

尿酸トランスポーター遺伝子 *ABCG2* の  
rare variant と痛風の疾患感受性との関連

ひがしの      としひで  
東野      俊英

(分子生体制御学専攻)

防衛医科大学校

平成30年度

## 目次

第1章 背景 .....	1
第2章 目的 .....	8
第3章 対象及び方法 .....	9
3-1. ターゲット・シーケンシングによる <i>ABCG2</i> 遺伝子の非同義変異の 同定.....	9
3-1-1. 対象.....	9
3-1-2. ターゲット・シーケンシング .....	10
3-1-3. <i>ABCG2</i> 遺伝子変異の同定とアノテーション.....	11
3-2. <i>ABCG2</i> 変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析によるタンパク質 機能変化予測アルゴリズムの評価.....	12
3-2-1. <i>ABCG2</i> 変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析.....	12
3-2-2. タンパク質機能変化予測アルゴリズムなどを用いた rare variant の評価.....	14
3-2-3. 痛風の疾患感受性との関連解析に用いる rare variant の選定...	15
3-3. <i>ABCG2</i> の非同義変異と痛風の疾患感受性との関連解析.....	16

第4章 結果 .....	18
4-1. ターゲット・シーケンシングによる <i>ABCG2</i> 遺伝子の非同義変異の 同定.....	18
4-2. <i>ABCG2</i> 変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析によるタンパク質 機能変化予測アルゴリズムの評価.....	18
4-2-1. <i>ABCG2</i> 変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析.....	18
4-2-2. ATP 依存性尿酸輸送機能とタンパク質機能変化予測アルゴリズム スコアの相関解析.....	19
4-2-3. 痛風の疾患感受性の関連解析に用いる <i>rare variant</i> の選定.....	19
4-3. <i>ABCG2</i> の非同義変異と痛風の疾患感受性との関連解析.....	20
4-3-1. <i>ABCG2</i> の <i>common variant</i> と痛風の疾患感受性との関連解析	20
4-3-2. <i>ABCG2</i> の <i>rare variant</i> と痛風の疾患感受性との関連解析.....	21
第5章 考察 .....	22
第6章 結論 .....	29
謝辞 .....	30
付記 .....	31
単語・略語説明 .....	32
参考文献 .....	39

图表 .....	48
----------	----

## 第1章 背景

ありふれた病気、いわゆる common disease は遺伝的要因と環境的要因の両者が複雑に交絡することで発症する。一般に個体の生存や生殖に大きな不利益をもたらす遺伝子変異は進化の過程で選択されるため、集団内での頻度は低くなる傾向がある。そのため、遺伝子変異のうち common disease の疾患感受性に対する影響が強いものは稀になることが多い。また、限定的な影響に留まるものは一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) などの頻度の高い遺伝子変異として集団内に広がることが多い。該当する遺伝子変異の頻度が高いと多くの人がリスクを抱えていることになるので、社会医学的な影響を考えた場合、遺伝子変異の集団内における頻度は重要である。集団遺伝学的見地からは遺伝子変異の頻度と疾患感受性に及ぼす影響の大きさの両者がいずれも重要と考えられるが、Manolio ら<sup>1)</sup>は、通常これらは両立しないとしている (図1)。そのため、一定の集団内での common disease の発症に関する遺伝的背景を考えた場合に、頻度が高いものの発症に関する影響は限定的と考えられる common variant と、稀少ではあるが疾患感受性に強力な影響を及ぼすものが含まれる rare variant のうちどちらが主要であるかについて、いずれの立場からも学説が存在する。前者<sup>2, 3)</sup>が Common Disease, Common Variant 仮説、後者<sup>4, 5)</sup>が Common Disease,

Multiple Rare Variant 仮説と呼ばれている。

痛風は高尿酸血症に続発する関節炎であり、尿酸結晶が沈着することで発症する、よく知られた common disease の一種である。患者統計においては痛風と高尿酸血症が区別されづらい傾向があるので正確な患者数の把握は困難であるが、本邦における推計総患者数は平成 28（2016）年の厚生労働省「国民生活基礎調査・健康（第 2 巻・第 1 章）」の総傷病者数を参考にすると約 110 万 5000 人である<sup>6)</sup>。この平成 28（2016）年の痛風の推計総患者数は高齢化の影響も相俟ったことから、平成 10（1998）年の統計に比較して約 2 倍であり近年増加傾向にある<sup>6)</sup>。時代を遡ると安土桃山時代に来日したイエズス会宣教師ルイス・フロイスはその著書「ヨーロッパ文化と日本文化」で西洋人に多い痛風が日本人には稀であることを記述しており<sup>7,8)</sup>、また、一説には明治初期にお雇い外国人として東京医学校の教師に招かれたドイツ人医師エルヴィン・フォン・ベルツも「日本には痛風患者がいない」と述べたとされる<sup>9)</sup>。また、鎌谷<sup>10)</sup>は痛風について日本では戦前は稀な疾患であったことを述べている。つまり、本邦における痛風患者は歴史を通じて少数であったものの、戦後、特に近年の食事の欧米化などの環境的要因の変化に伴って徐々に増加したことが窺える。

痛風発症のリスク要因としては肥満や飲酒が環境的要因として挙げられている<sup>11-13)</sup>。一方、遺伝的要因としてはこれまでにゲノムワイド関連解析（GWAS:

genome-wide association study) をはじめとする分子遺伝疫学的研究から痛風の疾患感受性<sup>14-18)</sup>や血清尿酸値<sup>19-23)</sup>に影響を及ぼす多くの遺伝子がこれまでに同定されてきた。その中でも尿酸排泄トランスポーターである ATP-binding cassette, subfamily G, member 2 (ABCG2) をコードする *ABCG2* 遺伝子の SNP 解析において見出された機能低下型変異である Q126X (rs72552713) と Q141K (rs2231142) については、①Q126X は機能消失型変異であり、Q141K は機能半減型変異であること、②これらの変異が同一ハプロタイプ (染色体) に同時には存在しないことから、この 2 つの変異を調べることで、ヒトの体内における尿酸排泄トランスポーター *ABCG2* の尿酸輸送機能は、「機能正常 (=4/4)」「機能 3/4」「機能 1/2」「機能 1/4」「機能無し(=0/4)」の 5 種類に推定して分類可能であること、の 2 点の性質が報告されている<sup>24)</sup> (図 2)。尿酸値正常の対照群と痛風患者群の比較からは、この 2 つの SNP のうちいずれかを持つ場合、いずれも持たない場合に比べて痛風発症リスクはオッズ比として 3 倍以上高くなる。また、痛風患者全体の約 8 割がこの 2 つのいずれかの SNP を持つ。さらに *ABCG2* の尿酸輸送機能が 3/4 以下と推定されるヒトの割合は、対照群では 1.2%に留まるのに対して、患者群では約 5.2%と高い<sup>24)</sup>。

*ABCG2* は腎臓の近位尿細管や腸管上皮に発現していることが判明しており、腎臓や腸管から尿酸の排泄を行っていると考えられている<sup>25-27)</sup>。また、*ABCG2*

の Q126X と Q141K は、日本人集団において若年発症する痛風の主要な原因遺伝子変異であることも判明している<sup>28)</sup>。これまでのところ、臨床診断された痛風患者を用いた GWAS においては、日本人集団<sup>14,15)</sup>でも、漢民族集団<sup>16)</sup>でも全ての遺伝子座の中で *ABCG2* の遺伝子座がその発症と最も有意な関連を示している。また、同様に白人集団における GWAS でも *ABCG2* の遺伝子座が痛風および高尿酸血症の疾患感受性に最も有意な関連を示すことがわかっている<sup>20,29)</sup>。集団のリスクの指標である人口寄与危険度割合 (PAR%: population-attributable risk percent) を用いて行われた「加齢」「肥満」「飲酒」という代表的な環境的要因との比較では、高尿酸血症の発症において *ABCG2* 遺伝子の機能低下型 SNP がこれらの環境要因よりも高値を示し、より強い影響力を持つことが証明されている<sup>30)</sup>。

このように *ABCG2* トランスポーターはヒトの体内における尿酸排泄にきわめて重要であり、*ABCG2* 遺伝子の機能低下型 SNP である Q126X と Q141K が痛風・高尿酸血症の疾患感受性を著しく上昇させることが証明されてきた。しかしながら、より稀少な遺伝子変異である rare variant が一定の集団内で痛風の発症に対してどのような影響を及ぼしているかについては明らかにされていない。そこで本研究では、痛風群と対照群を設定し、個別化医療の推進のために *ABCG2* 遺伝子の rare variant を同定し、それらのリスクを解析することとした。つまり、



収集した痛風患者と対照者のゲノム DNA に対して、まず次世代シーケンサーにより *ABCG2* 遺伝子のエクソン部位の DNA 配列を読み取ることで、同部位に存在する遺伝子変異を網羅的に同定した (ターゲット・シーケンシング)。その後、日本人集団における頻度をもとに **common variant** と **rare variant** に分類することとした。ここで、*ABCG2* の SNP による痛風の疾患感受性への影響は、血清尿酸値に対する影響よりも大きいという報告<sup>20)</sup>が存在したため、痛風発症リスクに対するより精密なアセスメントのために血清尿酸値ではなく痛風の疾患感受性を対象に解析を行うこととした。

分類した *ABCG2* の **rare variant** については、まず、可能な限りヒト胎児腎細胞由来の細胞系統である HEK293 細胞を用いた ATP 依存性尿酸輸送機能解析により、尿酸輸送機能低下の程度を評価することとした。機能解析実験では、尿酸輸送機能低下のメカニズムを探索するために、*ABCG2* タンパク質の細胞膜への発現についても解析することとした。痛風との疾患感受性との関連解析において、*ABCG2* の非同義変異を伴う **common variant** である Q126X と Q141K に関しては、機能解析の結果と遺伝子型の組み合わせから推定した尿酸輸送機能低下の程度が大きいほど痛風発症リスクが高いことが示されていた<sup>24)</sup>が、**rare variant** に関してはそのリスク評価はまだ行われていなかった。但し、それぞれの **rare variant** に対応する変異体の評価法として、研究中に同定した多種類の **rare variant**

