

機関番号：30110

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590332

研究課題名 (和文)

ヒト耳垢型決定遺伝子発現マウスモデルの解析

研究課題名 (英文)

Establishment of model system including human ABCC11 transgene

研究代表者

太田 亨 (OHTA TOHRU)

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：10223835

研究成果の概要 (和文)：

ABCC11 遺伝子は耳垢型決定遺伝子であり、SNP(c.538G > A, rs17822931)により、乾型、湿型が決定される。今回、この SNP 以外の多型である、 $\Delta 27$  (27bp 欠失)の頻度を検出した。また、乳がんのエストロゲン非感受性グループと耳垢乾型の頻度の関連性を解析した。市販されているサプリメント A が、腋窩臭を抑制することを推定していたので腋窩臭官能評価をおこない、腋窩 (腋臭) を予防できることが判明した。また、ヒト ABCC11 遺伝子を含む BAC clone をマウス ES 細胞ゲノムに挿入したが、ABCC11 遺伝子発現は認められなかった。現在もマウス ES 細胞の transgene を作成中である。

研究成果の概要 (英文)：

Human earwax is a secreted material from ceruminous apocrine glands, consisting of wet and dry types. Previous analysis demonstrated a SNP (c.538G > A, rs17822931) in the ABCC11 gene is the earwax-type determinant. Body odor is sometimes one of the nervous matters for human. However, the chemical constitution for the odor was not yet clear. The human body odor is mainly discharged from apocrine glands of persons with G allele.

Curiously, rodent has genomic deletion of the full Abcc11 gene that might be evolutionally advantage to escape from enemy by means of no body odor. Thus, the mouse is a natural model system as dry type of ear wax.

Previous analysis demonstrated another polymorphism ( $\Delta 27$ ) of the ABCC11. As the first project, we detected new two people with  $\Delta 27$  from Japanese. One is a homozygote of  $\Delta 27$  and AA, the other is a heterozygote with  $\Delta 27$  and GA. The second project was how association of breast cancer with the ABCC11 polymorphism. It was possible that the dry type could be associated with reduction of frequency in the estrogen receptor negative breast cancer. We have previously found a supplement which might reduce the body odor. However, scientific evaluation had not yet performed. As the third project, we analyzed the effect of the supplement against the human axillary odor for the people with ear wax G type. We detected significant difference between the people who took the supplement against the no supplement. As the last project, we have interested if the mouse has the wet type ABCC11, how the secreted material was increased or newly discharged. The mouse cell including the ABCC11 might also useful for a study of drug resistance. We constructed the transgene including the human genomic DNA of the ABCC11. However, the adequate expression was never observed in the mouse ES cells. Now we are ongoing to generate the model system for analysis the function of the ABCC11.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 平成20年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 平成21年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 平成22年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人類遺伝学

キーワード：ABCC11、耳垢、乳がん、モデル細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト耳垢型の乾型耳垢は日本人を含めた東アジア人特有であり、その他の民族の多くは湿型優位である。近年、ゲノム解析・関連解析によって、ヒト耳垢型決定遺伝子 ABCC11 が同定され、そのタンパクコーディング部位の SNP 多型 (c.538G>A) が東アジア人の乾型表現型の原因であることが明らかになった。この解析結果によると乾型は AA ホモ接合体、湿型は GG ホモ接合体または GA ヘテロ接合体である。また、ABCC11 はアポクリン腺で発現する遺伝子であり ABCC11 蛋白 (MRP8) の乾型蛋白 (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なっていった。

この ABCC11 の SNP 多型 (c.538G>A) は exon 4 に存在するが、それ以外に exon 29 に存在する 27bp の欠失を持つ人が数例知られていた。

