

分担研究報告書

疾患遺伝子解析のための新規手法, ホモ接合指紋法, ホモ接合ハプロタイプ法の開発と
それを用いた疾患遺伝子解析

研究分担者 埼玉医科大学呼吸器内科教授 萩原弘一

研究要旨

- 1) 劣性遺伝子同定手法としてホモ接合指紋法を開発した
- 2) 優性, 劣性遺伝子同定手法として, ホモ接合ハプロタイプ法を開発した
- 3) ホモ接合ハプロタイプ法を用いて全ゲノム関連解析を行う新たな手法を確立した
- 4) 両手法を用いて, サルコイドーシスCOPDの解析を施行している.
- 5) 現在利用可能な疾患遺伝子解析手法は, 「良く見るが集団内の頻度が1%以下」という, 教科書に載っているほとんどの疾患の疾患遺伝子解析には適しない. ここで開発したホモ接合指紋法, ホモ接合ハプロタイプ法はそれらのブラックボックスとなっている疾患に使用可能である. これらの手法は, 未同定の疾患遺伝子の同定を加速すると考えられる.

A. 研究目的

疾患は, 遺伝因子と環境因子の相互作用により発症すると考えられる. 遺伝因子の関与の強い疾患, 環境因子の関与の強い疾患がそれぞれ存在すると想定されているが, 多くのヒト疾患では疾患遺伝子が明らかとなっておらず, 遺伝因子と環境因子の関与割合は明確ではない. ヒトの遺伝子総数は約 22000 と推定されているが, 疾患との関連が示されている遺伝子は 2000 に過ぎない(McKusick VA, Am J Hum Genet. 80:588-604, 2007). 疾患遺伝子解析に使用される方法は複数ある. 複数の構成員が疾患を有する大家系が使用可能な稀少疾患では連鎖解析, よくある疾患 (common disease) では全ゲノム関連解析が使用される. 前者は疾患遺伝子頻度が高い疾患, 浸透率が低い疾患, 高齢で発症する疾患

には効率が悪い. 後者は疾患遺伝子頻度が単塩基多型(SNP)のマイナーアレル頻度より低い疾患(1%以下)には効率が悪い. そのため, 両法の適応が難しい疾患が数多ある. 疾患遺伝子の同定は, 疾患原因の同定や治療法開発に直接結びつく情報であるため, 上記のような疾患に対して適応可能な疾患遺伝子同定法の開発は重要である.

我々は, Homozygosity mapping として知られる劣性遺伝子同定手法を高密度 SNP アレイデータに適応可能とする homozygosity fingerprinting 法(ホモ接合指紋法:HF法)を開発した. この手法は, 集団内に存在している近親婚の痕跡を使用して疾患遺伝子解析を行うものである. 本手法を用いて, それまで疾患遺伝子の知られていなかった肺胞微石症の疾患遺伝子を同

定することができた。

次に、ゲノム上の情報を集約する新たな概念として Homozygosity haplotype を提唱し、それを用いた家系解析法を報告した (Miyazawa et al. Am J Hum Genet 80:1090, 2007)。この手法は、従来使用されて来た連鎖解析のほとんどの置き換えるものである。ノンパラメトリックな解析法であるため、家系図は不要であり、浸透率にも影響されない。単純なメンデル遺伝形式を取る疾患には極めて有効に働くと考えられる。

近年、全ゲノム関連解析 (GWAS) による結果が報告されるようになって来た。しかし、GWAS によって求められる疾患関連 SNP はほとんどが相対危険度の低いものであり、疾患に深く関与し、さらに臨床応用可能な疾患遺伝子を求めることは容易でないことが明らかとなって来た。この状況を打ち破るためには、一般集団に適応可能な新たな疾患遺伝子解析法を開発する必要がある。我々は homozygosity haplotype 法 (HH 法) を改良し、疾患遺伝子を集団内に広めた最近の共通先祖 (most recent common ancestor: MRCA) が数千年前に存在するような集団から、MRCA が疾患内に広めた疾患遺伝子 (founder gene) を効率的に検出できるようにした。さらに、同手法を用いてサルコイドーシス、及び COPD の解析を行っている。サルコイドーシスの遺伝型決定は埼玉医科大学ゲノム医学研究センターで行い、既に 48 例の解析が終了している。COPD の遺伝型決定は Denmark の AROS 社で行なっているが、現時点では終了していない。

B. 研究方法

開発には MacPro (MacOSX10.5, Intel Xeon Microprocessor, 8 GB RAM) 上で動く

XCODE3.0, GCC4.0 を用いた。サルコイドーシス患者 DNA は、旭川医科大学呼吸器内科が収集したものをを使用した。COPD 患者 DNA は、埼玉医科大学呼吸器内科で収集したものをを使用した。SNP 遺伝型は Affymetrix 社の SNP6.0 を用いて決定した。

(倫理面への配慮)

本計画の研究計画書は各施設の倫理委員会にて審査を受けた。患者 DNA の採取は、患者に文書で説明を行い、同意書に署名を得た後に行なった。

C. 研究結果

(A) HF 法の開発

自己接合性断片 (autozygosity segment: AS) と近交係数

近親婚家系では家系図に環が存在する。この環の弧の両側を伝わって、両親の共通先祖 (父親側で m 世代前、母親側で n 世代前) の一本の染色体由来の断片 (同祖断片: segment identical by descent, IBD) が、特定の個人でホモ接合になる (図 1)、このホモ接合部分が AS である。

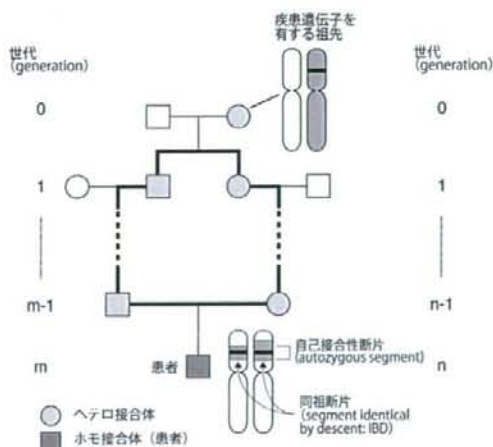


図 1 近親婚と自己接合性断片 (AS)

近親婚家系で見られる家系内の環を太線で示す。疾患遺伝子を有する祖先の単一染色体の一部がホモ接合となったものが AS である。

AS 上に劣性疾患遺伝子がある場合、疾患遺伝子はホモ接合となり遺伝疾患が発症する可能性がある。近交係数(inbreeding coefficient) F は、個人の一対のアレルが祖先の単一の染色体に由来する確率である。よって F は、
 $F = \frac{\text{全ての AS の遺伝長の合計}}{\text{全常染色体の遺伝長の合計}}$
 で計算できる。

AS の長さ

被験者が共通先祖から父系をたどって m 代目、母系をたどって n 代目の場合(図 1)、Haldane の Poisson model を用い、染色体を無限長とすると、AS の長さは

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad \lambda = \frac{m+n}{100} (cM^{-1})$$

の指数分布に従う。染色体長は有限なので、実際の値は式 1 よりわずかに異なるが、通常の解析では AS cutoff は染色体長より十分に短いので、上式を使用して近似する。