全てについて高い精度で機能解析実験を行うことは困難である。そこで、rare variant と common disease との関連を解析した先行研究<sup>5)</sup>でも使用実績のある、アミノ酸置換パターンからタンパク質機能変化を予測する「タンパク質機能変化予測アルゴリズム（以下、タンパク質予測アルゴリズム）」を本研究でも用いることとした。こうして、機能解析を行わなかったミスセンス変異についてもタンパク質予測アルゴリズムで評価することで ABCG2 タンパク質機能に影響しない rare variant を分別することとした。その際に、機能解析実験の結果とタンパク質予測アルゴリズムとの相関を検定し、有意であったもの、または有意な傾向を示したタンパク質予測アルゴリズムのスコアを ABCG2 機能低下の評価に用いることとした。一般に、特定の遺伝子の rare variant と common disease の疾患感受性との関連解析においては、多種類の rare variant が同定される一方で、研究対象者のうち rare variant を持つ者は少数であるため、限られた研究対象者数で関連解析の結論を導き出すことは困難である。そのため、複数の rare variant を包括的に評価する方法が用いられることが多く<sup>4,5)</sup>、さらにタンパク質の機能や発現に影響を与える可能性が高い rare variant のみを解析対象に絞り込むこともある<sup>5)</sup>。

機能解析実験の結果とタンパク質予測アルゴリズムのスコアから、機能低下を伴わないと判断されたものを除く複数の rare variant を包括的に評価し、痛風

患者と対照者間で **rare variant** を一つ以上持つことを **rare variant carrier** として関連解析を行うこととした。関連解析の手段として、**rare variant** と **common variant** が独立した痛風発症リスクであるかどうかを確認するために、多変量ロジスティック回帰解析と層別化関連解析を用いた。以上により、**ABCG2** の **rare variant** と **common variant** 双方が痛風の病態形成において与える影響を解明し、それらを比較することを目的とした。

## 第2章 目的

近年、痛風の分子遺伝疫学的研究により、尿酸トランスポーター遺伝子 *ABCG2* の common variant (rs72552713; Q126X、rs2231142; Q141K) が日本人集団における痛風の疾患感受性に強い影響を及ぼすことが示唆されており、これらは尿酸輸送機能の喪失または低下を伴うことが判明している。しかしながら、*ABCG2* の rare variant の痛風発症における重要性は明らかではない。そこで、我々は医師による臨床診断を受けた痛風患者と対照者を用いた症例対照研究を通じて、*ABCG2* の尿酸輸送機能低下を伴う rare variant が日本人集団において痛風の疾患感受性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 第3章 対象及び方法

### 3-1. ターゲット・シーケンシングによる *ABCG2* 遺伝子の非同義変異の同定

#### 3-1-1. 対象

痛風症例としては、平成 23 (2011) 年 10 月 7 日から平成 24 (2012) 年 12 月 17 日までに両国東口クリニック (東京都) を受診した患者のうち、米国リウマチ学会の診断基準<sup>31)</sup>をもとに医師が痛風であると確定診断した日本人男性症例のみを用いた。また、痛風患者のうち、Lesch-Nyhan 症候群などの遺伝性高尿酸血症の患者は対象から除いた。対照者としては浜松市での平成 18 (2008) 年 2 月 9 日から平成 19 (2009) 年 12 月 27 日までの健診における日本多施設共同コホート研究 (J-MICC Study: Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study)<sup>32)</sup>の参加者 (痛風群と同様に都市圏在住者を対象としており、会社企業に就労する者が多いなどの点でライフスタイルが近い) で、痛風・高尿酸血症に罹患した経験のない日本人男性を用いた。また、一般に遺伝子変異の頻度は人種や民族間で大きく異なり、例えば本土の日本人集団は、同じ東アジアの漢民族や朝鮮民族、琉球諸島の日本人集団とも遺伝的に異なった集団であることが示されている<sup>33)</sup>。そのため、痛風群・対照群ともに直系尊属に外国人か沖縄県民を持つ者を除き、遺伝的に本土の日本人である者のみを用いた。収集したサンプル

のうち、ゲノム DNA の量と質が解析可能であったものは全例選択した。以上により、関連解析の対象者として、痛風患者 480 人と対照者 480 人を得た。平均年齢 ( $\pm$ 標準偏差) はそれぞれ痛風群 46.2 ( $\pm$ 9.8) 歳、対照群 52.3 ( $\pm$ 7.9) 歳、平均の BMI (Body Mass Index) ( $\pm$ 標準偏差) はそれぞれ痛風群 25.3 ( $\pm$ 3.7) kg/m<sup>2</sup>、対照群 23.2 ( $\pm$ 2.6) kg/m<sup>2</sup>であった。全ての研究参加者からは、ヘルシンキ宣言のもと書面でのインフォームドコンセントを得た。また、研究の実施にあたり防衛医科大学校、国立遺伝学研究所、および名古屋大学の倫理委員会の承認を得た。

### 3-1-2. ターゲット・シーケンシング

研究対象者の末梢血全血からゲノム DNA を抽出した<sup>34)</sup>。その後、ゲノム DNA の量と質が解析可能であるサンプルについて、以下の手順で DNA からターゲットキャプチャー法<sup>35)</sup>を用いて *ABCG2* 遺伝子のエクソン部位を収集、増幅しシーケンス用のライブラリーを調整した。まず抽出した DNA の濃度を Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific 社、Waltham、Massachusetts、USA) と FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Readers (Molecular Device 社、San Jose、California、USA) を用いて定量した。そして、SureSelect QXT Library Prep Kit (Agilent Technologies 社、Santa Clara、California、USA) により 96 穴プレート

上で 20 ng の DNA を断片化し、アダプター配列に接合した。こうしてそれぞれが同じ量の断片化されアダプター配列が結合されたライブラリーを準備した。その後、NimbleDesign (<https://design.nimblegen.com>) によりターゲット領域である *ABCG2* 遺伝子のエクソン部位に相同であるようにデザインした DNA プローブと SepCap EZ choice system (Roche Diagnostic 社、Basel、Switzerland) を用いてターゲット領域を濃縮した。調整、濃縮したライブラリーを HiSeq2500 (Illumina 社、San Diego、California、USA) のラピッドランモードで 150 塩基対毎にペアエンドでシーケンシングを行い、Fastq 形式の塩基配列を取得した。

### 3-1-3. *ABCG2* 遺伝子変異の同定とアノテーション

BWA (Burrows-Wheeler Aligner)<sup>36)</sup>を用いて、Fastq 形式で得られた断片化された DNA 塩基配列情報を、参照配列である hg19 にアラインメントし、SAMtools<sup>37)</sup>を用いてファイル形式を BAM 形式に変換した。その後、一塩基変異 (SNV: single nucleotide variant) や挿入欠失変異 (indel: insertions and deletions) などの短い変異を GATK<sup>38,39)</sup>の HaplotypeCaller を用いて同定した。同定された変異に関する機能的な情報は ANNOVAR<sup>40)</sup>を用いてアノテーションした後、*ABCG2* のトランスクリプト情報 (accession number: NM\_004827) をもとにエクソン上に存在する非同義変異のみを抽出した。また、抽出した変異のうち、マ

マイナーアレル頻度が 1%未満のものを rare variant、1%以上のものを common variant と定義した。なお、分類のためのマイナーアレル頻度はゲノム疫学データベースである 1000 ゲノムプロジェクト・フェーズ 3<sup>41)</sup>のうち東京の日本人集団 (JPT: Japanese in Tokyo) におけるものを用いた。

### 3-2. ABCG2 変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析によるタンパク質機能変化

#### 予測アルゴリズムの評価

##### 3-2-1. ABCG2 変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析

ターゲット・シーケンシングにより同定した非同義変異に対応する ABCG2 変異体の尿酸輸送機能を推定するため、まず本研究のターゲット・シーケンシングで同定した 22 個の非同義変異のうち半数の 11 個 (common variant として V12M、Q126X、Q141K の 3 個、rare variant として V178I、P269S、S441N、G462R、F506SfsX4、V508I、R575X、A634V の 8 個) を抽出し、それらに関して ATP 依存性尿酸輸送機能解析を行った。解析対象の変異は同定した非同義変異 (ミスセンス変異 17 個、ナンセンス変異 3 個、挿入欠失変異 2 個) のうち、各種について約半数になるように (ミスセンス変異 8 個、ナンセンス変異 2 個、挿入欠失変異 1 個) 無作為に選択した。今回同定した非同義変異の中では単独で痛風の疾患感受性との関連解析を行う必要のある common variant (V12M、Q126X、Q141K) を優



先し、その他は **rare variant** の中から選択した。さらに、本研究では同定されなかったが過去の準備研究で同定し **ABCG2** を含む細胞膜小胞（ベシクル）を作成済みであったことから、実験手順の大半を終了していた 9 個の **rare variant** (**F208S**、**G268R**、**N299S**、**E311K**、**E334X**、**L447V**、**S486N**、**V516M**、**C608X**) についても同時に機能解析実験を行った。

機能解析では、**common variant** である **Q126X** および **Q141K** と痛風の疾患感受性との関連解析に関する既報<sup>24)</sup>において、これらの変異が機能低下型変異であることを示した実験と同等の方法を用いた。あらかじめ **ABCG2** 遺伝子をクローニングして作成しておいたプラスミドである **myc-ABCG2 wild-type (WT)** / **pcDNA3.1 (+)** から **site-directed mutagenesis** の手法を用いて変異体を作成し<sup>42)</sup>、ヒト胎児腎細胞由来の細胞系統である **HEK293** 細胞に遺伝子導入を行った<sup>43,44)</sup>。なお、コントロールとしては野生型の **ABCG2** を含む **pcDNA3.1(+)** とエンピティベクターである **pcDNA3.1(+)** を用いた。遺伝子導入後の **HEK293** 細胞から細胞膜小胞を分離して、解析に使用するまで **-80°C** で保存した。その後、細胞膜小胞と放射性同位元素 [**<sup>14</sup>C] で標識した尿酸を用い、細胞膜小胞内の放射能を測定することによって尿酸輸送機能を定量化した<sup>42)</sup>。そして、**ATP** の存在下および非存在下で尿酸輸送量を測定し差を計算することにより、**ATP** 依存性尿酸輸送機能を測定した。また、同じ量の **ABCG2** の変異体あるいはコントロールの細胞膜小**