さらに、出産直後の初乳量の少なさと湿型耳垢型との相関も明らかとなっていた。また、湿型耳垢型と腋窩臭症との関係は両者に強い相関が示唆されている。

ほぼすべての哺乳類に耳垢は湿型であり、ヒトでもこの ABCC11 遺伝子座領域は多型の頻度が少ないことが知られている。しかし、数万年前に起こったこの乾型変異は進化上有利に働いたと思われ東アジア全体に拡散している。奇妙なことにマウスでは、Abcc11 遺伝子を含むゲノム領域が大きく欠失している。マウスにもアポクリン腺は存在するがマウスは体臭がなく、MHC を基盤とした尿臭によって個体識別を行っている。ABC11 タンパクは神経細胞にも存在することが明らかにされており、神経においても基質の輸送に関わっているようである。

ABCC11 は耳垢決定遺伝子であるが、上記のように様々な表現型に関与している重要な遺伝子である。特に薬剤耐性との関わりは東アジア人特有の薬剤量の決定などに重要な

因子であるが、輸送される基質や薬剤の全貌は明らかでない。

2. 研究の目的

一般集団における 27bp 欠失頻度の解析

ABCC11 の SNP 多型 (c.538G>A) は exon 4 に存在するが、それ以外に exon 29 に存在する 27bp の欠失が数例知られていたが、その頻度は、まだ明らかでない。今回、この 27bp の欠失の allele 頻度を検出する。

乳がん と ABCC11 A/G allele の違いにおける頻度の関連解析

乳がんは東アジア人に少なく、また乳房の大きさなどは遺伝的に、耳垢表現型と関連していると言われてきた。BRCA 遺伝子変異などで起こる家族性乳がんとは違い、薬剤非感受性の乳がんや、エストロゲン感受性乳がんなどは、とくにその可能性が高く日本では西洋人に比較してその頻度は低い。そこで、乳がん と耳垢型の関連解析をおこない、関連性があるかを確認する。

腋窩臭評価の実施

別目的で市販されているサプリメント A が、腋窩臭を著明に現象させるという減少を、体験談などにより知っていた。

今回は、このサプリメント A が、腋窩臭にどのような影響を及ぼすか、官能試験を行う。

Transgenic モデル細胞の作製とその解析

ヒト ABCC11 遺伝子の G 型の DNA コンストラクトを含む transgene を挿入させたマウス ES 細胞の作製し、ヒト ABCC11 発現が確認されたのち、マウスを作成し、マウス表現型の違い、薬剤耐性能の違いを解析する。この研究期間内には、マウス培養細胞を用いたヒト ABCC11 タンパクの適切な発現の確認をおこなう。

3. 研究の方法

#### 一般集団における 27bp 欠失頻度の解析

インフォームド・コンセントを得ている連結不可能サンプルの日本全国の高校生の爪から採取したサンプル (760 サンプル) と、ウクライナ人のサンプル (397 サンプル) を用いた。

Δ27 領域を挟む primer セットを用いて PCR により増幅し、27 塩基欠損の確認を行った。また、欠損の確認されたサンプルに対し、Δ27 の上流の SNP 型 (G/G、G/A、A/A) を決定した。

#### 乳がん ABCC11 A/G allele の違いにおける頻度の関連解析

乳がん病理検査用スライド切片を、倫理委員を経てウクライナサンプルと日本人サンプルを得た。乳がんのありなしで、ABCC11 の A allele と G allele のケースコントロール解析を行った。サンプル数は乳がんウクライナと日本人の 571 検体を解析した

#### 腋窩臭評価の実施

官能評価実施者 (試験管理者) は、パネラーに対して同一の提供者より採取したサプリメント A 投与前検体および投与後検体の腋窩臭サンプルをバイアル瓶に入れたものを同時に掲示し、どちらの腋窩臭がより強いかを判定させた。

これを 1 検体につきパネラー 1 名 1 2 回行った。パネラーは合計 3 名に対して官能評価を実施したため、一組の検体につき合計 3 6 回の官能試験を行った。なお、官能評価実施に際して、各検体の提示は、全てブラインドで行った。