被験者

常染色体劣性遺伝疾患である Siyama 型 $\alpha 1$ アンチトリブシン欠損症患者、および健常対照者の DNA サンプルは、順天堂大学倫理委員会によって承認された手順に基づきインフォームドコンセントを取得した後に、被験者の末梢血を採取し、精製した。患者 1 から患者 6 は、いずれも親戚関係がない。また居住地区も日本の中で異なっている。患者 1 から患者 4 までは両親がいとこ同士の近親婚である。患者 5 と患者 6 では、

家族歴から近親婚は認められなかった。

GeneChip Mapping 500K Array Set を用いて解析した、互いに親戚関係にない日本人 45 名のデータは、Affymetrix 社のウェブサイトより入手した

(http://www.affymetrix.com/support/downloads/data/500K_HapMap270_DM.zip)。

SNP 型の決定

$\alpha 1$ アンチトリブシン欠損症患者の全ゲノムレベルの SNP 型の決定は、GeneChip Human Mapping 100K Set を使用して行った。以前の解析により confidence value 0.02 以下の測定値は信頼性が高いと考えられたため、confidence value が 0.02 以下の SNP 解析データのみを使用して以後のデータ解析を行った。

一般対照群を用いた解析

RHS を共有する被験者の数を「 $\alpha 1$ アンチトリブシン欠損症患者群」と「健常対照者群」とで比較した。ここでは RHS を共有する「 $\alpha 1$ アンチトリブシン欠損症患者群」被験者数、 x_1 を RHS を共有する「健常対照者群」被験者数、 x_2 を RHS を共有する「健常対照者群」被験者数、

$$\hat{p}_1^* = \frac{x_1 + 0.5}{n_1 + 1}, \quad \hat{p}_2^* = \frac{x_2 + 0.5}{n_2 + 1},$$

$$\hat{p}^* = \frac{x_1 + x_2 + 0.5}{n_1 + n_2 + 1},$$

$$u_0 = \frac{\hat{p}_1^* - \hat{p}_2^*}{\sqrt{\hat{p}^*(1-\hat{p}^*)\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

が標準正規分布に従うものとして P 値を計算した。P 値は、

$$P = \int_{u_0}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx$$

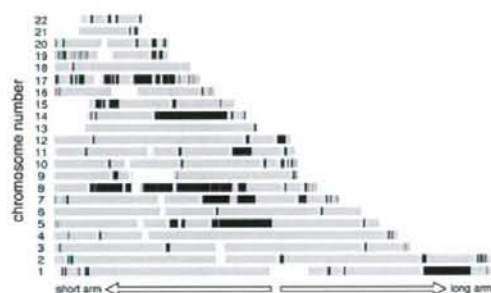
で算出した。

各患者の RHS, および複数の患者で共有されている RHS の計算

RHS cutoff 値 2.0 cM を用いて各患者の RHS を求めた(図 2). 家族歴から近親婚が明らかな患者 1-4(図 2a-d)と近親婚が明確でない患者 5-6(図 2e, 2f)に分けて示してある。

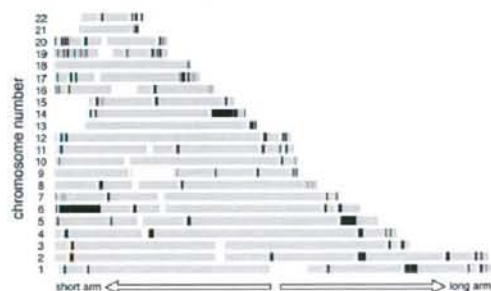
A

患者 1



B

患者 2



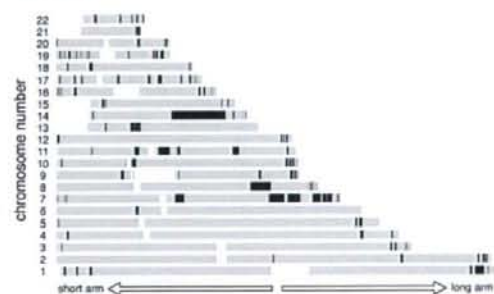
C

患者 3



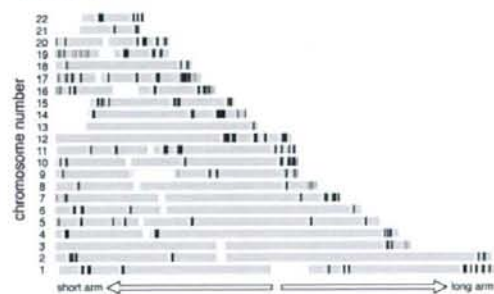
D

患者 4



E

患者 5



F 患者 6

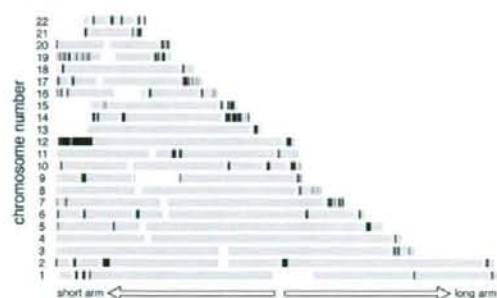


図2 AS同定

Siiyama型 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症各患者のAS. ASは黒で、他の常染色体領域は灰色で示してある. 各図の横の番号は染色体番号である.

患者 2a-d では長い RHS が認められ、近親婚の影響が明確である (RHS の長さと同婚に
関しては後述). いとこ婚両親の子供
では であるため、図 2a-d には、A 型偽陽
性 0.000, B 型偽陽性 0.002, 偽陰性 0.007
で、いとこ婚が原因である AS を推定した領
域が示されていることになる. しかし、全
ての領域がいとこ婚が原因で生じているか否
かは不明である. なぜならば患者両親は、
その祖父母以外にも、より昔の世代に共通
先祖を有している可能性があるからである.

複数患者での AS 共通領域

Homozygosity mapping では複数患者に
共通の AS 領域 (AS 領域の積集合) に疾患
遺伝子が存在すると考える. 図 2 で得られ
た AS を用いて、 $\alpha 1$ アンチトリプシン遺伝
子の同定が行なえるか検討した.

患者 1 と 2 (図 3A) の 2 名だけでも、共通
領域はかなり狭いものとなる. 1-3 (図 5B),
患者 1-4 (図 3C: 両親がいとこ婚の患者全
て) と共通領域は徐々に減少する. 患者 1-6

(図 3D 全患者) の AS 共通領域の合計は合
計 24.5 cM. 矢印で示した 2.7 cM の領域に
 $\alpha 1$ アンチトリプシン遺伝子が存在する. こ
の領域は遺伝子重複によって生じたと思わ
れる $\alpha 1$ アンチトリプシン遺伝子類似遺伝
子のクラスターがあり、22 の遺伝子を含ん
でいた.