胞を対象として、N末端に myc-tag が結合した ABCG2 に対して抗 myc 抗体を用いたイムノブロット法を行うことで、細胞膜への ABCG2 タンパク質の発現量を測定した<sup>24,42)</sup>。この際、タンパク質の発現量の解析は画像処理装置である Fusion Solo 4<sup>TM</sup> system (Vilber Lourmat 社、Eberhardzell、Germany) を用いて行った。

### 3-2-2. タンパク質機能変化予測アルゴリズムなどを用いた rare variant の評価

本研究のターゲット・シーケンシングで同定したミスセンス変異のうち、機能解析を実施しなかった 9 個 (P112L、D128V、A149P、M152T、R163S、Y276C、F489L、C608R、D620G) に関しては、ANNOVAR<sup>40)</sup>によりアノテーションされた情報のうち、タンパク質予測アルゴリズムである Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT)<sup>45)</sup>および Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2)<sup>46)</sup>のスコアを使用することで評価した。SIFT はタンパク質のアミノ酸配列保存性をもとにスコア化するアルゴリズムであり、生物進化の過程で保存性の高いアミノ酸が置換されるほど低いスコアを示す<sup>45)</sup>。PolyPhen-2 はアミノ酸置換のパターンから疎水性の変化などを計算し、タンパク質の立体構造に影響を与える可能性を予測するアルゴリズムであり、スコアが高いほど立体構造が変化する可能性が高い<sup>46)</sup>。いずれもミスセンス変異のみを解析対象とし、0 から 1 の間の連続値をとる<sup>45,46)</sup>。また、PolyPhen-2 には PolyPhen-2 HumVar と PolyPhen-2 HumDiv が

存在し、前者は大きなタンパク質機能変化を伴う変異を検出するために、後者は多因子疾患などの解析において関連遺伝子変異を検索するために、それぞれデザインされている<sup>47)</sup>。

また、機能解析実験を実施した合計 20 個の非同義変異のうち、ミスセンス変異である 14 個に関して機能解析実験の結果と、SIFT および PolyPhen-2 のスコアとの相関を SPSS v22.0J (IBM 社、Armonk、New York、USA) を用いて解析し、これらのタンパク質予測アルゴリズムのうちどれを用いるかを決定した。つまり、有意 ( $p < 0.05$ ) または有意な傾向のあるもの ( $0.05 \leq p < 0.1$ ) を用いることとした。

### 3-2-3. 痛風の疾患感受性との関連解析に用いる rare variant の選定

変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能と SIFT および PolyPhen-2 のスコアから、同定した *ABCG2* 遺伝子の rare variant のうちミスセンス変異であるものについて、「①変異体の機能解析を行ったものに関しては、野生型と比較して尿酸輸送機能がほぼ維持されているもの」「②機能解析を行わなかったものに関しては SIFT および PolyPhen-2 のスコアがそれぞれ 1、0 に近い数値であり変異体の尿酸輸送機能低下が軽微と予想されるもの」を除き解析の対象とした。

SIFT や PolyPhen-2 はミスセンス変異のみを対象としているアルゴリズムであ

るが、挿入欠失変異およびナンセンス変異に関しては、機能解析実験を行った変異体の尿酸輸送機能が全て 50%未満に低下していることを確認した上で、機能解析の対象外とした rare variant も全て解析の対象に含める方針とした。

### 3-3. *ABCG2* の非同義変異と痛風の疾患感受性との関連解析

個々の *ABCG2* の common variant のうち、痛風の疾患感受性に影響しているものを同定するため、痛風の有無を目的因子、V12M、Q126X、および Q141K の遺伝子型を説明因子として単変量および多変量ロジスティック回帰解析を行った。

痛風の疾患感受性と *ABCG2* の rare variant との関連解析に際しては、個々の rare variant を持つ対象人数は非常に少ないため、解析の対象となる複数の rare variant を Collapsing method<sup>48)</sup>という手法により集約した。Collapsing method は、ある個体にいずれか1つの rare variant が存在する場合に rare variant carrier とみなし、rare variant が1つも存在しない non-carrier と区別する手法である<sup>48)</sup>。その後、痛風群と対照群の間で rare variant carrier であるか non-carrier であるかに関して、カイ二乗検定により関連解析を行った。さらに、過去の報告から Q126X と Q141K の2種類の *ABCG2* の common variant が痛風の疾患感受性に対して強い影響を与えることがわかっており<sup>24,49)</sup>、rare variant が common variant と独立した痛風発症リ

スクであるかどうかを確認するために、Q126X と Q141K のいずれの common variant も持たない研究対象者での rare variant carrier の有無と痛風の有無との関連解析を行った。次に、それぞれの遺伝子変異が疾患感受性に独立して影響を及ぼすかを明らかにするために、痛風の有無を目的因子、Q126X、Q141K のそれぞれの遺伝子型と rare variant を説明因子として多変量ロジスティック回帰解析を行った。

全ての統計解析は SPSS v22.0J (IBM 社、Armonk、New York、USA) を用いて実施し、p 値は 0.05 未満のものを統計学的に有意とした。

## 第4章 結果

### 4-1. ターゲット・シーケンシングによる *ABCG2* 遺伝子の非同義変異の同定

*ABCG2* のアミノ酸配列の変異を伴う 3 種類の common variant と 19 種類の rare variant を抽出した (表 1)。痛風患者群では 33 名から、対照群では 18 名から 1 つ以上の rare variant が同定された。特定の rare variant をホモ変異として持つ研究対象者は存在しなかった。また、痛風群、対照群において common variant である V12M、Q126X、Q141K の遺伝子型別の研究対象者数の内訳は表 2 のように分布し、ホモ変異として持つ研究対象者も確認できた。

### 4-2. *ABCG2* 変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析によるタンパク質機能変化予測アルゴリズムの評価

#### 4-2-1. *ABCG2* 変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析

変異体の ATP 依存性尿酸輸送機能解析を行った 20 個の非同義変異の結果を図 3 に示す。S441N、G462R、F208S、G268R、S486N、V516M の 6 つのミスセンス変異では尿酸輸送機能はほぼ完全に喪失し、一方で、V12M と P269S の 2 つのミスセンス変異では、野生型とほぼ同等の尿酸輸送機能を維持した。また、ナンセンス変異である Q126X、E334X、欠失変異である F506SfsX4 では尿酸輸

送機能はほぼ完全に喪失した。その他のナンセンス変異である R575X と C608X でも野生型に比較して 40%以下と尿酸輸送機能の顕著な低下を認めた。イムノブロット法による細胞膜への発現解析 (図 4) では野生型や多くの ABCG2 の変異体において細胞膜への発現が確認された一方で、F208S、E334X、R575X、Q126X、F506SfsX4 では細胞膜への ABCG2 の発現を確認できなかった。

#### 4-2-2. ATP 依存性尿酸輸送機能とタンパク質機能変化予測アルゴリズムスコアの相関解析

13 個の ABCG2 ミスセンス変異体に関する ATP 依存性尿酸輸送機能解析の結果と、タンパク質予測アルゴリズムである SIFT、および PolyPhen-2HumVar、PolyPhen-2HumDiv のスコアとの相関を図 5 に示す。SIFT のスコアと ABCG2 変異体の尿酸輸送機能には、正の相関が認められた ( $p=0.026$ )。一方、PolyPhen-2HumDiv のスコアは変異体の尿酸輸送機能と統計学的に有意ではないものの、負の相関にある傾向を示した ( $p=0.089$ )。これに対し、PolyPhen-2HumVar のスコアと変異体の尿酸輸送機能には統計学的に有意な相関はみられなかった。

#### 4-2-3. 痛風の疾患感受性の関連解析に用いる rare variant の選定

痛風の疾患感受性の関連解析の対象から、変異体の尿酸輸送機能に低下のみ

られなかった P269S をまず除外した。そして、SIFT のスコアが 1、PolyPhen-2HumDiv のスコアが 0 であり (表 3)、かつ過去の ABCG2 の ATP 依存性薬剤輸送機能の解析に関する報告<sup>39)</sup>でも輸送機能に変化がないと報告されていた A149P も除外した。ナンセンス変異である Q126X、E334X、R575X、C608X および欠失変異である F506SfsX4 では、いずれもこれらの変異体の尿酸輸送機能が野生型に比較して少なくとも 40%以下に低下していたことが確認できた (図 3) ため、機能解析を行わなかったナンセンス変異と挿入欠失変異に関しても全て解析対象に含めた。

#### 4-3. ABCG2 の非同義変異と痛風の疾患感受性との関連解析

##### 4-3-1. ABCG2 の common variant と痛風の疾患感受性との関連解析

ABCG2 の common variant である V12M、Q126X、Q141K のいずれも、それぞれの遺伝子型を説明因子とした単変量ロジスティック回帰解析で痛風の疾患感受性との有意な関連を示した (表 4)。この解析において、Q126X (オッズ比=2.6、 $p=1.9\times 10^{-4}$ ) と Q141K (オッズ比=2.2、 $p=1.2\times 10^{-14}$ ) は痛風発症に対して正のリスクであるが、V12M (オッズ比=0.58、 $p=1.1\times 10^{-5}$ ) は逆に負のリスクであった。しかし、これらの 3 つの common variant の遺伝子型を説明因子とした多変量解析では、Q126X と Q141K のみが有意な関連を示し、V12M は有意な関連を示さ



なかった (表 5)。

#### 4-3-2. *ABCG2* の rare variant と痛風の疾患感受性との関連解析

Q126X と Q141K のいずれも持たない研究対象者について行った層別化関連解析では、rare variant carrier であることが痛風の疾患感受性と有意な関連を示し ( $p=6.4\times 10^{-3}$ )、オッズ比は 3.2 であった (表 6)。また、多変量ロジスティック回帰解析では、rare variant (オッズ比=2.7、 $p=3.0\times 10^{-3}$ )、Q126X (オッズ比=3.4、 $p=3.1\times 10^{-6}$ ) および Q141K (オッズ比=2.3、 $p=2.7\times 10^{-16}$ ) が相互に独立した痛風発症リスクであることが示された (表 7)。