#### Transgenic モデル細胞の作製とその解析

TK promoter ハイグロマイシン耐性遺伝子と SV40 polyA シグナルからなる、ハイグロマイシン耐性遺伝子カセットを、ABCC11 BAC DNA に挿入した。129/S6 マウス ES cells へ、FuGENE HD transfection reagent (Roche Diagnostics) および Neon transfection systems (Invitrogen) を用い、transgene を transfect し、マウス ESGRO complete cell culture system (Millipore) の培地を利用して ES 細胞に transfection した。BAC DNA のインサートが 150 kb を超える比較的長い BAC DNA のため、ハイグロマイシンが挿入された後の BAC DNA は、インサートの 5' 末端、中央部、3' 末端、ハイグロマイシン挿入部位の外側両側の数か所の PCR の増幅の有無によりスクリーニングし、陽性クローンを拾い上げた。陽性クローンは、feeder 細胞のない培養液で 1 週間培養後、細胞を回収し RT-PCR で発現の確認を行った。

#### 4. 研究成果

##### 一般集団における 27bp 欠失頻度の解析

スクリーニングの結果、下記の人数であった。

|       | 陽性 | 全サンプル数 |
|-------|----|--------|
| 日本    | 2  | 760    |
| ウクライナ | 0  | 397    |

Δ27 ヘテロ接合体の上流の SNP 型は、G/A であった。

もう一人は Δ27 ホモ接合体であり、その上流の SNP 型は、A/A であった。

日本の高校生のサンプルにおける Δ27 のアレル頻度は 3/1,520 (0.0020) であり、先行研究の結果 (1/668, 0.0015) との間に有意差は見られなかった。ウクライナにおけるサンプルでは Δ27 は発見されなかったが、先行研究でも欧州において Δ27 陽性サンプルは発見されており、これを裏付ける結果となった。

Δ27 の上流の SNP は G のみが確認されていたが、今回の実験では A を持つ検体が確認されたため、538G>A と Δ27 座間で組み換えが起こったと考えられた。

Δ27 が検出される民族では、A アレル頻度が比較的高い地域が多いため、Δ27 が A アレルをもつ DNA 上で起こった可能性も示唆される。

##### 乳がん ABCC11 A/G allele の違いにおける頻度の関連解析

| Population, genotype | BCa cases | Controls   | ERb positive BC | ER negative BC |
|----------------------|-----------|------------|-----------------|----------------|
| n (%)                | n (%)     | n (%)      | n (%)           |                |
| Japanese             | n=276     | n=269      | n=167           | n=83           |
| GG                   | 6 (2.2)   | 6 (2.2)    | 1 (0.6)         | 3 (3.6)        |
| GA                   | 85 (30.8) | 66 (24.5)  | 47 (28.1)       | 33 (39.8)      |
| AA                   | 185 (67)  | 197 (73.2) | 119 (71.3)      | 47 (56.6)      |
| P                    | 0.262     |            | 0.32            | 0.016          |
| A, %                 | 0.824     | 0.855      |                 |                |
| Ukrainian            | n=295     | n=264      | n=193           | n=102          |

|      |               |               |               |           |
|------|---------------|---------------|---------------|-----------|
| GG   | 208<br>(70.5) | 181<br>(68.6) | 136<br>(70.5) | 72 (70.6) |
| GA   | 82<br>(27.8)  | 80<br>(30.3)  | 53<br>(27.5)  | 29 (28.4) |
| AA   | 5 (1.7)       | 3 (1.1)       | 4<br>(2.1)    | 1 (1)     |
| P    | 0.711         |               | 0.605         | 0.929     |
| A, % | 0.156         | 0.163         |               |           |

乳がんと ABCC11 wet type との関連解析をおこなった。乳がん全体との有意差は認めなかったが、上記表のように、乳がんのエストロゲン非感受性グループは乾型の頻度が有意に低く検出された。遺伝的多型と多因子表現型の関連を結論付けるには、検体数が少なく思われるが、アポクリン腺で働く ABCC11 タンパクと、乳腺における腫瘍との関連で、今後の研究において興味深い関連が検出される可能性がある。

#### 腋窩臭評価

| 検体 E | NE  | %   | P 検定  |              |
|------|-----|-----|-------|--------------|
| 1    | 2 8 | 8   | 7 8   | p < 0. 0 5   |
| 2    | 2 9 | 7   | 8 1   | p < 0. 0 1   |
| 3    | 3 1 | 5   | 8 6   | p < 0. 0 0 1 |
| 4    | 2 7 | 9   | 7 5   | NS           |
| 5    | 2 3 | 1 3 | 6 4   | NS           |
| 計    | 1 3 | 8 4 | 2 7 7 | p < 0. 0 0 1 |

