

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390251

研究課題名(和文) エクソーム解析による小児喘息発症の個別化医療と創薬のための分子標的遺伝子の探索

研究課題名(英文) Exploring rare variants associated with pediatric asthma for personalized medicine by exome analysis

研究代表者

野口 恵美子 (Noguchi, Emiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40344882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次世代シーケンサーを使用した気管支喘息のエクソーム解析により疾患発症に影響を与えるアレバリアントの同定をおこなうことを目的とした。喘息患者67名のDNAを使用してエクソーム解析を行い、Human Genetic Variation Databaseから得られた日本人集団のアレル頻度と比較した。過去の全ゲノム関連解析で検出されている喘息関連領域に存在するバリエーションについて検討したところ、IL1RL1とGSDMBのミスセンス変異が喘息と関連している可能性が示唆された。また、喘息関連遺伝子変異候補となる複数のレアバリエーションが同定された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate rare variants associated with asthma by exome analysis using next generation sequencer. We performed exome analyses on 67 patients who were diagnosed with asthma. Control genotype/allele frequencies were obtained from Human Genetic Variation Database. In the genomic regions which were identified to be associated with asthma by genome-wide association studies, we found two missense variants (one in IL1RL1 and the other in GSDMB) to be possibly associated with asthma ($P < 0.05$). We also found several candidate rare variants to be associated with asthma.

研究分野：遺伝医学 アレルギー学

キーワード：エクソーム アレルギー

1. 研究開始当初の背景

アレルギー疾患のみならず糖尿病やがんなどの多くの多因子疾患において近年全ゲノム関連解析が行われており、多くの疾患と関連する遺伝子が同定されている。しかし、多くの全ゲノム関連解析で明らかとなった遺伝子多型が実際の疾患発症に与える影響は強くなく、オッズ比にして 1.1-1.5 程度であり、その遺伝率の一部を説明するにすぎない。一方で、近年自閉症や精神遅滞、統合失調症などで複数の稀な変異(アレル頻度 1%程度)が疾患発症に強い影響を持つことが報告されている。アレルギー疾患においては皮膚の保湿成分であるフィラグリン機能喪失変異がアトピー性皮膚炎と強く関連することが知られておりオッズ比も 2 以上と疾患との関連も強い。全ゲノム関連解析や連鎖領域で同定された遺伝子領域には発症に強い影響を与える稀な遺伝子変異が存在することが示唆されている。このような疾患に強い影響を与える遺伝子の同定が今後、遺伝子をターゲットとした薬剤の開発や個別化医療等に重要である。

2. 研究の目的

本研究では次世代シーケンサーを使用した気管支喘息のエクソーム解析により疾患発症に強い影響を与える遺伝子の同定をおこない現在までのゲノム解析では達成されていない発症予測、個別化医療、分子標的薬の開発に発展させることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

喘息患者の DNA を使用してエクソーム解析を行った。シーケンシング用のライブラリ作成は SureSelect Human All Exon kit (Agilent)および Nextera Rapid Capture Exome Enrichment kit (illumina) を使用した。SOLiD5500xl (Life technologies)または illumina HiSeq (illumina) を使用してシーケンシングを行い、得られたデータを SOLiD については LifeScope Genomic Analysis Software (version 2.5.1)、illumina については Burrows-Wheeler Aligner

(BWA, Li et al, Bioinformatics, 2009) を使用してヒトゲノムリファレンス

(human_g1k_v37.fasta) にマッピングした。得られたデータを Broad Institute の Genome Analysis Tool kit (GATK) の Best Practice に準じて解析を行った。フィルタリングすみの得られたバリエーションについて、ANNOVAR (Wang et al., Nucleic Acid Res, 2010) を使用して変異の意義や各人種のアレル頻度を付加を行った。コントロールとして、自施設の in-house reference と公共データベースで利用可能である Human Genetic Variation Database (<http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/download.html>) の HGVD Release Version 1.42 の遺伝子型情報を日本人の遺伝子型コントロール頻度として利用した。シーケンシングについては Variant Quality Score Recalibration (VQSR) を適応したのちに Pass となったバリエーションのみを使用して解析を行った。コントロールにおいて頻度が 5% 以下であるバリエーションや過去の全ゲノム関連解析で関連が検出されている領域を中心に検討を行った。

4. 研究成果

喘息サンプル 67 例について解析を行った。常染色体 (1 - 22) で検出されたバリエーション数は 92359 個で、そのうち VQSR を適応したのちに Pass となったバリエーションはコントロールサンプルと合わせて 48765 個であった。さらにアミノ酸配列の変化が期待されるバリエーションは 23695 個、その中で dbSNP138 に登録すみのバリエーションは 10005 個であった。

過去の全ゲノム関連解析 (Moffatt et al, N Engl J Med 2010 等) で検出されている喘息関連領域に存在するバリエーションについて検討を行った。

2q12 領域については IL1RL1 のミスセンス変異の一つが $P < 0.01$ で関連が認められた。

5q22.1 領域については TSLP について稀なミスセンス変異が検出されている。

5q31 領域については、RAD50 に稀なミスセンス変異が検出されている。IL4 のミスセンス変異 (コントロール頻度 0.024, rs56279116) につ