## 第5章 考察

本研究では痛風における個別化医療の推進のため、*ABCG2* 遺伝子の common variant だけでなく rare variant が日本人集団において痛風の疾患感受性に及ぼすことを明らかにすることを目的として、その両方を含んだ遺伝子解析を実施した。*ABCG2* は腎臓や腸管における尿酸排泄トランスポーターである<sup>25-27)</sup>ことから、その機能低下型変異は主として尿酸排泄機能低下に起因する血清尿酸値の上昇を介して、痛風の疾患感受性の上昇に寄与していることが推測される。しかしながら、過去の GWAS に関する報告<sup>20)</sup>では、*ABCG2* の SNP は血清尿酸値に対する影響以上に痛風の疾患感受性に影響することが示されており、SNP 解析の点からみた *ABCG2* の痛風の疾患感受性に対する影響は、尿酸排泄機能低下以外の機序が存在することも考えられる。そのため、本研究においては血清尿酸値に関してではなく、痛風の疾患感受性に関して遺伝子解析を実施し、*ABCG2* 遺伝子変異のうち common variant と rare variant の両方がいずれも独立して痛風の疾患感受性に影響するののかについて検証した。

これまでに非同義の *ABCG2* 遺伝子の common variant として Q126X、Q141K、V12M の3種類の変異が検出されている。過去の報告では、これらの3種類の非同義変異は同一染色体上に存在しないことが判明している<sup>19-21)</sup>。すなわち、こ

これらの変異はお互いに完全連鎖不平衡の関係にある。いずれも単変量ロジスティック回帰解析では痛風の疾患感受性と有意な関連を示し、Q126X と Q141K は痛風発症に関するリスク因子、V12M は疾患回避因子であることを示した。以上から、V12M は単独で解析した場合には痛風の疾患発症に対して保護的な効果があるようであるが、3種類の変異を説明変数として多変量解析を行った結果では、有意な説明変数ではなかった。これは V12M、Q124X、および Q141K が互いに完全連鎖不平衡にあることから、V12M を持つ場合には痛風発症リスクである Q124X または Q141K を持つ可能性が低くなるためであると考えられる。本研究において行った ATP 依存性尿酸輸送機能解析においても、V12M は野生型の ABCG2 と比較して機能低下を認めず、このことは多変量ロジスティック回帰解析にて V12M が痛風の疾患感受性に直接的な影響を与えないという解析結果と矛盾しない。

本研究では、ヒト胎児腎細胞由来の細胞系統である HEK293 細胞を用いた ATP 依存性尿酸輸送機能解析を行うことで ABCG2 変異体の尿酸輸送機能を定量化した。機能解析において尿酸輸送機能の低下を伴った ABCG2 変異体の中では、細胞膜上の発現量が保たれるものと、細胞膜上での発現がみられないものが存在した。このことから、ABCG2 変異体の尿酸輸送機能低下の原因として、一分子当たりの尿酸輸送機能の低下と、細胞膜移行に必要な安定なタンパク発現も

しくは細胞膜への移行機序のうち、いずれかまたは両方が関与していることが示唆された。*ABCG2* の common variant と痛風の疾患感受性の関連解析に関する既報<sup>24)</sup>では、同様の機能解析を Q126X と Q141K 変異に対して行った上で、この2つの SNP の遺伝子型の組み合わせから *ABCG2* の尿酸輸送機能が推定できることを示している。この推定法による *ABCG2* 機能は、低くなるほど痛風発症リスクが大きくなるため、ATP 依存性尿酸輸送機能解析により非同義変異に伴う *ABCG2* の機能変化を評価することは痛風発症リスクの評価において有用であると考えられる。しかしながら、*ABCG2* 変異体の機能解析を行う際には、変異体発現細胞の細胞膜小胞を大量に抽出する必要があることなどから非常に多くの労力を要する。そのため、ターゲット・シーケンシングなどにより網羅的に多種類の変異体が検出された場合、全ての変異体に対してその都度、機能解析を実施することは現実的ではない。そこで、本研究のターゲット・シーケンシングで同定した 22 個の非同義変異のうちミスセンス変異、ナンセンス変異、挿入欠失変異ごとにそれぞれの約半数の、合計して 11 個の非同義変異に対して機能解析を行った。また、同時に過去の別の研究で同定し *ABCG2* 変異体の細胞膜小胞を作成済みであった 9 個の非同義変異についても機能解析を実施した。ターゲット・シーケンシングで同定したものの機能解析の対象としなかった 9 個のミスセンス変異に関しては、タンパク質予測アルゴリズムである SIFT およ

び PolyPhen-2 のスコアを通じて評価した。ATP 依存性尿酸輸送機能解析の結果は SIFT のスコアと有意な相関を示し、PolyPhen-2HumDiv のスコアも相関傾向を示した。このように、分子遺伝疫学的研究において部分的に機能解析を行った上でタンパク質予測アルゴリズムを併用することは、特にミスセンス変異については多種類の rare variant を対象とした場合には現実的な評価法であると考えられる。

こうして、まず、尿酸輸送機能解析とタンパク質予測アルゴリズムによる解析を組み合わせ、*ABCG2* の非同義変異を伴う rare variant のうち尿酸輸送機能の低下を伴わないと考えられる一部の rare variant を除外した。そして、残りの rare variant を一つ以上持つ者を rare variant carrier として、*ABCG2* の機能低下を伴う common variant である Q126X と Q146K と共に説明因子としてロジスティック回帰解析を行った。その結果、Q126X と Q141K の痛風発症リスク（オッズ比）はそれぞれ 3.4 と 2.3 であった。これまでに GWAS<sup>14-16</sup>などの症例対照研究で発見された痛風関連の common variant のオッズ比は *ABCG2* に関連するものを除いて全て 2.0 未満であり、Q126X と Q146K の痛風発症リスク（オッズ比）はこれらの値よりも高値である。さらにこれらの common variant は日本人集団において広く分布しているため、今回の研究でもその重要性和 Common Disease, Common Variant 仮説は支持されるものと考えられる。Q126X は *ABCG2* の尿酸輸送

機能喪失を伴う SNP であるが、1000 ゲノムプロジェクト・フェーズ 3<sup>41)</sup>のデータベースや過去の報告<sup>50)</sup>によると日本人集団では約 2.4%のマイナーアレル頻度があるものの、日本人以外の集団ではほぼ存在しない。また、Q141K は ABCG2 の尿酸輸送機能がほぼ半分になる SNP であるが、同データベースによると全世界的に分布するものの、日本を含めた東アジアにおいて約 30%のマイナーアレル頻度があり、その他の地域ではいずれも 15%未満であることに比べて顕著に高い。過去の記述<sup>7-10)</sup>から判断すると、本邦では近世より第 2 次世界大戦前に至るまで痛風患者数がごく少数であったと考えられる。すなわち、長期間にわたり食生活などの環境要因が痛風に及ぼす影響は低く、痛風の疾患感受性に対する選択圧が低かったと考えられる。日本人集団での痛風発症における ABCG2 遺伝子変異の影響を考えた場合に、歴史的に痛風の疾患感受性への選択圧が長期間低かったことが、大きな痛風発症リスクである Q124X と Q141K を common variant とさせた可能性が高い。

今回の研究では Q126X と Q141K の両者を持たない群で行った関連解析にて、尿酸輸送機能の低下が推測される ABCG2 の rare variant を一つ以上持つことが、痛風の疾患感受性と有意な関連を示した。これらの rare variant を一つ以上持つ者は痛風患者群では、480 人中 30 人存在した。これは Q126X と Q141K をヘテロまたはホモ変異で持つ患者がそれぞれ 55 名ならびに 325 名であることと比較

すると少数であるが、患者全体の約 6.3%にあたる。さらに、Q126X と Q141K をいずれも持たない痛風患者 131 名に限れば、その約 10.7%を占める。また、多変量ロジスティック回帰解析による rare variant の痛風発症に対するオッズ比は 2.7 であり、オッズ比がそれぞれ 3.4、2.3 である Q126X や Q141K と近似した値となった。そのため機能低下型の rare variant はこれらの common variant より特別に大きくはないものの、ほぼ同等のリスクであり、かつ本研究における患者群では約 6.3%と高頻度で分布している。すなわち、*ABCG2* 遺伝子と痛風の疾患感受性との関連においては、前述したように common variant が非常に重要であり、Common Disease, Common Variant 仮説が成立していることは示唆されるが、さらに同時に Common Disease, Multiple Rare Variant 仮説も両立しているものとする。このことから、個別化医療の視点からも *ABCG2* 遺伝子の Q126X と Q141K などの common variant だけでなく、特にこれらの SNP を持たない場合に rare variant を評価することでより詳細に痛風の遺伝的リスクを評価することができる。本研究の規模では、遺伝子の rare variant と common disease の疾患感受性との関連解析を行う場合に、それぞれの個々の rare variant を持つサンプル数が症例群、対照群ともに非常に少なかったため、特定の rare variant の疾患発症リスクについて詳細な検討を行うことは困難であった。しかしながら、次世代シーケンシングにより同定した rare variant のうち、本研究において関連

解析の対象に含めたもののように、タンパク質予測アルゴリズムのスコアから ABCG2 の尿酸輸送機能が低下していると判断できる場合には、総体としてオッズ比が約 2.7 の痛風発症リスクであることを示すことができた。以上のことから今後、さらにサンプル数を増やして個々の rare variant についてより詳細な解析を行うことにより、痛風発症に関わる特定の rare variant を高い確率で同定することができれば個別化医療に応用する第一歩になりうる。例えば、高リスクとなる rare variant を持つ場合には、より精密な栄養管理や投薬治療を計画することで痛風の発症予防にも通じうる。また、common disease の遺伝的要因という大きな視点で見たとき、ある common disease の発症に関して、同一遺伝子の common variant と rare variant の両者がいずれも大きな影響を及ぼしているという報告はあまり例がない。そのため、本研究の成果は、common disease の遺伝的要因に関して、「集団内において複数の common variant と rare variant がともに common disease の遺伝的背景を形成する」という新たな概念である「Common Disease, Multiple Rare and Common Variant モデル」を提唱するものである。