NS : Not Significant

P 検定 (Fisher の正確確率検定)

全 5 検体のデータの合計は、有効率 77% で、有意な効果 (p < 0. 001) を有することがわかった。5 種類いずれの検体においても E の選択率 (有効率) は、50% を超えていた。特に検体 1~3 では、検体単独で統計学的な有意差があり、優れた腋臭の予防または治療効果が認められた。

以上の結果から、サプリメント A を、経口的に投与することにより、腋窩 (腋臭) を予防および/または治療できることが判明した。この結果を用いて特許出願した。

#### Transgenic モデル細胞の作製とその解析

マウス ES 細胞のゲノムに挿入したのち、スクリーニング陽性細胞で、ゲノム DNA の PCR による確認では、3 クローンしか、正しくハイグロマイシン耐性遺伝子が挿入されていなかった。BAC インサートの 5' 末端、中央部、3' 末端の primer を用いたゲノム DNA の PCR では、すべて陽性に出たため、このハイグロマイシン耐性細胞クローンから、RT-PCR

を行ったが、ABCC11 の発現は認めなかった。また、長期間のスクリーニングで ES 細胞は死滅した。一部 transient な状態での発現も解析したが、ABCC11 の発現を認めなかった。これは発現調節部位もヒトゲノムのため発現調節がうまくいかないのか、組織特異的のため ES 細胞で発現しない、挿入されたコンストラクトが組み換えり異常を起こしているなどが考えられた。

耐性遺伝子の TK promoter のメチル化が早期に認められたため、より発現力のある耐性遺伝子を組み込んで、現在も ES 細胞スクリーニングしている。

#### 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 6 件)

- ① Sosonkina N, Nakashima M, Ohta T, Niikawa N, Starenki D. Down-regulation of ABCC11 protein (MRP8) in human breast cancer. *Exp Oncol*. 2011 33(1):42-6.
- ② Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC, Cook J, Yoshiura K, Matsumoto T, Matsumoto N, Miyake N, Tonoki H, Naritomi K, Kaname T, Nagai T, Ohashi H, Kurosawa K, Hou JW, Ohta T, et al. Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011 155A(7):1511-6.
- ③ Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat. Genet*. 2010 42(9): 790-793.
- ④ The Super Science High School (SSH) Consortium (S Sakai, K Imai, T Ogawa, H Iwaoka, M Ishii, S Komori, T Yoshida, H Jumonji, K Iizumi, H Ohshima, T Maeda, A Kanno, K Takahashi, H Kubota, Y Inoue, Y Takahashi, H Onoda, R Uchiyama, M Matsuda, T Akazawa, N Kawamura, T Odagiri, Y Watanabe, Y Matsumoto, S Shinoda, M Terada, M Matsuoka, C Ueno, E Ozaki, S Takaya, T Takeyama, T Hujita, K Kawakatsu, J Takemura, H Maekawa, T Doei, S Ihara, Y Sakaguchi, Y Hirota, A Shindo, H

- Araki, J Miura, T Morita, T Fujiwara, H Akiyama, S Itome, Y Tanaka, K Nakagawa, S Okamoto, S Yamamoto, T Aoyagi, T Noda, Inoue, I Hirota, K Tanaka, T Nagashima, I Koga, K Watanabe, H Kusadome, H Otsuka, T Takayama, H Miwa, A Hamakawa, K China, N Niikawa, T. Ohta, et al. nese map of the earwax gene frequency: a nation-wide collaborative study by Super Science High School (SSH) Consortium. *J Hum Genet* 54: 499-503, 2009.
- ⑤ Miyazaki K, Mapendano CK, Fuchigami Y, Kondo S, Ohta T, Kinoshita A, Tsukamoto K, Yoshiura K, Niikawa N, Kishino T: Developmentally dynamic changes of DNA methylation in the mouse *Snurf/Snrpn* gene. *Gene* 432: 97-101, 2009.
- ⑥ 太田 亨、新川詔夫 DNAメチル化と遺伝子発現制御のしくみを探る *Biophilia* 2009 5(3)11-15

