

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21406006

研究課題名（和文）結核を対象とした国際遺伝疫学研究および研究開発ネットワーク構築

研究課題名（英文）Networking for research on human genetics of Tuberculosis

研究代表者

徳永 勝士（TOKUNAGA KATSUSHI）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40163997

研究成果の概要（和文）：結核症は世界三大感染症の一つで、数億人に影響を与えている。ゲノムワイド関連解析(GWAS)をタイ人と日本人の結核症で実施し、年齢毎のメタ解析と独立したReplication サンプルにて、45歳未満の若年層で20q12の領域のHSPEP1-MAFB遺伝子近傍に関連を同定した。更に、ゲノムワイド連鎖解析で同定された領域や候補遺伝子アプローチから3つの関連遺伝子を報告した。年齢や菌体情報も含むサンプルをタイ、日本、インドネシアを中心に収集し結核の遺伝疫学研究ネットワークを強化した。

研究成果の概要（英文）：Tuberculosis (TB) is one of three major infectious diseases, affecting billions of people worldwide. Genome-wide association analyses in Thais and Japanese were carried out. The result of meta-analysis of young tuberculosis, an age subset GWAS was conducted in Thai and Japanese populations and a risk locus for young TB on 20q12 was identified. While the locus is located far from coding regions, the genes (HSPEP1-MAFB) close to this locus are promising candidates for tuberculosis susceptibility. We have collected samples based on our research network in Thailand, Japan, and Indonesia including age and pathogen information, which may accelerate the identification of the distinct host factors of TB.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：人類遺伝学

キーワード：遺伝学、感染症、結核、ゲノム、関連遺伝子、国際共同研究、タイ、インドネシア

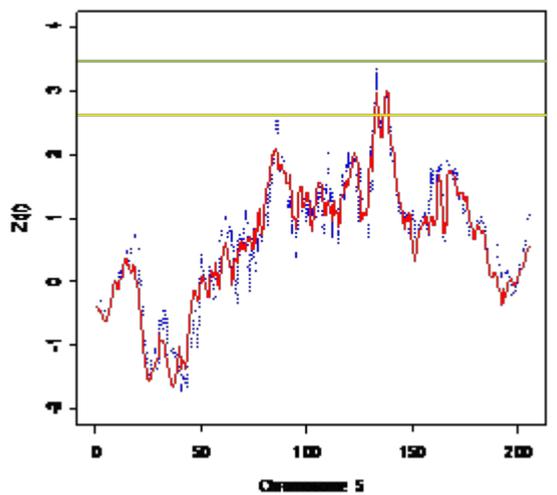
1. 研究開始当初の背景

結核症は、世界3大感染症として、人類に

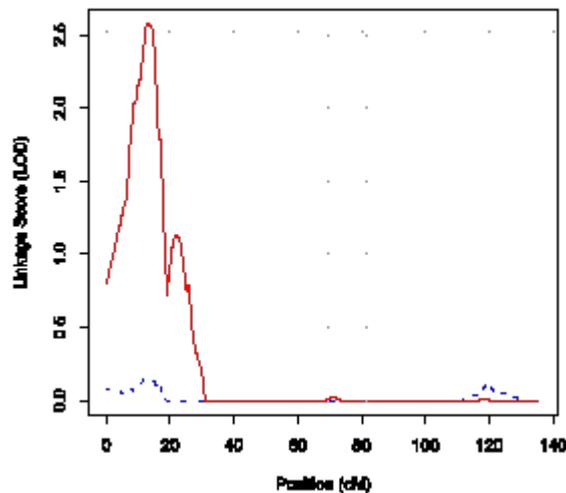
多大な健康被害を与えている。しかし、結核対策のツールとされている、感染源の直接監

視下での現有の抗結核薬による治療プログラム (DOTS: ドッツ) のみでは、結核を2050年までに消失させるという国際目標に到達するには程遠いため、ゲノム医学からのアプローチも含めて多様なアプローチが求められている。

