

Electronic supplementary material

ESM Table 2 Sequences of polymerase chain reaction primers used for amplification of *Gck*

Region	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
β cell-specific exon 1A	GGG CTC TGC TCC TTA GTG TG	TTG AAG CCA CAG CTT CCT CT
β cell-specific exon 1B	ACA TGG CTC CTC CTG AAG AC	AGA GAT CTT TCT GCC CGA CA
Liver-specific exon 1	CTG ATC CCA CGT GGT TCT TT	GTG GAC TCC TCA AGA GCT GG
Exon 2	CAG AGG ACC AAA AGA GAC C	TGA CCC AGA GAC AAA AAG G
Exon 3	CAC CTT TGA CCC TTC CAC A	TTG CTG CTG ACC TTT CTT C
Exon 4	TGC CTC CCA TTG TCC CTA AG	CCA CCC ATT CAT CTC CTC TC
Exon 5 and exon 6	TGT GAA ACA AGG TGT TGG GA	TGA GTG CTA TGA GCC TGT GC
Exon 7	AAA TGT GCC TCA TCC CGT AG	CAA CTT GCT TCT CCC CAG AG
Exon 8	TAA CCA GAA TAG GGC GCT TG	CCC ACT TCA TCC CTC TGT GT
Exon 9	GAC TTC CCT CCC TAA TAC C	CAC CCC TCA GCC CAG ACT
Exon 10A	GTG GCA AAG GTG GGA TCT AA	TGT CTC ACT GGC TGA CTT GG
Exon 10B	GAC TCC ACA CCC CAC AAA TG	CGC AGC CTC TTC AGC CAC AG
Exon 10C	AGG TAG CTT CAG CAG CTT GG	AAA CCT GAC AGG GAT GAT GG
Exon 10D	AAG CAA GCC ACC CAC AGC AT	GCC TCC ACA TTC CTA TTC CT

Electronic supplementary material

ESM Table 3 Correspondence of diabetogenic loci on chromosomes 11 and 14 reported here with loci linked with diabetes and related phenotypes reported in other mapping studies

Chromosome	Linked marker	Position (cM)	Cross	Phenotype	Reference
11	<i>D11Mit1</i>	2.4	C57BL/6 × C3H	Fasting glucose level	[1]
11	<i>D11Mit242</i>	31.0	NSY × C3H	Blood glucose level	[2] ^a
11	<i>D11Mit41</i>	49.0	NZO × NON	Serum insulin level	[3]
11	<i>D11Mit128</i>	68.0	TSOD × BALB/c	Blood glucose level	[4]
11	<i>D11Mit254</i>	75.4	Akita × A/J	Blood glucose level	[5]
14	<i>D14Mit55</i>	10.5	C57BL/6 × 129S6	Blood glucose level	[6]
14	<i>D14Mit52</i>	11.5	C57BL/6 × 129S6	Insulin resistance	[7]
14	<i>D14Mit212</i>	13.5	NZO × NON	Adiposity	[8]
14	<i>D14Mit5</i>	22.5	NSY × C3H	Blood glucose level	[2] ^a
14	<i>D14Mit192</i>	40.0	C57BL/6 × 129S6	Body weight	[7]
14	<i>D14Mit165</i>	52.0	KK × C57BL/6	Fasting glucose level	[9]

The map positions were obtained from the Mouse Genome Database (www.informatics.jax.org)

^aOur previous study. The representative marker was picked up because the position of the QTL peaks changed according to the age and the peaks were broad

References

1. Toye AA, Lippiat JD, Proks P et al (2005) A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia* 48:675–686
2. Ueda H, Ikegami H, Kawaguchi Y et al (1999) Genetic analysis of late-onset type 2 diabetes in a mouse model of human complex trait. *Diabetes* 48:1168–1174
3. Leiter EH, Reifsnyder PC, Flurkey K, Partke HJ, Junger E, Herberg L (1998) NIDDM genes in mice: deleterious synergism by both parental genomes contributes to diabetogenic thresholds. *Diabetes* 47:1287–1295
4. Hirayama I, Yi Z, Izumi S et al (1999) Genetic analysis of obese diabetes in the TSOD mouse. *Diabetes* 48:1183–1191
5. Takeshita S, Moritani M, Kunika K, Inoue H, Itakura M (2006) Diabetic modifier QTLs identified in F2 intercrosses between Akita and A/J mice. *Mamm Genome* 17:927–940
6. Almind K, Kulkarni RN, Lannon SM, Kahn CR (2003) Identification of interactive loci linked to insulin and leptin in mice with genetic insulin resistance. *Diabetes* 52:1535–1543
7. Almind K, Kahn CR (2004) Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 53:3274–3285
8. Reifsnyder PC, Churchill G, Leiter EH (2000) Maternal environment and genotype interact to establish diabetes in mice. *Genome Res* 10:1568–1578
9. Suto J, Matsuura S, Imamura K, Yamanaka H, Sekikawa K (1998) Genetic analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in KK and KK-Ay mice. *Eur J Endocrinol* 139:654–661



Clinical and genetic characteristics of patients with autoimmune thyroid disease with anti-islet autoimmunity

Masanori Moriguchi^a, Sinsuke Noso^a, Yumiko Kawabata^a, Takaaki Yamauchi^a, Takeshi Harada^a, Katsumori Komaki^a, Naru Babaya^a, Yoshihisa Hiromine^a, Hiroyuki Ito^a, Satomi Yamagata^a, Kaori Murata^a, Takahiro Higashimoto^a, Choongyong Park^a, Akinobu Yamamoto^b, Yasuhiro Ohno^a, Hiroshi Ikegami^{a,*}

^aDepartment of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, Kinki University School of Medicine, Osaka-sayama, Osaka 589-8511, Japan

^bTakaishi City Medical Examination and Treatment Center, Takaishi, Osaka 592-0002, Japan

Received 7 January 2010; accepted 14 July 2010

Abstract

In contrast to the large number of studies on autoimmunity against the thyroid gland in patients with type 1 diabetes mellitus, little is known about the anti-islet autoimmune status in patients with autoimmune thyroid diseases (AITDs). We therefore studied the anti-islet autoimmune status in patients with AITD and the clinical and genetic characteristics of AITD patients with anti-islet autoimmunity. The positivity and titer of glutamic acid decarboxylase antibody (GAD Ab) were studied in 866 Japanese patients with AITD (546 with Graves disease and 320 with Hashimoto thyroiditis), 221 patients with thyroid disease of nonautoimmune origin, and 282 control subjects. The clinical characteristics and genotypes of *HLA-DRB1*, *DQB1*, and *CTLA4* were compared between AITD patients with and without GAD Ab. The prevalence of GAD Ab was significantly higher in AITD patients than in control subjects (5.8% vs 2.1%, $P = .01$), particularly in Graves disease (7.1% vs 2.1%, $P = .0019$). The prevalence of diabetes mellitus was significantly higher in AITD patients with GAD Ab than in those without (40.0% vs 10.1%, $P < .0001$), particularly in those with a high titer of GAD Ab (high vs low titer: 64% vs 16%, $P = .001$) and also in those positive for insulinoma-associated antigen 2 (IA-2) Ab (IA-2 positive vs negative: 75.0% vs 31.3%, $P = .016$). The AITD patients with GAD Ab were characterized by younger age at onset of diabetes, lower body mass index, higher hemoglobin A_{1c} level, and higher frequency of insulin therapy than those without GAD Ab. The frequency of the *DRB1*0405-DQB1*0401* haplotype was significantly higher in AITD patients with GAD Ab than in those without GAD Ab and control subjects. A single nucleotide polymorphism (rs3087243) of *CTLA4* was significantly associated with AITD, but not with positivity of GAD Ab. These results indicate that patients with AITD, and in particular Graves disease, are prone to develop β -cell autoimmunity and insulin-requiring diabetes, particularly those with a high titer of GAD Ab and/or positive for both GAD and IA-2 Ab. Glutamic acid decarboxylase Ab positivity in AITD patients was associated with HLA, conferring susceptibility to type 1 diabetes mellitus.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Both type 1 diabetes mellitus and autoimmune thyroid diseases (AITDs), including Graves disease and Hashimoto thyroiditis, are organ-specific autoimmune diseases affecting insulin-producing β -cells of the pancreas and the thyroid gland, respectively. Both are multifactorial diseases caused by a complex interaction of genetic and environmental

factors, with genetic factors consisting of multiple susceptibility genes. Among susceptibility genes, HLA and CTLA4 polymorphisms have been reported to be associated with type 1 diabetes mellitus as well as AITD [1-9].

Patients with type 1 diabetes mellitus frequently develop other organ-specific autoimmune diseases, of which AITD is the most frequent disorder [10-12]. Type 1 diabetes mellitus patients complicated by AITD show some differences in clinical and genetic characteristics from those without AITD. Clinically, type 1 diabetes mellitus patients with AITD have been reported to have glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GAD Abs) for a longer time and at higher titers

* Corresponding author.

E-mail address: ikegami@med.kindai.ac.jp (H. Ikegami).

than patients without AITD [11]. Genetically, the association with *CTLA4* was reported to be concentrated in patients with type 1 diabetes mellitus complicated by AITD [9]. In contrast to the large number of studies on autoimmunity against the thyroid gland in patients with type 1 diabetes mellitus, little is known about the anti-islet autoimmune status in patients with AITD. We therefore studied the anti-islet autoimmune status in patients with AITD, and the clinical and genetic characteristics of AITD patients with anti-islet autoimmunity were compared with those of patients without.

2. Methods

2.1. Subjects

A total of 866 Japanese patients with AITD (695 female and 171 male; age [mean \pm SD], 50.2 \pm 16.3 years; body mass index [BMI], 21.7 \pm 3.3 kg/m²) were studied. The AITD patients consisted of 546 patients with Graves disease (422 female and, 124 male; age, 45.8 \pm 15.6 years; BMI, 21.2 \pm 3.1 kg/m²) and 320 patients with Hashimoto thyroiditis (273 female and 47 male; age, 57.8 \pm 14.5 years; BMI, 22.7 \pm 3.5 kg/m²). Autoimmune thyroid diseases was diagnosed clinically by endocrinologists and confirmed by abnormal levels of thyroid hormones and autoantibodies to thyrotropin receptor, thyroid peroxidase, and/or thyroglobulin. As a control group, 221 patients (age, 57.1 \pm 16.0 years; BMI, 21.8 \pm 3.2 kg/m²) with thyroid disease of nonautoimmune origin such as subacute thyroiditis or thyroid nodules and 282 healthy control subjects (age, 52.4 \pm 14.4 years; BMI, 22.6 \pm 3.3 kg/m²) who underwent annual health checkup were also studied. The serum thyrotropin level and status of thyroid autoantibodies were not investigated in control subjects. Positivity of GAD Ab and its titer in patients with AITD were compared with those in patients without thyroid autoimmunity. The status of diabetes mellitus and other clinical characteristics as well as the genetic characteristics in patients with AITD positive for GAD Ab were compared with those in patients negative for GAD Ab. This study was approved by the appropriate ethical committees, and informed consent was obtained from all participants.

