

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 4 月 24 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710191

研究課題名（和文）

生活習慣病の予防・診断および薬剤投与前の事前診断のための遺伝子解析法の開発

研究課題名（英文） Development of genetic analysis method for risk diagnosis for multifactorial disease and drug response

研究代表者

西田 奈央（NISHIDA NAO）

国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター・上級研究員

研究者番号：50456109

研究成果の概要（和文）：

個人に対応した生活習慣病の予防・診断や薬剤投与前の事前診断を目的とするSNP解析では短時間で正確な解析結果を得ることが重要となる。本研究では、DigiTag2法によるSNP解析を短時間かつ低コストで実施することを目指して、実験プロトコルの改良を行った。この結果、96か所のSNP解析結果を得るのにかかる時間は、従来のプロトコルでは約13時間を要していたが今回の改良により約7時間まで短縮することができた。

研究成果の概要（英文）：

High-throughput and highly accurate SNP typing platforms are required to perform risk diagnosis for multifactorial disease and drug response. Here, we improve the DigiTag2 assay to shorten the running time and save the running cost by applying new type of enzyme. The DigiTag2 assay enables analysis of a set of 96 SNPs using Kapa 2GFast HotStart DNA polymerase with a new protocol that has a total running time of about 7 hours, which is 6 hours shorter than the previous protocol.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：SNP・タイピング・多因子疾患・個別化医療

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初から現在まで、生活習慣病を含むさまざまな疾患について疾患感受性遺伝子を探索・特定する研究が数多く報告されている（図1中、フェーズ1およびフェーズ2）。これらのフェーズで使用されている解析プラットフォームの多くは海外資本のもの

であり、日本発の解析プラットフォームは皆無といっても過言ではない。日本人における多因子疾患の疾患感受性遺伝子を探索・特定するために、高価な海外製の解析プラットフォームを導入せざるを得ないというのが現状である。近い将来に訪れる「個人に対応した生活習慣病の予防・診断、薬剤投与前の事

前診断 (図 1 中、フェーズ 3)」を目的とした解析プラットフォームは間違いなく数年内に必要とされることから、まさに今が本課題「生活習慣病の予防・診断および薬剤投与前の事前診断のための遺伝子解析法の開発」に取り組むタイミングであるといえる。



2. 研究の目的

研究代表者が確立した DigiTag2 法は、ゲノムワイド関連分析 (GWAS) で検出された複数の疾患感受性遺伝子候補領域の中から、真の疾患感受性遺伝子を効率よく特定するのに適した遺伝子解析法である。DigiTag2 法を用いて、様々な疾患のリスク診断および薬剤投与前の事前診断を行うための遺伝子解析プラットフォームを用意することで DigiTag2 法が研究の場だけでなく臨床の場でも利用されることが期待される。しかしながら、研究の場および臨床の場で DigiTag2 法を利用していく上で、1) 初期費用の削減、2) ランニングコストの削減、3) ランニング時間の短縮、4) コンテンツの充実などが今後の課題として挙げられる。本研究においてこれらの課題を解決することで、DigiTag2 法による疾患のリスク診断・薬剤投与前の事前診断を目的とした遺伝子解析プラットフォームの利用ニーズが広がるだけでなく、全く新しい研究分野へも利用の場を広げていくことが期待される。

本研究では、初期費用にかかるコストを約 40%削減し、ランニングコストを約 75%削減することを目指す。また、新しい酵素を用いてマルチプレックス PCR にかかるランニング時間を約 50%短縮することを目指す。様々な疾患の疾患感受性遺伝子座位および薬剤応答に関与する SNP をまとめて解析することで、「個人に対応した生活習慣病の予防・診断および薬剤投与前の事前診断を目的とした遺伝子解析プラットフォーム」を開発することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) DigiTag2 法のコスト削減

DigiTag2 法の現行のプロトコルでは、1 か所の SNP を検出するために 5 本のオリゴ DNA (PCR 用プライマー 2 本、SNP 検出用プローブ 3 本) が必要となる。96 か所の SNP を解析するためには、合計 480 本のオリゴ DNA を購入するための初期費用が (ランニングコストとは別に) 必要となる。DigiTag2 法にかかる初期費用の削減を目指して、現行の 5 本/SNP の必要なオリゴ DNA 本数を 3 本/SNP で済むようにプロトコルを改良する。具体的には、現在のプロトコルで採用している **Oligonucleotide Ligation 法** から **Single base extension 法** に変更することを試みる。この改良により初期費用にかかるコストを約 40%削減することができる。また、DigiTag2 法の現行プロトコルでは同時解析 SNP 数の上限を 96SNPs としているが、384SNPs の同時解析を目指す。384SNPs の同時解析が可能となれば、ランニングコストを約 75%削減することができる。