我々は、タイ国との過去の共同研究にて、約100例の兄弟発症例 (罹患同胞対) よりゲノムDNAを収集し、ノンパラメトリック連鎖解析を実施し、染色体5q領域において結核との連鎖を検出した。更に、若年者のみの解析で染色体17pと20pを同定し、年齢により遺伝要因が異なる事を示した [Genes Immun 2008]。この基盤と経験を生かして、特にアジアにおいて国際的なネットワークを作成して、更なる関連遺伝子同定を志向した。



GWAS analysis of chromosome 17



2. 研究の目的

多因子疾患の感受性遺伝子を見つけ出すためには、多くの場合、(1)ゲノム全域からの関連領域の探索、(2)探し出された領域をより詳しく調べて疾患感受性遺伝子を同定という2段階の研究実施が必要である。

(1)のゲノムワイドな探索では、背景に述べたゲノムワイド連鎖解析に引き続き、数十万個に及ぶ遺伝子多型情報すなわちSNP (single nucleotide polymorphism, 単一塩基多型) のパターンを疾患群と健常群で比較し、疾患関連遺伝子を同定するゲノムワイド関連解析 (GWAS: Genome-wide association study) を実施した。付随して、現在使用されている、最も統計学的に有意なSNPのみを見る方法 (the “most-significant SNPs/genes” approach) は、多くの偽陽性、偽陰性のSNPsを検出しやすく、生物学的に有意義な発見につながらない可能性が高い為、SNPsを遺伝子レベルからPathwayレベルまでセットで扱う統計学的改善法も検討した。

(2)の遺伝子同定の為にアジア諸国における検体収集を強化し、ゲノムワイド関連解析の結果の再現性 (replication) 検討の為にサンプルとして使用するだけでなく、ゲノムワイド連鎖解析等で示唆された領域のFine Mappingや候補遺伝子研究を進めた。

3. 研究の方法

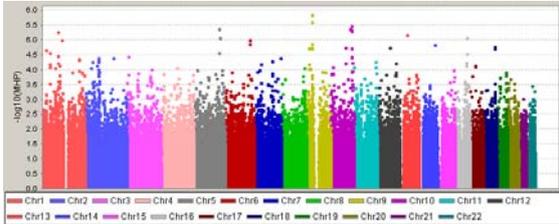
理化学研究所ゲノム医科学センターや結核予防会と共同し、タイ人の結核433人・対照295人の他に、バイオバンク日本からの結核症188人・対照934人の検体も含め、イルミナHapmap550とHapmap610を使い両者に共通した553,252SNPsに対してゲノムワイド関連メタ解析にて探索をした。さらに、再現性検討を、独立した日本人結核112人・対照1087人、タイ人結核369人・対照439人のサンプルで実施した。ゲノムワイド連鎖解析で、年齢の関与が考えられていたので、30歳から70歳まで5歳毎に年齢を分けQQプロットにて期待値と観察値を比較し、分けるべき年齢があるか検討した。

GWASデータにおいて、より意義のある情報を引き出すために、アルバータ大学安井教授との共同研究で、多変量解析の一つであるLogic Regressionを遺伝子レベルでのSNPsセットに応用し、クローン病の公開データにて統計手法の有用性を検討した。

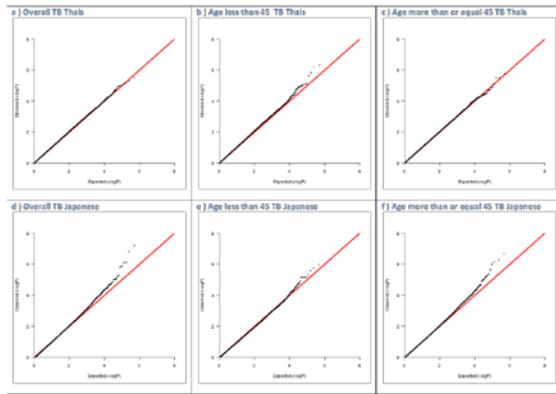
(2)の遺伝子同定では、ゲノムワイド関連解析からの候補の他にも検討した。ゲノムワイド連鎖解析で同定された5q領域で感受性遺伝子と考えられるSLC22A4、SLC22A5、IRF1、IL5、RAD50、IL13、IL4、KIF3AとSEPT8の遺伝子多型75SNPsを検討できるDigiTag2 assayが開発されていたので、それをタイ人検体に適用し解析した。また、ヒト樹状細胞上の結核菌受容体であるDendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin (DC-SIGN)に関与するCD209遺伝子や、アジア集団以外の集団で結核との関連が示唆されている関連遺伝子を候補遺伝子アプローチとして検討した。