2.2. Methods

2.2.1. Autoantibody assay

Glutamic acid decarboxylase Ab was measured by a commercially available radioimmunoassay kit using ¹²⁵I-labeled recombinant human GAD65 as a tracer reagent (Cosmic, Tokyo, Japan) [13]. Samples were defined as GAD Ab positive when the level was higher than a threshold of 1.5 U/mL as suggested by the manufacturer [14,15]. This assay had a sensitivity of 82% and specificity of 92% in the first Proficiency Test of Diabetes Autoantibody Standardization Programs organized by the Immunology of Diabetes Society [16].

Autoantibody to insulinoma-associated antigen 2 (IA-2 Ab) was measured by an immunoprecipitation assay using ¹²⁵I-labeled IA-2 [17]. Samples were defined as IA-2 Ab positive when the level was higher than 1.0 U/mL [17].

2.2.2. Genotyping of HLA-DR, -DQ, and CTLA4

The *HLA-DRB1* and *-DQB1* alleles were genotyped in all AITD patients positive for GAD Ab (n = 42) as well as in age- and sex-matched AITD patients negative for GAD Ab (n = 158). *DRB1* and *DQB1* data from healthy subjects in our previous study (n = 230) [8] served as controls. *DRB1* and *DQB1* were genotyped by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism and polymerase chain reaction–sequence-specific oligonucleotide (SSO) and/or sequence-based typing (SBT) methods as described previously [8,18–20]. Haplotypes were determined based on the most probable haplotypes according to the linkage disequilibria in the Japanese population [21,22].

A single nucleotide polymorphism (SNP) in the CTLA-4 gene, rs3087243 (+6230G>A), which has been reported to be associated with type 1 diabetes mellitus as well as AITD [6,7,9], was genotyped in 189 patients with AITD as reported previously [9]. Genotype data of healthy subjects in our previous study served as control [9].

2.2.3. Statistical analysis

χ^2 test and Fisher exact probably test were used to determine the significance of differences in the distribution of the number of subjects and alleles. Student *t* test was used to compare the levels of clinical parameters. Statistical significance was defined as *P* < .05.

3. Results

3.1. Prevalence and clinical characteristics of AITD patients positive for GAD Ab

The prevalence of positivity for GAD Ab in AITD patients was significantly higher than that in healthy control subjects (5.8% vs 2.1%, *P* = .01) (Table 1). The prevalence in patients with Graves disease was significantly higher than that in control subjects (7.1% vs 2.1%, *P* = .0019) as well as in patients with Hashimoto thyroiditis (7.1% vs 3.4%, *P* = .02) (Table 1). The prevalence in patients with Hashimoto thyroiditis was slightly, but not significantly, higher than that in healthy control subjects (3.4% vs 2.1%, not significant [NS]). To confirm the positivity of GAD Ab, 42 AITD

Table 1
Frequency of subjects positive for GAD antibodies

			GAD Ab (+) n (%)	<i>P</i> ^a (vs control)
AITD	Total	(n = 866)	50 (5.8%)	.01
	Graves disease	(n = 546)	39 (7.1%)	.0019
	Hashimoto thyroiditis	(n = 320)	11 (3.4%)	NS
Controls		(n = 282)	6 (2.1%)	

^a χ^2 test.

patients positive for GAD Ab were repeatedly tested for GAD Ab. All but 2 patients positive for GAD Ab at the first test were positive for GAD Ab at the second test (Supplementary Figure 1). The 2 patients who became negative for GAD Ab at the second test had a low titer (1.6 and 1.5 U/mL) of GAD Ab at the first test (Supplementary Figure 1), suggesting the importance of the titer in studying the prevalence of GAD positivity.

To compare the titer of GAD Ab in patients with AITD with that in other conditions, patients with thyroid diseases of nonautoimmune origin ($n = 221$) were tested for GAD Ab. Although the prevalence of GAD Ab was not significantly different between AITD patients and patients with thyroid diseases of nonautoimmune origin (5.8% vs 4.5%), the titer of GAD Ab was markedly higher in AITD than in other conditions (Fig. 1). None of the patients with thyroid diseases of nonautoimmune origin as well as healthy control subjects showed a titer higher than 10 U/mL, whereas 23 (46%) of 50 AITD patients positive for GAD Ab showed a titer higher than 10 U/mL ($P = .017$).

The prevalence of diabetes mellitus was significantly higher in AITD patients positive for GAD Ab than in those negative for GAD Ab (40.0% vs 10.1%, $P < .0001$). When AITD patients positive for GAD Ab were divided into 2 groups according to the titer of GAD Ab, a high-titer group and a low-titer group, so that each group contained approximately the same number of subjects, the prevalence of diabetes mellitus was significantly higher in the high-titer group than in the low-titer group (64% vs 16%, $P = .001$). When the clinical characteristics of AITD patients with diabetes mellitus were compared between those with and without GAD Ab, age at onset of diabetes mellitus was significantly younger, BMI was significantly lower, and hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) level and the frequency of patients treated with insulin were significantly higher in patients with GAD Ab than in those without (Table 2).

To study the positivity of other islet-related autoantibodies, we measured IA-2 Ab in patients who were

Table 2

Clinical characteristics of AITD patients with diabetes mellitus relative to positivity of GAD antibodies

	GAD Ab (+) (n = 20)	GAD Ab (-) (n = 83)	P
GAD Ab titer (mean U/mL) (range)	3176.8 (1.9-26100)		
Graves disease/Hashimoto thyroiditis	17/3	42/41	.006
Age at onset of diabetes (y)	43.2 ± 10.2	53.3 ± 14.2	.004
BMI (kg/m ²)	20.4 ± 3.8	24.1 ± 4.8	.002
HbA _{1c} (%)	8.8 ± 2.3	7.0 ± 1.3	<.0001
Treatment with insulin	85.0%	14.4%	<.0001

Fisher exact probability test for number of patients and Student *t* test for clinical parameters.

positive for GAD Ab. Among 44 patients with GAD Ab, 12 patients (27.3%) were also positive for IA-2 Ab. When positivity of IA-2 Ab was studied relative to the titer of GAD Ab, all 12 patients with IA-2 Ab had a high titer of GAD Ab (mean, 1439; range, 15.7-7310 U/mL). The prevalence of diabetes was significantly higher in patients with both GAD and IA-2 Ab than in patients with GAD Ab alone (75.0% vs 31.2%, $P = .016$).

To study the impact of age on positivity of islet-related autoantibodies, AITD patients who were younger than 30 years ($n = 99$) were compared with those 30 years or older ($n = 767$). The prevalence of GAD Ab in younger patients was not significantly different from that in older patients (4.0% vs 6.0%, NS).

3.2. Genetic background

The frequencies of the *DRB1*0405* and *DQB1*0401* alleles and *DRB1*0405-DQB1*0401* haplotype were significantly higher in AITD patients with GAD Ab than in those without GAD Ab and control subjects (Table 3, Supplemental Tables 1 and 2). When HLA in AITD patients positive for GAD Ab was compared between those with and without diabetes, the frequencies of haplotypes known to confer susceptibility to type 1 diabetes mellitus in Japanese, *DRB1*0405-DQB1*0401* and *DRB1*0901-DQB1*0303*, tended to be higher and those of haplotypes known to provide protection against type 1 diabetes mellitus in Japanese, *DRB1*1501-DQB1*0602* and *DRB1*1502-DQB1*0601*, tended to be lower in diabetic patients than in nondiabetic patients (Table 4). The frequencies of genotypes with 2 doses of susceptible haplotypes (*DRB1*0405-DQB1*0401* and *DRB1*0901-DQB1*0303*) were significantly higher in diabetic patients than in nondiabetic patients (52.6% vs 17.4%, $P < .05$). The frequencies of genotypes with at least 1 dose of resistant haplotypes (*DRB1*1501-DQB1*0602* or *DRB1*1502-DQB1*0601*) tended to be lower in diabetic patients than in nondiabetic patients (5.3% vs 30.4%, $P = .05$) (Table 4).

The frequencies of the *DRB1*0803* allele and *DRB1*0803-DQB1*0601* haplotype were significantly

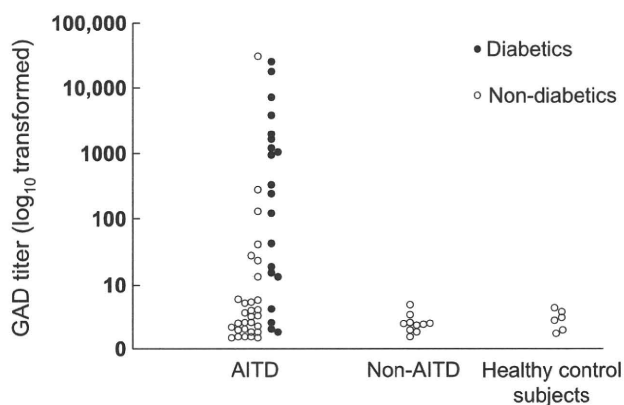


Fig. 1. Titer of GAD antibodies in antibody-positive patients with AITD, patients with thyroid diseases of nonautoimmune origin, and healthy control subjects. Closed circles, patients with diabetes; open circles, nondiabetic patients.

Table 3
Frequency of *DRB1-DQB1* haplotype in patients with AITD with and without GAD Ab and control subjects

<i>DRB1-DQB1</i>	AITD		Control (n = 230) ^c	<i>P</i> (<i>P</i> ^a)		
	GAD (+) (n = 42)	GAD (-) (n = 158)		GAD (+) vs GAD (-)	GAD (+) vs control	GAD (-) vs control
0101-0501	1 (2.4)	8 (5.1)	37 (16.1)	NS	.01 (NS)	.0009 (.013)
0403-0302	1 (2.4)	11 (7.0)	9 (3.9)	NS	NS	NS
0405-0401	25 (59.5)	50 (31.6)	67 (29.1)	.0009 (.013)	.0001 (.0014)	NS
0406-0302	0 (0)	11 (7.0)	14 (6.1)	NS	NS	NS
0410-0402	3 (7.1)	8 (5.1)	6 (2.6)	NS	NS	NS
0802-0302	1 (2.4)	6 (3.8)	4 (1.7)	NS	NS	NS
0802-0402	4 (9.5)	3 (1.9)	9 (3.9)	.04 (NS)	NS	NS
0803-0601	7 (16.7)	44 (27.8)	32 (13.9)	NS	NS	.0007 (.0098)
0901-0303	14 (33.3)	31 (19.6)	59 (25.7)	NS	NS	NS
1101-0301	0 (0.0)	13 (8.2)	11 (4.8)	NS	NS	NS
1201-0301	1 (2.4)	9 (5.7)	16 (7.0)	NS	NS	NS
1302-0604	1 (2.4)	13 (8.2)	27 (11.7)	NS	NS	NS
1501-0602	4 (9.5)	26 (16.5)	20 (8.7)	NS	NS	.02 (NS)
1502-0601	4 (9.5)	21 (13.3)	54 (23.5)	NS	.04 (NS)	.01 (NS)
Others ^b	9 (21.4)	46 (29.1)	75 (32.6)			

Data are number (percentage) of subjects.

^a *P* value corrected for number of haplotypes tested (n = 14).