[学会発表] (計8件)

- ① 日本人におけるヒト耳垢遺伝子 ABCC11 の Δ27 アリルの新たな見解. 松田律史, 山田愛子, 小野佑輔, 堀 佑輔, スタレンキディミトロ, ソソンキナ ナディア, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~10日(金), 神戸ポートアイランド, 神戸.
- ② ホールエクソンキャプチャーによる歌舞伎メーキャップ症候群の解析. 要 匡, 塚原正俊, 柳 久美子, 藤森一浩, 喜久里育也, 照屋盛実, 今田有美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友紀, 三輪有希乃, 平野 隆, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫, 成富研二. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 2010年12月7日(火)~10日(金), 神戸ポートアイランド, 神戸.
- ③ Frequency of 27-bp deletion mutation, another earwax determinant, in ABCC11 among the Japanese population. A. Yamada, Y. Hori, Y. Ono, N. Matsuda, D. Starenki, N. Sosonkina, K. Yoshiura, T. Ohta, N. Niikawa. The American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting, Washigton D.C., Baltimore, November 2-6, 2010
- ④ Discovery of a gene for Kabuki syndrome by exome sequencing and genotype-phenotype relationship in 110 cases. M.J. Bamshad. M.C. Hannibal, K.J. Buckingham, A.E. Beck, S.B. Ng, M. McMillin, H. Gildersleeve, A.W. Bigham, H.K. Tabor, K. Yoshiura, T.

- Matsumot, N. Matsumoto, H. Tonoki, K. Naritomi, T. Kaname, T. Nagai, H. Ohashi, K. Kurosawa, J. Hou, T. Ohta, et al. 本人類遺伝学会 2010年10月27日(水)-30日(土), 大宮ソニックシティー, 大宮
- ⑤ 日本人におけるヒト耳垢遺伝子 ABCC11 の Δ27 アリル頻度. 山田愛子, 堀 佑輔, 小野佑輔, 松田律史, ストランキー デイマ, ソソンキナ ナディア, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 太田 亨. 第55回日本人類遺伝学会 2010年10月27日(水)-30日(土), 大宮ソニックシティー, 大宮
- ⑥ 歌舞伎メーキャップ症候群のエクソーム解析. 要 匡, 塚原正俊, 柳 久美子, 藤森一浩, 喜久里育也, 照屋盛実, 今田有美, 鼠尾まい子, 矢野修一, 佐藤友紀, 三輪有希乃, 平野 隆, 吉浦孝一郎, 太田 亨, 新川詔夫, 成富研二. 第55回日本人類遺伝学会 2010年10月27日(水)-30日(土), 大宮ソニックシティー, 大宮
- ⑦ ABCC11 expression and 538G/A polymorphism in human breast cancer. Sosonkina Nadiya, Starenki Dmytro, 太田 亨, 吉浦孝一郎, 新川詔夫. 第55回日本人類遺伝学会 2010年10月27日(水)-30日(土), 大宮ソニックシティー, 大宮
- ⑧ DNA array-based copy number analysis in chorionic cillus samples (CVS) of spontaneous abortions with normal karyotypes. Yamada T, Ohra T, et al. The American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting, Honolulu, Hawaii, October 20-27, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 体臭抑制剤

発明者: 長田和実、新川詔夫、太田亨

権利者: (特許出願人) 学校法人東  
日本学園北海道医療大学

番号: 特願 2012-016299

出願年月日: 平成24年1月30日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 亨 (OHTA TOHRU)

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: 10223835

(2) 研究分担者

及川 恒之 (OIKAWA TSUNYUKI)

北海道医療大学・心理科学部・教授

研究者番号: 80150241

(3) 研究分担者

長田 和実 (Osada Kazumi)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：00382490

(4)研究分担者

山田 崇弘 (Yamada Takahiro)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：20419948