## 第6章 結論

日本人痛風患者 480 名と対照者 480 名に対して、次世代シーケンサーを用いたターゲット・シーケンシングを実施し、尿酸トランスポーター遺伝子 *ABCG2* の common variant と rare variant の両方が痛風の疾患感受性に強くかつ独立して影響していることを示した。また、日本人集団において、リスクとなる *ABCG2* 変異のうち common variant である Q126X と Q141K は高頻度で存在し、これに複数種類の rare variant も包括的に評価すると、いずれか一つを持つ頻度は高いことをあわせて示した。以上の発見は、痛風発症の遺伝的リスクの高い人をより正確に見つけ出すことに寄与し、個別化医療の推進につながるものと考えられる。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究における御指導ならびに本研究論文の御高閲を賜りました防衛医科大学校分子生体制御学講座教授 四ノ宮成祥先生に深謝いたします。また、本研究論文の御高閲を賜りました同衛生学公衆衛生学講座教授 角田正史先生、同准教授 中島宏先生、本研究全般において直接御指導頂きました同分子生体制御学講座講師 松尾洋孝先生、ATP 依存性尿酸輸送機能解析の御支援を頂きました東京大学薬学部教授 鈴木洋史先生、同講師 高田龍平先生、同特任研究員 豊田優先生、遺伝子解析において御支援頂きました国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門教授 井ノ上逸郎先生、同助教 中岡博史先生、統計解析において御支援頂きました防衛医科大学校数学研究室准教授 中村好宏先生、検体・臨床情報を御提供頂きました両国東口クリニック 大山博司先生、名古屋大学予防医学講座教授 若井建志先生をはじめ、その他多くの共同研究者の皆様、そして多大な御支援を賜りました防衛医科大学校分子生体制御学講座の皆様、この場を借りて御礼申し上げます。

## 付記

本論文の一部は以下で発表した。

Higashino T, Takada T, Nakaoka H, Toyoda Y, Stiburkova B, Miyata H, Ikebuchi Y,  
Nakashima H, Shimizu S, Kawaguchi M, Sakiyama M, Nakayama A, Akashi A,  
Tanahashi Y, Kawamura Y, Nakamura T, Wakai K, Okada R, Yamamoto K,  
Hosomichi K, Hosoya T, Ichida K, Ooyama H, Suzuki H, Inoue I, Merriman TR,  
Shinomiya N, Matsuo H. Multiple common and rare variants of *ABCG2* cause gout.  
*RMD Open* 3: e000464, 2017.

## 単語・略語説明

### アレル (allele)

ヒトは両親から 1 セットずつゲノムを引き継ぐ。そのため、同一遺伝子座においては父親あるいは母親由来のものが 1 つずつ存在するが、この個々の遺伝子をアレル (対立遺伝子) と呼ぶ。遺伝子変異において、異なるアレルを受け取った状態をヘテロ変異あるいはヘテロ接合型、同じアレルを受け取った状態をホモ変異あるいはホモ接合型と呼ぶ。また、集団内の多くが共通して持つアレルは「major allele」、それ以外のアレルは「minor allele」と呼ばれ、major allele のホモ接合型は一般的に「野生型 (wild type)」と呼ばれる。

### 一塩基変異 (SNV: single nucleotide variant)

ヒトの DNA は 4 種類の塩基 (A: adenine, T: thymine, G: guanine, C: cytosine) を含んだ配列で構成されている。この配列は個人間で少しずつ異なっているが、その違い (「遺伝子変異」とよばれる) は一か所あたり一塩基のみのものから複数塩基にわたるものまでさまざまである。このうち、一か所あたり一塩基のみの置換による遺伝子変異を一塩基変異 (SNV) と呼ぶ。

### **一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism)**

一塩基変異 (SNV: single nucleotide variant) のうち、集団内で 1% 以上に認められるものを一塩基多型 (SNP) と呼ぶ。SNP はおおよそ 1,000 塩基に一か所の頻度で存在するといわれる。

### **機能低下型変異 (dysfunctional variant)**

非同義変異により、遺伝子から翻訳されるタンパク質の生体内での機能が低下するとき、この遺伝子変異を機能低下型変異と呼ぶ。このうち、完全に機能が消失する場合を機能消失型変異とも呼ぶ。

### **ゲノムワイド関連解析 (GWAS: genome-wide association study)**

ヒトゲノム全体に渡って 50 万個以上の一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) と common な挿入欠失変異 (indel: insertion and deletion) の遺伝子型を同定し、アレル頻度と表現型との間に関連があるかどうかをみる遺伝統計学に基づいた研究手法で、2002 年に理化学研究所が初めて発表した。多数の SNP と indel に対して統計学的解析を実施するため、有意水準は一般的に多重検定を考慮し  $p < 5.0 \times 10^{-8}$  とされる。

## 選択圧 (selection pressure)

遺伝子変異の中には、自身の生存確率や次世代に残せる子の数に影響を与えるものがあり、その表現型が選択されることにより一定の方向に進化や種分化が進むことがある。この概念を生物学用語で選択、あるいは広義の自然選択 (natural selection) と呼び、1859 年にチャールズ・ダーウィンとアルフレッド・ウォレスにより体系化された。選択には自然環境に由来し生存率の差から生じる狭義の自然選択や、オスとメスの社会関係に由来し生殖効率の差により引き起こされる性選択 (sexual selection) などの概念が含まれる。この中で実際に生存率や生殖効率に差をもたらす自然環境の力を選択圧と言う。新たに発生した遺伝子変異に対する選択圧が高い場合、該当する遺伝子変異は集団内に広まらない。

## 挿入欠失変異 (indel: insertion and deletion)

DNA への塩基配列の挿入がある変異を挿入変異 (insertion)、欠失のある変異を欠失変異 (deletion) という。挿入欠失変異がコーディング領域に存在している場合、変異の長さが 3 の倍数でない限りフレームシフトを伴い、この変異以降のアミノ酸配列が全て置換される。また、多くの場合は終止コドンの場所がずれることによりタンパク質の長さも変化することになる。

### ターゲット・シーケンシング (targeted sequencing)

特定の遺伝子のサブセットまたは遺伝子領域を単離し、次世代シーケンサーで該当する生物種の参照ゲノムを用いてシーケンスする方法である。目標とする特定の遺伝子領域に時間、費用、およびデータ解析を集中させることができる利点がある。

### 非同義変異 (nonsynonymous variant)

核酸の塩基配列が、タンパク質を構成するアミノ酸配列へと生体内で翻訳されるとき、連続する3つの塩基配列(コドン)が各アミノ酸に対応する。DNAは4種類の塩基(A: adenine, T: thymine, G: guanine, C: cytosine)を含んだ配列で構成されているため、コドンは計64通り存在するが、対応するアミノ酸は20種類であり、この他に終止コドンと呼ばれるアミノ酸翻訳の終了を意味する組合せも存在するが、それを加えても21種類に過ぎない。そのため、一塩基変異(SNV: single nucleotide variant)にはアミノ酸配列が変化するものとし、ないものが存在する。前者を非同義変異、後者を同義変異と呼ぶ。非同義変異のうち、野生型のタンパク質を構成するアミノ酸が別のアミノ酸に置換するものをミスセンス変異、終止コドンに置換してそれ以降のタンパク質合成が行われないものをナンセンス変異と特に呼ぶ。非同義変異におけるアミノ酸配列の変化とし

て、例えば *ABCG2* 遺伝子では Q126X 変異や Q141K 変異などが存在する。この場合、「Q126X」では遺伝子 *ABCG2* において、グルタミン (Q) に対応する 126 番目のコドンが終止コドン (X) に、「Q141K」ではグルタミン (Q) に対応する 141 番目のコドンがリシン (K) に対応するコドンに、それぞれ変異している。なお、挿入欠失変異 (indel: insertion and deletion) では全ての変異がアミノ酸配列の変化を伴うため、非同義変異である。

### **疾患感受性 (disease susceptibility)**

common disease のように遺伝的要因と環境的要因が交絡して発症する複雑疾患において、個人がもつ遺伝的要因を表す量的概念が疾患感受性である。遺伝子解析においては、疾患群と対照群の間で遺伝子変異の頻度を比較する場合に「疾患感受性の解析」という表現を用いる。

### **マイナーアレル頻度 (MAF: minor allele frequency)**

ある集団内の総アレル数、すなわち集団の構成者数の 2 倍にあたる数のうち、マイナーアレルの占める割合を指す。



## ロジスティック回帰解析

ロジスティック回帰解析はベルヌーイ分布に従う変数の統計的回帰モデルの一種であり、以下の式のように  $n$  個の独立変数（共変量） $X_1, X_2, \dots, X_n$  で従属変数を表現（説明）する一般化線形モデルである。

$$\ln(p/1-p) = \alpha + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n$$

この式において  $p$  は確率であり、本研究の場合は痛風であるか否かという確率が相当する。 $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$  は偏回帰係数、 $\alpha$  は定数項と呼ばれる。本研究では、 $X$  に各種の *ABCG2* 遺伝子変異をとり、偏回帰係数から  $\exp(\beta)$  を計算することでオッズ比を求めた（表 4、表 5、表 7）。

## Common Disease, Common Variant 仮説 / Common Disease, Multiple Rare Variant 仮説

ありふれた疾患、すなわち common disease は遺伝的要因と環境的要因とが複雑に交絡して発症に至る多因子疾患である。その遺伝的要因も単一ではなく、複数の関連性遺伝子が単独で、あるいは複数で相互に作用することで構成されると考えられている。限られた集団は同一の祖先から生じているため、common disease の遺伝的要因を構成する疾患感受性アレルの少なくとも一部は、複数の患者間で共有されると考えられている。集団内で患者が共有している感受性ア

レルが主に common variant であるという学説を Common Disease, Common Variant 仮説、rare variant であるという学説を Common Disease, Multiple Rare Variant 仮説と呼ぶ。

### **common variant**

ヒトゲノム DNA における遺伝子変異 (genetic variant) のうち、ある集団内で 1% 以上に認められるものを common variant や多型 (polymorphism) と呼ぶ。

### **rare variant**

ヒトゲノム DNA における遺伝子変異 (genetic variant) のうち、ある集団内で 1% 未満にのみ認められるものを rare variant と呼ぶ。

## 参考文献

- 1 Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, *et al.*  
Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature*. 2009; 461(7265):  
747-53.
- 2 Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet.*  
2001; 17(9): 502-10.
- 3 Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. rare allele hypotheses  
for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev*. 2009; 19(3): 212-9.
- 4 Do R, Stitzel NO, Won HH, Jorgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, *et al.*  
Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for  
myocardial infarction. *Nature*. 2015; 518(7537): 102-6.
- 5 Cruchaga C, Karch CM, Jin SC, Benitez BA, Cai Y, Guerreiro R, *et al.* Rare  
coding variants in the phospholipase D3 gene confer risk for Alzheimer's disease.  
*Nature*. 2014; 505(7484): 550-4.
- 6 厚生労働省. “国民生活基礎調査”. e-Stat. 2018-07-20.  
<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&toukei=00450061>, (accessed  
2018-07-20).