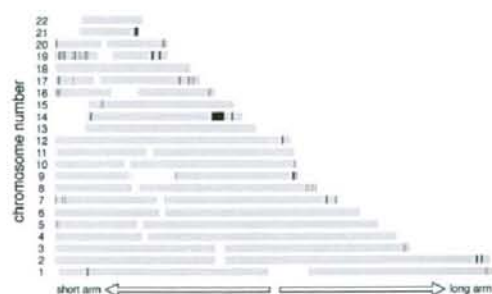
A 患者 1x2



B 患者 1x2x3



C 患者 1x2x3x4



D 患者 1x2x3x4x5x6



図3 疾患遺伝子解析

複数の患者のASの積集合を示す。矢印の部分に $\alpha 1$ アンチトリプシン遺伝子が存在する。

本手法を用いての疾患遺伝子同定には、いくつかの欠点がある。(1)本手法では偽陰性は0ではなく、わずかだが検出できないASもある。その場合、積集合を求める方法では、疾患遺伝子を含むASを除外してしまう可能性がある。(2)図3Dに示したように、AS共通領域は他にも存在する。特にテロメア付近に数多く認められ、これらはSNP array上のSNPの位置やホモ接合頻度の不均一さが原因となっている可能性が考えられる。(3)最終的に得られたASの共通領域(図3D)でも22の遺伝子を含んでおり、これらの遺伝子は個別に検索しなければならない。(3)は本手法ではこれ以上改善できないが、(1)、(2)の問題は、健常対象者のSNPデータを用いて軽減できる可能性がある。

(B)HH法の開発

HHはSNPハプロタイプのサブセットである。HHを求めるには、まずヘテロ接合のSNPを除去する(図4-(i))。すると全てのSNPはホ

モ接合となるため(図4-(ii))、残ったホモ接合のSNPに関してハプロタイプを一意に決定することができる(図4-(iii))。これがHHである。

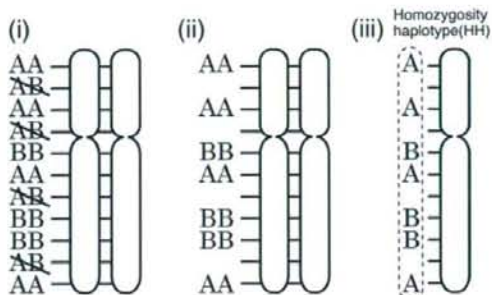


図4 HH

2本の染色体は同一のホモ接合ハプロタイプを有する。ヒトは二倍体であるため各染色体あたり2種類のハプロタイプがあるが、ホモ接合ハプロタイプは一種類のみであり、ヒトをあたかも1倍体であるかのように解析することができる。2名の個人のホモ接合ハプロタイプを比較する場合は、比較できるSNP (compSNP)のみを比較する(図5)。

comparable SNPs(compSNPs)

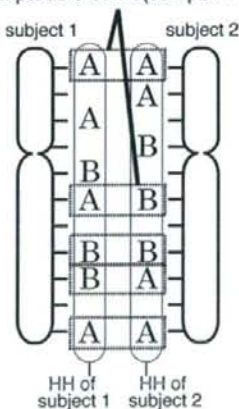


図5 HHの比較

2名の個人が同一先祖由来の染色体断片 (shared fragment) を有している場合、shared

fragmentの部分ではホモ接合ハプロタイプは一致する. 逆に, ホモ接合ハプロタイプが一致している場合, 2名の個人のそれぞれいずれか片方の染色体がshared fragmentである可能性がある(図6).

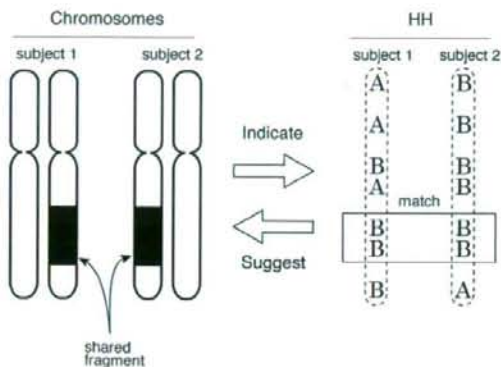


図6 HHが一致する意味

RCHHは, 閾値(RCHH cutoff)よりも長い遺伝長でホモ接合ハプロタイプが一致する領域である. RCHHはshared fragmentの目安となる(図7).

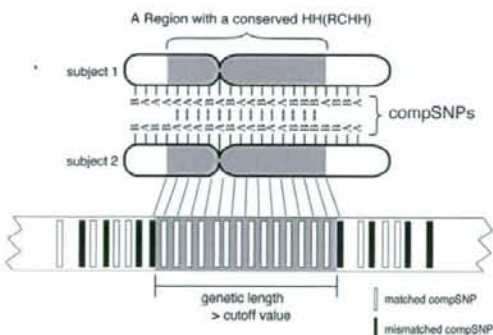


図7 RCHH

減数分裂がHaldaneのPoisson process modelに従って生じると仮定し, 2名の個人が共通先祖からm, n世代離れているとすると, $RCHH\ cutoff = c(m)$ において, RCHHはshared fragmentのうち

$$e^{-\lambda c}(1 + \lambda c), \lambda = \frac{m+n}{100}$$

を検出することができる.

Marfan症候群家系解析

ホモ接合ハプロタイプ(HH)の家系解析における有用性を, 多数のMarfan症候群を有する大家系を対象として検討した. Marfan症候群は全身の結合組織の異常を主徴とする常染色体優性遺伝疾患で, 染色体15番q21.1に存在するfibrillin-1遺伝子(FBN-1)または染色体3番p24.2に存在するTGF- β 2型受容体遺伝子の異常が原因であることが知られている. 対象家系は既に検索が行われた家系で, 6名の有症状患者と3名の無症候保因者が, FBN-1の1879C>T (R627C) 変異をヘテロ接合で有していることが分かっている(図8).

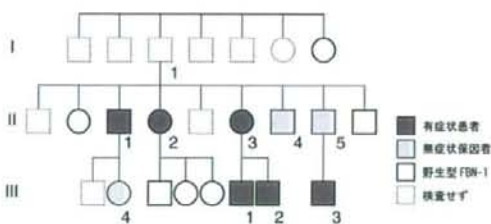


図8 使用した Marfan 症候群家系

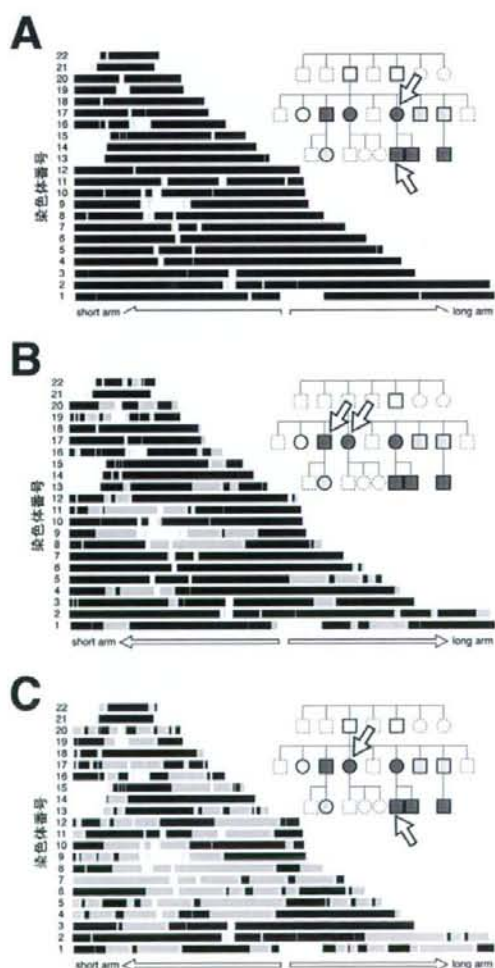
被験者 I-1は, この疾患遺伝子に関して, 対象家系の共通先祖と考えられる. 解析に当たり, 我々は以下の2つの疑問を解決することにした. (i) ホモ接合ハプロタイプ(HH)は6名の有症状患者データよりFBN-1遺伝子存在領域を同定できるか. (ii)さらに3名の無症候保因者のデータを加えることにより, 存在領域をさらに狭めることができるか.

