得られたマーカーに関しては、タイピングの結果の評価とデータの正確さをチェックするための品質管理を、タックマン法を用いて行なった上で、さらに検体数を増やして結果のバリデーションを行なった。現在リウマチ関連遺伝子の解析が最も進展しており、白人、日本人の両方で有意差が出た遺伝子が一個見つかった。この遺伝子は T 細胞の表面に発現しており細胞接着に関わっている。現在多数の検体を用いた結果のバリデーションを行なっている。プロジェクトの後半は、現段階ではタイピングに集中して疾患関連遺伝子の同定を試みるのが極めて重要だと考えている。年度途中の中間評価において、最も多数の検体数が揃っているリウマチに疾患を限定して、全力を注ぐよう助言をいただいたので、今後プロジェクトの終了までリウマチに限定して解析を進めるように方針変更を決定した。

2. 全ゲノムスキニング

対象疾患をリウマチに絞ったことで、検体数を十分確保した上で単一疾患を集中して解析できる人員と予算の余裕が生じた。またホールゲノムスキニングの技術にも進歩があり、コストも下がりつつある。そこで日本人、白人のリウマチ検体を用いてイルミナ社のシステムを用いてホールゲノムスキニングを開始した。まず白人の患者 200 検体、健常者 200 検体を用いたゲノムスキニングを終了し、現在結果の解析を行っている。また日本人検体についても同様の試みを開始し、2007 年 6 月をめどに、患者 400 検体、健常者 400 検体を用いた 1 次スクリーニングを終了する予定である。マーカー数は 30 万であるため、一次スクリーニング後に p 値が 0.01 を下回るマーカーは数千個出るものと予想される。しかしながら、日本人、白人の 2 人種で有意な p 値を保つマーカー数はかなり少ないと予想しており、そういったマーカーに関してのみ 2 次スクリーニングを行う。2 次スクリーニングの方法はマーカー数によって最適なテクノロジー（数十の場合は Taqman 法、数が多い場合はイルミナ社のカスタムパネル）を選択する。

3. SNP データベースの構築

大量のジェノタイプング結果を臨床情報とともに格納し、遺伝解析を行なえるかたちで提供するため、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タイピング結果を、それぞれの解析結果ファイルより人手による加工なしに直接取り込むプログラム

- 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)のプログラムの組み込み
- 5) 患者の臨床情報、人種などを指標とした基礎的な統計解析(アレル頻度計算他)の自動化
- 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

4. SNP の生物学的機能評価

疾患に関連する SNP が遺伝子機能に与える生物学的影響について、DNA 修復遺伝子を欠損したニワトリ細胞株にヒト DNA 修復遺伝子の野生型及び変異型の cDNA を導入し放射線や薬剤に対する感受性を測定することにより、同定した多型の機能を迅速に評価するシステムの構築を行なった。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、発現ベクターにクローニングし、それぞれ XRCC2^{-/-}, XRCC3^{-/-}, RAD51^{-/-}DT40 細胞に導入し、細胞増殖と抗癌剤シスプラチンに対する感受性を測定した。その結果、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。

遺伝子	変異	頻度(%)	増殖能	シスプラチン感受性
XRCC2	188Arg to 188His	8.6	野生型と同じ	<u>野生型より耐性</u>
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

5. プライマー伸長反応を基盤とする高精度ハイスループット SNP 解析技術の開発

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はほぼ終了した。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、低コスト化の検討を行った。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。

3. 研究実施体制

(1) 松田グループ

① 研究者名

松田 文彦(京都大学 教授)

② 研究項目

日仏共同体制による人種間ゲノム多型の比較解析

(2) 園田グループ

③ 研究者名

園田 英一郎(京都大学 助教授)

④ 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

(3) 辻本グループ

① 研究者名

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

(4) Lathrop グループ

① 研究者名

Lathrop, Mark (Centre National de Genotypage Director)

② 研究項目

多遺伝子型遺伝病の多人種間の比較解析

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Vasilescu A, Terashima Y, Enomoto M, Heath S, Poonpiriya V, Gatanaga H, Do H, Diop G, Hirtzig T, Auewarakul P, Lauhakirti D, Sura T, Charneau P, Marullo S, Therwath A, Oka S, Kanegasaki S, Lathrop M, Matsushima K, Zagury JF, Matsuda F. A haplotype of the human CXCR1 gene protective against rapid disease progression in HIV-1+ patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3354-9. Epub 2007 Feb 21.
- Danoy P, Sonoda E, Lathrop M, Takeda S, Matsuda F. A naturally occurring genetic variant of human XRCC2 (R188H) confers increased resistance to cisplatin-induced DNA damage. Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jan 19;352(3):763-8. Epub 2006 Nov 27.

- Yamada R, Matsuda F. A novel method to express SNP-based genetic heterogeneity, Ψ , and its use to measure linkage disequilibrium for multiple SNPs, D_g and to estimate absolute maximum of haplotype frequency. Genetic Epidemiology. (in press)

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:1 件)