(2) 実験プロトコルの時間短縮

現在の DigiTag2 法で時間がかかる工程は、ゲノム DNA をテンプレートとしたマルチプレックス PCR と蛍光分子を導入する工程であるラベリングである。短時間の実験プロトコルを実現するために、新しい酵素の適用を検討する。現行のプロトコルで使用している酵素、Qiagen multiplex PCR キットおよび Ex Taq polymerase に代わる酵素として、KAPA2G FAST PCR キット (KAPA) や SpeedSTAR HS DNA Polymerase (TaKaRa) といった短時間で PCR を行うことのできる酵素や Titanium Taq polymerase (Clontech) や Multiplex PCR Assay Kit (TaKaRa) などのマルチプレックス PCR に適した酵素を検討する。実験的な評価は、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した PSC 細胞株の精製ゲノム DNA を用いて、96-plex SNP タイピングを行う。ここで用いるタイピングセットはこれまでに設計したものから任意に選択する。

4. 研究成果

個人に対応した生活習慣病の予防・診断や薬剤投与前の事前診断を目的とする SNP 解析では、短時間で正確な解析結果を得ることが重要となる。本研究では、DigiTag2 法による SNP 解析を短時間かつ低コストで実施することを目指して、実験プロトコルを改良した。

従来のプロトコルでは、Qiagen multiplex PCR キット (工程: マルチプレックス PCR) および Ex Taq polymerase 酵素 (工程: ラベリング) を使用し、それぞれの工程に 5 時間 30 分、3 時間 30 分の時間がかかっていた。両工程で使用する酵素を KAPA2G FAST PCR キット (KAPA) に変えたところ、それ

ぞれの工程にかかる時間を **2 時間、1 時間 30 分に短縮**できることが明らかとなった。この結果、マルチプレックス PCR にかかる時間を 50%以上削減する目標を達成した。また、SNP 解析結果を得るためにかかる総時間についても、従来のプロトコルでは約 13 時間を要していたが、今回の改良により約 **7 時間まで短縮**することができた(図 2)(Nishida N et al. PLoS One 2012)。

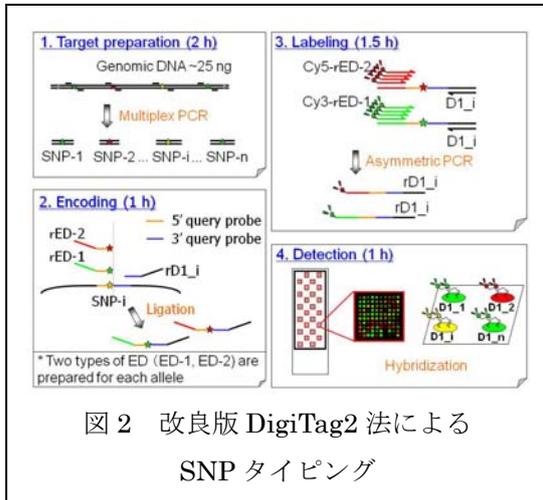


図 2 改良版 DigiTag2 法による SNP タイピング

KAPA2G FAST PCR キットを用いた SNP 解析結果(表 1a)を、従来のプロトコルによる SNP 解析結果(表 1b)と比較したところ、解析結果に大きな違いは見られなかった。合わせて、**192 か所を同時に増幅するマルチプレックス PCR**を実施し、その産物をテンプレートとした SNP タイピング結果の比較に

a) 新規プロトコル		192-plex PCR	96-plex PCR
1st set	Conversion rate	88/96 SNP	91/96 SNP
	Call rate	99.84%	99.76%
	reproducibility	(8,259/8,272 genotype)	(8,443/8,463 genotype)
	concordance	99.97%	99.99%
		(7,982/7,983 genotype)	
2nd set	Conversion rate	87/96 SNP	88/96 SNP
	Call rate	99.91%	99.83%
	reproducibility	(8,171/8,178 genotype)	(8,346/8,360 genotype)
	concordance	100%	100%
		(7,705/7,705 genotype)	
		(7,796/7,796 genotype)	
		100%	
		(8,161/8,161 genotype)	
b) 従来プロトコル		192-plex PCR	96-plex PCR
1st set	Conversion rate	86/96 SNP	86/96 SNP
	Call rate	99.84%	99.81%
	reproducibility	(7,728/7,740 genotype)	(6,695/6,708 genotype)
	concordance	99.99%	100%
		(7,288/7,289 genotype)	
		(6,121/6,121 genotype)	
		99.98%	
		(6,289/6,290 genotype)	
2nd set	Conversion rate	87/96 SNP	87/96 SNP
	Call rate	99.79%	99.79%
	reproducibility	(8,074/8,091 genotype)	(8,161/8,178 genotype)
	concordance	99.97%	99.99%
		(7,792/7,794 genotype)	
		(7,712/7,713 genotype)	
		99.97%	
		(7,882/7,884 genotype)	

