

# デング熱の発症と病態に関連する遺伝因子の同定

実施予定期間：平成 20 年度～平成 22 年度

代表機関：

京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センター

代表者：松田 文彦

国内参画機関：

東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター

代表者：山田 亮

国外参画機関：

タイ Mahidol University, Faculty of Medicine

代表者：Prida Malasit

## I. 概要

デング熱は、感染者によって軽度な感染から極めて重篤なデング出血熱まで、その病態が非常に多様であり、宿主の遺伝因子と密接に関連している。本提案課題では、京都大学医学研究科附属ゲノム医学センターとタイ国マヒドン大学医学部が中心となり、全ゲノムアプローチを用いて病態の異なる感染者の遺伝的多型をタイピングし、デング熱の発症、病態に関わる遺伝子の同定を目指す。

### 1. 研究の目的

寄生虫、細菌、ウイルスなどの感染症は、近代まで人の病気の大部分を占め、いわゆる伝染病として世界中で猛威をふるった。20 世紀に入って、臨床医学、微生物学、免疫学、薬理学、公衆衛生学などの発達、進歩により、多くの感染症に対する有効な治療法、予防法が開発され、先進国では人間の死と直結する危険は過去ほど多くはなくなったが、世界レベルでは感染症は未だに死因の約 1/4 を占め、集学的な対策が必須である。一方、先進国においても、温暖化による生態系の変化、交通手段の発達による物流の増加で、発展途上国から感染症が持ち込まれるケースが増加しつつある。そういった場合、流行の初期に適切な初期対策を怠れば、国中に蔓延し多くの死者を出す大災害を招く可能性が高く、感染症対策は、医学的見地からのみならず、行政的にも緊要の課題である。

感染症研究は、主に治療に関わる臨床研究、寄生体の遺伝子、蛋白に焦点を当てた研究を中心に進められ、膨大な研究成果があげられている。しかし、患者の症状の重症度、予後などは、宿主（ヒト）ゲノムの遺伝的多様性に大きく依存することが知られてきており、過去の膨大な研究成果が宿主ゲノムの情報と結びついてはじめて、感染症の総合的理解に至ると考えられる。

申請者らは東南アジアで現猛威をふるうデング熱に照準をあて、タイの感染症専門家チームとの研究協力によって、最新のゲノム疫学的手法を用いてヒトゲノム中の単一塩基多型（SNP）を網羅的に検索することで、デング熱の発症、病態と関連する遺伝子を同定する。こういった遺伝子を同定できれば、早期診断、予後の予測を通して、迅速でもっとも効果的な治療を施すことが可能となる。また、遺伝子の機能解析を進めることで、より効果のあるワクチンや新たな治療法の開発も可能である。さらに、申請者らが用いる手法は他の感染症にも十分に応用可能であり、「宿主側の要因も勘案した、ウイルス感染症の分子レベルでの

総合的理解」のための新戦略のモデルとなることが期待される。

### 2. 研究内容

デング熱はデングウイルスによって引き起こされ、ベクターのネッタイシマカが生息する熱帯地方での発症が多い。ネッタイシマカは人家と密接な関係を持ち、水槽や花瓶といった場所でも繁殖可能で、主に都市に生息するため、デング熱はマラリアと異なり、都市型の感染症である。デングウイルスは蚊の吸血の際に人体内に侵入し感染者に様々な症状を起こさせるが、発熱やそれに伴う体の痛みといった一般的な症状の他に、重篤なものになると、出血傾向と循環器障害を併発し、しばしば命を落とす。

デング熱はその症状の重篤度で DF（デング熱）、DHF（デング出血熱）DSS（デングショック症候群）の三種類に分けられている。DF は感染後、発熱、体の痛みを伴う潜伏期間を経て麻疹様の発疹が身体に広がるが、10 日程度で回復し、後遺症はみられない。一方 DHF は、DF の症状に加え血漿の漏出が起こり、それに加えて循環器障害と全身のショック症状をきたす場合を DSS と呼ぶ。DHF は平熱に戻りかけたときに発症することが多く、現在その予測はきわめて困難である。また DF から DHF への移行は 15 歳以下の子供に多く見られ、DF の児童患者のうち 1～10%が DHF に罹患するとされる。

