

平成 20 年 6 月 10 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 19390095
 研究課題名 (和文) 耳垢遺伝子 ABCC11 のヒト遺伝学的・医学的・人類学的研究
 研究課題名 (英文) Genetic, medical and anthropological study of human earwax gene, ABCC11
 研究代表者
 新川 詔夫 (NIIKAWA NORIO)
 北海道医療大学・個体差健康科学研究所・教授
 研究者番号：00111170

研究成果の概要：ヒト耳垢型決定遺伝子 ABCC11 多型に関する分子遺伝学的・医学的・人類学的研究を行った。乳癌との関係は証明されないが、産婦の初乳量と湿型耳垢型との間、および腋窩臭症と湿型多型間に相関を認めた。全国 SSH コンソーシアムとの共同研究で、乾型耳垢型のアレル頻度に関する日本地図を完成した。さらに、ABCC11 遺伝子多型が湿型。乾型耳垢型表現型を形成する分子機構を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
20 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

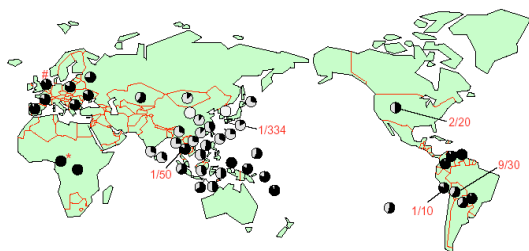
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

(1)ヒト耳垢型は 1907 年に台湾総督府医学専門学校の岸一太、次いで 1937 年に京都帝国



大学の足立文太郎によって最初に記載された湿型と乾型の二型から成るヒトの古典的メンデル形質である。その表現型は松永(1962)や尾本(1973)など、主として日本人遺伝学者・人類学者によって解析され、乾型耳垢は日本人を含めた東アジア人特有(80%～95%)であり、その他の民族の多くは湿型優位であることが判明していた。研究代表者らは日本人家系における連鎖解析(Tomitaら, 2002)、さらにゲノム解析・関連解析(Yoshiuraら, 2006)によって、ヒト耳垢型決定遺伝子 *ABCC11* を同定し、その

2種の多型 (c. 538A と△27 欠失多型) が日本人集団の全ての乾型を説明できること(乾型はAA ホモ接合体、湿型はGG ホモ接合体またはGA ヘテロ接合体)、ABCC11 蛋白 (MRP8) の発現・機能解析の結果、乾型蛋白 (MRP8-Arg) は野生型 (MRP8-Gly) に比べて、細胞内→外への基質排出能が低下していることを明らかにした。次いで世界の民族における c. 538G>A および△27 のアレル頻度、周辺多型のハプロタイプ解析・連鎖不平衡解析の結果、c. 538A の創始者効果、および古代東アジア人の移動・拡散を示唆することなどを明らかにした。本研究はヒトの可視的多型がDNA多型が決定することを示した最初の例である。

(2) *ABCC11* はアポクリン腺で発現する遺伝子であり、研究代表者らのデータでは、乾型耳垢個体の *ABCC11* の細胞内→外への基質排出機能は低下している (Yoshiura ら, 2006)。耳垢腺、乳腺、腋窩腺はアポクリン腺であり、耳垢型が乳がんの発生に関連するとする研究 (Petrakis 1971) があることから、*ABCC11* 多型頻度が東アジア人に少ない乳癌、さらに乳房発達や初乳量の程度などに関係している可能性がある。湿型耳垢型と腋窩臭症との相関は従来から指摘されていたが分子遺伝学的研究はなかった。*ABCC11* 多型との関係を調べることで、多くの日本人が悩んでいる腋窩臭症の座位が、*ABCC11* 座と連鎖するの同一座なのかを判明すると共に、その治療法の開発の糸口となる。