4. 研究成果

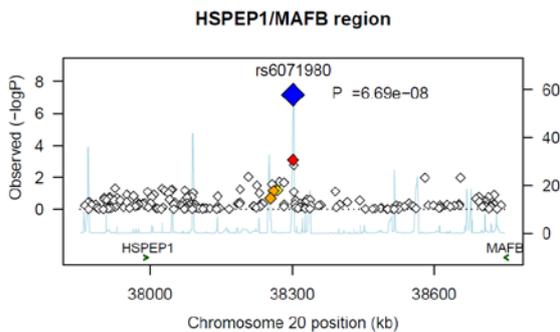
(1)のゲノムワイド関連解析では、全年齢をまとめたメタ解析のマンハッタン・プロット図を下に示す。この中で最上位($P_{M-H} < 10^{-5}$)であった 25SNPs の再現性を独立したサンプルで検討したが、ゲノムワイドに有意な SNP は同定されなかった。



QQ プロットは、下記に示す通り 45 歳まで期待値と観察値の差があった。



この QQ プロットの結果と共に、日本とタイで 45 歳前後に年齢分布の谷があった事と、タイでは 45 歳未満でより北京株の結核菌による症例が多いことより、45 歳で分けて年齢毎のメタ解析を実施した。45 歳未満の若年層のゲノムワイド関連メタ解析(タイ人 137 結核症例・295 対照、日本人 60 結核症例・249 対照)の結果得られた上位 50SNPs を Replication サンプル(タイ人 155 結核症例・249 対照、日本人 41 結核症例・462 対照)で確認し、20q12 の領域の HSPEP1-MAFB 遺伝子近傍にある rs6071980 との関連 ($p=6.69E-0.8$)を同定した[J Hum Genet 2012]。



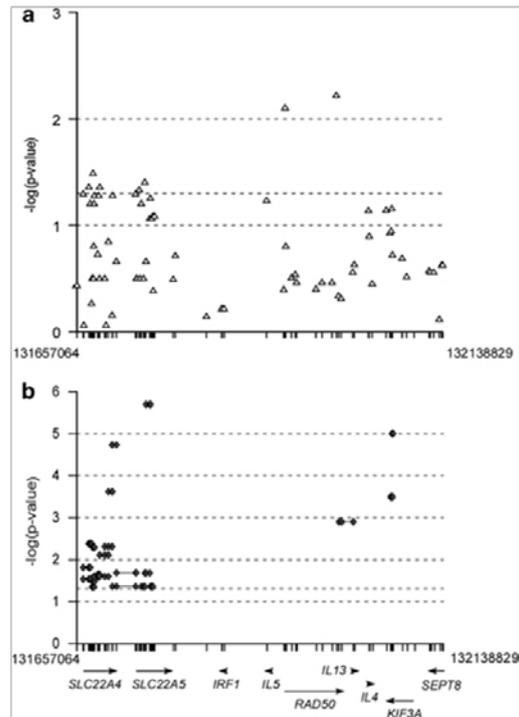
rs6071980: HSPEP1-MAFB

rs6071980	Cases(N)			Cases Freq	Controls(N)			Controls Freq	OR(95% CI)	P _{trend}	P _{M-H}
	11	12	22		11	12	22				
GWAS											
Thais	76	53	8	0.25	213	72	10	0.16	1.82 (1.28-2.59)	9.88E-04	
Japanese	24	24	12	0.40	132	100	17	0.27	1.81 (1.2-2.74)	5.48E-03	1.55E-05
Replication											
Thais	93	54	8	0.23	192	49	8	0.13	1.94 (1.34-2.82)	6.96E-04	2.51E-08
Japanese	18	19	4	0.33	239	180	43	0.29	1.21 (0.75-1.97)	4.39E-01	6.69E-08

