

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 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591229

研究課題名（和文）

ゲノム解析による円形脱毛症疾患感受性遺伝子同定の試み

研究課題名（英文）

Genomic analysis and identification of susceptible genes for alopecia areata

研究代表者

池田 志孝（IKEDA SHIGAKU）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：40193198

研究成果の概要（和文）：

この度の研究で、我々は第6番染色体短腕 HLA 領域 HLA-B のセントロメア側近傍に強い相関を同定した（OR: 3.21）。この領域をさらに詳細に解析した結果、詳細な microsatellite marker や SNP を用いて 2 megabase の領域に絞りこむことが出来た(Haida Y, Ikeda S, Takagi A, Komiyama E, Mabuchi T, Ozawa A, Kulski JK, Inoko H, Oka A: Association analysis of the HLA-C gene in Japanese alopecia areata. Immunogenetics, 2013; 65: 553-7.)。既に 50 症例における同部位のシークエンスが終了しており、1つのハプロタイプで更に強い相関を検出した（OR: 3.75）。また1つの遺伝子の中とその周囲に、エクソンとイントロンの多くの変異や多型が同定され、その幾つかは stop codon 形成や、タンパクの3次元構造を変化させる変異であった。現在この遺伝子の改変マウス作成や、患者皮膚における発現の検討を行っている。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have identified a strong candidate region for alopecia areata on chromosome 6, at around HLA-B locus (OR: 3.21). By detailed genetic analysis of this region using microsatellite markers and SNPs, we could successfully narrow the region to 2 megabase interval (Haida Y, Ikeda S, et al: An association study of Alopecia Areata within the HLA region using microsatellite markers. Immunogenetics, 2013; 65: 553-7.) . We further sequenced this 2 megabase region on 50 alopecia areata cases, and identified a strongly associated haplotype for alopecia areata (OR: 3.75). Moreover, in this region, we have identified multiple mutations and/or polymorphisms in the exons and introns of a gene, that frequently resulted in the formation of stop codon mutations and truncation of gene products. These results indicated that this gene could be a strong susceptible gene for alopecia areata. We are now producing gene modified mice for this gene, and also examining the expression of this candidate gene on the alopecia areata patients' skin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：円形脱毛症、ゲノム解析、マイクロサテライト、SNP、遺伝子、HLA

1. 研究開始当初の背景

1) 円形脱毛症とは：

円形脱毛症は若い女性に発症し、特に多発性ないし汎発性円形脱毛症では外観の変化により患者のQOLが著しく障害される。その発症機序としては自己免疫説が唱えられており、甲状腺炎や他の自己免疫疾患の合併が多く見られること、ステロイド療法や免疫療法などに反応する例が多いことが指摘されている。しかし難治例や再発を繰り返す例が多く、またステロイドの副作用などにより治療を中断せざるを得ないことが多いことも事実である。なお臨床疫学調査より、本疾患は多因子遺伝性疾患であると推定されている。

2) 候補遺伝子の相関解析で検出された候補遺伝子

自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子座としてHLA領域（6番染色体短腕、ch6p）が知られている。そのため以前より、同遺伝子座の解析が行われている。その結果、HLA-DQB1*03が感受性遺伝子であると複数の報告がある。HLA-DQB1*03は米国の80%のAA患者で見られ、またトルコからの報告でも確認されている。また中国からは、HLA class I分子やHLA-DQA1、DQB1の相関が報告されている。一方AAに「抵抗性」の遺伝子として、DRw52aなどが相関するとの報告もある。

旧来のMHC遺伝子以外の遺伝子としては、major histocompatibility complex class I chain-related gene A (MICA)がAAと相関するとの報告がある。MICAはNK細胞の受容体と反応すると考えられており、AA病変部の毛包周囲にNK細胞が増加していることと併せて興味深い。Cytokineやその受容体関係では、IL-1 receptor antagonist、macrophage migration inhibitory factor、Notch4（MHC class II部に局在）が相関すると報告されている。しかし相関解析では「疑陽性」が多いとされており、多民族、多集団での追加解析が必要である。

3) ゲノムワイドな連鎖解析で検出された候補領域

Alopecia areata registryの登録より米国・Israelの20の患者家系が選出され、MS

マーカーを用いてゲノムワイドな連鎖解析が行われた。その結果、ch6p（HLA遺伝子座）、ch6q、ch10、ch16、ch18に連鎖が認められた。

またAAモデルマウス(C3H/HeJ)の解析では、マウスch8、ch9、ch15、ch17に連鎖がみられ、さらにマウスch17はMHC座であった。

4) pooled DNAを用いたゲノムワイドな相関解析

poolされた患者DNAを用いて多型DNAマーカーを増幅し、その対立遺伝子と疾患の相関を統計学的に調べるものである。方法としては、まず100例の患者DNAサンプルを用いてスクリーニングを行い、ゲノム全長に大まかな候補領域を得る。更に異なる200例を2セットに分け、2次・3次スクリーニングを行い、候補領域を限定する。始めからSNPのみを用いて行う方法と、始めはMSマーカーを用いて、ある程度候補領域が絞られたのちSNPを用いる方法が報告されている。