(4) 従来、日本人の移動・拡散に関してはHLA (徳永 2001; 田島 2004) やミトコンドリア (宝来 1991)、Y染色体 (新家・中堀 1999) などの多型を利用した研究があるが、真に東アジア人に特有な耳垢型 SNP を指標にした研究は研究代表者らのものだけである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) *ABCC11* 遺伝子のヒト耳垢型を決定する機序の解明(分子遺伝学的目的)、(2) ヒト腋窩臭修飾遺伝子の同定とその機序の解明、(3) *ABCC11* 多型の乳癌発症、薬剤耐性、初乳量、腋臭症などへの役割の解明 (医学的目的)、および(4) *ABCC11* 内外の多型解析による日本人 (特に湿型耳垢をもつ縄文人型) の起源、移動、拡散の推定 (自然人類学的目的)、の4点である。

(1) *ABCC11* は乳癌組織で強い発現をみる遺伝子である (Bera ら, 2001; Bieche ら, 2004)。また、*ABCC11* は多剤耐性遺伝子であり (Yabuuchi ら, 2001; Tammur ら, 2001)、その蛋白 (MRP8) は種々の基質を細胞内→外へ排出する膜蛋白である。基質の一部はDNAアナログなどの抗がん剤でもある (Guoet ら, 2003)。したがって、東アジア人に少ない乳癌 (Chen ら, 2004) や、アジア人の薬剤耐性(副作用)を決定している可能性がある。

(2) 真に東アジア人に特有な乾型耳垢型 SNP を指標にする日本人の移動・拡散の研究は研究代表者らのもので独創的だと考える。その解析を通して逆に、日本人湿型に特有な数種のSNPsも同定された(未発表)が、他の民族での頻度などは不明であり、周辺の東・東南アジア人を中心に頻度・ハプロタイプを調べることで、湿型日本人(主として縄文人型)の起源・移動・拡散なども明らかになると考える。一方、乾型多型 (c. 538A) の国内各地でのアレル頻度は不明であり、47 都道府県における頻度分布調査によって、乾型耳垢型をもつ渡来人(弥生人型)の移動経路も明らかにするかも知れない。*ABCC11* 付近のゲノム領域は、過去、進化圧がかかったと考えられる SNP 砂漠であり (HapMap Consortium, 2005)、広い領域において連鎖不平衡がみられる領域なので、この研究には理想的である。

3. 研究の方法

上述した4つの研究目的を果たすための計画・方法の概略は以下の通りである。

(1) *ABCC11* 多型の耳垢型決定機構の解明：*ABCC11* 多型(c.538A/G)のAA ホモ接合体がなぜ乾型耳垢型表現型を呈するのかの機序を解明するために、*ABCC11* 蛋白のN結合型糖鎖形成、免疫組織化学手法による細胞内局在、プロテアソーム変性などを生化学的に解析する。

(2) *ABCC11* の修飾遺伝子の同定：湿型耳垢をもち、腋窩臭の強弱2群において全ゲノム SNP タイピングを行い、差異が著明な SNP 部位、さらに候補遺伝子を同定しその機能を明らかにする。①本研究ではAアレルの影響を除外する必要があるが、GG ホモ接合体は日本人では稀(頻度=0.03)なため、ウクライナ医科大学の協力を得て、約100名の白人集団を用いる。②質問アンケート(英文・露文)によって耳垢の多寡、腋窩臭の強弱を判定し、事前に対象者を2群に分ける。③GeneChip解析システムによるSNP

タイピングを行い遺伝子型を決定し、GG ホモ接合体のみを以下の統計解析の対象とする。④腋窩臭の強弱に関する統計的関連解析を行い、候補領域を決定する。

(3) *ABCC11* 多型の乳癌、初乳、腋窩臭症への関与の検討：上記形質への関与を証明あるいは否定する方法は、湿型耳垢個体 (GG および GA 遺伝子型) と乾型個体 (AA 遺伝子型) とで、2つの各表現型間あるいは計量値とに差があるか否かを検証すればよい。

①乳癌発症：インフォームド・コンセントの基に、100名の乳癌患者を集積して、その集団における *ABCC11* 遺伝子型頻度・アレル頻度を同一地域の一般集団と比較・検討する。②初乳量：この形質と耳垢型の関連は、従来から表現型のレベルではあるが示唆されていた (Jirka1968; Petrakis ら, 1975) が、その仮説を検証する。産科で出産した婦人の *ABCC11* 遺伝子型を決定し、初乳量を測定して、遺伝子型と統計的に比較検討する。遺伝子型は倫理委員会承認の基にインフォーム・コンセントを経て得た血液 DNA を用いて Taqman PCR 法で決定する。