- 7 Fróis L. Tratado em que se contem muito susintae abreviadamente algumas  
contradições e diferenças de costumes antre a gente de Europa e esta provincial  
de Japão. Canzusa, 1585.
- 8 Fróis L, 岡田章雄. ヨーロッパ文化と日本文化. 東京: 岩波文庫, 1991.
- 9 崎山真幸, 松尾洋孝. 若くして痛風を発症する遺伝的要因. *BIO Clinica*.  
2015;30493-96.
- 10 鎌谷直之. “尿酸代謝異常”. 新臨床内科学. 高久史磨他編. 第9版, 東京,  
医学書院, 2009, p. 724-727.
- 11 Williams PT. Effects of diet, physical activity and performance, and body weight  
on incident gout in ostensibly healthy, vigorously active men. *Am J Clin Nutr*.  
2008;87(5):1480-7.
- 12 Choi HK, Atkinson K, Karlson EW, Willett W, Curhan G. Alcohol intake and  
risk of incident gout in men: a prospective study. *Lancet*.  
2004;363(9417):1277-81.
- 13 Mikuls TR, Farrar JT, Bilker WB, Fernandes S, Schumacher HR, Jr., Saag KG.  
Gout epidemiology: results from the UK General Practice Research Database,  
1990-1999. *Ann Rheum Dis*. 2005;64(2):267-72.
- 14 Matsuo H, Yamamoto K, Nakaoka H, Nakayama A, Sakiyama M, Chiba T, *et al*.

- Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Ann Rheum Dis.* 2016; 75(4): 652-9.
- 15 Nakayama A, Nakaoka H, Yamamoto K, Sakiyama M, Shaukat A, Toyoda Y, *et al.* GWAS of clinically defined gout and subtypes identifies multiple susceptibility loci that include urate transporter genes. *Ann Rheum Dis.* 2017; 76(5): 869-77.
- 16 Li C, Li Z, Liu S, Wang C, Han L, Cui L, *et al.* Genome-wide association analysis identifies three new risk loci for gout arthritis in Han Chinese. *Nat Commun.* 2015; 67041.
- 17 Higashino T, Matsuo H, Sakiyama M, Nakayama A, Nakamura T, Takada T, *et al.* Common variant of PDZ domain containing 1 (PDZK1) gene is associated with gout susceptibility: A replication study and meta-analysis in Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2016; 31(6): 464-66.
- 18 Higashino T, Matsuo H, Okada Y, Nakashima H, Shimizu S, Sakiyama M, *et al.* A common variant of MAF/c-MAF, transcriptional factor gene in the kidney, is associated with gout susceptibility. *Hum Cell.* 2018; 31(1): 10-13.
- 19 Dehghan A, Kottgen A, Yang Q, Hwang SJ, Kao WL, Rivadeneira F, *et al.*

- Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008; 372(9654): 1953-61.
- 20 Köttgen A, Albrecht E, Teumer A, Vitart V, Krumsiek J, Hundertmark C, *et al*. Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nat Genet*. 2013; 45(2): 145-54.
- 21 Kamatani Y, Matsuda K, Okada Y, Kubo M, Hosono N, Daigo Y, *et al*. Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat Genet*. 2010; 42(3): 210-5.
- 22 Okada Y, Sim X, Go MJ, Wu JY, Gu D, Takeuchi F, *et al*. Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations. *Nat Genet*. 2012; 44(8): 904-9.
- 23 Kanai M, Akiyama M, Takahashi A, Matoba N, Momozawa Y, Ikeda M, *et al*. Genetic analysis of quantitative traits in the Japanese population links cell types to complex human diseases. *Nat Genet*. 2018; 50(3): 390-400.
- 24 Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, *et al*. Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med*. 2009; 1(5): 5ra11.

- 25 Ichida K, Matsuo H, Takada T, Nakayama A, Murakami K, Shimizu T, *et al.*  
Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat Commun.* 2012; 3764.
- 26 Matsuo H, Nakayama A, Sakiyama M, Chiba T, Shimizu S, Kawamura Y, *et al.*  
ABCG2 dysfunction causes hyperuricemia due to both renal urate  
underexcretion and renal urate overload. *Sci Rep.* 2014; 43755.
- 27 Matsuo H, Tsunoda T, Ooyama K, Sakiyama M, Sogo T, Takada T, *et al.*  
Hyperuricemia in acute gastroenteritis is caused by decreased urate excretion via  
ABCG2. *Sci Rep.* 2016; 631003.
- 28 Matsuo H, Ichida K, Takada T, Nakayama A, Nakashima H, Nakamura T, *et al.*  
Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout.  
*Sci Rep.* 2013; 32014.
- 29 Sulem P, Gudbjartsson DF, Walters GB, Helgadottir HT, Helgason A,  
Gudjonsson SA, *et al.* Identification of low-frequency variants associated with  
gout and serum uric acid levels. *Nat Genet.* 2011; 43(11): 1127-30.
- 30 Nakayama A, Matsuo H, Nakaoka H, Nakamura T, Nakashima H, Takada Y, *et al.*  
*al.* Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on  
hyperuricemia progression than typical environmental risk factors. *Sci Rep.*

- 2014; 45227.
- 31 Wallace SL, Robinson H, Masi AT, Decker JL, McCarty DJ, Yu TF. Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum.* 1977; 20(3): 895-900.
- 32 Hamajima N, Group JMS. The Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study (J-MICC Study) to detect gene-environment interactions for cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2007; 8(2): 317-23.
- 33 Takeuchi F, Katsuya T, Kimura R, Nabika T, Isomura M, Ohkubo T, *et al.* The fine-scale genetic structure and evolution of the Japanese population. *PLoS One.* 2017; 12(11): e0185487.
- 34 Sakiyama M, Matsuo H, Shimizu S, Chiba T, Nakayama A, Takada Y, *et al.* Common variant of leucine-rich repeat-containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility. *Hum Cell.* 2014; 27(1): 1-4.
- 35 Ahmadloo S, Nakaoka H, Hayano T, Hosomichi K, You H, Utsuno E, *et al.* Rapid and cost-effective high-throughput sequencing for identification of germline mutations of BRCA1 and BRCA2. *J Hum Genet.* 2017; 62(5): 561-7.
- 36 Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009; 25(14): 1754-60.



- 37 Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009; 25(16): 2078-9.
- 38 McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010; 20(9): 1297-303.
- 39 DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat Genet*. 2011; 43(5): 491-8.
- 40 Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38(16): e164.
- 41 Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, *et al.* A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015; 526(7571): 68-74.
- 42 Miyata H, Takada T, Toyoda Y, Matsuo H, Ichida K, Suzuki H. Identification of Febuxostat as a New Strong ABCG2 Inhibitor: Potential Applications and Risks in Clinical Situations. *Front Pharmacol*. 2016; 7518.

- 43 Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Kobayashi D, *et al.*  
Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res.* 2004;  
21(10): 1895-903.
- 44 Stiburkova B, Miyata H, Zavada J, Tomcik M, Pavelka K, Storkanova G, *et al.*  
Novel dysfunctional variant in ABCG2 as a cause of severe tophaceous gout:  
biochemical, molecular genetics and functional analysis. *Rheumatology (Oxford).*  
2016; 55(1): 191-4.
- 45 Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein  
function. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13): 3812-4.
- 46 Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe W, 3rd, Kondrashov AS, Bork P.  
Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet.* 2001; 10(6): 591-7.
- 47 Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human  
missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet.* 2013;Chapter  
7Unit7 20.
- 48 Li B, Leal SM. Methods for detecting associations with rare variants for  
common diseases: application to analysis of sequence data. *Am J Hum Genet.*  
2008; 83(3): 311-21.
- 49 Woodward OM, Kottgen A, Coresh J, Boerwinkle E, Guggino WB, Kottgen M.

Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(25): 10338-42.

- 50 Sakiyama M, Matsuo H, Takada Y, Nakamura T, Nakayama A, Takada T, *et al.* Ethnic differences in ATP-binding cassette transporter, sub-family G, member 2 (ABCG2/BCRP): genotype combinations and estimated functions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2014; 29(6): 490-2.

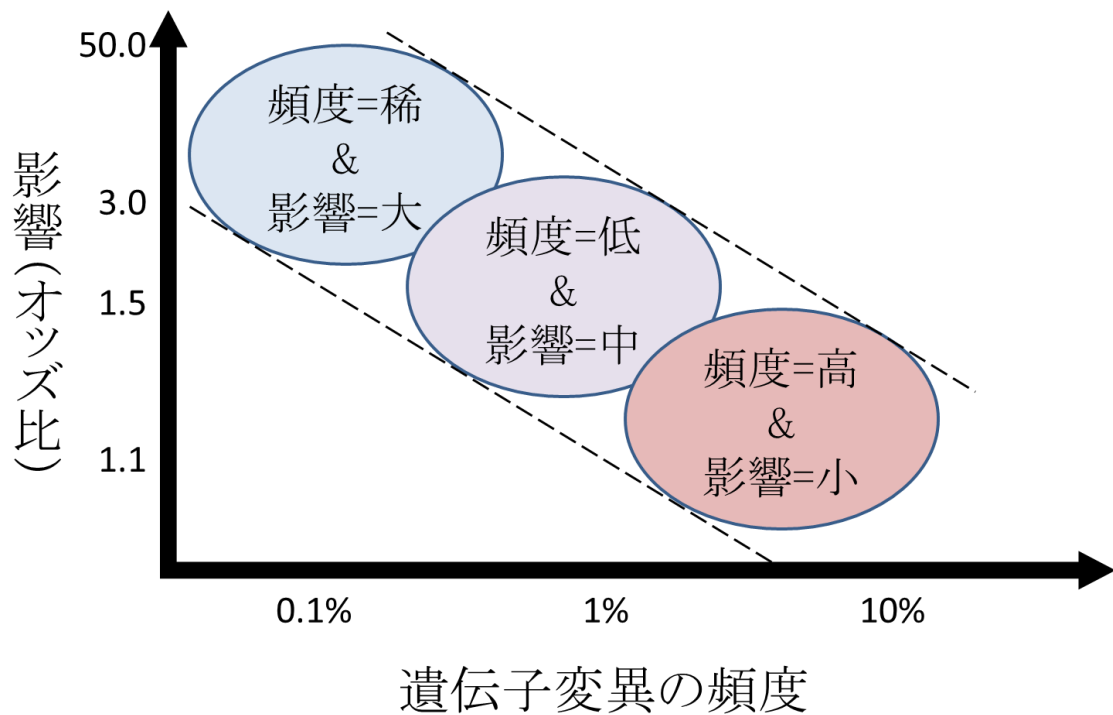


図1 集団内における遺伝子変異の頻度と疾患の発症に対する影響の大きさの関係

一般的な疾患発症の遺伝的背景において、個々の遺伝子変異が及ぼす影響の大きさを示す。頻度の高い遺伝子変異である **common variant** は疾患感受性に対する影響は限定的であるのに対して、稀少な遺伝子変異である **rare variant** にはより高い疾患発症リスクを示すものが含まれると考えられている。