近年我々は、やはり自己免疫性疾患の一種と考えられる「乾癬」のゲノム解析を行い、幾つかの疾患感受性遺伝子の候補を同定している(Mabuchi, T. et al.: Fine mapping of a psoriasis-susceptibility locus within the HLA class II region by using microsatellite makers in an association study of Japanese cases and controls. The Tokai J Exp Clin Med, 32: 6-13, 2007)。特に乾癬では、HLA座の新規候補遺伝子を検出し、現在その詳細を検討しているところである。

2. 研究の目的

今回の研究は、pooled患者末梢血DNAサンプルを用いたゲノム解析により、**円形脱毛症の疾患感受性遺伝子候補領域と遺伝子を同定する**ものである。

3. 研究の方法

1) 順天堂大学医学部附属順天堂医院皮膚科では脱毛症の専門外来を設置し、多くの円形脱毛症患者の診療を行っている。特に脱毛巣が3ヶ所以上の「多発性」患者は1000名以上、略全身に脱毛巣を認める「汎発性」患者は400名以上であり、この度のゲノム解析に必要な症例を確保出来るものと思われる。

2) すでに我々は、本学倫理委員会の承認を受け、まず125例の「多発性」ないし「汎

発性」患者の同意を得てゲノム DNA サンプルを集積し、解析を開始した。方法としては、10 数例の DNA サンプルを 1 チューブに混合保存し、各マイクロサテライトマーカーを PCR にて増幅、HPLC カラムを通し、各アレルの頻度を検定する。罹患者に最も高頻度のアレルが正常対照に比較し統計学的に有意である場合を「関連あり」とする。

3) 今後計125名X2セット (250名) の DNA サンプルを集積する。

4) これらサンプルと対照の125名のDNAサンプルを用いて検討する。

5) HLA-B近傍の塩基配列と SNP を決定し、SNP による相関解析と、候補遺伝子同定を行う。

4. 研究成果

この度の研究で、我々は第6番染色体短腕 HLA 領域 HLA-B のセントロメア側近傍に強い相関を同定した (OR: 3.21) (図1, 2)。この領域をさらに詳細に解析した結果、詳細な microsatellite marker や SNP を用いて 2 megabase の領域に絞りこむことが出来た (Haida Y, Ikeda S, Takagi A, Komiyama E, Mabuchi T, Ozawa A, Kulski JK, Inoko H, Oka A. Association analysis of the HLA-C gene in Japanese alopecia areata. Immunogenetics, 2013; 65: 553-7.)。既に 50 症例における同部位のシークエンスが終了しており、1つのハプロタイプで更に強い相関を検出した (OR: 3.75) (図3)。また1つの遺伝子の中とその周囲に、エクソンとイントロンの多くの変異や多型が同定され、その幾つかは stop codon 形成や、タンパクの3次元構造を変化させる変異であった。現在この遺伝子の改変マウス作成や、患者皮膚における発現の検討を行っている。