③腋窩臭症：インフォーム・コンセントの基に、腋窩臭症の手術のため形成外科を受診した腋窩臭症患者から血液を採取し、抽出した DNA における *ABCC11* 多型の GG および GA 個体の頻度を一般集団と統計的に比較検討する。腋窩臭症患者の全てが GG/GA 個体であれば(悉無律)、腋窩臭症座と *ABCC11* 座の一致が証明される。一方、一般集団との差は明白だが、悉無律に従わなければ、両座位は関連するが異なる、あるいは *ABCC11* 発現に対する修飾因子が存在すると結論される。

(4) *ABCC11* 内外多型を指標にした全国県別地図の作成と、弥生人型日本人の起源、移動、拡散の推定：全国スーパーサイエンスハイスクール (SSH) コンソーシアムの協力の元に、生徒および保護者からのインフォームド・コンセントを得て、47都道府県の各 SSH から50名の高校生の爪試料を収集する。爪 DNA 試料における *ABCC11* 多型 (c. 538A/G) および周辺領域の多型に関するタイピングを行い、各遺伝子型およびアレル頻度を算出する。アレル頻度を基に、白地図に記入し県別全国地図を作成する。主として弥生人型日本人の移動・拡散を推定する。

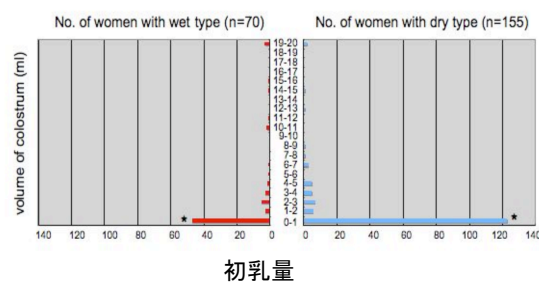
4. 研究成果

(1) *ABCC11* 多型の乳癌、乳房、初乳、腋窩臭症への関与の検討：

①91名の女性乳癌患者の *ABCC11* 遺伝子型頻度・アレル頻度を同一地域の127名の一般集団と比較・検討した結果、両者に差はみられなかった (0.862 vs 0.890, $p=0.310$)。この結果は少なくとも腫瘍型を無視した乳癌全体における *ABCC11* の役割は大きくはないことを示す。

	乳癌患者 (女性)	一般集団
乾型耳垢 AA	68	87
湿型耳垢 GA	21	36
GG	2	4
計	91	127
A頻度	0.862	0.890 ($p=0.31$)

② 225名の産婦 (155名が乾型、70名が湿型) では、出産後24~36時間における初乳分泌のない産婦の頻度は、乾型産婦が湿型産婦よりも有意に多く ($p<0.0002$)、分泌初乳の量も乾型産婦が有意に少なかった ($p<0.0341$)。従って、湿型耳垢型と初乳量増加の関連が明らかであった。



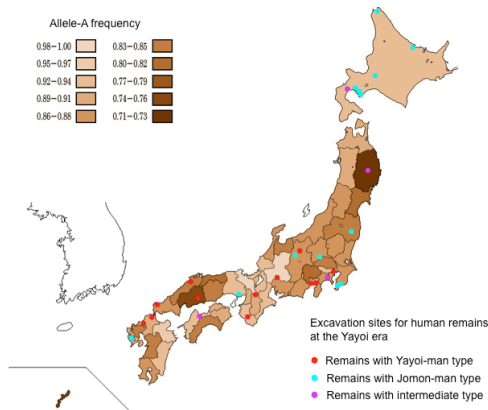
③ 腋窩腺除去手術のため形成外科クリニックを受診した79名の腋窩臭症 (本人申告) 患者から得た血液試料について *ABCC11* 遺伝子型を解析中し、1名を除いた全員が湿型多型を有し、一般集団との頻度差は明白であった ($p<1.1 \times 10^{-24}$)。

Allele	Wet		Dry	total
	AG	GG	AA	
A.O.	73	5	1	79
Control	36	4	87	127
total	109	9	88	206

