

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500503

研究課題名(和文)創薬研究推進のためのカニクイザル薬剤代謝遺伝子多型情報収集とその活用システム開発

研究課題名(英文) Exome sequencing of drug-metabolizing enzyme and transporter (DMET) genes and immune related genes in cynomolgus macaque.

研究代表者

鈴木 進悟 (SUZUKI, Shingo)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：30589776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナム産とフィリピン産のカニクイザル、各 15 個体について 259 個の薬剤代謝関連遺伝子における遺伝子多型情報を収集した。その結果、ベトナム産とフィリピン産に 767 個と 553 個の非同義置換をそれぞれ検出し、それらの内 188 個は両産地共通に検出された。一方、ある感染症に対して表現型の異なる 2 群、計 10 個体について、430 個の免疫関連遺伝子における多型解析を実施した結果、2 群を分けることのできる 4 個の非同義置換を検出した。したがって、アカゲザルのゲノム情報に基づいて、カニクイザルにおける薬物代謝関連ならびに応答関連遺伝子の多型情報を高効率かつ短期間に収集する技術の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：The cynomolgus macaque has emerged as an important experimental animal model. Here we tried to develop the detection method for encompassing SNPs of the protein-coding region (exomes) of cynomolgus macaque by next-generation sequencer. The DNA fragments encoding exomes were extracted by SeqCap EZ, and the nucleotide sequences were determined by IonPGM. (1) DMET genes: SNP information was extracted by mapping the sequences into rhesus macaque genome sequence (RheMac2). From this procedure, 767 and 553 non-synonymous substitutions were detected in 15 Vietnam and 15 Philippine animals, respectively. Of them, 187 non-synonymous SNPs were detected in both populations. (2) Immune related genes: SNP information was extracted by mapping the sequences into RheMac2 and human genome sequence. As a result of analysis, we identified four candidate SNPs which divided into phenotype A and B. These findings will provide for construction of SNP database and the typing system in cynomolgus macaques.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：カニクイザル 次世代シーケンサー 薬剤代謝遺伝子 免疫関連遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳綱霊長目オナガザル科マカク属に属するカニクイザルやアカゲザルは形態(目、指紋、掌紋、内蔵及び歯式等)、生理(内分泌及び代謝等)、知能ならびに疾患等においてヒトとの間に類似性または近似性が認められ、ヒトに最も近縁な実験動物の一種として、国内外問わず種々の生物医学研究に頻りに利用されている。H1型新型ブタインフルエンザウィルスはヒトと類似した病理学的所見を示すこと、ヒトの免疫関連分子に対する抗体の70%程度がカニクイザルの分子と交差反応を示すなどの免疫学的類似性を示すことが報告されている。マカク属サルのうち、カニクイザルはアカゲザルよりも小型なことから飼育スペースや飼育費用の面から飼育しやすく季節繁殖性がないこと、発生工学的手法を活用した室内計画的人工繁殖技術の開発により、マウスやラット並みの微生物学的統御や環境学的統御がなされつつある。5年前では不可能と考えられていた特定遺伝要因を有する大量繁殖コロニーの作製が現実味を帯びてきた。さらに、iPS細胞樹立とそれに基づく再生医療研究や移植研究、さらにはマームセット同様に遺伝子改変動物技術の開発が精力的に進められていることから、カニクイザルにおける生物医学研究は今後も加速的に進展することが有望視されている。したがって、アメリカではアカゲザルからカニクイザルへの大規模な移行を進めており、最近では年間3万2千頭を輸入している。日本国においても輸入個体数が毎年増加しており、年間7~8千頭のカニクイザルを輸入していることから、その単価の高騰により入手が困難になりつつある。ところが、カニクイザルはこのような高い資質、需要、将来性を有し、種々の生物医学研究に活用されているが、その生物医学研究基盤を圧倒的に弱めている唯一の問題点は遺伝子多型情報に基づく遺伝学的統御が全般的に考慮されていないことである。一般的に遺伝学的統御は近交退化を防ぎ、遺伝的多様性を維持する計画的交配を示すが、動物実験の精度と再現性を高めるためには、微生物学的統御や環境学的統御とともに遺伝子多型情報に基づく高い遺伝子構成の同一性、すなわち遺伝学的統御が求められる。例えば、再生医療分野におけるiPS細胞の移植実験のためには、移植関連遺伝子群の均質な個体特定とその系統化が必要となる。疾患や感染症モデルの安定供給のためには、原因となる多型特定とその多型に基づく系統化が必要である。新薬の安全性評価のためには、試験前に薬剤代謝関連遺伝子多型における個体スクリーニングが優れた戦略であろう。いずれの場合も遺伝子多型を考慮した生物医学研究実施の必要性は国内外から熱望されており、今後もさらなる必要性に迫られることに疑う余地はない。したがって、より精度と再現性の高い