デング熱の重篤度は、ウイルス自体の血清型では説明が難しく、罹患者の健康状態にも影響されるが、宿主ゲノムの遺伝的多様性に大きく依存する。申請者らは過去の研究で、候補遺伝子アプローチによって、DF から DHF への移行に関連する遺伝子/多型の同定に成功した。現在解析技術の急速な進歩で、遺伝子多型のタイピングを全ゲノムに拡大した解析（ゲノムスキャン）を比較的安価で行うことが可能となった。そこで申請者らは、タイの小児のデング熱罹患者の全ゲノムスキャンを試み、デング熱の病態や予後と関連する遺伝子/多型を同定する。

### 3. 国外参画機関の参画

本提案課題の実施には、デング熱に関する豊富な研究経験を有する感染症学者に加え、豊富な診察経験に基づいて患者を正確に診断、病型分類できる熟達した臨床医の参加が不可欠である。タイにおける熱帯医学、感染症学の研究中心のマヒドン大学医学部が、北東部タイのコンケン病院、南部タイのソククラ病院と連携し、検体および臨床情報の収集、臨床情報データベースの構築のネットワークがすでに確立されているので、ゲノム解析に必要な検体を迅速に収集することが可能となる。一方タイ側は大規模遺伝子解析を行う基盤が整っておらず、また専門家も少ないため、我が国がゲノム解析と遺伝統計を担当する。このような相互補完的な協力関係のもと、課題を理想的な形で進めることが可能となる。

### 4. 政策的ニーズ

第 3 期科学技術基本計画に対する総合科学技術会議の答申（諮問第 5 号「科学技術に関する基本政策について」に対する答申、平成 17 年 12 月 27 日）は、新興・再興感染症を「戦略重点科学技術」の中で、社会的な重要課題として迅速、的確に解決策を提供すべきものと位置づけ、課題

解決のための分野横断的な研究開発への取り組みに配慮すると述べられている。デング熱は“都市型”の感染症であり、地球温暖化による生態系の変化、交通手段の発達により、その流行地域は確実に拡大している。また我が国では、第二次大戦中に推定 20 万人が発病したと記録されている。現在我が国では、厳格な水際の防止策が功を奏し、デング熱の流入は最小限だが、その網をくぐって流入した場合、医療従事者の経験不足、一般市民の無知、行政側の適切な初期対策の遅れなどが重なり、国中に蔓延し多くの死者を出す大災害を招く可能性が高い。したがって行政的にも極めて急を要する重要課題で、政策的ニーズが極めて高い。

アジア諸国との連携という点で、熱帯感染症の研究は、感染症が蔓延しているアジアの国のパートナーの感染症研究の経験と知識なしには、遂行が極めて困難である。しかし、相手国には先端技術を導入・駆使した研究に対する基盤が整備されていない。相手国から生きた感染症学を学びながら、我が国の持つ先端技術を導入し、これらが有機的に結合した相互補完的な先端的研究を組織することで、新しいスタイルの国際協力が期待される。このように日本がアジアのリーダーとなって感染症対策に寄与することは、アジア全体にとって大きな利益となるばかりか、感染症の恐怖から日本を救う道にもなる。

## 5. 共同研究内容の先端性

デング熱関連遺伝子の同定は、新たなバイオマーカーの発見につながり、患者の病態を正確に把握し、迅速な診断、予後予測をもとにした、病態に応じた最適治療を施すことが出来る。また、現在のところデング熱には効果的な治療薬やワクチンがないが、免疫学的、細胞生物学的解析を通じた新たな治療薬、ワクチンの開発にもつながると期待される。さらに、デングウイルスと宿主の相互作用を分子レベルで解明することで、ウイルスの弱点を把握し、デング熱撲滅のための効果的な戦略がとれる。