^b Haplotypes with frequency <5% in each group.

higher in AITD patients negative for GAD Ab, but not in those positive for GAD Ab, than in control subjects (Table 3, Supplemental Tables 1 and 2). When GAD Ab–positive patients with and without diabetes were compared, the frequency of the *DRB1*0803-DQB1*0601* haplotype was significantly higher in nondiabetic patients (30.4%) than in diabetic patients (30.4% vs 0.0%, *P* = .009) (Table 4). The frequency of the *DRB1*0101-DQB1*0501* haplotype was significantly lower in AITD patients negative for GAD Ab than in control subjects.

The SNP rs3087243 (+6230G>A) of *CTLA4* was significantly associated with AITD. The frequency of the G allele was significantly higher in AITD patients than in control subjects (odds ratio, 1.41; 95% confidence interval,

1.07–1.87; *P* = .016) (Supplemental Table 3). No significant difference was observed in the frequency of the *CTLA4* genotype between AITD patients with and without GAD Ab (odds ratio, 1.12; 95% confidence interval, 0.58–2.19; NS).

4. Discussion

The present study demonstrated that the prevalence of anti-islet autoimmunity as assessed by GAD Ab was significantly higher in patients with AITD than in healthy control subjects. The AITD patients with GAD Ab showed a significantly higher frequency (40% vs 10%) of diabetes than those without GAD Ab; and this was more pronounced

Table 4
Frequencies of *DRB1-DQB1* haplotypes and genotypic combinations of haplotypes in AITD patients relative to GAD Ab and diabetes status

<i>DRB1-DQB1</i>	GAD (+)		GAD (-) (n = 158) (C)	Control (n = 230) (D)	<i>P</i> value			
	DM (+) (n = 19) (A)	DM (-) (n = 23) (B)			A vs B	A vs C	A vs D	B vs D
Haplotypes								
0405-0401	13 (68.4)	12 (52.2)	50 (31.6)	67 (29.1)	NS	.002	.0004	.023
0802-0302	0 (0.0)	1 (4.3)	6 (3.8)	4 (1.7)	NS	NS	NS	NS
0803-0601	0 (0.0)	7 (30.4)	44 (27.8)	32 (13.9)	.009	.008	NS	.036
0901-0303	9 (47.4)	5 (21.7)	31 (19.6)	59 (25.7)	NS	.01	NS	NS
1501-0602	0 (0)	4 (17.4)	26 (16.5)	20 (8.7)	NS	NS	NS	NS
1502-0601	1 (5.3)	3 (13.0)	21 (13.3)	54 (23.5)	NS	NS	NS	NS
Genotypes								
S/S	10 (52.6)	4 (17.4)	13 (8.2)	18 (7.8)	.02	<.0001	<.0001	NS
S/X	7 (36.8)	5 (21.7)	52 (32.9)	76 (33.0)	NS	NS	NS	NS
X/X	1 (5.3)	3 (13.0)	47 (29.7)	64 (27.8)	NS	.03	.03	NS
P/Y	1 (5.3)	7 (30.4)	46 (29.1)	72 (31.3)	.05	.03	.02	

Data are number (percentage) of subjects. S indicates haplotypes that confer susceptibility to type 1 diabetes mellitus, *DRB1*0405-DQB1*0401* and *DRB1*0901-DQB1*0303*; P, haplotypes that provide protection against type 1 diabetes mellitus, *DRB1*1501-DQB1*0602* and *DRB1*1502-DQB1*0601*; X, haplotypes other than S or P; Y, any haplotype.

in patients with a high titer of GAD Ab, as shown by the prevalence of diabetes of 64% in the high-titer group as compared with 16% in the low-titer group. Diabetes in AITD patients with GAD Ab was characterized by younger age at onset, lower BMI, higher HbA_{1c}, and higher frequency of insulin treatment than that in patients without GAD Ab, suggesting that diabetes in AITD patients positive for GAD Ab shows the clinical features of type 1 diabetes mellitus.

The prevalence of GAD Ab in patients with AITD was 5.8%, which was significantly higher than that in healthy control participants in this study (2.1%) as well as the previously reported prevalence in subjects with normal glucose tolerance (0.6%) [23]. In particular, the prevalence of GAD Ab in patients with Graves disease was much higher than that in control subjects (7.1% vs 2.1%, $P < .0019$) and was similar to the prevalence reported for Graves disease in previous studies [24-26]. The prevalence of GAD Ab in Hashimoto thyroiditis, on the other hand, was slightly, but not significantly, higher than that in control subjects, indicating that the increased prevalence of GAD Ab in AITD in the present study was mostly due to its increase in Graves disease.

In addition to positivity, the importance of the titer of GAD Ab was indicated by the marked difference in titer; but the prevalence of GAD Ab positivity was similar in AITD patients and patients with thyroid diseases of nonautoimmune origin in the present study (Fig. 1). None of the patients with thyroid diseases of nonautoimmune origin positive for GAD Ab showed a titer higher than 10 U/mL, whereas 23 (46%) of 50 AITD patients positive for GAD Ab showed a titer higher than 10 U/mL. None of the GAD-positive patients with thyroid diseases of nonautoimmune origin developed diabetes, whereas 40% of GAD-positive AITD patients developed diabetes. Even within AITD patients, the frequency of diabetes correlated with the titer of GAD Ab, with a 4-fold higher prevalence in the high-titer group than in the low-titer group. The titer in healthy control subjects positive for GAD Ab was also less than 10 U/mL (Fig. 1). A high titer of GAD Ab (>10 U/mL) was previously reported to be a marker for activated T-cell response to β -cell destruction and a high risk for progression to insulin dependence in adult-onset patients with diabetes mellitus [14,27,28]. These data indicate the importance of the titer in addition to positivity of GAD Ab in evaluating anti-islet autoimmunity and β -cell destruction in patients with AITD, as in the case of patients with adult-onset diabetes mellitus.

In addition to a high titer of GAD Ab, positivity for multiple islet-related autoantibodies has been reported to more strongly predict insulin requirement in adult diabetic patients [27]. Among AITD patients positive for GAD Ab in the present study, 27.3% were also positive for IA-2 Ab. The frequency of diabetes was significantly higher in patients with both GAD and IA-2 Ab than in those with GAD Ab alone. All AITD patients positive for both GAD Ab and IA-2 Ab had a high titer of GAD Ab (>10 U/mL). These data suggest that AITD patients with a high titer of GAD Ab and/

or patients positive for multiple autoantibodies are at risk for the development of diabetes. Because the present study is a cross-sectional study, prospective studies on diabetes and β -cell function in AITD patients positive for GAD Ab are necessary to further clarify whether or not nondiabetic AITD patients positive for GAD Ab develop diabetes and progress to insulin deficiency.

Genetic analysis of HLA in AITD patients with GAD Ab showed high frequencies of haplotypes known to confer susceptibility to type 1 diabetes mellitus and low frequencies of haplotypes known to provide protection against type 1 diabetes mellitus, indicating that AITD patients positive for GAD Ab differed genetically from those negative for GAD Ab, showing HLA genotypes typical of those in type 1 diabetes mellitus. These data, together with the clinical characteristics of patients with AITD positive for GAD Ab, suggest that AITD patients with GAD Ab have the genetic and clinical characteristics of type 1 diabetes mellitus.

The *DRB1*0803-DQB1*0601* haplotype was associated with AITD without GAD Ab, but not with AITD with GAD Ab, suggesting that the *DRB1*0803-DQB1*0601* haplotype confers susceptibility to autoimmunity against the thyroid gland, but not anti-islet autoimmunity. The association of the *DRB1*0803-DQB1*0601* haplotype with Graves disease has previously been reported in Japanese [4,18] and Korean populations [29]. In contrast, the *DRB1*0405-DQB1*0401* haplotype, which confers susceptibility to type 1 diabetes mellitus, was associated with AITD positive for GAD Ab, but not with AITD negative for GAD Ab, suggesting that the *DRB1*0405-DQB1*0401* haplotype is associated with anti-islet autoimmunity in subjects with as well as without AITD.

In addition to HLA, *CTLA4* has been reported to be associated with both AITD and type 1 diabetes mellitus. Previous studies showed that the association of *CTLA4* with type 1 diabetes mellitus was concentrated in patients complicated by AITD [9]. In fact, it was suggested that the weak association of *CTLA4* with type 1 diabetes mellitus may be secondary to the strong association of *CTLA4* with AITD and the high frequency of AITD complicated by type 1 diabetes mellitus. In the present study, *CTLA4* was associated with AITD as a whole; but no association with GAD Ab positivity was observed in AITD patients. These data further support the possibility that *CTLA4* is primarily associated with AITD; but the contribution of *CTLA4* to anti-islet autoimmunity and type 1 diabetes mellitus is weak, if any.

In conclusion, the present study demonstrated that the prevalence of GAD Ab was high, 5.8%, in AITD patients, and in Graves disease in particular (7.1%), and that 40% of these patients were diabetic, with clinical and genetic characteristics suggestive of type 1 diabetes mellitus, suggesting that AITD patients are prone to develop β -cell autoimmunity and insulin-requiring diabetes, in particular in those with a high titer of GAD Ab and/or positive for both GAD and IA-2 Ab. Prospective follow-up studies in nondiabetic patients with AITD positive for GAD Ab are

necessary to clarify the factors contributing to the development of diabetes, β -cell destruction, and insulin deficiency.

Acknowledgment

We thank Ms Shie Hayase for technical assistance.

Supported by grants-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture, Japan.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.metabol.2010.07.025.

