

64. ゲノム多型の地域差に着目した疾患関連遺伝子の探索

今西 規

東海大学 大学院医学研究科 ゲノム多様性解析センター

Key words : 網膜色素変性症, HLA, ゲノム多型, 地域差

緒言

日本人のゲノム多型には地域差があり、それが各種の疾患の発症率の地域差に関連していることが予想される。われわれは以前にヒト白血球抗原である HLA 遺伝子群について都道府県単位での遺伝子頻度を推定してその地域差を明らかにした [1] が、HLA は細胞性免疫において異物を認識する分子であるため、地域差の情報を詳細に解析することにより自己免疫疾患等との関連が新たにみつかるとの可能性がある。

網膜色素変性症 (retinitis pigmentosa) は網膜の視細胞が変性・消失することにより視力の低下や失明に至る疾患で、難病に指定されており、原因解明や治療法の開発が期待されている。患者の 50% には遺伝性が認められ、常染色体劣性遺伝を示すタイプが 35%、常染色体優性遺伝を示すタイプが 10% を占める (難病情報センターHP より)。事前解析で日本の 47 都道府県における HLA 遺伝子頻度の分布と、人口 10 万人あたりの網膜色素変性症の患者数を比較したところ、HLA-DRB1 遺伝子の DRB1*04:05 対立遺伝子の頻度が患者数と正の相関 ($r=0.536$) を示した (図 1)。患者数の地理的分布は環境要因、HLA 以外の遺伝要因、診断基準の不統一などにより影響を受けることがあるため、たとえば HLA 対立遺伝子頻度との間で相関が認められても「因果関係」があるとは限らない。そこで、DRB1*04:05 と網膜色素変性症の発症には関連があるのかどうか、さらに他の HLA 遺伝子が網膜色素変性症と関連するのかどうかを検証するために、実際の患者のゲノム DNA を使った研究を実施した。本研究の結果、当初の予想とは異なる HLA 対立遺伝子が網膜色素変性症に関連することが示唆される結果が得られた。

方法

網膜色素変性症患者のゲノム DNA を、医薬基盤・健康・栄養研究所難病研究資源バンクより取得した。解析に際しては血縁者を除き、さらに外国人に多い HLA 型を持つ個体 (1 名) を解析対象から除外した。最終的に本解析に用いた患者は、兵庫県在住の患者 51 名、兵庫県以外の近畿地方在住の患者 56 名、そして関東地方在住の患者 45 名の合計 152 名分である (表 1)。

HLA 遺伝子のタイピング実験は、クラス I 遺伝子の *HLA-A*, *B*, *C* とクラス II 遺伝子の *HLA-DRB1*, *DQB1*, *DPB1* の合計 6 座位を対象とした。それぞれの遺伝子座について主なエクソンをカバーするように設計されたプライマーを用いて long PCR で増幅し [2]、次世代シーケンサー MiSeq (Illumina 社) を用いて塩基配列を決定した。この配列データから、HLA 対立遺伝子の判定ソフト TypeStream Visual V2.1.0.40 [3] および配列データベース IMGT Ver.3.43.0.0 を用いて HLA 対立遺伝子を判定した。その後、直接に対立遺伝子数を数えることにより、患者群における各遺伝子座の対立遺伝子頻度を推定した。

統計解析では、健常群と疾患群の間で対立遺伝子頻度を比較し、有意差があるものを探した。健常群の HLA 対立遺伝子頻度は、都道府県ごとの HLA 対立遺伝子頻度 [1] に基づいて、都道府県ごとの患者数を考慮した加重平均を計算することにより決定した。*HLA-DQB1* および *HLA-DPB1* の対立遺伝子頻度は、HLA 研究所が求めた全国における頻度を用いた。統計的検定にはカイ二乗検定を用いたが、多重検定となるため、遺伝子座ごとの対立遺伝子数を考慮した Bonferroni 法による p 値の補正を行った上で 1% および 5% 水準で評価した。