## 6. 制度の付加価値

デング熱は、いまだに発症、病態に関する分子レベルの理解が乏しく、その全貌解明には、長期間の地道な研究成果の積み上げが必要で、産業界主導で行なうべき段階には至っていない。しかし、基礎研究の成果が蓄積されれば、新薬、ワクチン開発などの点で、産業界との協力は不可欠である。本提案課題の最大の特色は、既に研究体制・環境の整った機関の間で、専門分野の知識、経験を持ち寄って行なう連携事業という点で、なおかつ研究目的が極めて明確なことである。マヒドン大学にはデング熱研究に関する COE ユニットが開設され、将来的に日本の研究者を派遣して感染症学を学ばせることも可能である。京都大学では、ゲノム医学センターは、タイからも研究者を受け入れており、そういう人材が日本をよく知る研究者として、将来の我が国との国際学術交流で中心的役割を果たすと期待している。

## 7. 過去の蓄積

京都大学医学研究科とマヒドン大学医学部は、2004 年 11 月にゲノム医学を中心とした研究協力の覚え書きを締結し、また拠点大学交流事業で、マヒドン大学の研究者の長期の招聘（過去 5 年間で 5 人、延べ招聘期間 4 年以上）を含む活発な共同研究が行われており、一流学術雑誌への論文掲載をはじめ優れた業績を上げ、強い信頼関係が作られ

ている。また、参画研究者の Suriyaphol 博士は、ゲノム医学センターの外国人客員助教授として遺伝子解析データベースの共同開発のため 2007 年 2 月～5 月の間京都に滞在している。

## 8. 研究の背景等

### (1) 国内外の研究状況

ウイルス感染症の研究で宿主の遺伝的多型に踏み込んだアプローチは、異なる専門分野の研究者の大規模で組織的な取り組みが必要で、また相応の研究予算が必要なため、世界レベルでもいまだ一般的ではない。申請者らは、臨床情報や検体を効率的に収集する理想的なネットワークを構築し、それらを用いた候補遺伝子アプローチにより、DC-SIGN1 遺伝子の多型がデング熱の予後と強い相関を示すことを見いだしたが、現在までそれ以外の遺伝因子は同定されておらず、デング熱のゲノム医学に関しては、申請者らが世界をリードする立場にある。

### (2) 提案にいたる準備・調査等

京都大学医学研究科とマヒドン大学医学部の研究協力は、研究代表者が現職を得てから極めて活発に進んでおり、数年間の共同研究により、提案課題を行なう準備が以下のように進められた。

1) 京都大学医学研究科附属ゲノム医学センターにおける、大規模遺伝子多型解析プラットフォームの整備（文部科学省 特別教育研究経費 2005-2009 年度）

2) 京都、マヒドン両大学とフランス国立ジェノタイプングセンターの連携による多人種間比較解析のための遺伝子解析データベース（MESHMD）の共同開発（独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 2003-2008 年度）

3) マヒドン大学を中心とした臨床情報、検体収集ネットワークと臨床情報データベースの構築（タイ国 National Center for Genetic Engineering and Biotechnology による研究助成 2005-2007 年）