(文献1より引用改変)

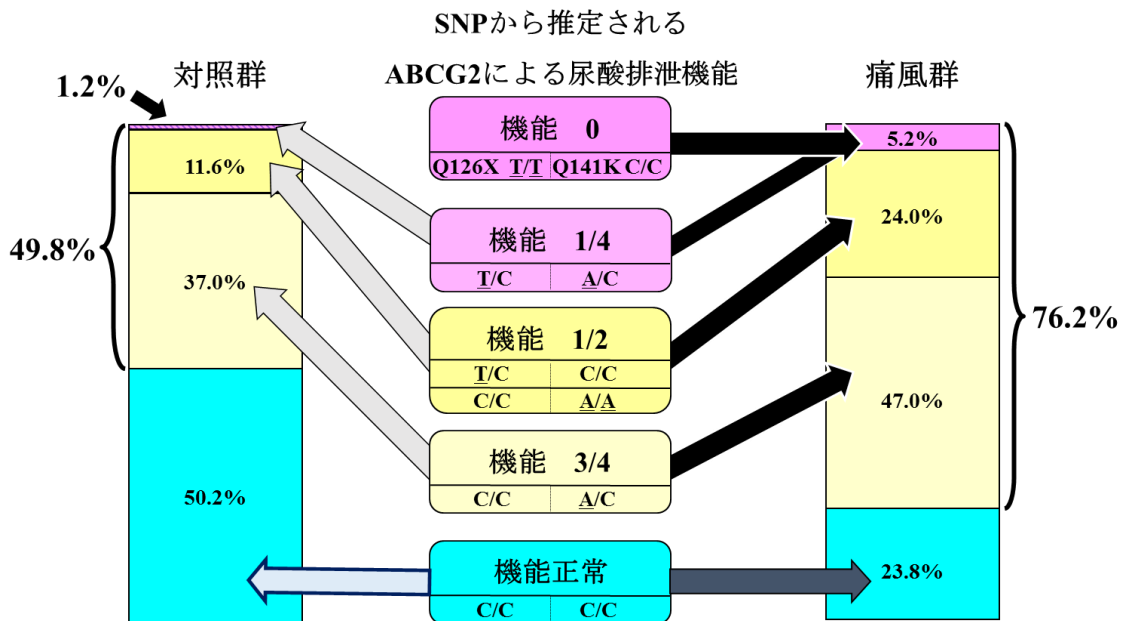


図2 ABCG2 遺伝子の SNP と痛風発症との関係

機能消失型変異である Q126X と機能半減型変異である Q141K の 2 つの SNP のディプロタイプから、ABCG2 による尿酸輸送機能は 5 段階に推定できる。これらの 2 つの SNP は、痛風・高尿酸血症に罹患歴のない対照群では 49.8% にしか認められなかったのに対し痛風群では全体の 76.2% に認められた。また、ABCG2 による尿酸輸送機能が 1/4 以下と推定されるサンプルは、対照群では 1.2% に留まったのに対し痛風群では 5.2% を占め、オッズ比が 25.8 となる極めて高い痛風発症リスクを示した。

(文献 24 より引用、改変)

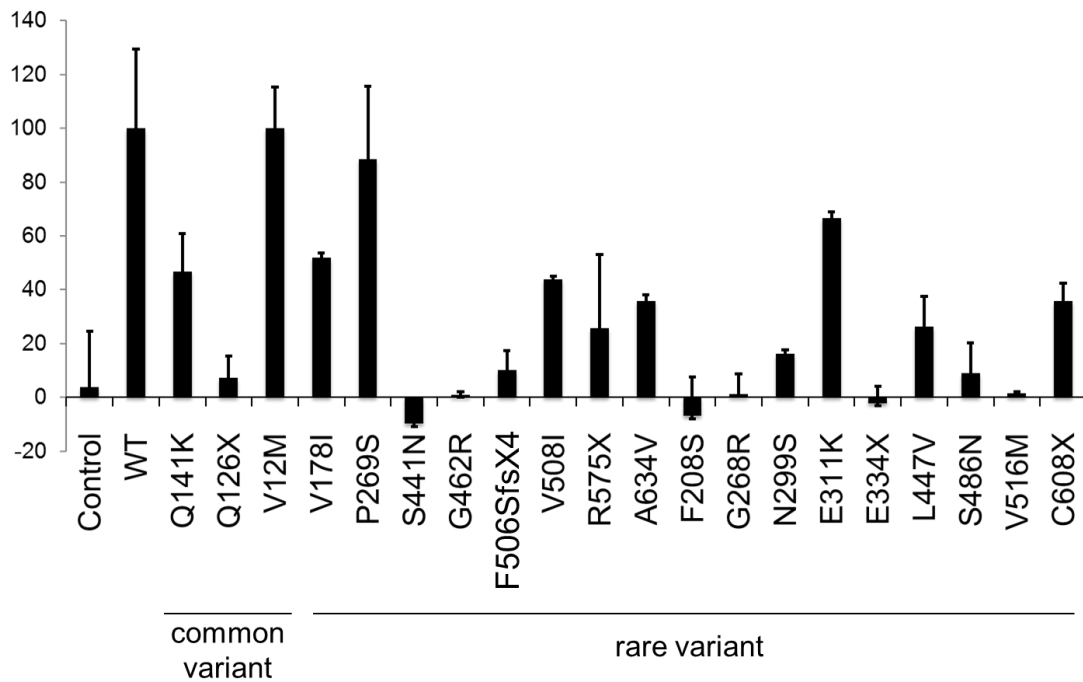


図3 ABCG2の変異体を用いたATP依存性尿酸輸送機能の解析

縦軸は変異体ごとのATP依存性尿酸輸送機能を表しており、野生型(WT)を100%として比較した場合のパーセンテージで数値化している。尿酸輸送機能はいくつかのミスセンス変異(S441N、G462R、F208S、G268R、S486NおよびV516M)、ナンセンス変異(Q126XおよびE334X)、そしてフレームシフトを伴う欠失変異(F506SfsX4)では、ほとんど消失していた。対照的に、V12MとP269Sの2つの変異では機能の低下を認めなかった。

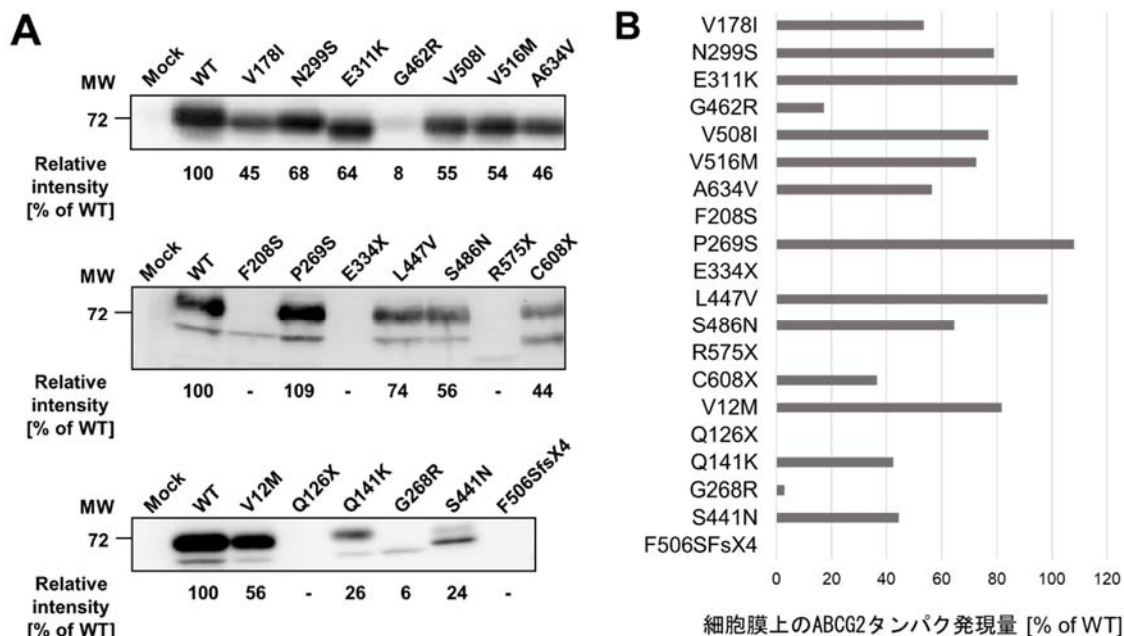


図4 イムノブロットによる、野生型および変異型 ABCG2 の細胞膜上の発現解析

同じタンパク量のサンプルを用い、ABCG2 の発現をイムノブロット法により解析をした。N 末端を myc-tag が標識した ABCG2 に対して、抗 myc 抗体を用いることで検出を行った。各バンドの濃さは画像処理装置である Fusion Solo 4<sup>TM</sup> system (Vilber Lourmat 社、Eberhardzell、Germany) を用いて定量化した後、野生型 (WT) を 100% として比較した場合のパーセンテージを数値化した (A)。また、変異体ごとに 2 回または 3 回の発現解析実験を行い、得られた結果の平均を示した (B)。F208S、E334X、R575X、Q126X、F506SfsX4 の変異体では細胞膜への ABCG2 の発現を確認できなかった。

