

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460894

研究課題名(和文)ハプトグロビン血中濃度に関する遺伝子多型の検索

研究課題名(英文) Searching of genetic polymorphisms affecting the serum haptoglobin concentration.

研究代表者

神田 芳郎 (Koda, Yoshiro)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90231307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ハプトグロビン(HP)は、肝臓で作られ、遊離ヘモグロビンに結合しヘモグロビンの喪失を防ぎ、その毒性を中和する機能を有する血清蛋白である。本研究では、病態による変動以外に個人差が存在することが知られており、この個人差を説明する遺伝的背景を解明することを目的とし、様々な集団を対象とし解析を行った結果、2つのSNPs、rs5472とrs2000999、HP欠失アリル(HPdel)のそれぞれが濃度に影響することを示した。さらに、輸血副作用原因遺伝子であるHPdelの生成年代を推定するためにシーケンス解析をおこない、比較的最近生じた可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Haptoglobin (HP) is produced by the liver and it bind to free hemoglobin to prevent the loss of hemoglobin and neutralize the adverse physiologic effects of it. It is known that the serum HP concentration is influenced not only by various diseases or physical conditions but individual variability. In this study, we performed association study on various populations to explain the individual variability. Accordingly, 2 SNPs, rs5472 and rs2000999, and HP deletion allele, HPdel, independently influenced the serum HP concentration. In addition, we estimated the generation time of the HPdel by sequence analysis of the region flanking the junctions to be relatively recent because no substations in the analyzed sequence.

研究分野：法医学、人類遺伝学

キーワード：ハプトグロビン 血中濃度 遺伝子多型 関連解析 アリルの生成年代

1. 研究開始当初の背景

(1) ハプトグロビン (HP とする) は、主に肝臓で合成される急性期蛋白で、溶血あるいは赤血球の代謝により放出された遊離ヘモグロビンに結合し、遊離ヘモグロビンが発揮する酸化障害を含む様々な生理学的な影響を中和する機能を有する血清蛋白であると理解されている。

3 つの主要なサブタイプ HP1-1, HP2-1, HP2-2 は common 多型とよばれ、HP 遺伝子の 2 つの共優性アリルである HP1 と HP2 の産物で、HP1 の遺伝子頻度には集団間に差が認められる。

血清の HP 濃度は、感染症、悪性腫瘍、自己免疫疾患、あるいは組織壊死などの様々な病態を反映し変化することが知られている。たとえば、炎症で 200~500%増加し、溶血、無効造血、肝疾患、妊娠後期には減少する。

(2) 一方、血清 HP 濃度には病態に関与しない個人差も存在する。性別、年齢、喫煙、ヘモグロビン濃度は HP 濃度に相関することが示されているが、これらに加え、遺伝的な因子が影響していることも報告されている。まず、集団によって結果は異なるものの、3 つの common 多型間で異なることが分かっている。また、我々は、日本人集団で、HP 欠失アリル (HP^{del}) のホモ接合体は、HP 蛋白が全く作られないため無 HP 血症を呈し、さらに輸血による重篤な副作用であるアナフィラキシーショックを来しうること、HP1 あるいは HP2 とのヘテロ接合体は低 HP 血症になり得ることを示した。また、ヨーロッパ人集団を対象としたゲノムワイド関連解析 (GWAS) の結果、HP 関連遺伝子のイントロン 2 の一塩基多型 (SNPs) である rs2000999 が血清 HP レベルに強い相関を示すことが報告された。

プロモーター多型で HP の発現に影響する多型としては転写開始点から 61 塩基上流の SNPs が知られているが、分布がアフリカ人とヒスパニック系集団に限られる。さらに、日本人の去勢抵抗性前立腺がんの短期間生存グループの末梢血単核細胞で 55 位の SNPs (rs5472) が HP の発現量と相関することを示されている。

これらの多型と HP 濃度との関係を 1 つの集団で調べた報告は存在しなかったことから、日本人集団の HP^{del} のヘテロ接合サンプルを用いた解析をおこない、それぞれの多型が HP 濃度に影響することをより鮮明に示すことが出来た。また、HP^{del} のヘテロ接合群では HP^{del} を持たない群に比べ有意に HP 濃度が低い結果が得られた。