解析に先立ち、我々はSNP型解析データの正確度に関して検討した。式1より、親子間ではホモ接合ハプロタイプ(HH)は同一になるので、両者間の型の一致した比較可能SNP(compSNP)と全比較可能SNP(compSNP)の比は、SNP型決定の正確度を反映するはずである。我々は、3ペアの被験者II-1とIII-4、II-3とIII-1、II-5とIII-3に関して検討した。GeneChip解析では、各SNPの型は confidence 値と共に出力される。confidence 値が低いほど正確なSNP型と考えられる。confidence 値のカットオフ値として0.05を使用することにした。

次に我々は、ホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)を定義するためのカットオフ値(以後ホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)カットオフ値と記載)を決定した。我々はカットオフ値として3.0 cMを採用した。なぜなら、この値ではA型およびB型偽陽性率が低く、同時に偽陰性率も許容範囲と考えられたからである。

そして6名の有症状患者の解析を行った。その結果を図9に段階を追って示した。被験者 II-3とIII-1 は親子であり、ホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)は常染色体領域全体を占めている(図9A)。II-1とII-2 は兄弟で、ホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)は常染色体全域の81%を占めている(式1からの予測値は75%)(図9B)。II-2とIII-1 は叔母と姪で、ホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)は56%を占めている(予測値50%)(図9C)。III-2とIII-3 はいとこ同士で、ホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)は39%を占めている(予測値25%)(図9D)。全有症状患者に共通のホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)を図9Eに示す。補遺表1より、共通先祖由来領域(RCA)の96%がこの全有症状患者に共通

のホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)に含まれると計算され、実際に全有症状患者者に共通のホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)はFBN-1を含んでいた(図9E)。無症候性保因者(II-4、II-5 および III-4: 図4A)を加えることにより、共通のホモ接合ハプロタイプ保存領域(RCHH)をさらに狭めることが可能であった(図9F)。これらの結果は、ホモ接合ハプロタイプ(HH)解析が大家族解析において効率的、直感的な手法であることを示すものである。



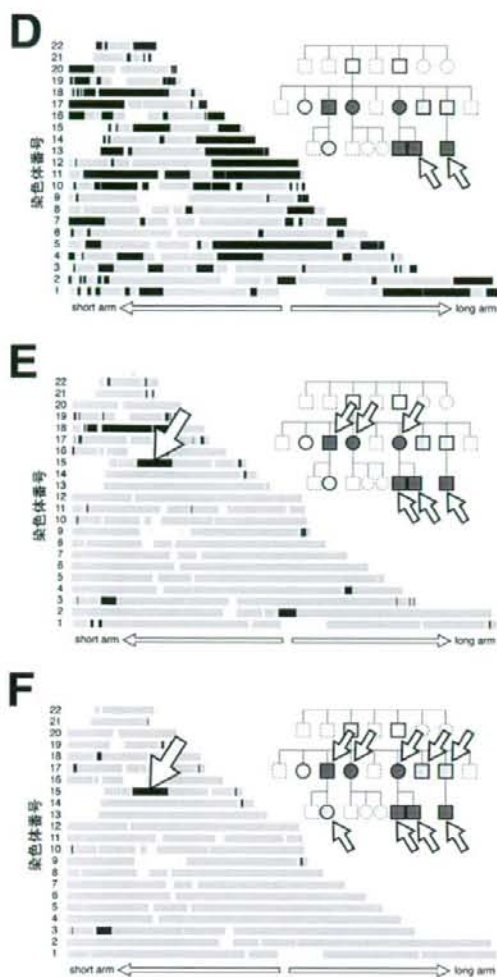


図9 Marfan 症候群家系解析

(C) HHによるGWASの開発

SNPの密度が十分に高いなら、偶然にRCHHが生じる可能性、即ちRCHH cutoff長に亘ってcompSNPが偶然に一致する可能性は十分に小さくなる(Miyazawa et al. Am J Hum Genet 80:1090, 2007). 例えば $m=n=50$, RCHH cutoff=0.83 cMの場合、shared fragmentの0.8を検出できる一方、偶然に生じるRCHHは常染色体全領域の0.004程度に留まる。これは2名の疾患患者がおり、その疾患の原因が50世代前の共通

先祖に由来する疾患遺伝子である場合、ホモ接合ハプロタイプにより十分にshared fragmentが検出可能なことを意味している。しかしながら、2名の共通先祖は多数あり得るため、疾患遺伝子同定のためには別の共通先祖由来のshared fragmentを除去せねばならない。これは多数の患者を組み合わせることで可能となる。一人の共通先祖から疾患遺伝子を受け継いでいる多数の患者の全ての2名のペアでRCHHを求め、その数を染色体の各領域で積算する。RCHHが得られる頻度が最も多い領域が疾患遺伝子領域と推定される。コントロールとして100名の健常対照者を用意する。染色体の各部位で、RCHHを共有する人数を求め、caseとcontrolの比較によりP値を計算すれば、疾患遺伝子領域を $-\log_{10}(P)$ のpeakとして描出することができる(図10, 11)。

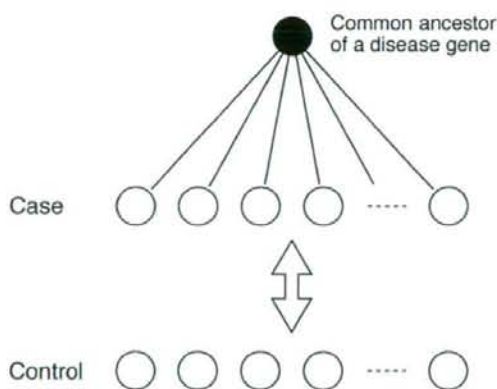


図10 HHを用いた疾患遺伝子検索のstrategy

図11では、SNP6.0で検出できる90万のSNPのうち、25000番目、50000番目、75000番目、... 875000番目に50世代前のMRCA由来の疾患遺伝子があるデータを作成し、それをHHを用いたGWASによって

検出している。RCHH cutoff は0.80 cMである。

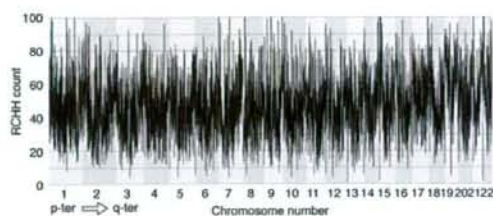


図 11-1 case

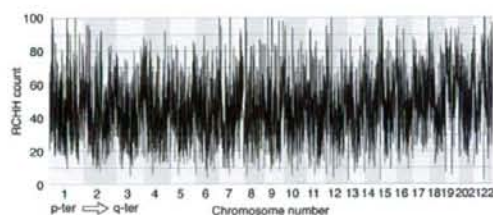


図 11-2 control

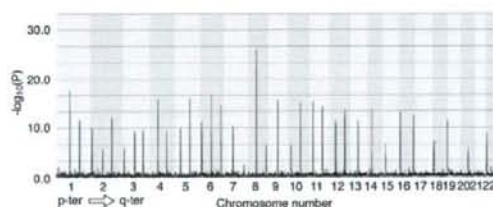


図 11-3 $-\log_{10}(P)$. それぞれの疾患遺伝子の場場所が描出されている。

上記の計算方法は、染色体上でホモ接合ハプロタイプの多様性の多い領域ではうまく働く。しかしながら、ハプロタイプの多様性の乏しい領域ではうまく行かない。図11-2で示すように特にテロメアの近くでは、多くの被験者がRCHHを共有してしまう。これは、RCHH cutoffの値をSNP単位で変化させることで解決できる。RCHH cutoffが大きくなれば、より長い領域でホモ接合ハプロタイプが一致しない限りRCHHとして検出できない