(2) *ABCC11* 内外多型を指標にした全国県別地図の作成と、弥生人型日本人の起源、移動、拡散の推定：

①全国47都道府県のスーパーサイエンスハイスクール (SSH) から成る SSH コンソーシアムに

よる各県毎の乾型 A アレル頻度の全国地図を作成する共同研究を技術的に全面協力・支援した。48 校の SSH を含む 55 校の各高等学校および 5 大学の各校の高校生・教諭・大学生ボランティア 25~50 名から集積した計 1,963 指爪試料を集積し、爪 DNA を用いた *ABCC11* 多型(c.538A/G)の遺伝子型解析を行いアレル頻度を算出し、乾型耳垢型のアレル頻度に関する日本地図を完成した。



②結果は、日本列島のうち関西地方より北における A アレル頻度はそれ以西の県よりも低い傾向を示し、A アレル頻度の高値は北九州から東九州、四国北部瀬戸内海側、関西地方を中心に兵庫県から岐阜県までを含めた地域で顕著であった。逆に、A アレル頻度の低値は、沖縄県、九州西南部、中国地方、東北地方東部でみられた。

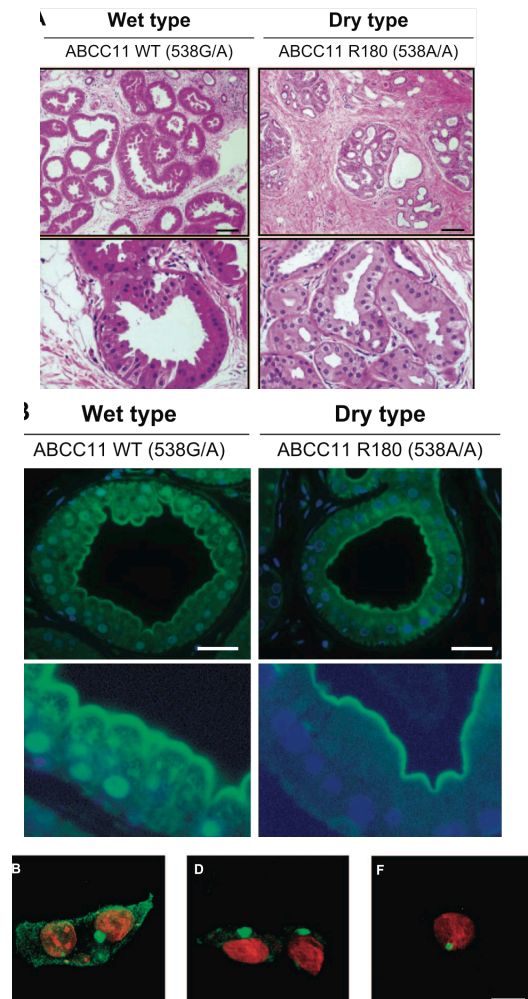
③このことは、過去 3 千年の歴史の中で、日本列島では未だ湿型耳垢型をもつ集団と乾型耳垢型をもつ集団との交雑が均一化していないことを示唆し、成人 T 細胞白血病ウイルスや B 型肝炎ウイルス、また他の DNA マーカーなどの過去の研究結果と一致した。弥生時代人骨・縄文系人骨の発掘場所と耳垢型分布は重なっていて、現代における A アレル頻度の高い地域と、弥生時代の大陸渡来系弥生人の人骨の分布が一致する地域があることは興味深い。乾型耳垢型遺伝子の全国地図は、大陸からの渡来系弥生人が乾型耳垢型遺伝子を持ち、北九州から東へと在来の縄文人と混血をくりかえしながら広がって行ったことを裏付ける重要な資料となり、高校生の歴史教科書に掲載されることが期待される。