References

- [1] Vaidya B, Kendall-Taylor P, Pearce SH. The genetics of autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5385-97.
- [2] Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001;358:221-9.
- [3] Yanagawa T, Manglabruks A, DeGroot LJ. Strong association between *HLA-DQA1*0501* and Graves' disease in a male Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:227-9.
- [4] Katsuren E, Awata T, Matsumoto C, Yamamoto K. HLA class II alleles in Japanese patients with Graves' disease: weak associations of HLA-DR and -DQ. *Endocr J* 1994;41:599-603.
- [5] Heward JM, Allahabadi A, Daykin J, et al. Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and family-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3394-7.
- [6] Yanagawa T, Hidaka Y, Guimaraes V, Soliman M, DeGroot LJ. CTLA-4 gene polymorphism associated with Graves' disease in a Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:41-5.
- [7] Ueda H, Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 2003;423:506-11.
- [8] Kawabata Y, Ikegami H, Kawaguchi Y, et al. Asian-specific HLA haplotypes reveal heterogeneity of the contribution of HLA-DR and -DQ haplotypes to susceptibility to type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:545-51.
- [9] Ikegami H, Awata T, Kawasaki E, et al. The association of CTLA4 polymorphism with type 1 diabetes is concentrated in patients complicated with autoimmune thyroid disease: a multicenter collaborative study in Japan. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1087-92.
- [10] Mimura G, Kida K, Matsuura N, et al. Immunogenetics of early-onset insulin-dependent diabetes mellitus among the Japanese: HLA, Gm, BF, GLO, and organ-specific autoantibodies—the J.D.S. study. *Diabetes Res Clin Pract* 1990;8:253-62.
- [11] Kawasaki E, Takino H, Yano M, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with IDDM and autoimmune thyroid disease. *Diabetes* 1994;43:80-6.
- [12] Kordonouri O, Klinghammer A, Lang EB, Gruters-Kieslich A, Grabert M, Holl RW. Thyroid autoimmunity in children and adolescents with type 1 diabetes: a multicenter survey. *Diabetes Care* 2002;25:1346-50.
- [13] Powell M, Prentice L, Asawa T, et al. Glutamic acid decarboxylase autoantibody assay using 125I-labelled recombinant GAD65 produced in yeast. *Clin Chim Acta* 1996;256:175-88.
- [14] Maruyama T, Tanaka S, Shimada A, et al. Insulin intervention in slowly progressive insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2115-21.
- [15] Schmidli RS, Colman PG, Bonifacio E, Bottazzo GF, Harrison LC. High level of concordance between assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The First International Glutamic Acid Decarboxylase Antibody Workshop. *Diabetes* 1994;43:1005-9.
- [16] Murao S, Kondo S, Ohashi J, et al. Anti-thyroid peroxidase antibody, IA-2 antibody, and fasting C-peptide levels predict beta cell failure in patients with latent autoimmune diabetes in adults (LADA)—a 5-year follow-up of the Ehime study. *Diab Res Clin Prac* 2008;80:114-21.
- [17] Masuda M, Powell M, Chen S, et al. Autoantibodies to IA-2 in insulin-dependent diabetes mellitus. Measurements with a new immunoprecipitation assay. *Clin Chim Acta* 2000;291:53-66.
- [18] Awata T, Katsuren E, Matsumoto C, et al. Absence of shared HLA class II (DR, DQ)-linked genetic basis between IDDM and autoimmune thyroid disease in Japanese. *Diabetes Care* 1995;18:582-3.
- [19] Voorter CE, Rozemuller EH, de Bruyn-Geraets D, van der Zwan AW, Tilanus MG, van den Berg-Loonen EM. Comparison of DRB sequence-based typing using different strategies. *Tissue Antigens* 1997;49:471-6.
- [20] Voorter CE, Kik MC, van den Berg-Loonen EM. High-resolution HLA typing for the DQB1 gene by sequence-based typing. *Tissue Antigens* 1998;51:80-7.
- [21] Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T, editors. *HLA 1991: Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference*. Oxford, UK: Oxford University Press; 1992. p. 1065-220.
- [22] Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M. Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. *Tissue Antigens* 2000;56:522-9.
- [23] Takeda H, Kawasaki E, Shimizu I, et al. Clinical, autoimmune, and genetic characteristics of adult-onset diabetic patients with GAD autoantibodies in Japan (Ehime study). *Diabetes Care* 2002;25:995-1001.
- [24] Kawasaki E, Abiru N, Yano M, et al. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in patients with autoimmune thyroid disease: relation to competitive insulin autoantibodies. *J Autoimmun* 1995;8:633-43.
- [25] Maugendre D, Verite F, Guilhem I, Genetet B, Allannic H, Delamaire M. Anti-pancreatic autoimmunity and Graves' disease: study of a cohort of 600 Caucasian patients. *Eur J Endocrinol* 1997;137:503-10.
- [26] Hiromatsu Y, Mukai T, Kaku H, et al. IL18 gene polymorphism confers susceptibility to the development of anti-GAD65 antibody in Graves' disease. *Diabetic Med* 2005;23:2111-5.
- [27] Kasuga A, Maruyama T, Nakamoto S, Ozawa Y, Suzuki Y, Saruta T. High-titer autoantibodies against glutamic acid decarboxylase plus autoantibodies against insulin and IA-2 predicts insulin requirement in adult diabetic patients. *J Autoimmun* 1999;12:131-5.
- [28] Suzuki R, Shimada A, Maruyama T, et al. T-cell function in anti-GAD65+ diabetes with residual beta-cell function. *J Autoimmun* 2003;20:83-90.
- [29] Park MH, Park YJ, Song EY, et al. Association of HLA-DR and -DQ genes with Graves disease in Koreans. *Hum Immunol* 2005;66:741-7.

● 第5章 各種データ解析

第2節 SNP解析

1. はじめに

SNP (single nucleotide polymorphism) タイピング技術の進展に伴って、ヒトのさまざまな多因子疾患に関わる遺伝子を探索する戦略としてゲノムワイド関連研究 (genome-wide association study; GWAS) が近年大きな注目を浴びている。ヒト多因子疾患の疾患感受性遺伝子を探索する統計遺伝学的手法には、大別して連鎖分析 (linkage analysis) と関連分析 (association analysis) がある。連鎖分析は患者家族を対象として、文字通り疾患遺伝子と多型マーカーの連鎖を検出する手法であり、ゲノム全域に分布する1万から数万種のSNPを用いれば十分である。一方、関連分析の代表であるケース・コントロール関連分析法は非血縁の患者群と健常対照群を対象として、疾患遺伝子と多型マーカーの連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) を検出する手法であり、これをゲノム全域にわたって適用するGWASでは数十万種以上のSNPあるいは数万種以上のマイクロサテライトマーカーを解析することが必要となる¹⁾。なお、このGWASは日本の研究者によって先駆的行われ、これまでにいくつかのヒト多因子疾患の感受性遺伝子を特定することに成功している^{2~5)}。また、2003年からオーダーメイド医療実現基盤を構築することを目標とした「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」が開始され、30万人の日本人を対象とした遺伝情報解析が行われている⁶⁾。2008年には、日本における2大プロジェクトである「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」と「ミレニアムゲノムプロジェクト」からそれぞれ独立に2型糖尿病に関連する遺伝子である *KCNQ1* を発見したという報告がなされた^{7,8)}。また、筆者らの研究室においても、*CPT1B* 遺伝子と *CHKB* 遺伝子の

間に存在するSNPが睡眠障害の1つであるナルコレプシーと関連していることを発見し、2008年に報告をした⁹⁾。

SNPタイピング法としてもっともよく知られている方法は、個々の多型部位を含む領域をPCR (polymerase chain reaction) で特異的に増幅した後にアリルを識別する方法である^{10~14)}。これらの方法では、1,000種程度のSNPを対象としたタイピングであれば、PCRプライマーをはじめとする各種試薬にかかるコストを考慮しても実用可能であるといえるが、数千から数万種を超える数のSNPをタイピングすることは困難となる。一方、近年になって多型部位特異的なPCRを行わずに大規模なSNPタイピングを行う方法が実用化された^{15,16)}。その1つであるAffymetrix社によって確立された方法では、まず制限酵素反応でゲノムDNAの断片化を行い、続いてそれら断片の両端にアダプター配列を付加し、まとめて増幅した後にマイクロアレイを用いたアリル特異的なハイブリダイゼーションを行う¹⁵⁾。現在では、この手法を用いて90万種を超えるSNPを同時にタイピングするキットが市販されている (Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0, 以下SNP Array 6.0)。筆者らの教室に設置したヒトSNPタイピングセンターではSNP Array 6.0によるSNPタイピングを効率的に行うためのシステムを構築し、いくつかの多因子疾患についてゲノムワイド関連分析を実施している。

SNP Array 6.0に搭載されたSNPは、公共のSNPデータベースおよびPerlegen社に登録された約220万種のSNPから遺伝学的情報量が最大化されるように、また連鎖不平衡やHapMapプロジェクトからの情報も考慮して選択された約44万種のSNPに、Tag SNP、X染色体およびY染色体に存在するSNP、ミトコンドリアSNPなどを加えた全909,622種のSNPである。全90万種のSNPについ

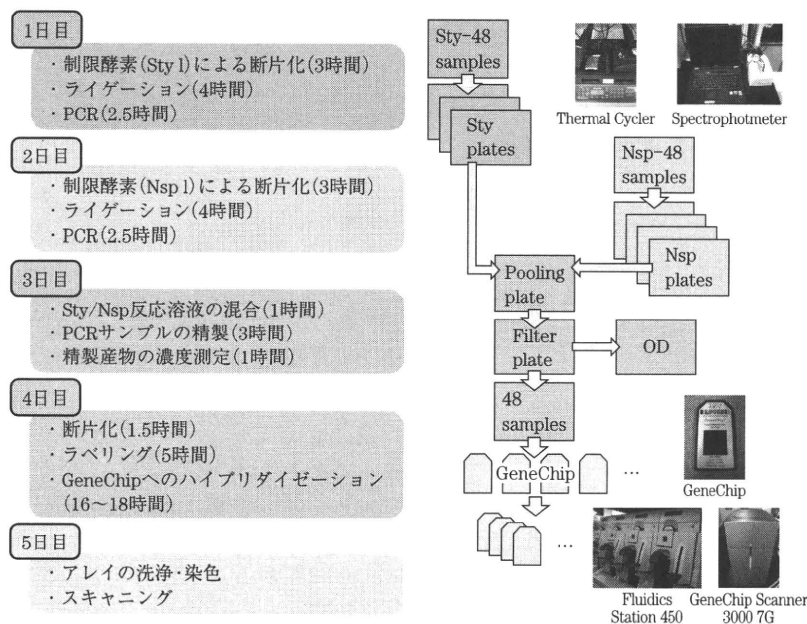


図1 SNP Array 6.0によるSNPタイピングの流れ

制限酵素(Sty I, Nsp I)による断片化反応からスキャニングまで全5日の工程でSNPタイピングが行われる。1検体につき500 ngのゲノムDNAを用いて全909,622種のSNPをタイピングすることができる。

て、HapMapの3集団(Caucasian, African, Asian)におけるマイナーアレル頻度(minor allele frequency; MAF)の平均は、それぞれ19.6%, 20.6%, 18.2%である。しかしながら、HapMapプロジェクトでは45検体の日本人しか解析していないため、MAFの低いSNPについては正確な頻度推定ができない¹⁷⁾。そこで、筆者らはSNP Array 6.0を用いて日本人健常者200検体を解析し、日本人を対象としたGWASにおいて統計解析に用いることのできるSNP数を算出することを試みた¹⁸⁾。また、SNP Array 6.0は遺伝子型を決定するためにBirdseedアルゴリズムを用いるが、Birdseedアルゴリズムを用いた遺伝子型決定の精度を上げることが、ゲノムワイド関連分析における偽陽性関連を効果的に排除することにつながる。そこで、日本人健常者200検体のタイピング結果を用いて、Birdseedアルゴリズムによる正確な遺伝子型決定方法を検討した¹⁸⁾。

2. SNP Array 6.0の技術原理

SNP Array 6.0によるSNPタイピングは、ゲノ

ムの複雑さを低減しマイクロアレイへのハイブリダイゼーション効率を上げるための酵素反応ステップと、洗浄・染色装置(Fluidics Station 450)およびマイクロアレイ用スキャナ(GeneChip Scanner 3000 7G)を用いた検出ステップで構成される(図1)。SNPタイピングは1検体につき合計500 ngのゲノムDNAを使用し、2種類の制限酵素(Sty I, Nsp I)を用いて実現される。制限酵素によるゲノムDNAの断片化を行った後、断片化されたゲノムDNAの両末端にアダプター配列をライゲーション反応により付加する。アダプター配列は、続くPCRで使用されるプライマーと相同な配列をもち、また制限酵素認識配列を突出端として持つ二本鎖DNAである。2種類の制限酵素(Sty I, Nsp I)のそれぞれに対して用意されるアダプター配列は、制限酵素認識配列を除いて共通の配列をもっているため共通のプライマーを使用してPCRを行うことができる。PCRでは、目的の長さをもったDNA断片(250~1100 bp)だけが選択的に増幅される。ここまでの酵素反応により、もともと30億塩基対のゲノムDNAが5億塩基対程度のPCR混合産物となる。マイクロアレイへの効率的なハイブリダイゼーションには、ゲノムの複雑さを低減することが大きな役割を果たす