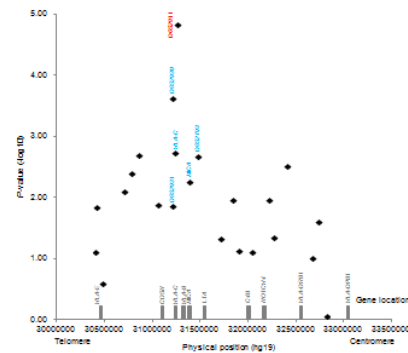
【図1】

Allelic association

HLA region	Locus	No of observed allele	Allele	Allele frequency		OR	95% CI of OR		HWE	H	P	
				Case	Control		Lower	Upper				
Class I (1.08Mb)	D6S2840	15	200	0.053	0.085	0.61	0.36	1.03	0.683	0.812	0.890	7.50E-02
	D6S2790	3	232	0.051	0.071	0.71	0.41	1.23	0.128	0.148	0.495	2.48E-01
	D6S2950	10	104	0.370	0.456	0.70	0.54	0.91	0.633	0.524	0.688	8.00E-03
	D6S2827	8	216	0.103	0.054	2.00	1.29	3.10	0.157	0.247	0.703	4.00E-03
	D6S2925	14	235	0.277	0.370	0.65	0.50	0.86	0.022	0.566	0.785	2.00E-03
	D6S2938	6	420	0.159	0.105	1.51	1.12	2.33	0.005	0.609	0.573	1.30E-02
	D6S2931	17	371	0.231	0.170	1.47	1.08	1.99	0.153	0.750	0.889	1.35E-02
	D6S2830	15	441	0.231	0.144	1.79	1.31	2.43	0.032	0.545	0.869	2.31E-04
	HLA-C	17	C*04:01	0.077	0.036	2.25	1.35	3.75	0.105	0.458	0.887	1.84E-03
	D6S2911	22	208	0.077	0.025	3.25	1.91	5.54	0.001	0.840	0.903	1.40E-05
MICA	5	A5	0.375	0.293	1.45	1.11	1.83	0.741	0.050	0.777	5.56E-03	
D6S2793	16	224	0.022	0.004	5.12	1.81	14.5	0.009	0.768	0.791	2.07E-03	
D6S2780	15	145	0.013	0.003	4.71	1.21	18.4	0.037	0.238	0.819	4.70E-02	
D6S2924	8	142	0.009	0.000	-	-	-	0.820	0.367	0.722	1.10E-02	
D6S2973	4	232	0.015	0.004	3.61	0.98	13.3	0.789	0.379	0.163	7.40E-02	
D6S2920	15	212	0.091	0.061	1.54	0.98	2.42	0.531	0.164	0.888	7.60E-02	
D6S2740	5	322	0.166	0.234	0.65	0.47	0.91	0.036	0.262	0.703	1.10E-02	
D6S2802	11	203	0.007	0.000	-	-	-	0.011	0.748	0.811	4.50E-02	
D6S2839	17	142	0.074	0.036	1.99	1.19	3.35	0.003	0.443	0.769	1.30E-02	
D6S2893	9	130	0.204	0.135	1.65	1.20	2.27	0.966	0.254	0.795	3.00E-03	
D6S2876	8	198	0.003	0.017	0.15	0.03	1.11	0.258	0.512	0.659	9.70E-02	
D6S2818	5	124	0.135	0.191	0.66	0.47	0.94	0.412	0.299	0.703	2.90E-02	
D6S2820	2	104	0.115	0.120	0.96	0.64	1.40	1.000	0.158	0.212	8.44E-01	

【図2】

Allelic association and gene location



【図3】

Haplotype analysis

Haplotype ID	Haplotype				Haplotype frequency		OR	95% CI of OR		P	
	D6S2931	D6S2920	HLA-C	MICA	Case	Control		Lower	Upper		
Hep01	371	429	C*14:02	A5	200	0.037	0.099	0.79	0.30	1.24	1.72E-01
Hep02	371	441	C*04:01	A5	200	0.081	0.018	3.76	2.01	6.88	2.23E-06
Hep03	376	450	C*14:03	A5	200	0.047	0.055	0.80	0.44	1.45	4.65E-01
Hep04	416	409	C*07:02	A5.1	200	0.040	0.047	0.81	0.43	1.52	5.06E-01
Hep05	376	422	C*05:01	A5	222	0.033	0.036	0.89	0.44	1.81	7.55E-01
Hep06	376	421	C*14:02	A5	204	0.026	0.037	0.69	0.32	1.49	2.48E-01
Hep07	399	441	C*03:02	A5	200	0.020	0.010	1.90	0.74	5.29	1.75E-01
Hep08	395	437	C*01:02	A4	204	0.016	0.046	0.33	0.14	0.81	1.51E-02
Hep09	395	437	C*01:02	A4	200	0.016	0.016	1.00	0.37	2.71	9.98E-01
Hep10	399	433	C*03:02	A5	200	0.016	0.045	3.63	1.13	11.6	2.01E-02
Hep11	379	446	C*01:02	A5	200	0.013	0.021	0.62	0.21	1.79	2.78E-01
Hep12	379	437	C*07:02	A9	202	0.013	0.0071	1.81	0.55	5.93	3.21E-01
Hep13	379	437	C*07:02	A9	216	0.013	0.0009	14.5	2.76	76.8	1.58E-03

		Allele frequency		OR	95% CI of OR		HWE	H	P		
HLA-C	Locus	Case	Control								
D6S2911	22	208	0.077	0.026	3.25	1.91	5.54	0.001	0.840	0.903	1.40E-05
MICA	5	A5	0.375	0.293	1.45	1.11	1.83	0.741	0.050	0.777	5.56E-03

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Haida Y, Ikeda S, Takagi A, Komiyama E, Mabuchi T, Ozawa A, Kulski JK, Inoko H, Oka

A. Association analysis of the HLA-C gene in Japanese alopecia areata. Immunogenetics, 2013; 65: 553-7.

[学会発表] (計1件)

1. Ikeda S, Takagi A, Komiyama E, Mabuchi T, Haida Y, Oka A, Ozawa A: An association study of alopecia areata using microsatellite markers within the major histocompatibility complex. 7th World Congress for Hair Research, 3-6, May, 2013, Edinburg, UK

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田志孝 (IKEDA SHIGAKU)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号 : 40193198