2. 研究の目的

上記のように、我々は日本人集団で HP common 多型、rs2000999、rs5472 更に HP^{del} が HP 濃度に影響することを示した。本研究では、日本人以外の集団でも同様の結果が得られるのか、さらに、これらの多型以外に HP 濃度に影響する多型を探索しヒト個体間に存在する血中 HP 濃度の差異を説明する遺伝的背景、さらに HP 濃度に影響する多型に自然選択は働いているのか、東アジアと東南アジアに分布する HP^{del} はいつぐらいに生成したのか、を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画の内容は、実施に先立ち、Health Sciences University of Mongolia、自治医科大学、University of Ghana Medical School、愛媛大学及び久留米大学の各倫理委員会へ実施計画を提出し、承認を得た。

(1) モンゴル人集団における、血中 HP 濃度と遺伝子多型の関連解析

試料

HP common 多型及び HP^{del} の zygosity を既に決定していたモンゴル人 927 人の血漿及びゲノム DNA

血中 HP 濃度の測定

100 倍、5000 倍、20000 倍に希釈した血漿を試料とし、sandwich ELISA 法を用いて血中 HP 濃度の定量検査をおこなった。実験は duplicate でおこなった。

多型解析

ゲノム DNA を鋳型とし rs2000999 と rs5472 の遺伝子型判定は TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR 法でおこなった。

統計解析

JMP® 10.0.0 でおこない、DnaSP version

5.10 を用い連鎖解析を実施した。性別、年齢、BMI で補正あるいは共変量とした。

(2) 血清 HP 濃度に関与する遺伝子多型に働く自然選択の可能性

試料

ランダムに選択した日本人 47 人、アメリカ在住のヨーロッパ人 48 人、ガーナ人 48 人のゲノム DNA

多型解析

HP 遺伝子の転写開始点の 238 bp から 1543 bp の 1781 bp を PCR 増幅し、サンガー法により塩基配列を同定した。

ハプロタイプの推定と中立性の検定

ハプロタイプの推定には PHASE version 2.1、中立性の検定には DnaSP version 5.10.1 を利用した。Fu and Li's test で outgroup として用いたチンパンジーの配列は、public database から引用した

(<http://asia.ensembl.org/index.html?redirect=no>)。

(3) ベトナム人集団における HP^{del} の遺伝子頻度の推定

試料

ベトナム紅河デルタ地区 (Hoa Hau, Liem Thuan, Thanh Vanh, Thach Hoa, Son Dong, Van Phuc) に居住する 293 名のゲノム DNA

多型解析

HP common 多型と HP^{del} の同時検出は、TaqMan probe 法に基づく、HP² に特異的な配列とコントロール配列 (HP のエクソン 1 の 5' 領域) の比較 Ct 法によりおこなった。

(4) 新たな遺伝子欠失アリルの探索

試料

HapMap project の database で HP 遺伝子欠失が疑われた Yoruba 人サンプルのゲノム DNA (Coriell Institute から購入)

遺伝子欠失の探索

欠失点近傍約 1.5 kb を増幅するプライマーセットを作成し PCR をおこなった。

(5) ガーナ人集団における、血中 HP 濃度と遺伝子多型の関連解析

HP common 多型及び rs5472 を既に決定し

ていたガーナ人 121 人の血漿及びゲノム DNA

血中 HP 濃度の測定

100 倍、5000 倍、20000 倍に希釈した血漿を試料とし、sandwich ELISA 法を用いて血中 HP 濃度の定量検査をおこなった。実験は duplicate でおこなった。

多型解析

ゲノム DNA を鋳型としリアルタイム PCR 法で rs2000999 の遺伝子型判定をおこなった。

統計解析

Microsoft Excel 2010 でおこなった。

(6) rs2000999 近傍 3 kb あるいは 0.3 kb のエンハンサー活性についての解析

試料

rs2000999 の遺伝子型が分かっている日本人のゲノム DNA

クローニング

PCR 産物を pUC118 ベクターに組み込み、得られたクローンのシーケンスを確認後、HP 遺伝子の minimum promoter (rs5472 を含む) を有するプロモーターレポーターコンストラクト pGL3 の、プロモーターの上流に挿入した。

転写活性のアッセイ

lipofection 法により肝臓細胞株 HepG2 と Huh-7 に pGL3 コンストラクトを導入し、2 日後細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