(3) *ABCC11* の修飾遺伝子の同定：ウクライナ医科大学の協力を得て、白人ボランティアか

ら、耳垢の多寡、腋窩臭の強弱に関する臨床情報と爪試料の収集を開始した。現在 50 数名の試料が収集済みであるが、試料数が少ないため、解析は未着手である。

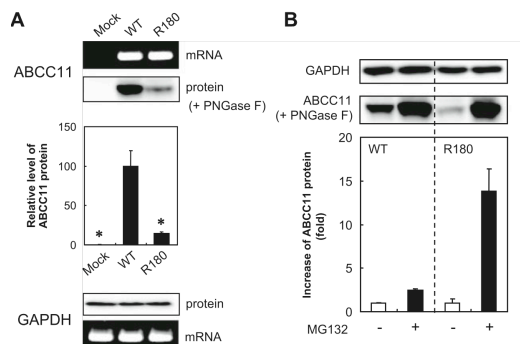
(4) *ABCC11* 多型による耳垢型決定の機構：

①抗 *ABCC11* 抗体を作成し、それを用いた免疫染色によって、湿型の耳孔腺では大きな管腔構造と細胞質内顆粒・空胞が著明であり、*ABCC11* 蛋白質は細胞質膜および細胞質内顆粒表面に局在した。一方、乾型では細胞質内顆粒が欠如していた。



②乾型 (R180 と Δ27) の *ABCC11* 蛋白質の発現は低下しているが、プロテアソーム阻害剤(MG132)によって著明に増加し、R180 蛋白質はプロテアソーム変性しやすいことを示唆する。

③湿型 (WT) 蛋白質は N 結合型糖鎖合成化と非糖鎖合成化の両型が存在するが、R180 と Δ27 蛋白質では N 結合型糖鎖合成化型が欠如する。



これらの結果から、野生型(湿型耳垢型に対応)ABCC11 蛋白は、小胞体において Asn838 と Asn844 部位で N 結合型糖鎖合成された後ゴルジ装置で処理され、細胞質内顆粒や空胞膜を形成する。耳垢は ABCC11 蛋白で輸送・分泌される。それに対して、変異型(乾型耳垢型に対応)ABCC11 蛋白は異常な折り畳み構造の蛋白と認識され、直ちにユビキチン化・プロテオソーム変性されると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Satoshi Sakai, Kazumi Imai, Takashi Ogawa, Hiroshi Iwaoka, Mikiko Ishii, Shinichiro Komori, Toyohiko Yoshida, Hideyuki Jumonji, Keiji Iizumi, Hiroshi Ohshima, Toshiaki Maeda, Akira Kanno, Kenji Takahashi, Hiroto Kubota, Yoko Inoue, Yoshiyuki Takahashi, Hiroshi Onoda, Rie Uchiyama, Michihiko Matsuda, Takashi Akazawa, Naohiro Kawamura, Toru Odagiri, Yasuharu Watanabe, Yukihiro Matsumoto, Seiji Shinoda, * Masato Terada, Manabu Matsuoka, Chikara Ueno, Etsuo Ozaki, Sadafusa Takaya, Tetsuharu Takeyama, Toshiaki Hujita, Kazuya Kawakatsu, Junichi Takemura, Hironori Maekawa, Tomoko Doei, Shigeru Ihara, Yuji Sakaguchi, Yasuyuki Hirota, Akihiko Shindo, Hiroko Araki, Junko Miura, Tatsumi Morita, Takayuki Fujiwara, Haruhiko Akiyama, Shinya Itome, Yoshihisa Tanaka, Kazunori Nakagawa, Sumito Okamoto, Shushi Yamamoto, Takaaki Aoyagi, Toru Noda, Shinichi Inoue, Isao Hirota, Kiyoshi Tanaka, Tetsuya Nagashima, Iwao Koga, Kayo Watanabe, Hideto Kusadome, Hiroshi Otsuka, Tosifumi Takayama, Hiroshi Miwa, Atsushi Hamakawa, Katsunori China, Norio Niikawa, Tohru Ohta, Dmytro Starenki, Ken Umehara, Kensuke Yamada, Yoichi Shimada, Hiroyuki Nagasawa, Takashi Minato, Toshihiko Ogin, Koh-ichiro Yoshiura, Nobutomo Miwa, Masayo Nomura, Hideo Kuniba, Yasuko Noguchi, Shinji Ono, Masayoshi Tsuda, Mitsuko Nakashima, Taeko Kikuchi, Daisuke Satoh, Tatsuya Kishino, Shinji Kondo, Akira Kinoshita: Japan map of the earwax gene frequency: A nation-wide collaborative study by Super Science High School (SSH) Consortium. *J Hum Genet* (in press)

Toyoda Y, Sakurai A, Mitani Y, Nakashima M, Yoshiura K, Nakagawa H, Sakai Y, Ota I, Lezhava A, Hayashizaki Y, Niikawa N, Ishikawa T: Earwax, osmidrosis, and breast cancer: Why does one SNP (538G>A) in the human ABC transporter *ABCC11* gene determine earwax type? *FASEB J* 23 (6): 2001-2013, 2009.