表 1 SNP タイピング結果の比較

においても、新規プロトコルと従来プロトコルの間で大きな差は見られなかった(Nishida N et al. PLoS One 2012)。また、256 か所を同時に増幅した結果においても、タイピング結果に大きな差異は見られなかった(論文未報告)。目標であった 384 か所のマルチプレックス PCR は今後の課題として残ったものの、256 か所の同時増幅が可能であったことから約 60%のランニングコスト削減が現実的なものとなった。

また、タイピングコストの削減を目指して、1箇所 の SNP について 5 種のオリゴ DNA を必要とした従来のプロトコルから、3 種/SNP で済む一塩基伸長法による遺伝子型決定を試みた。一塩基伸長法に適したプローブ配列の設計パラメータを決定した。なお、プローブデザインは Visual OMP ソフトウェアを用いて実施した。4 種類の蛍光分子を使用する一塩基伸長法での SNP タイピングでは、4 種類の蛍光分子を検出する DNA アレイスキャナーを準備する必要がある。一塩基伸長法による SNP タイピングを実験的に検証することが今後の課題として残った。

これまでに DigiTag2 法を用いてヒトの様々な疾患(肝炎、2 型糖尿病など)を対象として合計 3,724 種の SNP タイピングを実施し、そのうち 3,384 種の SNP タイピングに成功した(タイピング成功率 **90.87%**)。現在も、国内外において様々な疾患を対象とした研究が進められており、GWAS 後の Replication 解析などで複数か所の SNP を対象とした解析の必要性は今後ますます高まるものと考えられる。

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 23 件)

- ① Okada Y, Nishida N, et al. (他 49 名、10 番目): Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Nature Genetics* 44 (5): 511-6, 2012. 査読有, doi: 10.1038/ng.2231.
- ② *Nishida N, Mawatari Y, et al. (他 2 名、1 番目): Highly Parallel and Short-Acting Amplification with Locus-Specific Primers to Detect Single Nucleotide

- Polymorphisms by the DigiTag2 Assay. *PLoS One* 7(1):e29967, 2012. 査読有, PMID: 22253840
- ③ Shimogiri T, Nishida N, et al. (他8名、2番目): Genetic relationships between Japanese native and commercial breeds using 70 chicken autosomal SNP genotypes by the DigiTag2 assay. *Animal Genetics* 43(1):98-103, 2012. 査読有, doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02206.x.
- ④ Hirata M, Nishida N, et al. (他14名、10番目): C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP-13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. *Human Molecular Genetics* 21(5):1111-23, 2012. 査読有, PMID: 22095691
- ⑤ Kawamura Y, Nishida N, et al. (他19名、16番目): A genome-wide CNV association study on panic disorder in a Japanese population. *Journal of Human Genetics* 56(12):852-6, 2011. 査読有, doi: 10.1038/jhg.2011.117.
- ⑥ Naka I, Nishida N, et al. (他1名、2番目): No Evidence for Strong Recent Positive Selection Favoring the 7 Repeat Allele of VNTR in the DRD4 Gene. *PLoS One* 6(8):e24410, 2011. 査読有, PMID: 21909391
- ⑦ Kurosaki M, Nishida N, et al. (他21名、20番目): Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antiviral Therapy* 16(5):685-94, 2011. 査読有, PMID: 21817190
- ⑧ Tanaka Y, Nishida N, et al. (他20名、3番目): Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Human Molecular Genetics* 20(17):3507-16, 2011. 査読有, PMID: 21659334
- ⑨ Kurotaki N, Nishida N, et al. (他8名、7番目): Identification of novel schizophrenia Loci by homozygosity mapping using DNA microarray analysis. *PLoS One* 6(5):e20589, 2011. 査読有, PMID: 21655227
- ⑩ Okamoto K, Nishida N, et al. (他12名、8番目): Common variation in GPC5 is associated with acquired nephrotic syndrome. *Nature Genetics* 43(5):459-63, 2011. 査読有, PMID: 21441931
- ⑪ Koike A, Nishida N, et al. (他2名、2番目): Comparative analysis of copy number variation detection methods and database construction. *BMC Genomics* 12:29, 2011. 査読有, PMID: 21385384
- ⑫ Sakamoto N, Nishida N, et al. (他18名、