ためである。RCHH cutoffとRCHHの定義を拡張する(図12)。これは古い定義を包含している。

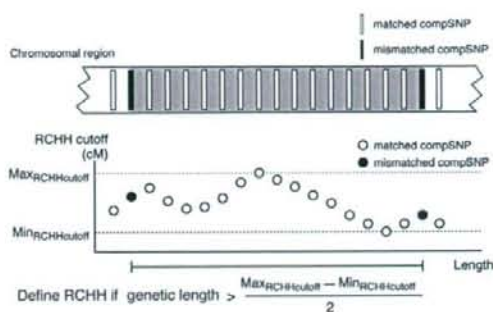


図 12 RCHH cutoff の拡張

この新しい定義を利用した計算手順は図13のようになる。

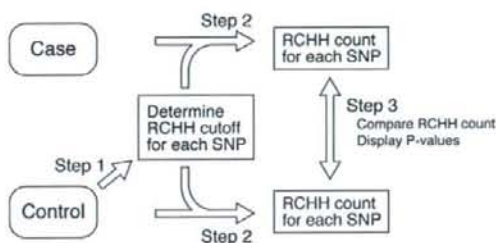


図 13 拡張 RCHH cutoff を利用した計算手順

コントロールを100名が、全ての染色体領域でRCHHを共有する人数が40名以下となるようにRCHH cutoffを変化させる(図14)。

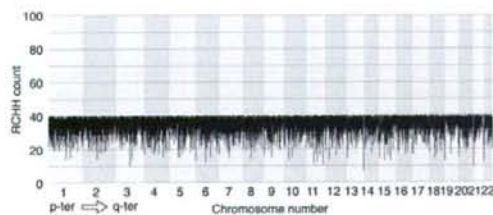


図 14 RCHH の共有数が全常染色体で 40 名以下となるようにする. Control の図

このようにすると, ハプロタイプの多様性の乏しい領域でも, 検出力は低いが出検できるようになる(図15).

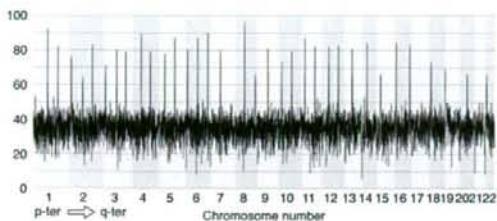


図 15-1 RCHH の共有数が全常染色体で 40 名以下となるようにする. Case の図

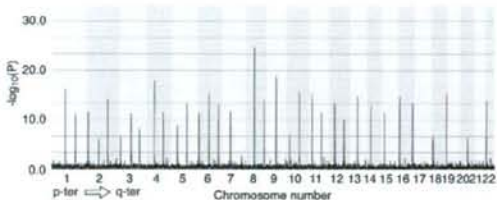


図 15-2 RCHH の共有数が全常染色体で 40 名以下となるようにする. $-\text{Log}_{10}(P)$ の図

染色体全域では150世代前の founder gene でもかなりの確率で検出できるようになる。この手法のもう一つのメリットは, 多重検定の問題を permutation によって避けることができることである(図16)。

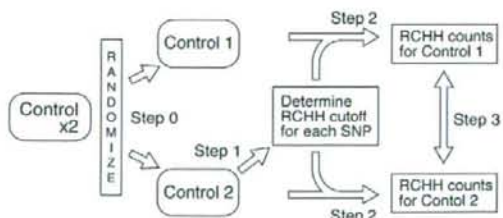


図 16-1 Permutation による有意水準の検討. これを 100 回繰り返して $-\text{log}_{10}(P)$ の最大値を有意水準とする

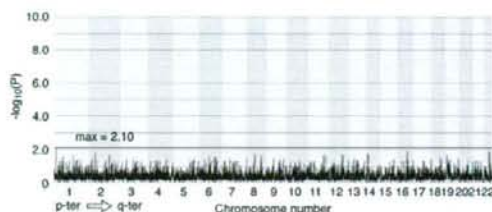


図 16-2 Permutation による有意水準の設定. 100 回繰り返した $-\text{log}_{10}(P)$ の最大値は 2.10 となった. これが有意水準となる

患者100名のうち同一の founder gene によるものの割合が低い場合など, 条件を変えたシミュレーション結果を図17に示す。

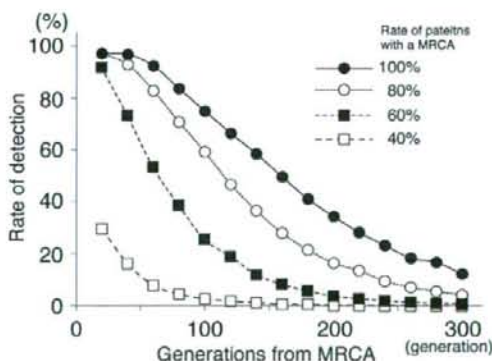


図 17-1 Case 中に同一の MRCA からの遺伝子を有している患者が 100%, 80%, 60%, 40% の場合のシミュレーション. SNP6.0 を使用した場合の結果。

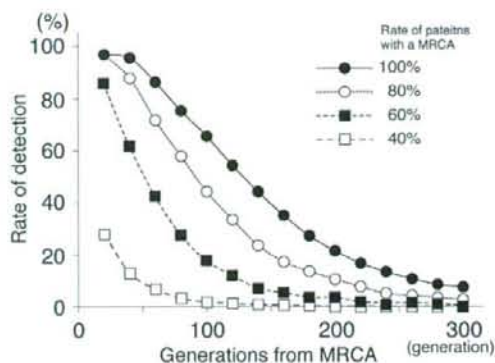


図17-2 図12-1と同様. 500kGeneChipを用いた場合のシミュレーション

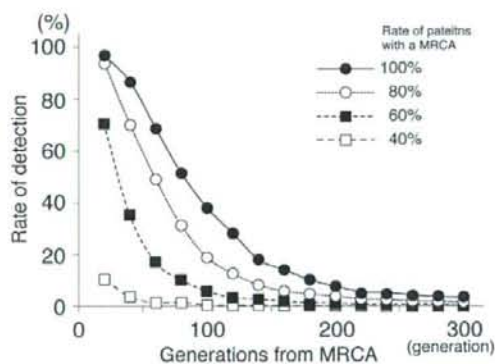


図17-3 図12-1と同様. 250kNSPGeneChipを用いた場合のシミュレーション

MRCAがより近い世代に存在する場合(例えば100世代以下), 図9で示した「RCHHを共有する患者の割合」を5%にすることで, より少ない患者でも効率的に検出することができるようになる(図18).

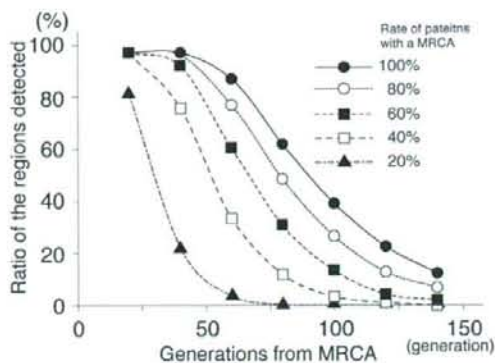


図18-1 Case中に同一のMRCAからの遺伝子を有している患者が100%, 80%, 60%, 40%の場合のシミュレーション. SNP6.0を使用した場合の結果.