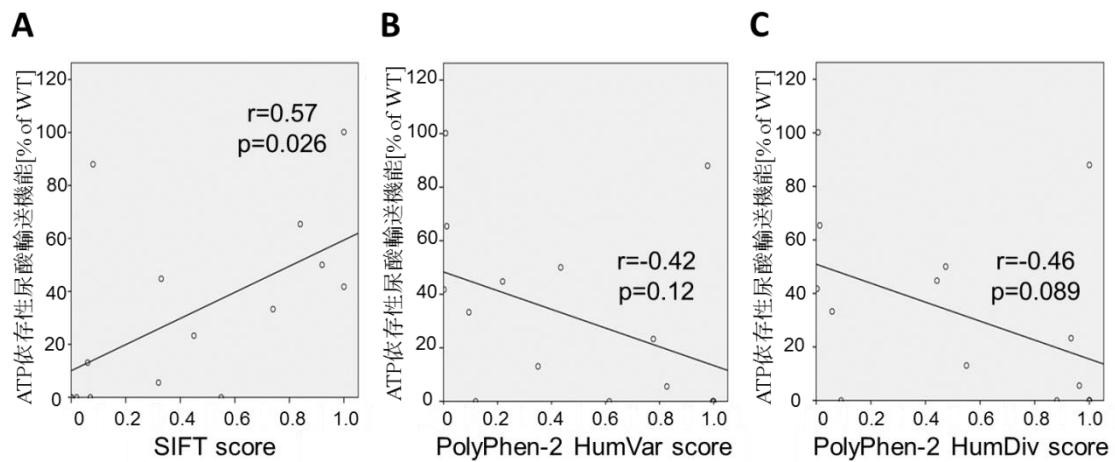


図5 ATP依存性尿酸輸送機能とタンパク質機能変化予測アルゴリズムスコアの相関

縦軸は変異体ごとのATP依存性尿酸輸送機能を表しており、野生型(WT)を100%として比較した場合のパーセンテージを示す。横軸はタンパク質機能変化予測アルゴリズムのスコアを示す。それぞれ(A) Sorting Intolerant from Tolerant (SIFT)、(B) Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) HumVar、(C) PolyPhen-2 HumDivのスコアである。SIFTのスコアは機能解析の結果と有意な正の相関を示した( $r=0.57$ 、 $p=0.026$ )。また、PolyPhen-2HumDivのスコアは有意ではないものの、機能解析の結果とは負の相関にある傾向を示した( $r=-0.46$ 、 $p=0.089$ )。



表1 本研究において同定された *ABCG2* の非同義変異の一覧

頻度による変異の分類	rs 番号	染色体上の位置*	塩基置換†	アミノ酸置換	痛風群		対照群	
					該当者数‡	MAF (%)	該当者数‡	MAF (%)
common variant	rs2231137	89061114	G34A	V12M	118	12.3	180	18.8
	rs72552713	89052957	C376T	Q126X	55	5.73	23	2.40
	rs2231142	89052323	C421A	Q141K	325	33.9	218	22.7
rare variant	rs199473672	89052998	C335T	P112L	6	0.625	4	0.417
	rs149106245	89052361	A383T	D128V	2	0.208	1	0.104
	rs201006821	89052299	G445C	A149P	0	0	1	0.104
	rs199753603	89052289	T455C	M152T	1	0.104	0	0
	N/A	89052255	G489C	R163S	1	0.104	0	0
	rs746311704	89042944	G532A	V178I	1	0.104	1	0.104
	rs200190472	89039366	C736T	R246X	1	0.104	2	0.208
	rs34678167	89039297	C805T	P269S	3	0.313	2	0.208
	N/A	89039275	A827G	Y276C	0	0	1	0.104
	rs750972998	89034567	1079_1081delAGA	K360del	2	0.208	1	0.104
	N/A	89022427	G1322A	S441N	3	0.313	0	0
	rs752408502	89020584	G1384A	G462R	1	0.104	0	0
	rs192169063	89020503	T1465C	F489L	8	0.833	3	0.312
	rs868217328	89018737	1515delC	F506SfsX4	3	0.313	0	0
	N/A	89018730	G1522A	V508I	2	0.208	0	0
	rs548254708	89016686	C1723T	R575X	0	0	2	0.208
	rs200933122	89013532	T1822C	C608R	2	0.208	0	0
rs748531218	89013495	A1859G	D620G	1	0.104	0	0	
N/A	89013453	C1901T	A634V	1	0.104	0	0	
「rare variant carrier」数§					33		18	
総数					480		480	

## 表 1 の説明

いずれの種類 **rare variant** でもホモ変異を持つ研究対象者は同定されなかった。

\*染色体上の位置は **GRCh37** の配列情報に基づいて記載した。

†塩基置換の位置は **NM\_004827** の配列情報に基づいて記載した。

‡該当者数はホモ変異とヘテロ変異の両者の合計数を記載した。

§1 つ以上の **rare variant** を持つ研究対象者数を示す。

**MAF**, マイナーアレル頻度; **N/A**, 該当するものなし

表2 *ABCG2* 遺伝子の common variant の遺伝子型

rs 番号	アミノ酸置換	A1/A2*	痛風群				対照群			
			A1/A1	A1/A2	A2/A2	Unknown	A1/A1	A1/A2	A2/A2	Unknown
rs2231137	V12M	G/A	361	109	9	1	299	159	21	1
rs72552713	Q126X	C/T	423	53	2	2	455	23	0	2
rs2231142	Q141K	C/A	152	233	92	3	262	185	33	0

\*A1 に major allele を、A2 に minor allele をそれぞれ記載した。

表3 ATP依存性尿酸輸送機能解析を行わなかった *ABCG2* 遺伝子の rare variant の SIFT および PolyPhen-2 のスコア

rs 番号	アミノ酸置換	SIFT	PolyPhen-2 HumVar	PolyPhen-2 HumDiv
rs199473672	P112L	0.21	0.176	0.455
rs149106245	D128V	0	0.998	1
rs201006821	A149P	1	0	0
rs199753603	M152T	0.03	0.022	0.03
N/A	R163S	0.47	0.103	0.044
N/A	Y276C	0	0.998	1
rs192169063	F489L	0.07	0.35	0.377
rs200933122	C608R	0	0.963	0.999
rs748531218	D620G	0.14	0.053	0.017

本研究において同定した *ABCG2* の非同義変異のうち、ATP依存性尿酸輸送機能解析を行わなかったものに関して SIFT と PolyPhen-2 のスコアを記載した。

N/A, 該当するものなし

表 4 痛風の疾患感受性に対する *ABCG2* 遺伝子の **common variant** を変数とした単変量ロジスティック回帰解析

変数	$\beta$	OR (95% CI)	p 値
V12M	-0.55	0.58 (0.45-0.74)	$1.1 \times 10^{-5}$
Q126X	0.94	2.6 (1.6-4.2)	$1.9 \times 10^{-4}$
Q141K	0.78	2.2 (1.8-2.7)	$1.2 \times 10^{-14}$

OR, オッズ比; CI, 信頼区間

表 5 痛風の疾患感受性に対する *ABCG2* 遺伝子の **common variant** を共変数とした多変量ロジスティック回帰解析

変数	$\beta$	OR (95% CI)	p 値
V12M	-0.15	0.86 (0.66-1.1)	0.27
Q126X	1.1	3.0 (1.8-5.1)	$2.3 \times 10^{-5}$
Q141K	0.78	2.2 (1.8-2.7)	$5.7 \times 10^{-13}$

この解析では、それぞれの **common variant** の影響を他の 2 つの **common variant** により補正した。

OR, オッズ比; CI, 信頼区間

表6 Q126X および Q141K 変異による ABCG2 遺伝子の rare variant の層別化関連解析

解析対象	痛風群			対照群			p 値	OR (95% CI)
	総数	Carrier <sup>*</sup>	Freq (%) <sup>†</sup>	総数	Carrier <sup>*</sup>	Freq (%) <sup>†</sup>		
全ての研究対象者	480	30	6.3	480	15	3.1	0.022	2.1 (1.1-3.9)
Q126X のない研究対象者	425	30	7.1	457	15	3.3	0.011	2.2 (1.2-4.2)
Q126X、Q141K の両方がない研究対象者	131	14	10.7	247	9	3.6	6.4×10 <sup>-3</sup>	3.2 (1.3-7.5)

一塩基変異および挿入欠失変異のうち、1%未満のマイナーアレル頻度でかつ非同義変異であるものを対象として解析した。

P268S 変異は ATP 依存性尿酸輸送機能が野生型とほぼ同等であるため、この解析から除外した。

\*1 つ以上の rare variant を持つ研究対象者数

†1 つ以上の rare variant を持つ研究対象者数のパーセンテージ

A149P 変異は過去の機能解析に関する報告（文献 43）、および SIFT と PolyPhen-2 のスコアから ABCG2 の尿酸輸送機能が低下しない可能性が高いと判断できるため、この解析から除外した。

OR, オッズ比; CI, 信頼区間

表7 痛風の疾患感受性に対する *ABCG2* 遺伝子の rare variant および2種類の common variant を共変数とした多変量ロジスティック回帰解析

変数	$\beta$	OR (95% CI)	p 値
rare variant	0.99	2.7 (1.4-5.2)	$3.0 \times 10^{-3}$
Q126X	1.21	3.4 (2.0-5.6)	$3.1 \times 10^{-6}$
Q141K	0.85	2.3 (1.9-2.9)	$2.7 \times 10^{-16}$

この解析では *ABCG2* 遺伝子の rare variant および2種類の common variant のうち1つの影響を他の2つで補正した。P268S 変異は ATP 依存性尿酸輸送機能が野生型とほぼ同等であるため、この解析から除外した。

A149P 変異は過去の機能解析に関する報告（文献 43）、および SIFT と PolyPhen-2 のスコアから *ABCG2* の尿酸輸送機能が低下しない可能性が高いと判断できるため、この解析から除外した。

OR, オッズ比; CI, 信頼区間