なお、本研究は東海大学医学部臨床研究審査委員会の承認を得て実施した (21R149)。

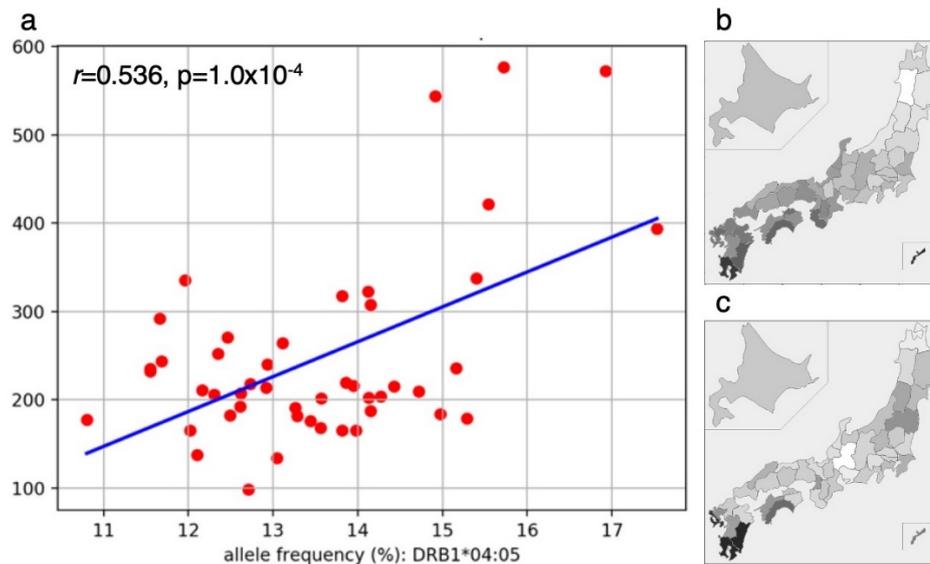


図 1. 網膜色素変性症と HLA-DRB1*04:05 対立遺伝子の地理的相関

- a) 横軸は 47 都道府県における対立遺伝子頻度 [1]、縦軸は人口 100 万人あたりの患者数 (難病情報センターHP より引用)。
- b) 都道府県ごとの HLA-DRB1*04:05 対立遺伝子頻度。最大値を黒、最小値を白で塗り、中間の値をグレースケールで表示した。
- c) 人口あたりの患者数を b) と同様に表示した。

表 1. 患者群の出身都府県の分布。

地方	都府県	人数
近畿地方 1	兵庫県	51
近畿地方 2	大阪府、京都府、奈良県、和歌山県	56
関東地方	東京都、神奈川県、千葉県、茨城県、群馬県、埼玉県	45
	合計	152

結果および考察

HLA 遺伝子型タイピングは、計 152 人のすべての個体について型判定を行うことに成功した。152 人の患者群における対立遺伝子頻度を計算し、この頻度を健常人 (HC : healthy control) と比較した (表 2、3)。その結果、健常人と患者群の間で頻度に有意差がある対立遺伝子が複数見出された。クラス I の HLA-A*02:10 対立遺伝子は患者群で高頻度に出現した (オッズ比 OR=3.70)。また、クラス II の HLA-DQB1*06:09 対立遺伝子も患者群で高頻度に出現した (OR=7.19)。このほか、HLA-B*15:07 (OR=2.57) と HLA-DRB1*06:01 (OR=1.34) は 5%水準で有意に患者群で多く、HLA-A*26:01 (OR=0.43) と HLA-DQB1*06:04 (OR=0.37) は 5%水準で有意に患者群で少なかった。患者群で高頻度の対立遺伝子は網膜色素変性症に関連することが示唆され、逆に患者群で低頻度の対立遺伝子は疾患に抵抗性があると考えられる。また、当初より注目していた HLA-DRB1*04:05 についてはオッズ比が 0.75 となり、患者群では頻度が健常群よりもやや低いことが判明した。つまり、地理的分布から予想された関連とは逆の結果となった。