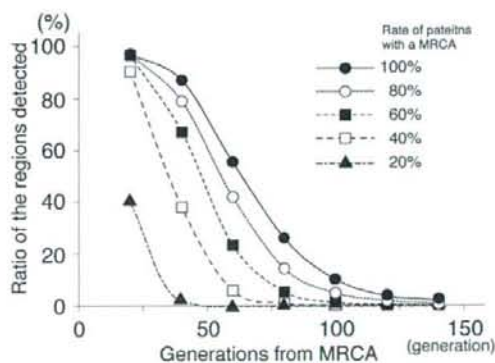


図18-2 図12-1と同様. 500kGeneChipを用いた場合のシミュレーション

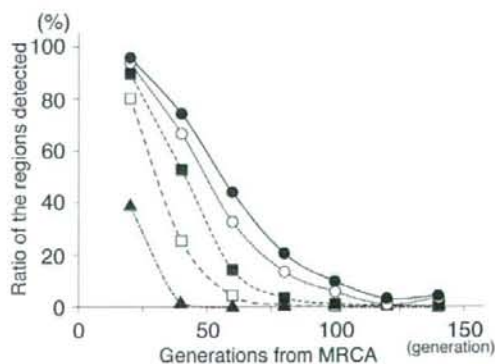


図18-3 図12-1と同様. 250kNSPGeneChipを用いた場合のシミュレーション

(B)HHによるGWASを用いたサルコイドーシス解析

サルコイドーシスは、原因不明の全身性肉芽腫性疾患である。遺伝的な素因(遺伝因子)に、細胞性免疫を活性化する外的要因(環境因子)が作用して発症すると考えられている。家族性発症(患者同胞や親族での高い罹患頻度)、人種間での罹患頻度の相違(黒人の発症率は白人の3.5倍)、HLAとの高い相関(HLA-DRB1やHLA-DQB1)など、遺伝因子の関与を示唆する所見は多い(Iannuzzi M.C. and Rybicki B.A. Proc Am Thorac Soc 4:108, 2007)。ヨーロッパでは精力的な遺伝因子同定研究が行われており、マイクロサテライトマーカー検索でBTNL2遺伝子(Valentonyte R et al. Nature Genet 37:357,2005)が、全ゲノム関連解析でANXA11遺伝子(Hoffman S et al. Nature Genet 40:1103,2008)が同定されている。サルコイドーシスは多因子疾患と考えられ、病態に民族差があることから各民族で関与する遺伝子も異なると思われるが、日本人では遺伝学的研究はほとんど行なわれていない。

旭川地方の人口は、明治維新前後より始まった移民(移住)により成立した。このような歴史的背景がある集団では遺伝構造が単純化するため、効率的な疾患遺伝子解析が行なえると考えられる(図19)。

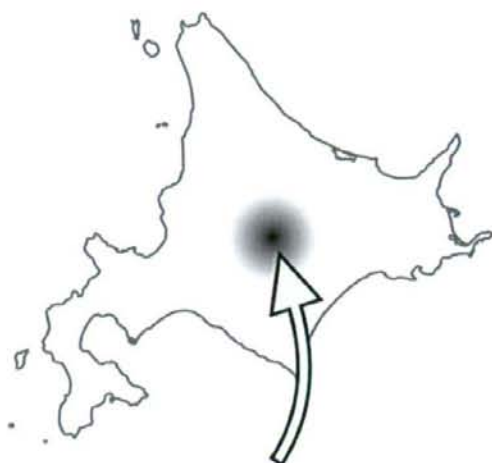


図19 旭川地方。近代の移民によって成立した集団では、「瓶の首効果」により遺伝構造が単純化するため、疾患遺伝子解析が容易になる。

この仮説に基づき、我々は旭川地方の48名のサルコイドーシス患者の全ゲノムSNP解析を行い、それをHHを用いたGWASにより解析した。コントロールとしては、東京地方で採取された48名分の健常人SNPデータを使用した(図20)。

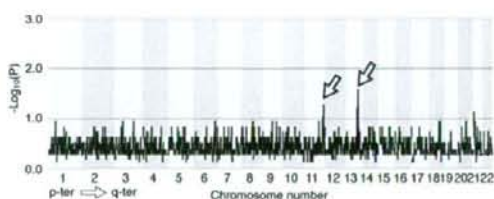


図20 旭川地方のサルコイドーシス解析。有意水準には届いていないが、2つのピークが認められる。これらのピークは従来報告されているBTNL2遺伝子やANXA11遺伝子の位置とは異なっている。

症例数が十分でないこと、コントロールとして東京地方で採取されたDNAを用いてい

ることより、いまだ十分な結果ではない。症例数を増やして約100名の解析とし、また旭川地方で採取された健康人DNAをコントロールとして使用して行くことにより、より精緻な解析を行う必要がある。

D. 考察

Homozygosity mappingは強力な疾患遺伝子同定手法であるが、家族歴から近親婚が明確にできる症例は限られている。近親婚の家族歴の明確でない症例にも適応を広げることができれば、その応用範囲は広いものとなる。

Homozygosity mappingでは、多型マーカーが全てホモ接合になる領域を検索する。しかし、ある領域がautozygosity segmentであるか否かの検討は、統計的手法を取る以外はない。本稿のように偽陽性、偽陰性を計算できる定義を使用すれば、客観的な判断が可能となる。高密度SNPをarray用いることで、古い近親婚の痕跡も捉えることが可能となる。

ASでは、全ての遺伝子異常がホモ接合となる。ASに劣性遺伝疾患遺伝子が存在すれば、その疾患が発症する可能性がある。よって、図3のように個人のRHSを描出し、RHS中に存在する遺伝子を列挙することにより、各個人がかかる可能性が高い劣性遺伝疾患のリストが作成できることになる。このリストは疾患遺伝子が偶然にホモ接合となる場合は考慮されていないが、個人の疾患罹患傾向を考慮する上で有用なものとなる。

AS長を用いて計算した日本人の近交係数は0.032であった。A型偽陽性、B型偽陽性が小さくなるようにRHS cutoffを大きめに取ったが、それでもSNPのアレル頻度、染色体上の不均一が原因となって偽陽性が

生じているのかもしれない。しかしながら、近交係数の計算は、家系図を用いて行なったものが多く、実際の近交係数は家系図から計算されるものよりかなり高いのかもしれない。近親婚が多いアラブの近交係数は同程度の高いものがある。日本も近年まで近親婚は普通の結婚形態であった。集団の個体数が限られている場合は必然的に近親婚が生じ、集団構成員の平均近交係数は上昇する。