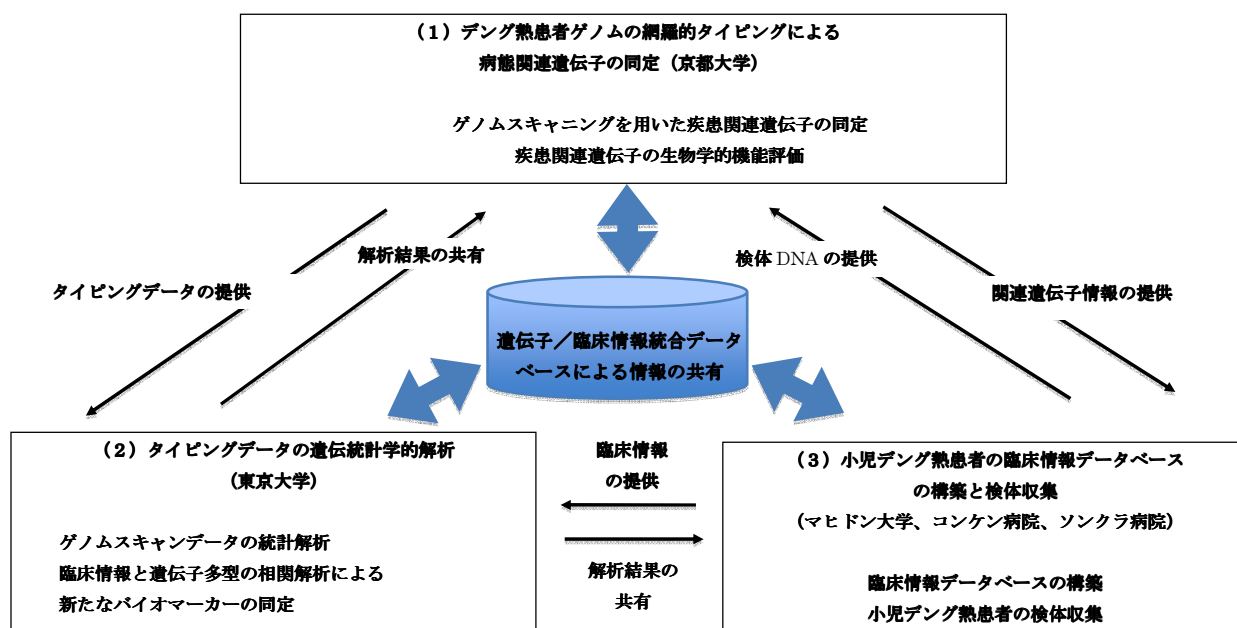
## 9. 生命倫理・安全面への配慮について

検体の収集は、相手国の倫理指針の厳格な適用によって行なわれており、臨床情報、検体の匿名化に関しても、相手国で既に終了しており、プライバシーの問題は基本的に生じない。また我が国で行なうゲノムスキャン等の遺伝子のタイピングに関しては、倫理審査申請書を現在作成中であり、京都大学倫理委員会の承認を得て国の倫理指針に基づいて遂行する予定である。

## 10. 実施体制

患者検体および詳細で正確な臨床情報の収集は、マヒドン大学医学部が、コンケン病院、ソクラ病院と連携して臨床情報データベースの構築を行い、情報の共有と遺伝子タイピング結果を用いた遺伝統計学的解析に供する。ゲノム解析は、京都大学医学研究科附属ゲノム医学センターにおいて実施する。同センターには DNA 検体保管システム、遺伝子タイピング装置、試料分注装置、塩基配列決定装置等が設置、稼働しており、また、データ解析の要である遺伝子解析データベースが既に構築されている。複雑な遺伝的背景を持つ集団を用いた遺伝解析は、医学・生物学の深い知識を持ちかつ数学・統計学に精通した優れた専門家の参加が不可欠であるため、東京大学の山田が解析を担当する。

氏名	所属部局・職名	提案課題における役割
松田 文彦	京都大学医学研究科・教授	研究の総括および遺伝子情報データベースの管理
村上 善基	京都大学医学研究科・産学官連携准教授	遺伝子機能解析
高橋 めい子	京都大学医学研究科・助教	ゲノムスキャンおよびタイピング
山田 亮	東京大学医科学研究所・准教授	タイピング結果の統計解析
Prida Malasit	Medical Molecular Biology Unit, Siriraj Hospital, Mahidol University/ Director	検体・臨床情報収集ネットワークの責任者
Prapat Suriyaphol	Bioinfo. and Data Management for Research Unit, Siriraj Hospital, Mahidol University/ Director	臨床情報データベースの開発と管理
Anavaj Sakuntabhai	Ramathibodi Hospital, Mahidol University/ Assistant Professor	検体・臨床情報の品質管理
Sirijitt Vasanawathana	Pediatric Department, Khon Kaen Hospital/ Director	タイ北東部の小児デング熱患者の検体と臨床情報の収集
Wanee Limpitikul	Pediatric Department, Songkhla Hospital/ Director	タイ南部の小児デング熱患者の検体と臨床情報の収集