表2. 患者群におけるHLAクラスI遺伝子 (*HLA-A*, *C*, *B*) の対立遺伝子頻度

alleles	Patients		HC		OR	p
	allele	frequency	allele	frequency		
A*24:02	120	39.47	35191	36.63	1.14	0.3047
A*02:01	32	10.53	10759	11.20	0.94	0.7098
A*02:06	33	10.86	8700	9.06	1.23	0.2753
A*11:01	30	9.87	8679	9.03	1.11	0.6126
A*31:01	28	9.21	8501	8.85	1.05	0.8248
A*26:01	10	3.29	6997	7.28	0.43	0.0074
A*33:03	19	6.25	7415	7.72	0.80	0.3377
A*02:07	6	1.97	3184	3.31	0.59	0.1918
A*26:03	10	3.29	2281	2.37	1.40	0.2954
A*26:02	2	0.66	1752	1.82	0.36	0.1288
A*24:20	2	0.66	720	0.75	0.88	0.8532
A*02:10	5	1.64	434	0.45	3.70	0.0020
A*01:01	2	0.66	467	0.49	1.36	0.6668
A*03:01	3	0.99	423	0.44	2.26	0.1513
other	2	0.66	557	0.58		
total	304	100.00	96060	100.00		

alleles	Patients		HC		OR	p
	allele	frequency	allele	frequency		
B*52:01	42	13.82	11046	11.61	1.24	0.2307
B*51:01	28	9.21	8448	8.88	1.06	0.8396
B*35:01	31	10.20	7585	7.97	1.33	0.1527
B*15:01	25	8.22	7455	7.84	1.07	0.8015
B*40:02	17	5.59	7351	7.73	0.72	0.1636
B*54:01	22	7.24	7297	7.67	0.95	0.7765
B*44:03	17	5.59	6570	6.91	0.81	0.3667
B*40:01	10	3.29	5253	5.52	0.59	0.0886
B*07:02	16	5.26	5324	5.60	0.95	0.8006
B*40:06	11	3.62	4514	4.74	0.76	0.3559
B*46:01	13	4.28	4453	4.68	0.92	0.7388
B*39:01	11	3.62	3251	3.42	1.08	0.8469
B*48:01	5	1.64	2944	3.09	0.53	0.1446
B*55:02	8	2.63	2404	2.53	1.06	0.9080
B*59:01	5	1.64	1846	1.94	0.86	0.7092
B*15:18	8	2.63	1523	1.60	1.68	0.1531
B*13:01	1	0.33	1147	1.21	0.27	0.1614
B*67:01	6	1.97	1063	1.12	1.81	0.1559
B*15:11	1	0.33	901	0.95	0.35	0.2662
B*56:01	3	0.99	860	0.90	1.11	0.8783
B*58:01	3	0.99	709	0.75	1.35	0.6241
B*15:07	5	1.64	623	0.65	2.57	0.0329
B*37:01	2	0.66	543	0.57	1.17	0.8411
B*40:03	3	0.99	429	0.45	2.23	0.1635
B*44:02	2	0.66	400	0.42	1.59	0.5237
B*39:02	2	0.66	338	0.36	1.88	0.3758
B*15:27	2	0.66	157	0.17	4.06	0.8411
other	5	1.64	702	0.75		
total	304	100.00	95136	100.00		

alleles	Patients		HC		OR	p
	allele	frequency	allele	frequency		
C*01:02	55	18.09	16575	17.22	1.06	0.6879
C*03:03	46	15.13	12564	13.05	1.19	0.2827
C*07:02	36	11.84	12196	12.67	0.93	0.6641
C*03:04	25	8.22	11546	12.00	0.66	0.0431
C*12:02	43	14.14	11165	11.60	1.26	0.1665
C*08:01	18	5.92	7181	7.46	0.78	0.3073
C*14:02	22	7.24	6585	6.84	1.06	0.7850
C*14:03	17	5.59	6512	6.77	0.82	0.4155
C*04:01	14	4.61	4253	4.42	1.05	0.8743
C*15:02	6	1.97	2839	2.95	0.66	0.3149
C*08:03	6	1.97	1459	1.52	1.31	0.5146
C*07:04	6	1.97	915	0.95	2.10	0.0665
C*06:02	3	0.99	892	0.93	1.07	0.9129
C*03:02	3	0.99	715	0.74	1.33	0.6213
C*05:01	3	0.99	396	0.41	2.42	0.1183
other	1	0.33	454	0.47		
total	304	100.00	96247	100.00		

a) *HLA-A*, b) *HLA-C*, c) *HLA-B*遺伝子の患者群および健常群の対立遺伝子頻度。
 黄色は1%、緑は5%水準で有意な対立遺伝子。HC : healthy control.