我々はHH法を用いてGWASを行う手法を確立し、それを用いてサルコイドーシス、COPDの疾患遺伝子解析を施行している。

HH法を用いたGWASでは、MRCAの存在を仮定している。逆に言うと、そのような存在を仮定できるような集団をcaseとして解析を行うことが必要である。

MRCAが存在する最も有名な例は「下戸の遺伝子」(ALDH2の変異遺伝子:アルコール代謝機能が低下する)である。「酒が飲めない人」は東洋人に限られる。「下戸の遺伝子」は中国で生じ、地域で広がったものだからである(Goeddel et al. Hum Genet 88:344, 1992)。日本には弥生時代に渡来人がもたらした。日本に入って2000年程度という新しい遺伝子だが、現日本人に高率に見いだされる(Shibuya et al. Am J Hum Genet 43:741, 1988)。特殊な状況(「下戸の遺伝子」ではアルコール摂取)のみで明確になる遺伝子は通常の生活では選択を受けないため、集団内に広がりやすい。同様に、加齢に伴って生じる疾患の遺伝子は生殖による選択を受けにくいいため、集団中に広がっている可能性がある。HH法によるGWASは300世代(4500-6000年前)のMRCAを検出することができるため、数多くの疾患が解析対象となると思われる。MRCAの存在を担保するため、extreme

phenotype(極端な表現型), 移民後に成立した集団などを考慮に入れ, case となる集団を選択するのが望ましいと考えられる。

北海道の集団は, 明治以降の移民によって成立したため, このような解析の対象となりうると考えられる。サルコイドーシスの解析は, そのような試みの一つである。

E. 結論

我々は, HF 法, HH 法, HH 法による GWAS を確立し, それを実際に応用しつつある。現在の連鎖解析, SNP を用いた GWAS では, 疾患遺伝子の集団内での頻度が 0.01 以下の遺伝子, 即ち珍しくはないが非常に多いわけでもない, 我々が日常目にする多くの疾患は解析対象から外れてしまう。HH 法による GWAS により, これらの疾患も疾患遺伝子解析の対象となっていくことが期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, Ando M, Yamazaki K, Saijo Y, Genma A, Miyazawa H, Tanaka T, Ikebuchi K, Nukiwa T, Morita S and Hagiwara K. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol* in press.
2. Ishihara Y, Hagiwara K, Zen K, Huqun, Hosokawa Y and Natsuhara A. A case of Pulmonary Alveolar Microlithiasis with an intra-genetic deletion in SLC34A2 detected by a genome-wide SNP study. *Thorax* in press.
3. Azuma A, Hagiwara K. and Kudoh S. Basis of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in Japanese patients. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1397-8, 2008.
4. Miyazawa H, Tanaka T, Nagai Y, Matsuoka M, Sutani A, Udagawa K, Zhang J, Hiramata T, Murayama Y, Koyama N, Ikebuchi K, Nagata M, Kanazawa M, Nukiwa T, Takenoshita S, Kobayashi K and Hagiwara K. Peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based detection test for gefitinib-refractory T790M epidermal growth factor receptor mutation. *Cancer Sci* 99:595-600, 2008.
5. Koyama N, Zhang J, Huqun, Miyazawa H, Tanaka T, Su X and Hagiwara K. Identification of IGFBP-6 as an effector of the tumor suppressor activity of SEMA3B. *Oncogene* 27:6581-9, 2008.
6. Miyanaga A, Gemma A, Ando M, Kosaihiira S, Noro R, Minegishi Y, Kataoka K, Nara M, Okano T, Miyazawa H, Tanaka T, Yoshimura A, Kobayashi K, Iwanami H, Hagiwara K, Tsuboi E and Kudoh S. E-cadherin expression and epidermal growth factor receptor mutation status predict outcome in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Oncol Rep* 19:377-83, 2008.

7. Koyama N, Nagata M, Hagiwara K and Kanazawa M. Survival of a patient with pulmonary *Cunninghamella bertholletiae* infection without surgical intervention. *Respirology* 13:309-11, 2008.
8. Soma T, Takaku Y, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M, Uematsu K and Nagata M. Inhibitory effect of budesonide alone and in combination with formoterol on IL-5 and RANTES production from mononuclear cells. *Int Arch Allergy Immunol* 146 Suppl 1:22-7, 2008.
9. Kobayashi T, Takaku Y, Yokote A, Miyazawa H, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M and Nagata M. Interferon-beta augments eosinophil adhesion-inducing activity of endothelial cells. *Eur Respir J* 32:1540-7, 2008.
10. Miyazawa H, Kato M, Awata T, Kohda M, Iwasa H, Koyama N, Tanaka T, Huqun, Kyo S, Okazaki Y and Hagiwara K. Homozygosity haplotype allows a genomewide search for the autosomal segments shared among patients. *Am J Hum Genet* 80:1090-102, 2007.
11. Huqun, Izumi S, Miyazawa H, Ishii K, Uchiyama B, Ishida T, Tanaka S, Tazawa R, Fukuyama S, Tanaka T, Nagai Y, Yokote A, Takahashi H, Fukushima T, Kobayashi K, Chiba H, Nagata M, Sakamoto S, Nakata K, Takebayashi Y, Shimizu Y, Kaneko K, Shimizu M, Kanazawa M, Abe S, Inoue Y, Takenoshita S, Yoshimura K, Kudo K, Tachibana T, Nukiwa T and Hagiwara K. Mutations in the SLC34A2 gene are associated with pulmonary alveolar microlithiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 175:263-8, 2007.
12. Tanaka T, Nagai Y, Miyazawa H, Koyama N, Matsuoka S, Sutani A, Huqun, Udagawa K, Murayama Y, Nagata M, Shimizu Y, Ikebuchi K, Kanazawa M, Kobayashi K and Hagiwara K. Reliability of the peptide nucleic acid-locked nucleic acid polymerase chain reaction clamp-based test for epidermal growth factor receptor mutations integrated into the clinical practice for non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 98:246-52, 2007.
13. Kobayashi T, Takaku Y, Kikuchi I, Soma T, Hagiwara K, Kanazawa M. and Nagata M. Eosinophils do not enhance the trans-basement-membrane migration of neutrophils. *Int Arch Allergy Immunol* 143 Suppl 1:38-43, 2007.
14. Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Takaku Y, Hagiwara K, Kanazawa M. and Nagata M. Theophylline attenuates the neutrophil-dependent augmentation of eosinophil trans-basement membrane migration. *Int Arch Allergy Immunol* 143 Suppl 1:44-9, 2007.
15. Sutani A, Nagai Y, Udagawa K, Uchida Y, Koyama N, Murayama Y, Tanaka T, Miyazawa H, Nagata M, Kanazawa M, Hagiwara K and Kobayashi K. Gefitinib for non-small-cell lung cancer patients with

epidermal growth factor receptor gene mutations screened by peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Br J Cancer* 95:1483-9, 2006.

16. Kushiya M, Saito K, Kikuchi I, Kobayashi T, Hagiwara K, Kanazawa M. and Nagata M. Differential effects of salbutamol and montelukast on eosinophil adhesion and superoxide anion generation. *Int Arch Allergy Immunol* 140 Suppl 1:17-22, 2006.

17. Koyama N, Jinn Y, Takabe K, Yoshizawa M, Usui Y, Inase N, Miyake S, Yoshizawa Y, Hagiwara K and Kanazawa M. The characterization of gefitinib sensitivity and adverse events in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 26:4519-25, 2006.

18. Kikuchi I, Kikuchi S, Kobayashi T, Hagiwara K, Sakamoto Y, Kanazawa M and Nagata M. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:760-5, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

[取得済み特許]

1. 特許第 4216266 (2008.11.14 登録) 萩原弘一 長井良昭 宮澤 仁志 高感度な既知変異遺伝子検出方法、および EGFR 変異遺伝子検出方法。

非小細胞肺癌の約 30%に見られる EGFR 遺伝子変異を、肺癌診療で確定診断のために採取される細胞診レベルの標本の一部を用いて検出する手法を提供。点突然

変異、小欠失の高感度検出法として他遺伝子にも適応可能な手法として特許取得。三菱メディエンスへ技術移転。実用化済。臨床検査として年間施行件数 10,000 件余。

2. 特許第 4059517 (2008.3.12 登録) 萩原弘一 ホモ接合指紋法による同祖領域判定方法、同祖領域判定装置、及び遺伝子スクリーニング方法。

少数例の患者全ゲノム SNP データから、劣性遺伝子を効率的に同定する手法を提供。肺胞微石症責任遺伝子の同定に成功 (業績論文 11)。トミーデジタルバイオロジーに技術移転。東北化学薬品にライセンスング。

[指定国移行済み特許]

1. 11/988812 (2008.1.14 移行:米国) Koichi HAGIWARA HOMOEOLOGOUS REGION DETERMINING METHOD BY HOMOJUNCTION FINGERPRINT METHOD, HOMOEOLOGOUS REGION JUDGING DEVICE, AND GENE SCREENING METHOD.

