

日本人ゲノム解析ツールによる運動器疾患の疾患感受性遺伝子の探索

東北大学大学院医学系研究科整形外科
森 優

研究の目的

変形発育性股関節形成不全 (Developmental dysplasia of hip: DDH) は出生時に関節内で寛骨臼から大腿骨頭が逸脱した状態を示す。DDH は日本人に好発し、本邦での発生頻度は 0.3% である。男女比はおおよそ 1:9 で、圧倒的に女性に多いことが特徴である。DDH 患者のなかには、中高年期以降に変形性股関節症 (OA) を発症する患者が多い。股関節の痛みや変形のため歩行困難となり、日常生活動作が著しく障害される。日本人における股関節 OA の有病率 1-4% と推定されており、そのうち約 80% が DDH に由来する二次性の股関節 OA であるとされる。DDH に対する原因療法はないため、関節破壊が進行した場合には人工股関節置換術により関節機能の改善や痛みの軽減を図るのが一般的である。

DDH の発症原因としては、遺伝的要因、出生前との環境因子が挙げられている。事実、DDH は同一家系内での発症が多いことから (30-40%)、遺伝的要因の関与が強く疑われている。OA 関連遺伝子の CALM1 やアスポリンの遺伝子多型の報告がある一方で、DDH 関連遺伝子についての報告は少ない。DDH 集積発症の一家族の解析から、Mabuchi らが 13q22 染色体上の遺伝子多型が関連することを報告しているが、DDH の発症、重症化予測の手が

りはいまだ明らかになっていない。

近年のヒトゲノム解析技術の発達により、ヒト全ゲノムデータベースを用いた疾患特異的な Single nucleotide polymorphism (SNP) の網羅的解析、すなわち genome-wide association study (GWAS) が可能となってきた。これにより特定の疾患に関連する複数の遺伝子座の SNP を網羅的に解析・同定することが広く行われている。整形外科疾患に限っても、この手法によって変形性関節症 (OA) に関わる GDF5、思春期特発性側弯症 (AIS) に関わる LBX1、および後縦靭帯骨化症 (OPLL) に関わる複数遺伝子の SNP が同定されている。DDH については、Sun らのグループが中国の漢民族を対象にして、386 名の DDH 患者と 558 名の健常者に対して、中国人向け SNP 解析ツールを用いた GWAS の解析結果を報告した。その結果 DDH 患者には、骨格の形態発生と成長に関わるタンパクである Ubiquinol-cytochrome c reductase complex chaperone (UQCC) をコードする遺伝子に、健常人と比較して有意な遺伝子多型があることが示した (Sun et al., 2015)。

ジャポニカアレイは日本人に最適化されたゲノムワイド関連解析ツールである (Kawai et al., 2015)。本ツールでは日本人に特異的な塩基配列を持つ約 66 万箇所の SNP を解析する。さらに、東北メ

ディカル・メガバンク機構で作成している全ゲノムリファレンスパネルなどを用いて、約 30 億塩基の全ゲノム構造を擬似的に再構成（インピュテーション）し、約 800 万箇所の SNP やコピー数変異（CNV）を解析することができる。東北大学メディカル・メガバンク機構で蓄積している約 1000 名の健常日本人の SNP データを比較対照にして、日本人の DDH 患者に特徴的な SNP の検索を行う。日本人に特化した SNP 解析ツールも用いることにより、日本人患者に対して信頼性が高い SNP 解析が行うことが可能となる。本研究の目的は、ジャポニカアレイを用いた DDH の原因遺伝子の解明である。具体的には DDH 症例について網羅的ゲノム解析を行い、発症に関連する疾患感受性遺伝子群を探索することである。

研究方法

本研究は東北大学倫理委員会の承認のもとに、対象患者に対する十分な informed consent を得たうえで行った。両股関節単純 X 線写真で Sharp 角 45° 以上かつ CE 角 20° 以下の状態を DDH と定義し、レントゲン画像で確認した DDH の 400 症例から検体を採取した。全血 7ml の採血を EDTA 入りの採血管に行い、核酸抽出までの間 -20°C で保管した。ゲノム DNA の抽出は QIAGEN 社の DNeasy Blood Mini Kit を用いて行った。抽出したゲノム DNA は $50\text{ng}/\mu\text{l}$ 以上の濃度で、 $20\mu\text{l}$ 以上となるように調整した。SNP 解析は、東芝の Japonica Array システムを用いて行った。本システムでは全ゲノム中の 86 万箇所の SNP をマイクロチップ上で解析し、日本人ゲノム情報を元にスーパーコンピューター上で imputation を加え、約 600 万箇所

の SNP 情報の推定が可能なシステムである。DNA 抽出を行った。200 症例についてジャポニカアレイでの SNP 解析（挿入欠失含む）を行っている。健常人コントロールは東北大学東北メディカル・メガバンクの 1070 人のストックデータを健常成人群として利用した。ジャポニカアレイでは、1070 名の健常人データと本研究対象の DDH 患者データを比較し、 $p < 1.0 \times 10^{-4}$ となる SNP を有意とした。また、ジャポニカアレイでの解析を行った症例とは異なる DDH の 200 症例について 400 人の健常者を対照にして、ジャポニカアレイで同定された SNP について RT-PCR を用いたジェノタイプ頻度の検討を行った。

研究結果

ジャポニカアレイの解析の結果をプロット図で示す（図 1）。p 値が 10^{-4} 以下の DDH に有意に出現頻度が高い SNP が 157 個同定された。またこれとは別に p 値が 10^{-3} の SNP が 800 個同定された。Sun らの漢民族での DDH についての報告にある（Sun et al., 2015）、UQCC1 遺伝子の SNP である rs6060355 のジャポニカアレイでのアレル頻度の検討では $p = 5.01 \times 10^{-5}$ であった。他の DDH に有意に発現頻度の高い SNP のアレル頻度の検討、ならびにジェノタイプ頻度の検討については今後も継続して行っていく予定である。

まとめ

ジャポニカアレイのゲノムワイド関連解析の結果から変形性関節症に関連する SNP とは異なる、DDH 固有の発症に関連が疑われる SNP が多数同定された。本研究の結果から UQCC1 遺伝子は日本人の DDH についても発症への関連が示唆された。ジャポニカアレイで同定された SNP につ

いて、新しい疾患感受性遺伝子の同定を目標にして今後もジェノタイプ頻度の検討を継続していく予定である。

参考文献

1. Kawai, Y., Mimori, T., Kojima, K., Nariai, N., Danjoh, I., Saito, R., Yasuda, J., Yamamoto, M., and Nagasaki, M. (2015). Japonica array: improved genotype imputation by designing a population-specific SNP array with 1070 Japanese individuals. *J. Hum. Genet.*

2. Sun, Y., Wang, C., Hao, Z., Dai, J., Chen, D., Xu, Z., Shi, D., Mao, P., Teng, H., Gao, X., et al. (2015a). A Common Variant Of Ubiquinol-Cytochrome c Reductase Complex Is Associated with DDH. *PLOS ONE* 10, e0120212.

図 1 日本人 DDH 症例のジャポニカアレイを用いたゲノムワイド関連解析