と考えられている¹⁹⁾。続いて、Sty I および Nsp I それぞれの PCR 産物を混合した後、混合産物を精製し、DNase I 制限酵素による断片化を行う。ここで断片化された PCR 産物は平均長で 180 bp 以下となる。マイクロアレイへの効率的なハイブリダイゼーションには、ゲノムの複雑さを低減することに加えて PCR 産物の断片化が重要になる。最後に terminal deoxynucleotidyl transferase 酵素反応により、断片化された PCR 産物の末端にビオチンを導入する。

続いて、専用のマイクロアレイ (GeneChip アレイ) を用いてハイブリダイゼーションを行う。マイクロアレイに固定されるプローブは 25 塩基長のオリゴ DNA で、SNP 部位を含む塩基配列をもっている。2 種類のアリルを正確に識別するために、SNP 部位を 25 塩基長のプローブの中心に置いたプローブを基本として、SNP 部位を中心から 4 塩基上流 (+4) にずらしたプローブから 4 塩基下流 (-4) にずらしたプローブまで 7 種類のプローブ (-4, -2, -1, 0, +1, +3, +4) を用意し、その中から最適な 1 種類のプローブを選択する。また、同一のプローブをマイクロアレイ上に 3 スポット用意することで、SNP タイピングデータの欠損を防ぐ工夫がなされている。

マイクロアレイへのハイブリダイゼーションが終了した後、洗浄・染色装置を用いてマイクロアレイの洗浄および蛍光染色を行う。蛍光染色は、蛍光分子で標識されたストレプトアビジンが、上述のビオチン導入された PCR 断片に結合することにより行われる。また、洗浄・染色装置内ではビオチン修飾された抗ストレプトアビジン抗体を用いてシグナルの増強が行われる。最後に蛍光染色されたマイクロアレイを専用のスキャナで画像データとして読み取り、続いて専用のソフトウェアを用いて各 SNP の遺伝子型を決定する。

複数の施設で行われた SNP Array 6.0 による SNP 解析の結果から、Overall call rate (全 909,622 SNPs のうち遺伝子型が決定された SNP の割合) は平均 99% 以上となり、また、HapMap データベースに登録された SNP との遺伝子型一致率は 99.7% を超えることが Affymetrix 社から報告されている。また、タイピング結果が悪いことが明らかとなっている 3,022 種の SNP をクオリティーコントロール (QC) として用いて、QC call rate (3,022 種の SNP

のうち遺伝子型が決定された SNP の割合) が 86% を下回る検体を除外したうえで全 SNP の遺伝子型は決定される。

3. システム構築

3.1 ハードウェアの整備

SNP Array 6.0 による SNP タイピングを効率的に行うために、環境、装置を整備し、作業マニュアルを作成した。まず、ゲノム DNA への PCR 産物のコンタミネーションを防ぐために、試料調製室と SNP 解析室を設けた。試料調製室にはゲノム DNA を保管し、PCR までの酵素反応を行うのに必要な装置 (サーマルサイクラーなど) を用意した。制限酵素 (Sty I, Nsp I) による断片化から PCR の反応溶液の調製までを試料調製室で行い、PCR 以降の酵素反応は SNP 解析室で行った。また、5 台の洗浄・染色装置を用意し、1 回のランで計 20 枚のマイクロアレイを洗浄・染色することができるようにした。すべてのマイクロアレイはバーコードで管理され、洗浄・染色が終了したマイクロアレイはオートローダ付きのマイクロアレイ用スキャナに装填され画像データが読み込まれる。オートローダ付きのマイクロアレイ用スキャナは計 64 枚のマイクロアレイを装填することができ、バーコードを参照しながらすべてのマイクロアレイの画像データを自動的に読み込むことができる。

SNP タイピング作業のルーチン化にあたって、制限酵素 (Sty I, Nsp I) による断片化からラベリングまでの酵素反応ステップで使用するすべてのマイクロタイタープレートをバーコードで管理する。また、48 検体を 1 バッチとして酵素反応を行うこととし、マイクロタイタープレートのウェル位置をサンプルと対応させることでサンプルの ID 化を行った。マイクロタイタープレート上のレイアウトを変えずに酵素反応を進めることで、ウェル位置をサンプル ID として解析結果を得ることができる。また、酵素反応の各工程を管理するためにチェックシートを作成し、反応工程の進行を随時チェックシートで確認しながら進める。PCR および DNase I 制限酵素による断片化の後にはアガロースゲル電気泳動を行い、PCR 産物の平均長が 250~1,100 bp とな

っていること、また断片化産物の平均長が 180 bp 以下となっていることを確認する。加えて、精製後の PCR 産物の濃度が 500~600 ng/ μ l となっていることを確認する。

3.2 ソフトウェアの開発

SNP Array 6.0 による SNP タイピングではメーカーが提供する 2 種類のソフトウェアを使用する (GeneChip Operating System (GCOS), Genotyping Console 3.0 (GTC 3.0))。GCOS は洗浄・染色装置およびマイクロアレイ用スキャナを操作する際に使用し、また GTC 3.0 はマイクロアレイの蛍光強度データ (CEL ファイル) から遺伝子型を判定する際に使用する。決定された全 909,622 種の SNP の遺伝子型は、検体ごとにテキストファイルとしてエクスポートすることができる。

筆者らが開発したゲノムワイド関連分析用ソフトウェア (Gene Chip Analysis ver 2.0.12) は、エクスポートしたテキストファイルを直接入力ファイルとして用いることができる。また、ケース・コントロール関連分析をするにあたって各検体から全 SNP の遺伝子型データを抽出し、さらにすべての検体をケース群およびコントロール群に分けて新たなテキストファイルとして作成する機能をソフトウェアに加えた。全 909,622 種の SNP について、アレル頻度、ジェノタイプ頻度、優性・劣性モデルでのケース・コントロール関連分析を行うことができ、関連分析の結果は専用のソフトウェア (Gene Chip Viewer ver 2.1.1) を用いて視覚的に表示することができる。

4. 日本人健常者 200 検体の SNP タイピングデータの解析結果

SNP Array 6.0 による SNP タイピングでは、Sty I および Nsp I による断片化反応に用いるゲノム DNA 量がそれぞれ 250 ng となるように調整することが SNP タイピングの精度に大きな影響を与えることがこれまでの実験結果から明らかとなっている¹⁸⁾。日本人健常者 200 検体のうち 195 検体のゲノム DNA 濃度は規定濃度である 50 ng/ μ l を満たしており、平均 54.8 ng/ μ l であったが、5 検体は規定濃度を下回り平均 41.1 ng/ μ l であった。そこで、

規定濃度を下回った 5 検体は制限酵素断片化反応に 6 μ l を持ち込み、ゲノム DNA の総量が約 250 ng となるように調整してタイピングを行うこととした。日本人健常者 200 検体の SNP タイピングを行った結果、QC call rate は平均 97.37% となり、また、

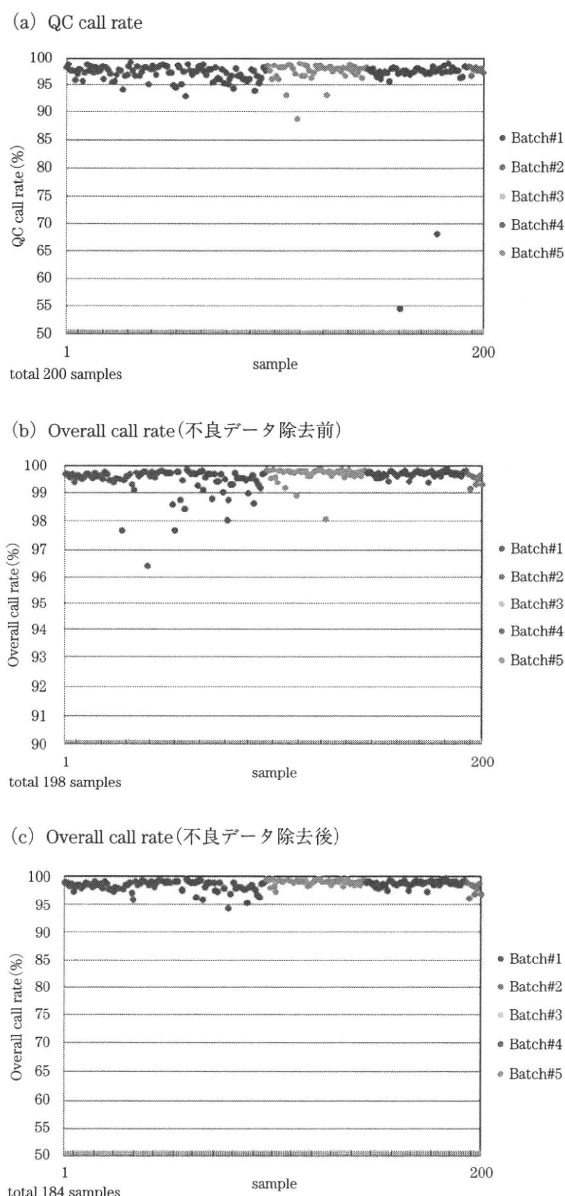


図 2 SNP Array 6.0 による日本人健常者 200 名のタイピング結果 (口絵—4 参照)

(a) クオリティーコントロール (QC) としてタイピングされた 3,022 SNPs のコール率を示す。(b) QC call rate が 86% を上回った 198 検体を用いて決定された全 909,622 SNPs のコール率を示す。(c) QC call rate を指標として不良データを除去した後の 184 検体を用いて遺伝子型を決定した際の全 909,622 SNPs のコール率を示す。

QC call rate が 86% を下回る検体は 200 検体のうち 2 検体であった(図 2(a))。続いて, QC call rate が 86% を上回った 198 検体を用いて Overall call rate を決定したところ, 平均 99.58% となった(図 2(b))。

5. Birdseed アルゴリズムによる 正確な遺伝子型決定方法

膨大な SNP データを取り扱うゲノムワイド関連分析において, タイピングエラーが原因で生じる偽陽性関連は解析を進めるうえで大きな障害となる。そこで, SNP Array 6.0 に搭載された全 90 万種の SNP について, できるだけ多くの SNP の遺伝子型を正確に決定する必要がある。遺伝子型決定に用いる Birdseed アルゴリズムの特性を知るために, 日本人健常者 198 検体の中からランダムに 12 検体を選択し, その 12 検体を含む六つの異なるサンプルサイズ(12, 24, 36, 48, 72, 96 検体)で決定した遺伝子型を, 198 検体で決定した際の遺伝子型と比較した¹⁸⁾。その結果, 12 検体だけで遺伝子型を決定した際の Overall call rate は平均 99.84% (99.62~99.92) となり, 検体数が増えていくと Overall call rate は下がり, 198 検体で決定した際には平均 99.71% (98.07~99.89) となった(図 3)。一方, 12 検体だけで決定した遺伝子型と 198 検体で決定した