上記特許 2. の指定国移行。

[PCT 出願済み特許申請]

1. PCT/JP2007/062368 公開番号 WO 2008/018240 萩原弘一 ホモ接合ハプロタイプ法 (科学技術振興機構:JST 特許出願支援制度対象)。

患者全ゲノム SNP データから、優性・劣性遺伝子双方を効率的に同定する手法を提供。Marfan 症候群家系で有効性を確認 (業績論文 10)。全ゲノム関連解析用アルゴリズムを拡張 (論文執筆中)。トミーデジタルバイオロジーに技術移転。東北化学薬品にライセンスング。

[国内申請中]

1. 特願 2006-311855 (2006.11.17 申請) 神田将和 岩佐泰靖 萩原弘一 岡崎康司
逆ホモ接合マッピング法による同祖領域の抽出方法および遺伝子スクリーニング方法.

取得済み特許 2. の拡張法 (共同出願).

厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

炎症性疾患の病態における生理活性ペプチドの関与に関する研究

研究分担者	栗原裕基	東京大学	教授
研究協力者	山口泰弘	東京大学	助教
研究協力者	山本寛	東京大学	助教

研究要旨

- 1) マウス β -defensin-6 過剰発現マウスにおいて、骨格筋線維の変性、再生の所見が認められた。当該マウスは、さらに、寿命の短縮、若いそう、骨密度低下、酸化ストレスの亢進など、老化の促進に相当する表現型を示した。抗菌ペプチドによる組織障害を個体レベルで明らかにした初めての研究である。
- 2) 抗菌ペプチド Human β -defensin-3 は、他の defensin と比較しても、培養細胞に対して、有意に強い細胞傷害性を有した。細胞膜透過性亢進がその主要な原因と考えられ、P2 受容体拮抗薬である PPADS により阻害された。さらに、この細胞傷害性は、抗腫瘍効果として、個体レベルでも確認された。
- 3) 血管拡張性ペプチドであるアドレノメデュリンの減少が、気道過敏性の増強を惹起することが、遺伝子改変マウスを用いて明らかとなり、そのメカニズムとして、気道平滑筋細胞の過形成性変化の関与が示された。

A. 背景・抗菌ペプチド defensin

自然免疫の中核として、高等脊椎動物にも数 kD の小さな抗菌ペプチドが存在する。ヒトの代表的な抗菌ペプチドとしては、defensin や cathelicidin が知られている。defensin は、特異的な6つのシステイン配列と3つの分子内ジスルフィド結合をもつ。このシステイン配列の相違から、 α -defensin と β -defensin の二つのサブファミリーに分類されている。ヒト α -defensin ファミリーとしては、好中球の顆粒中に存在する human neutrophil peptide-1, 2, 3, 4 (HNP-1, 2, 3, 4) と腸管のパネス細胞に存在する human defensin-5, -6 が知られている。

ヒト β -defensin としては、1995年に human β -defensin-1 (hBD-1) が、1997年に human β -defensin-2 (hBD-2) が報告され、その後、human β -defensin-3, 4 (hBD-3, 4) が報告された。さらに、我々は、2002年に精巣上体に特異的に発現する新規のヒト β -defensin である human β -defensin-5 (hBD-5)、human β -defensin-6 (hBD-6) を同定し報告した。現在、さらに human β -defensin-25, -26, -27, -28, -29, -118 などの発現が報告されている。

マウスの β -defensin としては、4つのアイソフォーム、mouse β -defensin-1, -2, -3, -4 (mBD-1, -2, -3, -4) が報告されて

いた。mBD-1、mBD-3 は、それぞれ hBD-1、hBD-2 のマウスホモログである。さらに我々は、2001 年に mouse β -defensin-6 (mBD-6) を同定し、その抗菌活性を証明した。mBD-6 は、舌や食道に加えて骨格筋でも発現が観察された。

hBD-3 は、ヒトの皮膚から単離されたが、気道系や食道、好中球、胎盤、男性生殖器など、幅広い組織での発現が確認されている。その特性として hBD-3 は、高濃度の Na 存在下でも殺菌作用を示すと報告されている。そのほか、グラム陽性球菌に対しても強い抗菌活性を示すことも特徴である。

一方、defensin が、抗菌活性とともに、哺乳類細胞自身に作用し、炎症の制御因子として機能しうることが報告されてきた。具体的には、細胞増殖の促進、サイトカイン分泌の促進、ヒスタミン分泌の促進、炎症細胞の遊走など様々な機能が報告されている。さらに、高濃度の defensin が細胞傷害性を有することも、主に HNP-1 について報告されている。

一方、Adrenomedullin (ADM) は近年ヒト褐色細胞腫の組織から単離された生理活性ペプチドである。ADM はヒトにおいては 52 残基のアミノ酸からなり、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin-gene-related-peptide, CGRP)や calcitonin, amylin と同じスーパーファミリーに属する。ADM の最も重要な生理作用は血管拡張性の強力な降圧作用である。ADM mRNA の発現はさまざまな臓器に認められるが、とりわけ副腎髄質や心房、そして肺に豊富に存在する。さらに、ADM は流血中にも多く含まれている。McLatchie らが最近、以前から orphan receptor として知られていた

calcitonin-receptor-like receptor (CRLR) が receptor-activity-modifying protein (RAMP) 2 の存在下に ADM 受容体として機能していると報告した。RAMP には RAMP1, RAMP2, RAMP3 という 3 つの isoform が存在し、このうち RAMP2、RAMP3 が CRLR の存在下に ADM 特異的な受容体として機能することがわかっている。RAMP2、RAMP3 の発現は肺できわめて強いことが示されており、ADM が肺において何らかの重要な役割を果たしていることが推測される。

ヒトの肺における ADM の作用を示す臨床成績としては、喘息患者において一秒量と血漿中の ADM の濃度が逆相関する、すなわち気管支喘息が重症なほど血漿中の ADM 濃度が高いとの報告がある。このことは気管支喘息と関連する気道収縮や低酸素状態が代償的に ADM の分泌量を増やす可能性を示唆しているものと思われる。実際、低酸素状態に対する応答として ADM が誘導されることに関しては多くの報告がなされている。また、気管支喘息以外の疾患においても、慢性閉塞性肺疾患(chronic obstructive pulmonary disease: COPD)や嚢胞性線維症(cystic fibrosis: CF)、特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)のような末期肺疾患において血漿中の ADM 濃度が上昇していることを示した報告も存在する。

我々は、ADM と気道過敏性の関連を検証するために ADM の遺伝子改変マウスを用いて、生理学的、生化学的検討を行った。ADM のホモ接合体ノックアウトマウスは胎内で死亡するため、ADM 遺伝子のヘテロ接合体ノックアウトマウスを実験に用いることにした。