## 11. 各年度の計画と実績

平成 20 年度

・計画

検体および臨床情報の採取：タイ国マヒドン大学チームは、タイ北東部のコンケン病院、タイ南部のソングクラ病院のデング熱を専門とする熟練した臨床家とネットワークを形成し、コンケン病院からは、きわめて詳細な臨床情報を伴う約 400 人の小児デング熱患者の検体（血漿、血清、DNA）を収集している。臨床情報はマヒドン大学シリラ病院の臨床情報データベースで一元管理され、検体もすぐに利用可能な状態で保管されている。このネットワークを用いて、研究期間全体を通してさらなる検体収集を継続して行い、2009 年度中に DF1000 例、(DHF+DSS) 1000 例の収集を目標とする。またこのデータベース、遺伝子解析データベー

ス（後述）の情報は、研究に従事する機関が情報を共有できるようにする。

ゲノムワイド多型解析：コンケン病院の 400 検体を用いて、遺伝子多型チップ（Illumina 社 550K：ヒトゲノム上のタグ SNP 55 万個搭載、を使用予定）でゲノムスキャンを開始し、2008 年 10 月までに実験を終了する。その後 SNP 毎、検体毎の実験成功率、ハーディー・ワインバーグ平衡値などを指標として結果の品質管理をおこない、最終結果をゲノム医学センターの遺伝子解析データベースに格納する。データ解析：まずは最も明確で重要なフェノタイプである血漿の漏出に着眼して、DF 対 (DHF+DSS) でケース・コントロール解析を行う。具体的には、各 SNP について、アレル頻度、ジェノタイプ頻度、優性、劣性の検定を行ない、また集団の構造化を補正するプログラムも用い、より正確

な検定を試みる。さらに、有意差  $p < 0.01$  が得られた多型に関しては、ハプロタイプでの検定も併せて行なう。

・実績

① タイピングデータの遺伝統計学的解

ゲノムワイド多型解析: コンケン病院の 304 検体に加えてシリラ病院の 100 検体を用いゲノムスキャン(一次スクリーニング)を開始した。ハーディー・ワインバーグ平衡値などを指標として結果の品質管理をおこない、最終結果をゲノム医学センターの遺伝子解析データベースに格納した。

さらに、臨床データとの関連データ解析も先行して開始した。コンケン病院の検体とシリラ病院の検体で関連遺伝子座候補が得られ、メタアナリシスの手法によりさらに詳細な解析を開始した。

次年度解析のために、バンコックのマヒドン大学シリラ病院、北東部のコンケン病院、南部のソクラ病院の臨床家とのネットワークを利用して、検体および臨床情報の採取を行った。

② 計算機環境の整備、解析ツールの準備・開発

デング熱の発病・重傷度に関連する遺伝因子の解析を実施するために、同疾患の疫学・病理学上の特徴を調査し、遺伝因子解析上の留意点を抽出し、それをもとに既存の遺伝疫学用解析ツールの改変を行った。

遺伝子解析データベースへの解析情報の格納に加えて、マヒドン大学シリラ病院の臨床情報データベースとの統合について検討し、研究情報の共有に資する統合データベースの構築を開始した。

さらに、公共データベースとの有機的結合のためのシステム仕様を検討した。

平成 21 年度

・計画

ゲノムワイド多型解析(継続): 前年度のゲノムスキャンの検出力を更に上げるため、新たに得られた検体で同様の実験を行う。検体数として、DF150 検体、(DHF+DSS) 150 検体を見込んでいる。結果は前年度と同様の過程を経てデータベースに格納する。

データ解析: 前年度と同様、DF 対 (DHF+DSS) で統計解析を行う。前年度の解析結果の再現性確認をおこなう。また単純に 2 セットのデータを合わせて統計解析を行うのではなく、おのおのを独立の結果として用いたメタアナリシスを試みる。また、デング熱と関連する種々のバイオマーカーの詳細な記録に基づき、重要性の高いマーカーを選択し、それらの値と関連する遺伝子多型の同定も試みる。候補遺伝子の同定: 有意差が得られた SNP マーカーを含む連鎖不平衡ブロックを公開情報から構築したのち、ブロックに含まれる SNP の中から追加の SNP マーカーを抽出し、ブロック全域の詳細なタイピングを行なう。この結果をも