遺伝子型を比較した際の一致率(concordance)は, 平均 99.47% (98.37~99.67) と最も低く, サンプルサイズが大きくなるにつれて一致率は上昇し, 96 検体で遺伝子型を決定した際の一致率は平均 99.87% (99.40~99.92) となった(図 3)。この結果から, Birdseed アルゴリズムはサンプルサイズが小さくても遺伝子型を決定できるものの, 高いタイピング精度を得るためには多くのサンプルを用いて遺伝子型を決定する必要があることが分かった。

Birdseed アルゴリズムによる遺伝子型決定において, サンプルサイズが大きくなるにつれて Overall call rate が低くなるという現象の原因として, QC call rate $\geq 86\%$ という閾値では十分に不良データを取り除けていないということが考えられる。日本人健常者 200 検体のタイピング結果から QC call rate と Overall call rate との間には強い相関があることが分かったため, QC call rate の閾値をより厳しくして不良データの除去を行った。QC call rate の閾値を 95% とすると 188 検体が閾値を上回り, Overall call rate は平均 99.65% (95.66~99.92) となった。しかし, 厳しい閾値をパスした検体の中に, Overall call rate がより悪くなるものが見られた。それらをさらに除外し, 最終的にすべての検体で Overall call rate が上昇するまで不良データの除去を繰り返したところ, 184 検体が残りに, Overall call rate は平均 99.71% (98.87~99.92) となった(図 2(c))。

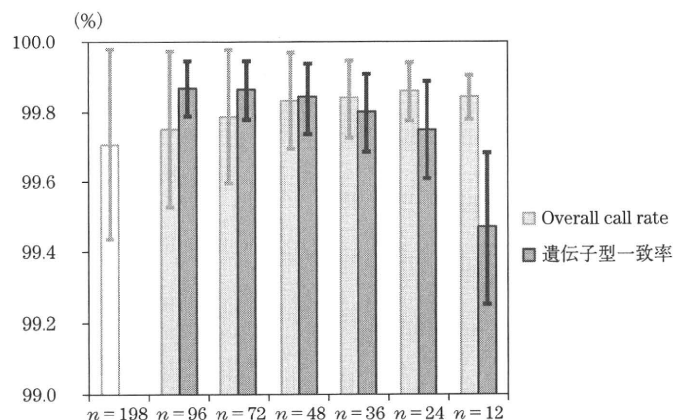


図 3 Birdseed アルゴリズムによる遺伝子型決定の精度

日本人健常者 198 検体の中からランダムに 12 検体を選択し, その 12 検体を含む六つの異なるサンプルサイズ(12, 24, 36, 48, 72, 96 検体)で決定した遺伝子型を, 198 検体で決定した際の遺伝子型と比較した。各サンプルサイズで遺伝子型を決定した際のその 12 検体の Overall call rate および遺伝子型一致率(concordance)を示す。

6. 日本人を対象とした SNP Array 6.0 による GWAS の有用性

日本人健常者 184 検体の SNP タイピングの結果から、SNP Array 6.0 に搭載された全 909,622 種の SNP のうち、約 20% に相当する 180,859 SNPs において多型性が見られないことが明らかとなった。また、遺伝子型が決定された SNP の中にはタイピング精度の悪い SNP が一部含まれており、それらの SNP は偽陽性関連の原因の一つになると考えられる。これについては、マイナーアレル頻度(MAF)、ハーディー・ワインバーグ平衡(Hardy-Weinberg equilibrium; HWE)および SNP call rate(各 SNP について、タイピングした全検体のうち遺伝子型を決定できた検体の割合)を指標として、タイピング精度の悪い SNP の大部分を排除することができる²⁰⁾。筆者らの解析では、MAF>5%、HWE p 値>0.001、SNP call rate>95% を満たす SNP は、590,248 SNPs となり、また、MAF>1%、HWE p 値>0.001、SNP call rate>95% を満たす SNP は 661,559 SNPs となった。この約 59 万種の SNP によりヒトゲノムの約 75% をカバーできることから、日本人においても SNP Array 6.0 を用いたゲノムワイド関連解析が有用であることが期待される。

7. SNP タイピングデータの デポジット

文部科学省の「統合データベースプロジェクト」において、筆者らは SNP タイピングデータの半永続的な集約管理と研究者間の情報共有を目指して、日本人健常者のデータを登録した標準 SNP データベース、日本人健常者のコピー数多型(CNV)を登録した CNV データベース、およびゲノムワイド関連解析のデータベース(GWAS-DB)を構築している²¹⁾。GWAS-DB は、研究概要、品質基準などの情報とともに、遺伝子型頻度やアレル頻度、及び遺伝統計解析の結果を登録している。また、GWAS-DB は SNP だけでなくマイクロサテライトや CNV の疾患関連解析の結果も登録・閲覧することができ、エクソン情報や CNV などの情報と遺伝統計解析の結果を重ね合わせて可視化する機能を備えている。疾患関連

SNP の候補を多面的に選択できるよう、複数の機関が産出した同一疾患のデータ、および、異なるプラットフォームの解析結果を比較したり、メタ解析を行ったりする機能を搭載し、専門家以外にも利用しやすいデータベースの構築を目指している。

本研究でタイピングした日本人健常者 200 検体の SNP 情報は、標準 SNP データベースに登録され、遺伝子型頻度やアレル頻度といった頻度情報は公開されている。また、今回タイピングした日本人健常者 200 検体のデータは、さまざまな多因子疾患を対象とした GWAS において共通のコントロール集団として用いられることが期待される。加えて、筆者らの研究室で行ったナルコレプシーを対象とした GWAS の結果も GWAS-DB に登録され、遺伝統計解析の結果が公開されている。

8. 疾患感受性遺伝子の特定を目的とした新規 SNP タイピング技術: DigiTag 2 法

筆者らはゲノムワイド連鎖分析あるいはゲノムワイド関連分析によって検出された候補領域において、第一義的な疾患感受性遺伝子多型を特定するため(絞り込み)に適する技術として DigiTag 2 法を確立した²²⁾²³⁾。DigiTag 2 法は、SNP の遺伝子型を DCN(DNA Coded Number)と呼ぶオリゴ DNA へ変換してマルチプレックス SNP タイピングを行う(図 4)。DCN(図 4 中、ED および D1)は物理的、化学的に性質が一樣となるように設計した 23 塩基長のオリゴ DNA で、DCN を使用することにより正確な DNA 分子反応を行うことが可能となる。また、DCN は解析対象となる SNP に対して自由に割り当てることができるため、結果表示に用いる DNA チップは解析対象に依存せず汎用的に使用できるという特徴を持っている。また、解析対象となる SNP 数にかかわらずラベリング反応に用いる蛍光プライマーが 2 種類で済むことから低コストで SNP タイピングを行うことが可能となる。

DigiTag 2 法は 32 種もしくは 96 種の SNP を 1 セットとして同時並行的に SNP タイピングを行う。これまでにいくつかの多因子疾患を対象とした絞り込み解析を DigiTag 2 法で行い、解析対象とした SNP の約 9 割でタイピング結果を得ることができ、また、平均 99.48% という高いコール率で SNP タ

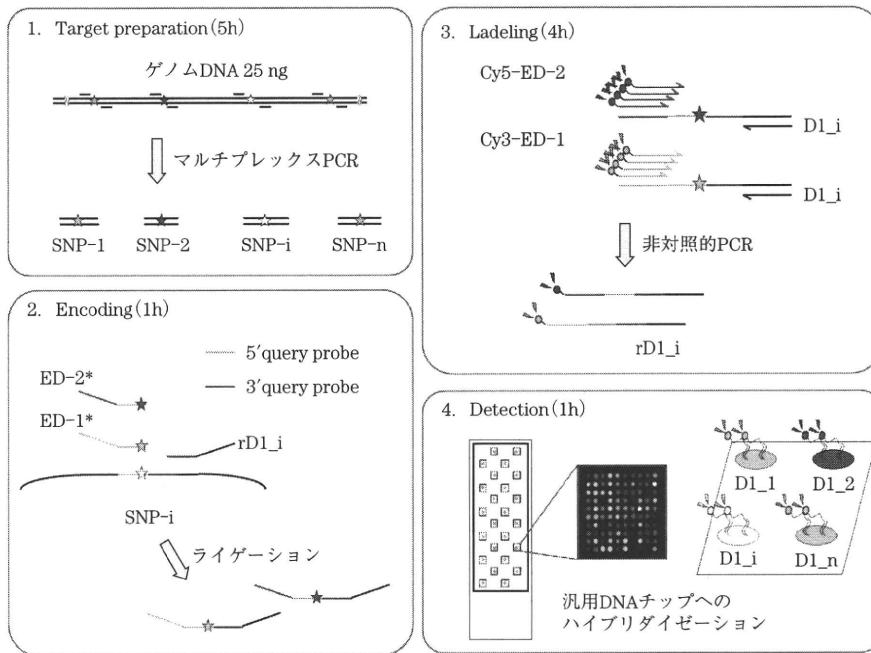


図4 DigiTag 2法の概要(口絵—5参照)

DigiTag 2法は、ターゲット分子調製、エンコード、ラベリング、検出の四つの工程で構成される。5' query probe にはアレルに対応して2種類のED(ED-1, ED-2)を付加し、また3' query probe にはSNP に応じてD1(D1_i)を付加する。EDおよびD1は物理的、化学的性質が一樣となるように設計した23塩基長のオリゴDNAである。配列が相補鎖である場合には配列名称の前に“c”を付けた。

タイピングを行えることが明らかとなった。DigiTag 2法は高い成功率でSNPタイピングを行えることから、ゲノムワイド連鎖分析あるいはゲノムワイド関連分析によって検出された候補領域における絞り込み解析を効率的に行う技術として確立することが期待される。

9. おわりに

90万種以上のSNPを一挙にタイピングできる技術の実用化によって、従来は存在しなかった広範囲かつ詳細なヒトゲノム多型情報が得られる時代となった。しかしながら同時に、われわれはまだ得られる膨大な多型情報を十分に活用できるノウハウを持っていないことも指摘しておきたい。筆者らの用意した統計解析ソフトウェアは個々のSNPについては関連分析を行えるものの、ハプロタイプについての関連分析はできない。市販のソフトウェアにも、限定した領域でハプロタイプ関連分析できるものはあ

るものの、ゲノム全域にわたって一挙に分析できるものはない。また、タイピングした検体の中には血縁関係にあるものや検体の重複などが含まれている可能性がある。血縁者が含まれていることが擬陽性の増幅につながるものが知られており、それらの関連分析に不適切な検体を取り除くことも真の疾患関連遺伝子を検出するためには重要となる。さらに、多数の検体について得られたゲノムワイド多型解析情報から、これまで全く知られていなかった新しい遺伝子/遺伝子相互作用が見いだされる可能性がある。しかし残念ながら、従来の統計学的手法や計算アルゴリズムでは、このように膨大なデータを実用的に処理できない。このように、ゲノムワイド多型解析情報はバイオインフォマティクスに関わるさまざまな研究者にとって挑戦に値する多くの課題を提供してくれるとともに、その達成によって従来にない実り豊かな成果をもたらしてくれるに違いない。

【引用・参考文献】

- 1) J. Ohashi and K. Tokunaga : *J. Hum. Genet.*, **46**, 478-482(2001).