生物医学研究を推進するためには、主要産地における網羅的な遺伝子多型情報の収集、その情報を生物医学研究に活用するシステムの構築こそが解決されるべき急務の課題である。このような観点から、申請者グループでは10年前より科学研究費特定領域研究、萌芽研究、基盤研究(B)ならびに関連研究機関との共同研究を通じて、カニクイザルの主要組織適合遺伝子複合体(Major Histocompatibility Complex; MHC)遺伝子の多型解析法の開発、多型検出と集団遺伝学的解析を約1,000頭規模にて実施し、その後の移植研究やワクチン開発などの生物医学研究を急速に進展させてきた実績を持つ。一方、従来の遺伝子多型を網羅的に収集する手法は大規模な解析環境が必要であり現実的ではなかったが、近年、遺伝子のタンパク質翻訳エクソンの多型解析を次世代シーケンシングにて収集する画期的な方法(exome解析)が開発され、申請者らは直ちにその先行実験に取り組み、カニクイザルにおけるその技術の確立に成功した。exomeとはゲノムにおける全てのcoding exon(ヒトゲノムではおよそ180,000のexon)、すなわちゲノムの全タンパク質翻訳領域を示す言葉であり、その総長は38Mb程度(ヒトゲノムの約1%に相当)である。ところが、ヒトゲノムの1%程度の占有率にも拘わらず、exomeの多型は疾患原因の約85%を説明しうる報告がある。実際に2010年以降、exome解析による疾患関連遺伝子の探索により、いくつかの疾患関連遺伝子が発見されている。このexome解析は全ゲノム配列決定法ならびにGWASに代表される全ゲノム相関解析よりも比較的安価、かつ小規模な解析環境にて疾患原因究明に役立つと期待されている。このような学術的背景より申請者はヒトで行われているexome解析をカニクイザルへ応用することにより、薬剤代謝関連遺伝子における網羅的な多型情報を迅速かつ簡便に収集出来ると考えた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、「創薬研究推進のためのカニクイザル薬剤代謝遺伝子多型情報収集とその活用システムの開発」と題し、アメリカ食品医薬品局(FDA)にて評価されており、かつ創薬研究に興味深い260個の薬剤代謝遺伝子ならびにある疾患のパスウェイ上に存在する430個の免疫関連遺伝子に焦点を絞り、それらタンパク質翻訳エクソン(exome)の網羅的な遺伝子多型情報を最新の次世代シーケンシング技術により収集し、その多型情報のデータベース化、ジェノタイプングシステムを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)ゲノムDNAサンプルの収集、(2)259個の薬剤代謝遺伝子ならびに430個の免疫関連遺伝子における塩基配列情報の抽出、(3)

その情報に基づくシーケンスキャプチャアレイの設計とそれを用いた DNA 断片の回収、(4) 次世代シーケンサーによる塩基配列の決定、(5) 多型データベースの開発による多型検出を計画した。

#### (1) ゲノム DNA サンプルの収集

薬剤代謝遺伝子の解析に付いては、滋賀医科大学動物生命科学研究センター、株式会社イナリサーチより供与されたベトナム産とフィリピン産のカニクイザルそれぞれ 15 頭、免疫応答関連遺伝子解析については、ある感染症に対して異なる表現型を示す 2 群 (A 群および B 群) のカニクイザルから、それぞれ 5 個体ずつの合計 10 頭、計 45 頭の末梢血由来ゲノム DNA を供試した。

#### (2) 薬剤代謝遺伝子および免疫関連遺伝子における塩基配列情報の抽出法

アメリカ食品医薬品局 (FDA) にて評価されている 214 個の薬物代謝酵素、輸送タンパク、受容体などの薬剤代謝遺伝子や、文献情報から興味深い 45 個の薬剤代謝遺伝子、合計 259 個の遺伝子、2,569 個のエクソンならびに、ある感染症のパスウェイ上に存在する 430 個の免疫関連遺伝子、3,883 個のエクソンについての塩基配列情報をアカゲザルゲノム配列 (MGSC Merged 1.0/rheMac2) ならびにヒトゲノム配列 (hg19) より抽出した。

#### (3) シーケンスキャプチャアレイの設計と DNA 断片の回収法

NimbleGen 社のカスタムシーケンスキャプチャアレイを用いた。すなわち、本章項目(2)の塩基配列情報を用いて、標的のタンパク質翻訳エクソンの DNA 断片をキャプチャしうるプローブ配列をデザインした後、そのプローブ配列が搭載されたアレイを作製した。そのアレイを用いて標的遺伝子の DNA 断片を網羅的に回収した。DNA サンプルには、キャプチャ前にマルチプレックス法にて処理し、複数検体を混合した DNA を用いることによりコストダウンを図った。