表 3. 患者群における HLA クラス II 遺伝子 (*HLA-DRB1*, *DQB1*, *DPB1*) の対立遺伝子頻度

alleles	Patients		HC		OR	p
	allele	frequency	allele	frequency		
DRB1*09:01	40	13.16	14172	14.72	0.88	0.4428
DRB1*04:05	31	10.20	12676	13.16	0.75	0.1263
DRB1*15:02	41	13.49	10283	10.68	1.31	0.1135
DRB1*15:01	26	8.55	7193	7.47	1.16	0.4736
DRB1*08:03	31	10.20	7691	7.99	1.31	0.1558
DRB1*13:02	19	6.25	6326	6.57	0.95	0.8219
DRB1*01:01	15	4.93	5532	5.75	0.85	0.5439
DRB1*08:02	9	2.96	3930	4.08	0.72	0.3234
DRB1*12:01	15	4.93	3576	3.71	1.35	0.2611
DRB1*14:54	9	2.96	3277	3.40	0.87	0.6705
DRB1*04:06	8	2.63	3222	3.35	0.78	0.4888
DRB1*04:03	9	2.96	2987	3.10	0.95	0.8864
DRB1*11:01	11	3.62	2544	2.64	1.39	0.2889
DRB1*04:10	3	0.99	1971	2.05	0.48	0.1919
DRB1*14:05	10	3.29	2049	2.13	1.57	0.1610
DRB1*12:02	3	0.99	1681	1.75	0.56	0.3125
DRB1*14:03	4	1.32	1508	1.57	0.84	0.7249
DRB1*14:06	2	0.66	1423	1.48	0.44	0.2362
DRB1*04:01	3	0.99	983	1.02	0.97	0.9535
DRB1*16:02	4	1.32	836	0.87	1.52	0.4013
DRB1*13:01	4	1.32	563	0.58	2.27	0.0952
DRB1*04:07	3	0.99	474	0.49	2.02	0.2182
DRB1*10:01	1	0.33	496	0.52	0.64	0.6499
other	3	0.99	893	0.93		
total	304	100.00	96286	100.00		

alleles	Patients		HC		OR	p
	allele	frequency	allele	frequency		
DQB1*06:01	73	24.01	571	19.10	1.34	0.0395
DQB1*03:03	49	16.12	465	15.55	1.04	0.7954
DQB1*04:01	31	10.20	386	12.91	0.77	0.1754
DQB1*03:01	31	10.20	342	11.44	0.88	0.5154
DQB1*03:02	25	8.22	287	9.60	0.84	0.4354
DQB1*06:02	27	8.88	214	7.16	1.26	0.2713
DQB1*05:01	15	4.93	197	6.59	0.74	0.2627
DQB1*06:04	6	1.97	155	5.18	0.37	0.0134
DQB1*04:02	8	2.63	126	4.21	0.61	0.1833
DQB1*05:03	12	3.95	118	3.95	1.00	0.9994
DQB1*05:02	11	3.62	79	2.64	1.38	0.3198
DQB1*06:03	4	1.32	18	0.60	2.20	0.1455
DQB1*06:09	12	3.95	17	0.57	7.19	0.0000
other	0	0.00	15	0.50		
total	304	100.00	2990	100.00		