Miwa N, Nakano M, Nakashima M, Miura S, Miura K, Masuzaki H, Hirano A, Yoshiura K, Niikawa

N: A strong association of body odor and axillary osmidrosis with the wet earwax type determined by genotyping of the *ABCC11* gene. *BMC Genetics* (in press)

Sakurai A, Onishi Y, Hirano H, Seigneuret M, Obanayama K, Kim GW, Liew EL, Sakaeda T, Yoshiura K, Niikawa N, Sakurai M, Ishikawa T: Quantitative SAR analysis and molecular dynamics simulation to functionally validate nonsynonymous polymorphisms of human ABC transporter ABCB1. *J Biochem* 46 (26): 7678-7693, 2007.

Miura K, Yoshiura K, Miura S, Shimada T, Yamasaki K, Yoshida A, Nakayama D, Shibata Y, Niikawa N, Masuzaki H: A strong association between human earwax-type and apocrine colostrum secretion from the mammary gland. *Hum Genet* 121: 631-633, 2007.

吉浦孝一郎, 新川詔夫: 耳垢型は *ABCC11* 遺伝子の一塩基多型によって決定されている。医学のあゆみ 217 (13): 1197-1198, 2006.

吉浦孝一郎, 新川詔夫: 耳垢型は一塩基の違いで決定される。バイオニクス 6; 68-69, 2006.

新川詔夫: 耳垢のタイプ。Medical Technology 10:1013-1014, 2006.

〔学会発表〕(計 5 件)

本多隆利, 村松紋佳, 田中清, 長嶋哲也, 小川隆, 吉浦孝一郎, 新川詔夫: 全国スーパーサイエンスハイスクール (SSH) の共同による耳垢型対立遺伝子の全国地図作成の研究. 第 53 回日本人類遺伝学会 2008 年 9 月 27-30 日, 横浜三輪晋智, 吉浦孝一郎. 耳垢型決定遺伝子 *ABCC11* が細胞の薬剤感受性に与える影響の検討. 第 51 回日本人類遺伝学会 2006 年 10 月 17 日 (火) ~20 日 (金), 米子

吉浦孝一郎, 木下 晃, 齋藤成也, 徳永勝士, 石川智久, 中村祐輔, 新川詔夫. 耳垢型決定遺伝子の同定. . 第 28 回日本分子生物学会年会 2005 年 12 月 7 日 (水) ~10 日 (土), 福岡市

新川詔夫, 駒木亮一, 園田俊郎, 平山謙二, 石田貴文, 齋藤成也, 吉浦孝一郎: 耳垢型決定遺伝子の同定. 第 50 回人類遺伝学会 (倉敷) 9 月 19~22 日

吉浦孝一郎, 木下 晃, 齋藤成也, 徳永勝士, 中村祐輔, 新川詔夫: 世界民族集団における乾型アレルの頻度とモンゴロイドの移住・拡散. 第 50 回人類遺伝学会 (倉敷) 9 月 19~22 日山崎庸子

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

「耳垢型又は腋下臭症の評価方法」、国際出願番号: PCT/JP2006/312673、発明者: 新川詔夫、吉浦孝一郎、出願日: 平成 19 年 12 月 14 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氏名: 新川 詔夫

所属研究機関・部局・職名: 北海道医療大学・

個体差健康科学研究所・教授

研究者番号: 0 0 1 1 1 1 7 0

(2) 研究分担者

氏名: 太田 亨

所属研究機関・部局・職名: 北海道医療大学・

個体差健康科学研究所・准教授

研究者番号: 1 0 2 2 3 8 3 5

氏名: 吉浦 孝一郎

所属研究機関・部局・職名: 長崎大学・医歯薬

学総合研究科・教授

研究者番号: 0 0 3 0 4 9 3 1