MAFB: Located on 20q12; Transcription factor determining differentiation fate of monocyte/macrophage; highly expressed in peripheral blood of active TB

Logic Regression を活用した遺伝子レベルの SNP s セット解析では、今まで報告された遺伝子を含み更に多くの遺伝子を同定して、感度の上昇が認められる[投稿中]。特性として、SNP 間の相互作用が統計的に検討できる利点が見された。結核菌体と宿主の相互作用を見る上でも有用であり、結核菌体の遺伝子解析の結果と併せ、年齢の要素を入れながら解析している。タイと同様に、菌体も保存している日本の複十字病院でも検体収集について倫理委員会の承認を得て進めている。

(2)の上記 GWAS 以外の感受性遺伝子同定では、SLC22A5 遺伝子の 3 SNPs(rs274559, rs274554, rs274553)から構成されるハプロタイプが多重比較を補正しても有意 ($P(\text{Global})=2.02 \times 10^{-6}$)な関連が認められた。また、SLC22A4 と KIF3A 遺伝子領域にも関連が認められた。SLC22A5 のハプロタイプは RAD50 と IL13 の発現レベルに影響をおよぼしていた[Genes Immun 2010]。



候補遺伝子アプローチとして、インドネシアの検体を中心として DC-SIGN に関する CD209 遺伝子のプロモーター領域 [Hum Immunol 2011]、HLA 関連にて HLA-A, HLA-B と HLA-DRB1 [Hum Immunol 2010]、Toll-like receptors (TLRs) のうち TLR-9 [Tissue Antigens 2012]にて結核との関連遺伝子を同定し論文発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Mahasirimongkol S, Yanai H, Mushiroda T, Promphittayarat W, Wattanapokayakit S, Promjai J, Yuliwulandari R, Wichukchinda N, Yowang A, Yamada N, Kantipong P, Takahashi A, Kubo M, Sawanpanyalert P, Kamatani N, Nakamura Y, Tokunaga K Genome-wide association studies of tuberculosis in Asians identify distinct at-risk locus for young tuberculosis *Journal of Human Genetics* 2012 May 3. doi:10.1038/jhg.2012.35. [Epub ahead of print], 査読有
- ② Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Naka I, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of TLR polymorphisms with development of tuberculosis in Indonesian females. *Tissue Antigens* 2012 Mar; 79(3):190-197. doi:10.1111/j.1399-0039.2011.01821.x. Epub 2011 Dec 29. , 査読有
- ③ Kobayashi K, Yuliwulandari R, Yanai H, Lien LT, Hang NT, Hijikata M, Keicho N, Tokunaga K. Association of CD209 polymorphisms with tuberculosis in an Indonesian population. *Human Immunology* 2011 Sep; 72(9):741-745. doi:10.1016/j.humimm.2011.04.004, 査読有
- ④ Ridruechai C, Mahasirimongkol S, Promjai J, Yanai H, Nishida N, Matsushita I, Ohashi J, Yamada N, Moolphate S, Summanapan S, Chuchotaworn C, Manosuthi W, Kantipong P, Kanitwittaya S, Sawanpanyalert P, Keicho N, Khusmith S, Tokunaga K. Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31-33

for tuberculosis. *Genes and Immunity* 2010 Jul; 11(5):416-422. doi:10.1038/gene.2010.26, 査読有