alleles	Patients		HC		OR	p
	allele	frequency	allele	frequency		
DPB1*05:01	129	42.43	1139	38.40	1.18	0.1694
DPB1*02:01	62	20.39	715	24.11	0.81	0.1476
DPB1*09:01	35	11.51	295	9.95	1.18	0.3876
DPB1*04:02	29	9.54	290	9.78	0.97	0.8940
DPB1*04:01	11	3.62	150	5.06	0.70	0.2694
DPB1*03:01	12	3.95	118	3.98	0.99	0.9789
DPB1*02:02	16	5.26	101	3.41	1.58	0.0967
DPB1*14:01	4	1.32	44	1.48	0.89	0.8169
DPB1*19:01	4	1.32	22	0.74	1.78	0.2831
DPB1*06:01	1	0.33	17	0.57	0.57	0.5836
other	1	0.33	75	2.53		
total	304	100.00	2966	100.00		

a) *HLA-DRB1*, b) *HLA-DQB1*, c) *HLA-DPB1* 遺伝子の患者群および健常群の対立遺伝子頻度。黄色は1%、緑は5%水準で有意な対立遺伝子。青は *DRB1*04:05* 対立遺伝子。HC : healthy control.

以上のように、対立遺伝子の地理的分布をヒントにして網膜色素変性症に関わる HLA 対立遺伝子の探索を行ったが、当初の予想とは異なる対立遺伝子の関連が示唆される結果となった。地理的分布のみを参考にして疾患関連遺伝子を見つけることは技術的に困難なのかもしれない、より強い証拠をそろえることが必要と考えられた。しかしながら、*HLA-A* 遺伝子と *HLA-DQB1* 遺伝子に有意な関連を示す対立遺伝子が存在しており、この結果は、網膜色素変性症には HLA の多型対立遺伝子が何らかの理由で関連していることを示唆する。HLA 分子の機能を考えると、この疾患には自己免疫疾患的な側面がある可能性もある。網膜色素変性症については他の原因遺伝子が知られており、一部の患者には例えば *EYS* 遺伝子などに遺伝子変異がある。今回 HLA 遺伝子で見出された関連が、既知原因遺伝子における遺伝子変異とどのような関係にあるのかについても、今後明らかにしていきたい。

共同研究者・謝辞

坂手龍一博士（医薬基盤・健康・栄養研究所難病研究資源バンク）と前田亜希子博士（理化学研究所生命機能科学研究センター）には網膜色素変性症患者ゲノム DNA の収集・提供にご協力いただいた。橋本志保博士（日本赤十字社中央血液研究所）には日本人 HLA 遺伝子頻度データを提供いただいた。横山圭子氏、王テイ氏（東海大学生命科学統合支援センター）には HLA タイピング実験にご協力いただいた。厚く御礼申し上げます。本研究の共同研究者は、東海大学医学部基礎医学系分子生命科学の大谷内梨聖、平壯雄、重成敦子、鈴木進悟、椎名隆である。

文 献

- 1) Hashimoto S, Nakajima F, Imanishi T, Kawai Y, Kato K, Kimura T, Miyata S, Takanashi M, Nishio M, Tokunaga K, Satake M. Implications of HLA diversity among regions for bone marrow donor searches in Japan. *HLA*. 2020 Jul;96(1):24-42. Epub 2020 May 12. PMID: 32222025. DOI: 10.1111/tan.13881.
- 2) Ozaki Y, Suzuki S, Kashiwase K, Shigenari A, Okudaira Y, Ito S, Masuya A, Azuma F, Yabe T, Morishima S, Mitsunaga S, Satake M, Ota M, Morishima Y, Kulski JK, Saito K, Inoko H, Shiina T. Cost-efficient multiplex PCR for routine genotyping of up to nine classical HLA loci in a single analytical run of multiple samples by next generation sequencing. *BMC Genomics*. 2015 Apr 18;16(1):318. PMID: 25895492; DOI: 10.1186/s12864-015-1514-4.
- 3) Barone JC, Saito K, Beutner K, Campo M, Dong W, Goswami CP, Johnson ES, Wang ZX, Hsu S. HLA-genotyping of clinical specimens using Ion Torrent-based NGS. *Hum Immunol*. 2015 Dec;76(12):903-9. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26423535. DOI: 10.1016/j.humimm.2015.09.014.