とに、SNP が原因する遺伝子の発現、遺伝子産物の機能の変化を加味して、デング熱の病態の変化と最も強い相関を持つ遺伝子/多型を複数個同定する。

・実績

① ゲノムワイド多型解析データの蓄積

収集済みのコンケン病院の検体を用いたゲノムスキャンのデータ蓄積を継続するとともに、前年度のスキャンの検出力を更に上げるために新たに得られた検体を加えて同様の実験を行った。検体数として、DF150 検体、(DHF+DSS) 150 検体を用い、結果は前年度と同様の過程を経てデータベースに格納した。

蓄積したデータ解析についても前年度と同様に DF 対 (DHF+DSS) で統計解析を行った。前年度の解析結果の再現性が確認された。また単純に 2 セットのデータを合わせて統計解析を行うのではなく、おのおのを独立の結果として用いたメタアナリシスを試み、結果の信頼性の確認を行った。

② 臨床情報/遺伝子情報統合データベースの構築

前年度に収集した検体 (DF650 例、(DHF+DSS) 650 例) を用いて昨年に同定した遺伝子/多型候補遺伝子の再現性の確認を開始した。また、新たな候補遺伝子の同定のために有意差が得られた SNP マーカーを含む連鎖不平衡ブロックを公開情報から構築したのち、ブロックに含まれる SNP の中から追加の SNP マーカーを抽出し、ブロック全域の詳細なタイピングの試みを行った。

マヒドン大学シリラ病院のデータベースの患者臨床情報及び京都大学の遺伝子解析の結果の統合データベースにこれらの結果を反映させながらの構築に継続して行った。解析情報の共有により共同研究の進展をはかった。

平成 22 年度

・計画

候補遺伝子の再現性確認: 2009 年度に同定された関連遺伝子/多型の再現性を、前年度に収集した検体 (DF650 例、(DHF+DSS) 650 例) を用いて確認する。

関連遺伝子/多型の機能解析: 多型が遺伝子に与える影響はその位置によって異なる。同定した多型の種類に応じて、1) レポーターアッセイ、2) 細胞株を用いた蛋白の発現実験、3) マイクロ RNA による関連遺伝子の遺伝子産物発現の抑制実験などが可能である。本課題の期間内にこれらをすべて終了することは時間的に困難なので、終了後も引き続きおこなう。

データの一般公開: デング熱の病態関連遺伝子/多型のカタログ化を行ない、ゲノム医学センターとマヒドン大学医学部の間で共同開発がほぼ終了した遺伝子解析データベース (MESHMD) に基礎情報を蓄積し、一般公開する。それらを通して、本研究の最終目標である「宿主側の要因も勘案したウイルス感染症の総合的理解」に向けた情報基盤を整備し発信することによる、社会貢献を目指す。

12. 年次計画

研 究 項 目	1 年 度 目	2 年 度 目	3 年 度 目
<p>(1) デング熱患者ゲノムの網羅的 タイピングによる病態関連 遺伝子の同定 (京都大学医学研究科)</p>	<p>ゲノム</p>	<p>スキャン タイピング結果の 関連遺伝子の</p>	<p>再現性確認 同定 機能解析</p>
<p>(2) タイピングデータの 遺伝統計学的解析 (東京大学医科学研究所)</p>	<p>ゲノムスキャン</p>	<p>データの相関解析 臨床情報と遺伝子 新たなバイオマ</p>	<p>多型の相関解析 ーカーの発見</p>
<p>(3) 小児デング熱患者の 臨床情報データベースの 構築と検体収集 (マヒドン大学 コンケン病院 ソククラ病院)</p>	<p>DNA 検体と臨床 臨床情報データ</p>	<p>情報の収集と管理 ベースの構築</p>	