- 2) Y. Ohnishi, T. Tanaka, K. Ozaki, R. Yamada, H. Suzuki and Y. Nakamura : *J. Hum. Genet.*, **46**, 471-477 (2001).
- 3) K. Ozaki, Y. Ohnishi, A. Iida, A. Sekine, R. Yamada, T. Tsunoda, H. Sato, H. Sato, M. Hori, Y. Nakamura and T. Tanaka : *Nat. Genet.*, **32**, 650-654 (2002).
- 4) The Wellcome Trust Case Control Consortium : *Nature*, **447**, 661-678 (2007).
- 5) L. A. Cupples, H. T. Arruda, E. J. Benjamin, R. B. D'Agostino Sr, S. Demissie, A. L. Destefano, J. Dupuis, K. M. Falls, C. S. Fox, D. J. Gottlieb, D. R. Govindaraju, C.-Y. Guo, N. L. Heard-Costa, S.-J. Hwang, S. Kathiresan, D. P. Kiel, J. M. Laramie, M. G. Larson, D. Levy, C.-Y. Liu, K. L. Lunetta, M. D. Mailman, A. K. Manning, J. B. Meigs, J. M. Murabito, C. Newton-Cheh, G. T. O'Connor, C. J. O'Donnell, M. Pandey, S. Seshadri, R. S. Vasan, Z. Y. Wang, J. B. Wilk, P. A. Wolf, Q. Yang and L. D. Atwood : *BMC Med. Genet.*, **8**, s 1 (2007).
- 6) 文部科学省リーディングプロジェクト「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」[<http://www.biobankjp.org/>]
- 7) H. Unoki, A. Takahashi, T. Kawaguchi, K. Hara, M. Horikoshi, G. Andersen, D. P. K. Ng, J. Holmkvist, K. Borch-Johnsen, T. Jørgensen, A. Sandbæk, T. Lauritzen, T. Hansen, S. Nurbaya, T. Tsunoda, M. Kubo, T. Babazono, H. Hirose, M. Hayashi, Y. Iwamoto, A. Kashiwagi, K. Kaku, R. Kawamori, E. S. Tai, O. Pedersen, N. Kamatani, T. Kadowaki, R. Kikkawa, Y. Nakamura and S. Maeda : *Nat. Genet.*, **40**, 1098-1102 (2008).
- 8) K. Yasuda, K. Miyake, Y. Horikawa, K. Hara, H. Osawa, H. Furuta, Y. Hirota, H. Mori, A. Jonsson, Y. Sato, K. Yamagata, Y. Hinokio, H.-Y. Wang, T. Tanahashi, N. Nakamura, Y. Oka, N. Iwasaki, Y. Iwamoto, Y. Yamada, Y. Seino, H. Maegawa, A. Kashiwagi, J. Takeda, E. Maeda, H. D. Shin, Y.M. Cho, K. S. Park, H. K. Lee, M. C. Y. Ng, R. C. W. Ma, W.-Y. So, J. C. N. Chan, V. Lysenko, T. Tuomi, P. Nilsson, L. Groop, N. Kamatani, A. Sekine, Y. Nakamura, K. Yamamoto, T. Yoshida, K. Tokunaga and M. Itakura : *Nat. Genet.*, **40**, 1092-1097 (2008).
- 9) T. Miyagawa, M. Kawashima, N. Nishida, J. Ohashi, R. Kimura, A. Fujimoto, M. Shimada, S. Morishita, T. Shigeta, L. Lin, S.-C. Hong, J. Faraco, Y.-K. Shin, J.-H. Jeong, Y. Okazaki, S. Tsuji, M. Honda, Y. Honda, E. Mignot and K. Tokunaga : *Nat. Genet.*, **40**, 1324-1328 (2008).
- 10) P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson and D. H. Gelfand : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7276-7280 (1991).
- 11) T. Pastinen, A. Kurg, A. Metspalu, L. Peltonen and A.-C. Syvänen : *Genome Res.*, **7**, 606-614 (1997).
- 12) M. Bannai, K. Higuchi, T. Akesaka, M. Furukawa, M. Yamaoka, K. Sato and K. Tokunaga : *Anal. Biochem.*, **327**, 215-221 (2004).
- 13) N. Nishida, T. Tanabe, M. Takasu, A. Suyama and K. Tokunaga : *Anal. Biochem.*, **364**, 78-85 (2007).
- 14) K. Krjutškov, R. Andreson, R. Mägi, T. Nikopensius, A. Khrunin, E. Mihailov, V. Tammekivi, H. Sork, M. Remm and A. Metspalu : *Nucleic Acids Res.*, **36**, e 75 (2008).
- 15) Affymetrix, Inc. [<http://www.affymetrix.com/index.affx>].
- 16) Illumina, Inc. [<http://www.illumina.com/>].
- 17) The International HapMap Consortium : *Nature*, **437**, 1299-1320 (2005).
- 18) N. Nishida, A. Koike, A. Tajima, Y. Ogasawara, Y. Ishibashi, Y. Uehara, I. Inoue and K. Tokunaga : *BMC Genomics*, **9**, 431 (2008).
- 19) B. Jordan, A. Charest, J. F. Dowd, J. P. Blumenstiel, R.-F. Yeh, A. Osman, D. E. Housman and J. E. Landers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 2942-2947 (2002).
- 20) T. Miyagawa, N. Nishida, J. Ohashi, R. Kimura, A. Fujimoto, M. Kawashima, A. Koike, T. Sasaki, H. Tanii, T. Otowa, Y. Momose, Y. Nakahara, J. Gotoh, Y. Okazaki, S. Tsuji and K. Tokunaga : *J. Hum. Genet.*, **53**, 886-893 (2008).
- 21) 文部科学省「統合データベースプロジェクト」[<https://gwas.lifesciencedb.jp/>].
- 22) N. Nishida, T. Tanabe, K. Hashido, K. Hirayasu, M. Takasu, A. Suyama and K. Tokunaga : *Anal. Biochem.*, **346**, 281-288 (2005).
- 23) N. Nishida, T. Tanabe, M. Takasu, A. Suyama and K. Tokunaga : *Anal. Biochem.*, **364**, 78-85 (2007).

〈西田 奈央／徳永 勝士〉

ゲノムワイド関連解析による疾患感受性 遺伝子・薬剤応答性遺伝子の探索

徳永勝士

Katsushi TOKUNAGA

東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学分野教授

1 はじめに

特定の遺伝子の変異が高い確率で発症に結びつく疾患は遺伝病(単一遺伝子疾患)と総称され、5千種類以上もあると推定される一方で各々の有病率は低い。これらとは対照的に、生活習慣病をはじめ日頃よく見聞きするありふれた疾患(common disease)は多因子病あるいは複合病と総称され、様々な環境要因のみならず、多数の遺伝要因も関わっていると考えられる。このような遺伝要因を特定できれば、疾患発症リスクの予測、発症機序の解明、治療法の開発、更には予防にまで役立つことが期待されるが、各々の遺伝子のリスクが高くないためにその特定には多くの困難があった。しかしながら、近年のゲノム科学・技術の進歩により状況は一変している。ここでは我々自身の経験を中心に、統計学的記述は最小限にとどめつつ、疾患感受性遺伝子や薬剤応答性遺伝子をゲノム全域から探索する戦略の現状について解説する。

2 候補遺伝子アプローチとゲノムワイド探索

疾患や治療に関与する遺伝子を含めて、ヒトの様々な特性(表現型)に関わる遺伝子の同定を目指す研究戦略は、候補遺伝子アプローチとゲノム全域へのアプローチに大別される。前者は、推定される病態・特性の分子機序や動物モデルの解析などに基づいて選択された遺伝子について、その変異・多型が患者群に多いかどうか検討する。従来盛んに用いられてきた戦略であり、近年は遺伝子アノテーションやパスウェイ・ネットワーク情報の集積も進んでい

ることから、ある程度の成功率で疾患関連遺伝子を同定できる戦略である。

一方、後者はゲノム全域をカバーする多数の多型マーカーを用いて統計遺伝学的解析を行うことにより、疾患関連遺伝子を探索する。この戦略の最大の魅力は、我々の知識・情報にはなかった新たな遺伝子の関与が発見される可能性である。多因子疾患に対してよく用いられたゲノム全域探索法が、罹患同胞対(affected sib-pair)を対象とする連鎖解析(linkage study)である。しかし、多数の罹患同胞対試料を収集することは容易ではなく、検出力の低さなどから限られた成果しか得られていなかった。

3 ゲノムワイド関連解析法(GWAS)の進展

2006年以降、疾患関連遺伝子の探索研究は新しい段階を迎えた。これをもたらした最大要因は2つの基盤整備である。まず情報基盤として、dbSNPやHapMap計画*で代表されるように、ヒトゲノム全域にわたる膨大な多様性情報が集積されてきた。次に技術基盤として、数十万種のSNP(single nucleotide polymorphism; 単一塩基多型)を数千もの個体について解析できるプラットフォームが市販化された。これらを活用することによって、ゲノムワイド関連解析(genome-wide association study; GWAS)が実用的な戦略となり、2007年には*Nature*、*Science*誌などに立て続けに成果が発表されることとなった。その後の、GWASによる各種疾患の感受性遺伝子の発見ラッシュには目を見張るものがある。

* HapMap計画についての用語解説は、414頁参照。

表1 *KCNJ15* の多型は非肥満2型糖尿病と関連する⁷⁾

	試料数	頻度(%)		オッズ比	
		アレル	遺伝子型	アレル	遺伝子型
3つの試料セット総計					
健常者	1,700	3.1	6.1	—	—
全患者	1,568	5.4	10.2	1.76	1.75
非肥満患者(I) ^{a)}	875	5.8	11.1	1.93	1.92
非肥満患者(II) ^{b)}	285	7.6	14.1	2.54	2.51

a)非肥満患者(I)群：診断時に肥満でなかった患者(BMI<24).

b)非肥満患者(II)群：これまで肥満になったことがない患者(BMI<24).

3つの独立な患者群・健常者群試料セットを合計した値を示す.