(7) HP^{del} の生成年代の推定

試料

中国人 16、韓国人 6、インドネシア人 2、モンゴル人 17、日本人 207 (秋田 4、沖縄 6、福岡 197) のヘテロ接合体、日本人ホモ接合体 1

シーケンス解析

合計 250 の HP^{del} アリルについて、欠失点周囲の 926 bp を PCR 増幅し、サンガー法により塩基配列を同定した。

4. 研究成果

(1) モンゴル人集団における、血中 HP 濃度と遺伝子多型の関連解析

遺伝的にヨーロッパ人の影響を受けている

モンゴル人集団で、HP common 多型、rs5472 と rs2000999 は、いずれも Hardy-Weinberg の平衡にあった。交絡因子を考慮した関連解析の結果、common 多型間、HP/HP と HP/HP^{del} では、いずれにも血中 HP 濃度に有意な差があることがわかった。rs5472 と rs2000999 はマイナーアレルの数が多いほど HP 濃度が低く、HP common 多型はヘテロで最も高かった。さらに、common 多型、rs5472 と rs2000999 は、性別、総コレステロールとともに HP 濃度の予測に有効な説明変数であることが示された。

(rs5472- HP common 多型-rs2000999) からなるハプロタイプを調べると、G-2-A はアレル数に依存して HP 濃度が減少し、A-1-G は増加する。2 つハプロタイプのセットで、rs5472 が G の方が A より HP 濃度が低いと言う結果が得られた。一方、rs2000999 については、サンプル数が少なく同様の比較ができなかった。

以上のことから、モンゴル人集団では、HP common 多型、rs5472、rs2000999 の 3 多型は、年齢と総コレステロールとともに、HP 量に影響すること、rs2000999 の効果については検討出来なかったが、rs5472 そのもの、あるいは連鎖する別の多型が HP 量に影響する可能性が示唆された。

(2) 血清ハプトグロビン濃度に関与する遺伝子多型に働く自然選択の可能性

日本人、アメリカ在住ヨーロッパ人、ガーナ人の 3 集団、286 染色体で HP 遺伝子の 1781 bp の配列を決定した。全体では、6 つのシングルトン (1 染色体のみで認められる多型) を含む 23 の SNPs を同定した。各集団について調べた結果、シングルトンの数はヨーロッパ人で最も多かった (5 SNPs)。塩基多様性の指標である π と、多型数から算出される多型サイトの割合を示す w/site を算出すると、 π はガーナ人集団、 w/site はヨーロッパ人集団で最も高い値を示した。この領域の多型のあり方が、中立性に従うのか、もしくは自然選択が関与しているのかについて検定をおこなった。全体、あるいはそれぞれの集団で、3 つの検定をおこなった結果、日本人集団では、Tajima's D と Fu and Li's F の

2 つの検定で有意に中立性が棄却された。また、ガーナ人集団では、Tajima's D の結果の p 値が、 $0.05 < p < 0.1$ であり、人口動態を考慮したシミュレーションでは有意な結果が得られた。

日本人集団では 2 つの検定で有意に中立性が棄却された。ガーナ人集団の Tajima's D の結果は marginal であったものの、同検定は集団構造の変化にも影響を受けることが知られており人口拡大 (population expansion) のシナリオを考慮すると有意に中立性が棄却され、この領域には自然選択 (平衡選択) が作用し多型が維持されている可能性が考えられる。

最近、HP の common 多型である HP1 と HP2 が自然選択を受けて維持されているという報告がなされたが、自然選択の対象は、common 多型ではなく、むしろ血清 HP 量に影響する多型あるいはハプロタイプかもしれない。今後、詳細な解析をおこない血清 HP 量に影響する多型の同定ならびに HP 遺伝子の進化や多型維持のメカニズムについて知見を得たいと考えている。

(3) ベトナム人集団における HP^{del} の遺伝子頻度の推定

HP 遺伝子型の頻度は Hardy-Weinberg の平衡状態にあり、HP¹ の頻度は、地理的に近い他集団 (0.294) に近かった。一方、HP^{del} は 0.02 でこれまでの調査で想像される地理的分布に矛盾しない結果であった。