#### (4) 次世代シーケンサーによる塩基配列の決定

回収した DNA 断片を用いて次世代シーケンサー (IonPGM) のプロトコールにしたがい塩基配列を決定した。得られた塩基配列を GS Reference Mapper (Roche) を用いてアカゲザルゲノム配 (MGSC Merged 1.0/rheMac2) ならびにヒトゲノム配列 (hg19) にマッピングした。

#### (5) 多型データベースの開発

各個体より得られた多型について多型のある染色体上の位置、エクソン番号、多型部位の厚み (Depth) Depth に対する多型の頻度、同義あるいは非同義置換の分類を盛り込み、データベース化することにより多型を検出した。その際、Depth に対する多型の頻度が 0.2~0.8 を示し、2 個体間以上に観察される塩基置換を多型と定義付けた。

#### 4. 研究成果

薬物の吸収、輸送、代謝および排泄に関連する 259 個の薬剤代謝関連遺伝子、2,569 個のエクソンにおける DNA 断片の回収および次世代シーケンシング技術を用いて、ベトナム産とフィリピン産のカニクイザル、それぞれ 15 頭における遺伝子多型情報を収集した。合計 30 頭の IonPGM によるシーケンスの結果、平均リード長 174 bp、総データ量 3.4Gb、各検体の平均 Depth= 31.1~139.9 の塩基配列を決定した。この塩基配列データをアカゲザルゲノム配列 (MGSC Merged 1.0/rheMac2) へマッピングすることにより塩基置換を抽出した。その結果、ベトナム産とフィリピン産からそれぞれ 7,233 個および 4,143 個の塩基置換を検出し、その内、非同義置換数は 767 個および 553 個であった。また、ベトナム産およびフィリピン産に特異的な非同義置換はそれぞれ、580 個および 366 個であり、両産地間に共通するものは 187 個であった。さらに、dbSNP に登録されているヒトの SNP 情報を用いて、得られた非同義置換の進化学的保存性を精査した。その結果、ベトナム産に検出された 26 個 (25 個の遺伝子) ならびにフィリピン産に観察された 22 個 (19 個の遺伝子) はヒトにも検出されている非同義置換であった。とりわけ、それらの内の 6 個 (6 個の遺伝子; CYP2C8, CYP2C18, CYP2A23, EPHX2, SULT1A2, TPMT) はヒトとカニクイザルに保存されている共通なものであった。

一方、430 個の免疫関連遺伝子、3,883 個のエクソンにおける DNA 断片の回収および次世代シーケンシング技術を用いた、ある感染症に対して異なる表現型を示す 2 群 (A 群および B 群) の各 5 頭の計 10 頭におけるシーケンスの結果、平均リード長 129 bp、総データ量 3.1Gb、各検体の平均 Depth= 100.1~140.2 の塩基配列を決定した。この塩基配列データをアカゲザルゲノム配列 (MGSC Merged 1.0/rheMac2) ならびにヒトゲノム配列 (hg19) へマッピングすることにより塩基置換を抽出した。その結果、カニクイザル 1 頭における塩基置換数は平均で 34,566 個であり、同義置換数および非同義置換数の平均は、それぞれ、5,506 個および 8,983 個であった。さらに、表現型 A 群および B 群と関連する変異を 1 個 および 3 個検出し、得られた 4 個の変異について、多検体を用いたサンガー法による検証の結果、表現型と矛盾なく変異を有していることを確認した。

従って、アカゲザルのゲノム情報に基づいて、カニクイザルにおける薬物代謝関連遺伝子群ならびに免疫関連遺伝子の多型情報を高効率かつ短期間に収集する技術を開発すると共に、多型情報解析パイプラインの確立に成功したことから、特定の遺伝子群に焦点を絞った遺伝子多型解析は比較的安価かつ小規模な解析環境で遺伝子多型の収集に役立つことが期待される。

## 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 1件)

Blancher A, Aarnink A, Yamada Y, Tanaka K, Yamanaka H, Shiina T. Study of MHC classII region polymorphism in the Filipino cynomolgus macaque population. *Immunogenetics*, 査読有り, 66, 2014, 219-230

〔学会発表〕(計 2件)

鈴木進悟、榎屋安里、尾崎有紀、猪子英俊、椎名隆、エクソームシーケンズ法によるカニクイザル感染症・免疫関連遺伝子の多型解析、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸ポートアイランド

鈴木進悟、小田部耕二、坂本憲吾、倉田昌明、野村護、山中久、中川博司、太田正穂、猪子英俊、椎名隆、次世代シーケンサーを用いたカニクイザルにおける薬物代謝関連遺伝子内 SNP 検出、第58回日本実験動物学会総会、2011年05月27日、タワーホール船堀

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等：無し

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 進悟 (SUZUKI, Shingo)  
東海大学・医学部・特定研究員  
研究者番号：30589776

### (2)研究分担者

椎名 隆 (SHIINA, Takashi)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：00317744

### (3)連携研究者

尾崎 有紀 (OZAKI, Yuki)  
東海大学・医学部・特定研究員  
研究者番号：80636118