GWASの成果が顕著な疾患の1つが2型糖尿病である。2007年に複数の欧米のグループから発表された結果は、いずれも数千人規模のGWASに基づくものであり、合わせて11個以上の感受性遺伝子が同定され、その半数以上が新規に見いだされた遺伝子であった。¹⁻⁴⁾ 翌2008年にはその3大グループが共同でメタ解析を行い、更に6個の新規感受性遺伝子を同定している。日本からも2つの独立なグループが、新規遺伝子*KCNQ1*を報告した。^{5,6)} 我々もその一方のグループにおいて、大規模SNP解析の一部を担当した。

また我々は最近、GWASではなくゲノムワイド連鎖解析によって検出された候補領域から段階的に絞り込むことによって、新たな感受性遺伝子*KCNJ15*を同定した。⁷⁾ 興味深いことに、見いだされたリスクアレルは2型糖尿病患者全体よりも肥満でない患者とより強い関連を示した。すなわち、BMI(body mass index)が24以上になったことのない患者では、オッズ比が2.5に達した(表1)。肥満でない2型糖尿病患者は、日本をはじめアジア諸国には多いが欧米諸国にはほとんどいない。実際、デンマークの共同研究者によれば、見いだされたリスクアレルの頻度は1%以下であった。興味深いことに、この遺伝子はインスリン産生の制御に関わる遺伝子と考えられ、特に高血糖時のインスリン産生誘導に抑制的な機能を持つと推定された(図1)。

代表的な過眠症であるナルコレプシーの発症にも、ストレスなどの環境要因に加えて複数の遺伝要因が関わると思われる。従来、遺伝要因として確定しているのは*HLA-DQB1*遺伝子のみであったた

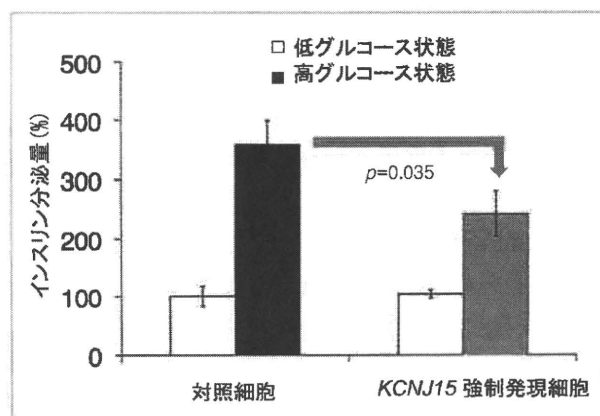


図1 インスリン分泌細胞に*KCNJ15*を強制発現すると応答性インスリン分泌量が減少する⁷⁾

め、我々がGWASを用いて探索した結果、22番染色体上の*CPT1B*及び*CHKB*遺伝子近傍の多型がナルコレプシーに関連することを見いだした(図2)。⁸⁾ このリスクアレルは両遺伝子の低発現レベルと関連した(図3)。さらに、スタンフォード大を中心とする国際共同研究グループのGWASによって、新たな感受性遺伝子*TCRA*(T細胞リセプター α)を見いだすことができた(表2)。⁹⁾ *TCRA*と上述した*HLA*とは、多様な抗原に対する免疫応答性を制御する主役であることが知られている。これらの成果から、我々はナルコレプシー発症には少なくとも2つの機序、すなわちオレキシン(ヒポクレチン)産生細胞に対する自己免疫、及び脂肪酸 β 酸化あるいはコリン代謝系の異常が関与していると推定している。

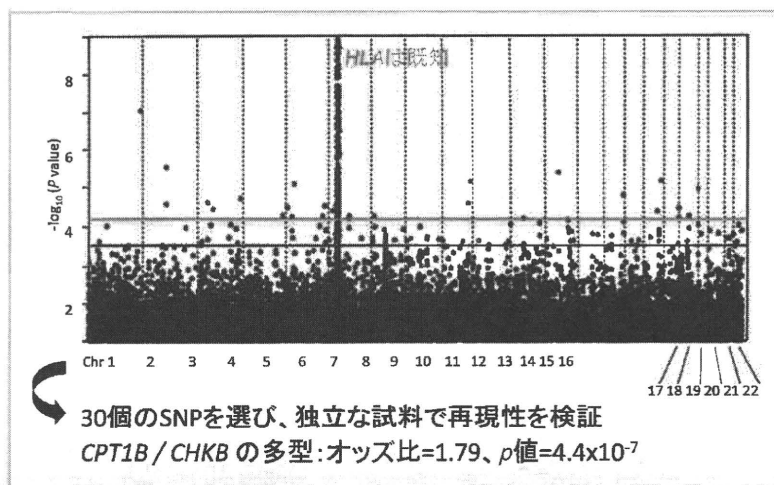


図2 GWASで検出されたナルコレプシーの感受性座位³⁾

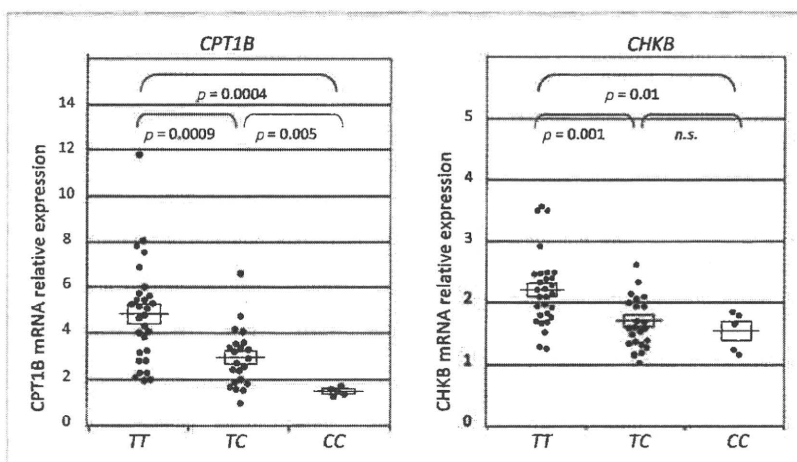


図3 感受性アレルは *CPT1B* 及び *CHKB* の低発現レベルと関連する³⁾
 末梢血白血球中の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法で定量した。

表2 *TCRA* の多型とナルコレプシーの関連³⁾

集団	rs 12587781	rs 1154155	rs 1263646
	C	C	G
ヨーロッパ系集団			
患者中頻度	0.22	0.22	0.24
健常者中頻度	0.14	0.14	0.16
p 値	3.58×10^{-5}	3.67×10^{-5}	2.19×10^{-4}
オッズ比	1.79	1.80	1.65
日本人及び韓国人			
患者中頻度	0.68	0.57	0.51
健常者中頻度	0.61	0.47	0.45
p 値	8.70×10^{-4}	2.30×10^{-7}	1.73×10^{-3}
オッズ比	1.34	1.54	1.30

4 GWASによる治療・薬剤応答性遺伝子の探索

ウイルス性肝炎に関する多施設共同研究においても、我々はGWASを担当している。最近、C型肝炎のペグインターフェロン α ・リバビリン併用療法の無効例と極めて強く関連する遺伝子として、全く予想されていなかった19番染色体上の*IL28B*遺伝子を見いだした。¹⁰⁾ すなわちGWAS段階で既に 10^{-12} レベルの p 値を示し、ゲノムワイド有意水準をクリアした(図4)。再現性検討段階を合わせると p 値は $10^{-27} \sim 10^{-32}$ となり、本治療法の無効性に関

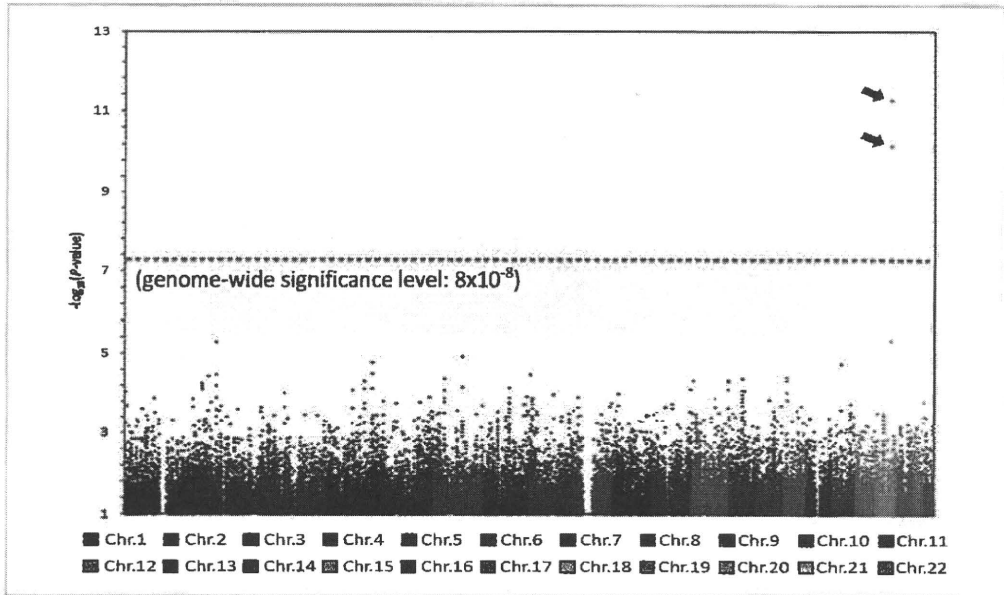


図4 19番染色体上の2個のSNPがGWAS段階でゲノムワイド有意水準の関連を示した¹⁰⁾

してマイナーアレル陽性患者群のオッズ比は17~30に達した(図5)。またリスクアレルを持つ患者群では、*IL-28*の発現レベルが有意に低いことも分かった。従来、ウイルスの型や量が主に関わると考えられてきたインターフェロン療法への応答性が、実はほぼヒトの遺伝要因で決定されていることの発見は大きなインパクトを持つ。さらに興味深いことに、*IL28B*はインターフェロン λ ファミリーの一員であり、治療に用いられるインターフェロン α と類似するレセプター及び細胞内シグナル伝達系を

介して、ウイルス感染に対する防御作用を発揮する。したがって、治療効果の見込めない患者の予測のみならず、新たな治療薬の開発への貢献が期待される。

このほか、各種の薬剤に対する反応性に関わる遺伝子が報告されており、GWASによって初めて同定された遺伝子も増えている。また、薬剤過敏症に関わる遺伝子の探索においても、GWASが用いられる研究が多くなっている。一般に薬剤応答性遺伝子は、疾患感受性遺伝子に比較してオッズ比が大きい傾向にあるため、比較的少数の試料でも遺伝子を特定できる可能性が高いことから、今後ますますの成果が期待される。

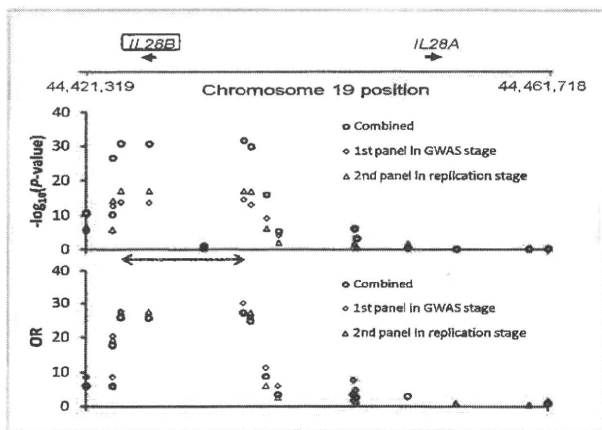


図5 C型肝炎のPEG-IFN- α /RBV治療応答性が*IL28B*遺伝子領域にマップされた¹⁰⁾

5 疾患関連遺伝子に見られる集団差

次に、先に述べた2型糖尿病の感受性遺伝子に見られた集団差を取り上げたい。表3は、ヨーロッパ系集団で見いだされた代表的な2型糖尿病感受性遺伝子*TCF7L2*と、日本人で見いだされた*KCNQ1*について、両集団におけるアレル頻度、オッズ比、*p*値を比較したものである。*TCF7L2*は、ヨーロッパ系集団では 10^{-48} と明確な関連を示すことが分かる。一方、日本人では*p*値が 10^{-4} レベルにとどまるが、その最大の理由はマイナーアレルの頻度の違