(4) 新たな遺伝子欠失アレルの探索

database 上で遺伝子欠失が疑われた Yoluba 人 DNA で欠失点近傍約 1.5 kb の増幅は認められなかった。

(5) ガーナ人集団における、血中 HP 濃度と遺伝子多型の関連解析

rs2000999 の頻度は低く (3.3%)、交絡因子の影響は調べられなかったものの、他の集団と同様、A アレルを有する方が低濃度になることが示唆された (平均値 G/G 130 mg/dl, A/G 70 mg/dl)。

(6) rs2000999 近傍 3 kb あるいは 0.3 kb

のエンハンサー活性についての解析

rs2000999 を含む長さの異なる領域がエンハンサー活性を有するのかどうか、その活性は多型によって異なるのかどうかを調べるために、HP プロモーターの上流に繋いだコンストラクトのルシフェラーゼ活性の比較を行った結果、3 kb に認められたエンハンサー活性は 0.3 kb では消失した。しかしながら、多型間でそのエンハンサー活性に差異は認められなかった。この結果から、活性の発揮には rs2000999 そのものは重要では無く 3 kb のうち rs2000999 を含まない他の領域が必要であることが示唆された。

(7) HP^{del}の生成年代の推定

今回調べた領域には全く多型が検出されなかった。すなわち、プライマーを除いた 873 bp × 250 アリル=218,250 bp に変異が 1 個も入っていない。一方、チンパンジーの相同領域の塩基配列と比較したところ、塩基置換が 6 か所に認められたことから、ヒトとチンパンジーが分岐した年代を 650 万年前であると仮定すると、遺伝子置換速度は 5.3×10^{-10} /サイト/年と推定される。したがって HP^{del} は最尤法で 8700 年以内に生成されたものと推定され、比較的最近生じたものと考えられる。今後、より広い領域について解析をおこない、HP^{del} が生じた年代を推定する予定である。

<引用文献>

Carter K. et al., Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol*, 29: 92-110, 2007

Koda Y. et al., The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaptoalbuminemia. *Am J Hum Genet*, 62: 245-252, 1998

Soejima M. et al., Genetic factors associated with serum haptoglobin level in a Japanese population. *Clin Chim Acta*. 433: 54-57, 2014

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Araki H, Pang X, Komatsu N, Soejima M, Miyata N, Takaki M, Muta S, Sasada T, Noguchi M, Koda Y, Itoh K, Kuhara S, Tashiro K. Haptoglobin promoter polymorphism rs5472 as a prognostic biomarker for peptide vaccine efficacy in castration-resistant prostate cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 査読有, 64, 1565-1573, 2015. doi: 10.1007/s00262-015-1756-7.

Soejima M, Agusa T, Iwata H, Fujihara J, Kunito T, Takeshita H, Lan VT, Minh TB, Takahashi S, Trang PT, Viet PH, Tanabe S, Koda Y. Haptoglobin genotyping of Vietnamese: global distribution of HP del, complete deletion allele of the HP gene. *Leg Med (Tokyo)*. 査読有, 17, 14-16, 2015. doi: 10.1016/j.legalmed.2014.08.004.

[学会発表](計8件)

副島美貴子、ハプトグロビン欠失アリルはいつ生じたか?、第101次日本法医学会学術全国集会、2017年6月8日~9日、長良川国際会議場、岐阜県岐阜市

副島美貴子、血清ハプトグロビン濃度に関する遺伝子多型に働く自然選択の可能性、第99次日本法医学会学術全国集会、2015年6月10日~12日、高知市文化プラザ かるぼーと、高知県高知市
副島美貴子、ベトナム人のハプトグロビン(HP)多型解析とHP欠失アリルHP^{del}の地理的分布、日本DNA多型学会第23回学術集会、2014年11月27日~28日、愛知県産業労働センターウインクあいち、愛知県名古屋市

副島美貴子、モンゴル人の血中ハプトグロビン濃度に影響する遺伝因子について、第64回日本法医学会学術九州地方集会、2014年10月10日~11日、鹿児島県市町村自治会館(鹿児島県鹿児島市)

[図書](計2件)

神田芳郎、医歯薬出版株式会社、倫理とは何か - 人を対象とした医学研究倫理について、2016年、113ページ

神田芳郎、医歯薬出版株式会社、研究の公正性、信頼性を確保するために - 利益相反について、2016年、95ページ

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/foren/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 芳郎 (KODA Yoshiro)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：90231307

(2) 研究分担者

副島 美貴子 (SOEJIMA Mikiko)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：80279140