- ⑤ Yuliwulandari R, Sachrowardi Q, Nakajima F, Kashiwase K, Hirayasu K, Mabuchi A, Salam A M, Tokunaga K*: Association of HLA-A, -B, and -DRB1 with pulmonary tuberculosis in western Javanese Indonesia. *Human Immunology*. 71(7): 697-701, 2010. doi:10.1016/j.humimm.2010.04.005 , 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 徳永勝士、Surakameth Mahasirimongkol、野内英樹、蒔田泰成、Wattoo Promphittayasatit、Sukanya Pokayawattanakit、Jurairut Phromjai、Rika Yuliwulandari、Nuanjun Wichukchinda、Amara Yowang、山田紀男、Pacharee Kantipong、高橋篤、久保充明、Pathom Sawanpanyalert、鎌谷直之、中村裕輔 Genome-wide association studies of tuberculosis in East Asians identify distinct at-risk locus for young tuberculosis、第56回日本人類遺伝学会(口頭演題0-076)、幕張メッセ(千葉県)、2011年11月11日
- ② 中内彩香、Rika Yuliwulandari、Surakameth Mahasirimongkol、野内英樹、徳永勝士 17 番染色体上の機能的及び位置的候補遺伝子と結核の関連解析 第 20 回日本組織適合性学会、一般ポスター演題 P20、ツインメッセ静岡(静岡県)、2011年8月28-30日
- ③ 徳永勝士 EFFECT OF AGE SUBSET ON GENOME-WIDE ASSOCIATION ANALYSIS OF TUBERCULOSIS IN THAIS 5th Human Genome Meeting、アラブ首長国連盟(ドバイ)、2011年3月14-17日
- ④ Sukanya Wattanapokayakit, Surakameth Mahasirimongkol, Jurairut Phromjai, Amara Yowang, Wattoo Promphittayasatit, Nuanjun Wichukchinda, Nusara Satproedprai, Wimala In-Unchot, Pathom Sawanpanyalert, Hideki Yanai, Taisei Mushiroda, Katsushi Tokunaga, Yusuke Nakamura. Candidate gene association analysis of single nucleotide polymorphism in *NEMO* with tuberculosis in Thailand Keystone Symposia Global Health Series,

Tuberculosis: Immunology, Cell
Biology and Novel Vaccination
Strategies, Vancouver, British
Columbia, Canada, January 15-20, 2011

- ⑤ 小林杏輔、Rika Yuliwulandari、慶長直人、Nguyen Thi Le Hang、徳永勝士 東南アジア系集団における結核感受性とCD209遺伝子の関連 第55回日本人類遺伝学会、一般演題P054、大宮ソニックシティ(埼玉県)、2010年10月27-30日
- ⑥ 野内英樹、出井禎 タイと日本における菌体と人検体の長期縦断的検体バンクによる結核の発症と難治化に関する要因研究 第57回日本臨床検査医学会学術集会(一般口頭演題、微生物検査(2)演題番号 0-66)、京王プラザホテル(東京都)、2010年9月10日
- ⑦ Surakameth Mahasirimongkol, Hideki Yanai, Nao Nishida, Chutharut Ridruechai, Ikumi Matsushita, Jun Ohashi, Surin Summanapan, Norio Yamada, Saiyud Moolphate, Charoen Chuchotaworn, Angkana Chaiprasert, Weerawat Manosuthi, Pacharee Kantipong, Sangkom Kanitwittaya, Thanyachai Sura, Srisin Khusmith, Katsushi Tokunaga, Pathom Sawanpanyalert, Naoto Keicho. Genome-wide SNP-based linkage analysis of tuberculosis in Thais 第84回日本結核病学会総会(シンポジウムII 結核における宿主遺伝要因研究の現状と展望 演題4)、札幌コンベンションセンター(北海道)、2009年7月2日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 勝士 (TOKUNAGA KATSUSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40163977

(2) 研究分担者

馬淵 昭彦 (MABUCHI AKIHIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80312312

渋谷 健司 (SHIBUYA KENJI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50322459

(3) 連携研究者

野内 英樹 (YANAI HIDEKI)
東京大学・大学院医学系研究科・
客員研究員
研究者番号：60437845
(H22 から連携研究者)