いては患者のアレル頻度はコントロールとほとんど差は認められなかった ($P > 0.1$)。9q24 領域については、IL33 のスプライスサイト変異 (rs113609242) のアレル頻度が患者において低い傾向が認められたが、最近の報告 (Williams et al., Eur J Hum Genet, 2016) によると、この変異は False positive であると報告されており、今後の確認が必要であることが示唆された。

11q13.5 については LRRC32 のコントロールアレル頻度 0.03 の 3'UTR のバリエーションのアレル頻度が患者においてより高い傾向が認められた。

15q22.3 の領域については SMAD6 に稀なミスセンスバリエーションが検出された。

最も喘息との関連が示唆されている 17q12-21 領域については、GSDMB の複数のミスセンス変異が $P < 0.05$ で関連が認められている。

レアバリエーションについては、VQSR を適応したのちに Pass となり、アミノ酸配列の変化が期待されるバリエーションのうち、コントロールアレル頻度が 5% 以下のものは 14665 個、1% 以下のものは 9063 個であった。コントロールアレル頻度 5% 以下で、かつ、ナンセンス変異は 177 個、1% 以下では 124 であった。これらの候補から、さらに喘息患者に多く検出されるバリエーション (Odds ratio > 2 , P value < 0.05) で絞り込みをおこなうとコントロールアレル頻度 5% 以下では 14 個、1% 以下では 8 個のナンセンス変異が喘息と関連するレアバリエーション候補として検出された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)(全編査読あり)

1 Suzuki H., Makino Y., Nagata M., Furuta J., Enomoto H., Hirota T., Tamari M., Noguchi E. A rare variant in CYP27A1 and its association with atopic dermatitis with high serum total IgE Allergy 2016 in press

2 Yatagai Y., Hirota T., Sakamoto T., Yamada H., Masuko H., Kaneko Y., Iijima H., Naito T., Noguchi E., Tamari M., Kubo M., Takahashi A., Konno S., Makita H., Nishimura M.,

Hijikata M., Keicho N., Homma S., Taguchi Y., Azuma A., Kudoh S., Hizawa N. Variants near the HLA complex group 22 gene (HCG22) confer increased susceptibility to late-onset asthma in Japanese populations J Allergy Clin Immunol 2016. In press, DOI : 10.1016/j.jaci.2015.11.023

3 Yamada H., Masuko H., Yatagai Y., Sakamoto T., Kaneko Y., Iijima H., Naito T., Noguchi E., Konno S., Nishimura M., Hirota T., Tamari M., Hizawa N. Role of Lung Function Genes in the Development of Asthma PLoS One 2016 11;1:e0145832 DOI :

10.1371/journal.pone.0145832

4 Yamada H., Yatagai Y., Masuko H., Sakamoto T., Iijima H., Naito T., Noguchi E., Hirota T., Tamari M., Hizawa N. Heritability of pulmonary function estimated from genome-wide SNPs in healthy Japanese adults Respir Investig 2015 Mar 53;2:60-7 DOI :

10.1016/j.resinv.2014.10.004

5 Yatagai Y., Sakamoto T., Yamada H., Masuko H., Kaneko Y., Iijima H., Naito T., Noguchi E., Hirota T., Tamari M., Konno S., Nishimura M., Hizawa N. Genomewide association study identifies HAS2 as a novel susceptibility gene for adult asthma in a Japanese population Clin Exp Allergy 2014 Sep 23 DOI : 10.1111/cea.12415

6 Nanatsue K., Ninomiya T., Tsuchiya M., Tahara-Hanaoka S., Shibuya A., Masuko H., Sakamoto T., Hizawa N., Arinami T., Noguchi E. Influence of MILR1 promoter polymorphism on expression levels and the phenotype of atopy J Hum Genet 2014 Sep 59;9:480-3 DOI : 10.1038/jhg.2014.57

7 Yatagai Y., Sakamoto T., Masuko H., Kaneko Y., Yamada H., Iijima H., Naito T., Noguchi E., Hirota T., Tamari M., Imoto Y., Tokunaga T., Fujieda S., Konno S., Nishimura M., Hizawa N. Genome-Wide Association Study for Levels of Total Serum IgE Identifies HLA-C in a Japanese Population PLoS One 2013 8;12:e80941 DOI : 10.1371/journal.pone.0080941

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 野口恵美子 次世代シークエンサーを用いたゲノム解析 第64回日本アレルギー学会学術大会 2015年5月26日 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール (東京都)
2. 野口恵美子 次世代シークエンサーとアレルギー疾患:どのように使えるか? 第26回日本アレルギー学会春季大会 2014年年5月9日 国立京都国際会館(京都市)
3. 野口恵美子 アトピー性疾患の感受遺伝子探索:次世代シークエンサーの管理と今後課題 東京女子医科大学第9回 テニユアトラック教員支援セミナー 東京女子医科大学 2013年7月5日(東京都)
4. 野口恵美子 「アトピー素因ってなんだろう」~アレルギーは遺伝するの? 第30回日本難治性喘息・アレルギー疾患学会 2013年6月8日(つくば市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

野口恵美子 (Emiko Noguchi)

筑波大学・医学医療系遺伝医学・教授

研究者番号: 40344882

(2)研究分担者

岡村浩司 (Koji Okamura)

国立成育医療研究センター・システム発生再生医学研究部・室長

研究者番号: 80456194