- 7番目): Association of IL28B variants with response to pegylated-interferon alpha plus ribavirin combination therapy reveals intersubgenotypic differences between genotypes 2a and 2b. *Journal of Medical Virology* 83(5):871-8, 2011. 査読有, doi: 10.1002/jmv.22038.
- ⑬ Kurosaki M, **Nishida N**, et al. (他19名、3番目): Pre-treatment prediction of response to pegylated-interferon plus ribavirin for chronic hepatitis C using genetic polymorphism in IL28B and viral factors. *Journal of Hepatology* 54(3):439-48, 2011. 査読有, PMID: 21129805
- ⑭ Sakamoto N, **Nishida N**, et al. (他13名、10番目): ITPA gene variant protects against anemia induced by pegylated interferon- α and ribavirin therapy for Japanese patients with chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 40(11):1063-1071, 2010. 査読有, doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00741.x.
- ⑮ Adachi S, **Nishida N**, et al. (他15名、10番目): Meta-analysis of genome-wide association scans for genetic susceptibility to endometriosis in Japanese population. *Journal of Human Genetics* 55(12):816-21, 2010. 査読有, PMID: 20844546
- ⑯ Tanaka Y, **Nishida N**, et al. (他3名、2番目): lambda-Interferons and the single nucleotide polymorphisms: A milestone to tailor-made therapy for chronic hepatitis C. *Hepatology Research* 40(5): 449-460, 2010. 査読有, PMID: 20546329
- ⑰ Saito T, **Nishida N**, et al. (他12名、7番目): Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nature Medicine* 16(6): 678-686, 2010. 査読有, PMID: 20495570
- ⑱ Ridruechai C, **Nishida N**, et al. (他16名、5番目): Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis. *Genes & Immunity* 11(5): 416-22, 2010. 査読有, PMID: 20485362
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 小池麻子, **西田奈央**, 吉田真希子, 井ノ上逸朗, 辻 省次, 徳永勝士, 統合化推進プログラムにおける ヒトゲノムバリエーションデータベース, 日本 DNA 多型学会 第 20 回学術集会, 2011 年 12 月 1 日, はまぎんホールヴィアマーレ
- ② **Nishida N**, Sawai H, Sugiyama M, Matsuura K, Han K-H, Koike A, Ahn SH, Tokunaga K, Tanaka Y, Mizokami M, The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance in Japanese and Korean, Asian Pacific Association for the Study of the Liver 2012, 2012 年 2 月 19 日, Taipei
- ③ **Nishida N**, Sawai H, Mawatari Y, Y amaoka M, Koike A, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, Mizokami M, Tokunaga K, A genome-wide association study identifies the association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, International Congress of Human G

enetics 2011 (61th Annual ASHG Meeting), 2011年10月11日-15日, Montreal

- ④ **西田奈央**, 田中靖人, 澤井裕美, 杉山真也, 馬渡頼子, 提嶋恵美, 小笠原有子, 石橋良美, 馬場菜津美, 溝上雅史, 徳永勝士, B型肝炎慢性化、B型肝炎ウイルス排除を規定する HLA-DP 遺伝子の同定, 日本分子生物学会, 2011年12月14日, パシフィコ横浜
- ⑤ 馬渡頼子, 提嶋恵美, **西田奈央**, 徳永勝士, Short-acting 192-plex PCR with locus specific primers to detect single nucleotide polymorphisms by DigiTag2 assay, 日本分子生物学会, 2011年12月13日, パシフィコ横浜
- ⑥ **Nishida N**, Sawai H, Mawatari Y, Yamaoka M, Matsuura K, Tanaka Y, Sugiyama M, Ito K, Tokunaga K, Mizokami M, The association of HLA-DP locus with chronic hepatitis B and viral clearance, American Association for the study of Liver Diseases The Liver Meeting 2011, 2011年11月5日, San Fransisco
- ⑦ **Nishida N**, Genome-wide screening to identify host genetic factors for hepatitis and developing a public database "Human Genome Variation Database", 2010 Translational Research Excellence Conference, 2010年10月11日, Brisbane Convention & Exhibition Centre
- ⑧ **Nishida N**, Genome-wide association study (GWAS) opens a new approach to identify host genetic factors for multifactorial diseases, aAsian Hepatitis Forum, 2010年12月16日, Tokyo Disney Sea Hotel MIRACOSTA
- ⑨ **西田奈央**, 田中靖人, 杉山真也, 小池麻子, 提嶋恵美, 小笠原有子, 石橋良美, 柴田靖加, 溝上雅史, 徳永勝士, C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法の有効性を規定する IL28B 遺伝子の同定, 日本人類遺伝学会第55回大会, 2010年10月30日, 大宮ソニックシティ
- ⑩ **西田奈央**, 田中靖人, 杉山真也, 小池麻子, 提嶋恵美, 小笠原有子, 石橋良美, 柴田靖加, 溝上雅史, 徳永勝士, C型慢性肝炎に対するペグインターフェロン+リバビリン併用療法の有効性を規定するホスト側遺伝要因の同定, 日本分子生物学会, 2010年12月10日, 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 奈央 (Nishida Nao)
国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター・上級研究員
研究者番号: 50456109

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし