

総 説

ゲノムワイド関連解析と精細マッピングを用いた痛風感受性遺伝子の同定

崎山真幸^{*, **}, 松尾洋孝^{*, **}, 四ノ宮成祥^{*, **}

防医大誌 (2017) 42 (4) : 153 - 169

要旨: 痛風のリスクとして食生活の欧米化などの環境要因が考えられている。一方、同じような生活習慣にもかかわらず、痛風を発症する人とならない人が存在することから、遺伝的要因も関与すると考えられてきたが、その全貌はまだ明らかではない。本研究ではゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、痛風関連遺伝子のさらなる同定を目指した。痛風症例群945人と対照群1,213人において、SNPアレイを用いて一次解析を実施した。痛風との強い関連性を示す上位16 SNPsについて、別の症例群1,048人と対照群1,334人を対象にTaqMan法による二次解析を行った。一次解析と二次解析の結果をメタ解析し、ゲノムワイド有意な領域を痛風関連遺伝子領域と考えた。GWASで見出された領域のうち、*MYL2-CUX2*領域は、GWASのみではどの遺伝子が真に痛風と関連するのか不明確であったため、さらに精細マッピングを行った。まず、GWASで同定された*MYL2-CUX2*領域のSNP (rs2188380) を中心として、10 Mbpに存在する8,595 SNPsとrs2188380との連鎖不平衡を検討し、真の関連候補を9 SNPsに絞り込み、症例群1,048人と対照群1,334人をTaqMan法で解析した。GWASと精細マッピングの結果、尿酸トランスポーターである*ABCG2*と*SLC2A9*、アルコール代謝に重要な酵素である*ALDH2*、糖代謝にかかわる*GCKR*とグルタミン酸受容体の補助サブユニットとなる*CNIH-2*の5つの痛風関連遺伝子領域が見出された。本発見は、痛風を発症する遺伝的リスクの高い人を早期に見つけ出し予防を可能とするもので、QOLの維持・向上につながるものと考えられる。

索引用語: ゲノムワイド関連解析 / 痛風・高尿酸血症 / コンパニオン診断 / SNP / 遺伝子 / *ABCG2* / *SLC2A9* / *ALDH2* / *GCKR* / *CNIH-2*

緒 言

高尿酸血症 (血清尿酸値が 7.0 mg/dL を超える¹⁾) は、尿酸結晶の沈着による痛風発作の原因となるほか、高血圧、腎疾患、心疾患、脳卒中などのリスクとなることが知られている²⁾。

生活習慣病のひとつである痛風は、「贅沢病」や「帝王病」などとも言われ、ナポレオン、ニュートン、ミケランジェロも患ったとされる。我が国では、明治初期にドイツ人医師のエルヴィン・フォン・ベルツが、「日本には痛風患者がいらない」と記録している³⁾。しかし、今

日では食生活が豊かになった影響もあり、我が国でも痛風・高尿酸血症患者は近年増加傾向にある。現在約1,000万人以上に高尿酸血症を認め、そのうちの一部が痛風を発症し、その数は約100万人と言われている。また、痛風は中年以降の男性が多く発症する病気であるところまでは考えられてきたが、最近では20歳代以下での発症も見られている^{3, 4)}。この原因として、食生活の欧米化や肥満などの環境要因が考えられるが、同じような生活習慣にもかかわらず、痛風を発症する人とならない人が存在することか

*陸上自衛隊第6師団司令部
The 6th Division Headquarters, Japan Ground Self Defense Force, Higashine, Yamagata 999-3797, Japan

**防衛医科大学校分子生体制御学講座
Department of Integrative Physiology and Bio-Nano Medicine, National Defense Medical College, Tokorozawa, Saitama 359-8513, Japan

平成29年5月11日受付
平成29年7月20日受理

ら、遺伝的要因も推定されてきた。しかし、痛風・高尿酸血症が発症頻度の高い一般的な疾患であるにもかかわらず、原因遺伝子としてこれまでに知られていたのは、Lesch-Nyhan症候群やvon Gierke病など痛風を伴う稀な先天性疾患から同定されたものに限定されていた。

近年、遺伝子解析技術が進歩し、ゲノムワイド連鎖解析やゲノムワイド関連解析 (GWAS; genome-wide association study) などによるヒトゲノム全体を網羅的に解析する手法が登場したことにより、痛風や尿酸値の変動にかかわる遺伝子がいくつかが同定されてきた。例えば ATP-binding cassette (ABC), subfamily G, member 2 (*ABCG2/BCRP*) 遺伝子は尿酸輸送トランスポーター (輸送体) をコードしており、痛風の主要な病因遺伝子であることが報告された^{5, 6)}。また、urate transporter 1 (*URAT1/SLC22A12*) 遺伝子⁷⁾ や glucose transporter 9 (*GLUT9/SLC2A9*) 遺伝子⁸⁾ の機能低下型変異が腎性低尿酸血症の原因となることが報告されている。しかし、痛風や尿酸値の変動にかかわる遺伝子の全貌はいまだ明らかではない。

尿酸は、核酸やアデノシン三リン酸 (ATP; adenosine triphosphate) などの構成成分であるプリン体の代謝産物である。マウスを含む多くの哺乳類では尿酸分解酵素であるウリカーゼにより尿酸が分解・代謝されるのに対し、ヒトではウリカーゼが欠損しているため、尿酸はヒトにおけるプリン体の最終代謝産物となる⁹⁾。肝臓を中心に1日あたり約700 mg産生された尿酸は、約2/3が腎臓から排泄され、残り約1/3は主に腸管から排泄される。腎臓では、尿酸は糸球体においてほぼ全量が濾過された後、近位尿細管を中心に再吸収と分泌の両方が行われ、最終的に糸球体で濾過された尿酸の約6~10%の量が尿中に排泄される。ここでの尿酸輸送機構には複数の尿酸トランスポーターが関与している。我々は、これらの尿酸輸送に関連する分子に着目し、その遺伝子の一塩基多型 (SNP; single nucleotide polymorphism) 解析を行い、尿酸輸送に関わる新規遺伝子の同定をこれまで行ってきた (図1)¹⁰⁾。しかし、これらの候補遺伝子解析で同定できる原因遺伝子は、*ABCG2*や*URAT1*など主に尿酸の輸送に関わる

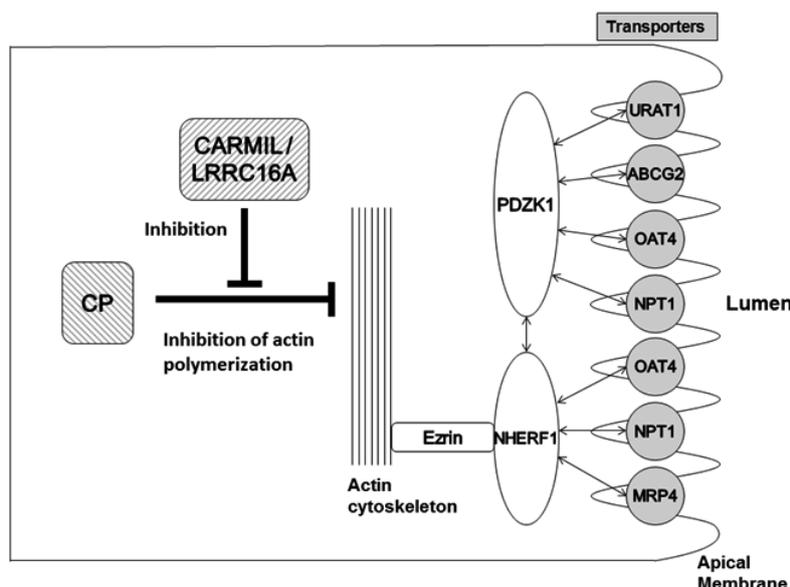


図1. 腎近位尿細管における尿酸トランスポートソーム

ヒトの腎近位尿細管の刷子縁膜側には複数の尿酸トランスポーターが発現しているが、これらはPDZ蛋白質により束ねられて複合体を形成し、生体膜における物質輸送の機能単位となっている。我々は*LRRC16A*遺伝子の解析により、トランスポートソームと疾患の関連を遺伝学的に初めて明らかにした。

(*ABCG2*; ATP-binding cassette (ABC), subfamily G, member 2, CP; capping protein, CARMIL; capping protein ARP2/3 and myosin-I linker, LRRC16A; leucine-rich repeat-containing 16A, MRP4; Multidrug resistance-associated protein 4, NHERF1; Sodium/proton exchanger regulatory factor 1, NPT1; sodium-dependent phosphate cotransporter type 1, OAT4; organic anion transporter 4, PDZK1; PDZ domain containing 1, URAT1; urate transporter 1.) (文献10より引用, 改変)

ものに限定されていた。

そこで本研究では、まず痛風のGWASを行った。SNPアレイを用いてゲノム全体にわたる遺伝子を解析し、アレル頻度が患者群と対照者群で異なるSNPを網羅的に探索することで、痛風・高尿酸血症の病態形成に関わる遺伝子のさらなる同定を目指した¹¹⁾。さらに、同定された痛風関連遺伝子領域のうち、GWASのみでは真に痛風の発症と関連する遺伝子が絞り込めなかった領域については、fine mapping (精細マッピング)を行うことで、その同定を目指した¹²⁾。また、近年痛風のGWASが複数報告されているが^{13, 14)}、それらには臨床所見が不十分である自己申告による痛風症例が含まれており、適切な病型分類にもとづいた遺伝子変異の実態はいまだ不明のままである。今回の我々のGWAS¹¹⁾は医師による臨床診断を受けた痛風症例のみを対象としているので、臨床病型との関連も評価した。

方 法

本研究は、ヘルシンキ宣言に従い、防衛医科大学校倫理委員会の承認を得て実施した。

痛風症例は、みどりヶ丘病院 (大阪府)、京都工場保健会診療所 (京都府) 及び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¹⁵⁾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。対照者はバイオバンク・ジャパン¹⁶⁾及び浜松市での健診における日本多施設共同コーホート研究 (J-MICC Study; Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study)^{17, 18)}の参加者で、痛風・高尿酸血症に罹患していない日本人男性を対象とした。

1. 痛風のGWAS

一次解析では、痛風患者946人と対照者1,213人をHumanOmniExpress v1.0 (Illumina社)を用いて727,413 SNPsをタイピングした (図2)。このうちタイピング成功率が99%未満のSNP

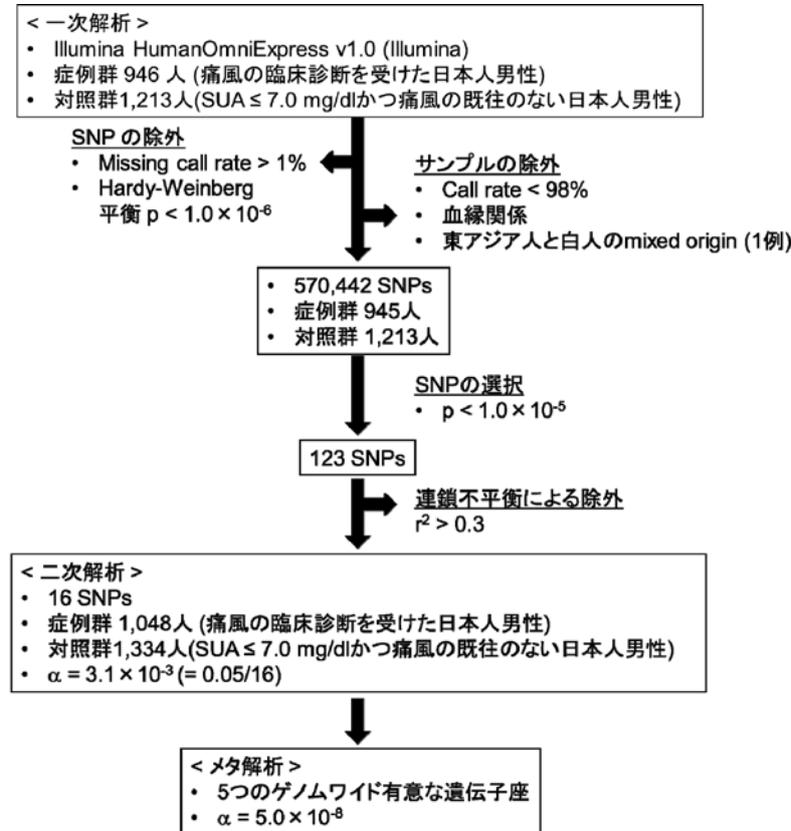


図2. 痛風のゲノムワイド関連解析のフローチャート
一次解析と二次解析あわせて痛風症例1,993例、対照例2,547例を解析し、5つのゲノムワイド有意な痛風関連遺伝子領域を同定した。(SUA; serum uric acid.)

は、以後の解析からは除外した。また対照群におけるHardy-Weinberg平衡の検定結果が統計学的に有意 ($p < 1.0 \times 10^{-6}$) なSNPも除外した。さらにこのHumanOmniExpress v1.0のタイピング結果と国際HapMap計画phase II¹⁹⁾ のデータをあわせて主成分分析^{20,21)} を行い、東アジア人と白人のmixed originと判断された1検体も除外した。なお同一アレル数の計算も行ったが、血縁関係にある検体は見いだされなかった。加えてquantile-quantile plotも作成し、バイアスとなりうる集団構造化がないことも確認した。以上のquality controlを実施し、最終的に痛風患者945人と対照者1,213人の症例・対照研究として、570,442 SNPsについて関連解析を実施した(図2)。

次に、一次解析で $p < 1.0 \times 10^{-5}$ の基準を満たした123 SNPsについて、互いに連鎖不平衡(LD; linkage disequilibrium)の関係にあるSNPがないか検討した。LDの指標としては r^2 値を用いた。 r^2 値は0から1の値をとり、値が大きいほど強いLDにある、すなわち2座位間での組み換えが起きにくいことを意味する。今回は $r^2 > 0.3$ という中等度以上のLDの関係にあるSNPについては、一次解析で最もp値が低いSNPのみを二次解析の候補SNPとして選択した。その結果16 SNPsが二次解析の対象となり、一次解析とは別の痛風患者1,048人と対照者1,334人をTaqMan法(Life Technologies社)にてタイピングし、関連解析を実施した(図2)。

さらに一次解析と二次解析の結果をあわせたメタ解析を実施することで、評価を行った¹¹⁾。

2. MYL2-CUX2遺伝子領域のfine mapping

GWASで見出された痛風関連遺伝子領域のうち、12番染色体のMYL2 (myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow) 遺伝子とCUX2 (cut-like homeobox 2) 遺伝子の間(MYL2-CUX2)の領域については、GWASのみではどの遺伝子が真に痛風と関連するのか不明確であったため、以下のfine mappingをさらに行った¹²⁾。

まず、GWASで同定されたMYL2-CUX2領域のSNPであるrs2188380を中心として10,000,000塩基対(10 Mb)の範囲に存在するSNPを国際HapMap計画phase III¹⁹⁾ のデータから抽出したところ、該当するものは8,595 SNPsであった

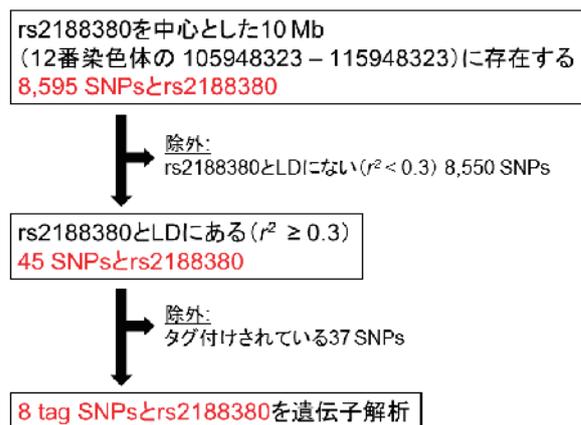


図3. MYL2-CUX2領域のfine mappingにおけるSNP選定フローチャート

国際HapMap計画のデータから得られた8,595 SNPsのLDを検討することで、遺伝子解析の対象を最終的に8 SNPsとrs2188380の計9 SNPsに絞り込んだ。これらの遺伝子解析の結果、ALDH2遺伝子のrs671が真の痛風関連SNPであることを同定した。(LD; linkage disequilibrium.)

(図3)。これら8,595 SNPsの中からrs2188380とLDの関係にあるものが真の痛風関連SNPである可能性があるため、LDの指標である r^2 値を計算したところ、中等度以上($r^2 \geq 0.3$)のLDであるものは45 SNPsであった。次に、この45 SNPsにrs2188380を加えた46 SNPsの r^2 値を全ての組み合わせ(1,035通り)で計算した(図4)。その結果、rs2188380, rs7978484, rs16940688, rs2071629, rs11065783, rs3809297, rs4766566, rs671, rs2555004の9 SNPsを選択すると、残りの37 SNPsがこの9 SNPsのいずれかと $r^2 \geq 0.8$ という強いLDの関係にあり、37 SNPsをタグ付けられることがわかったため、この9個のtag SNPsを解析対象とし、痛風患者1,048人と対照者1,334人をTaqMan法で遺伝子解析した。

3. 痛風の臨床病型分類

血清の尿酸値とクレアチニン値および蓄尿による尿中の尿酸値とクレアチニン値から尿中尿酸排泄率(FE_{UA} ; fractional excretion of uric acid)と尿中尿酸排泄量(UUE; urinary urate excretion)を算出し、 $FE_{UA} < 5.5\%$ かつ $UUE \leq 25 \text{ mg/h/1.73 m}^2$ (600 mg/day/1.73 m²)を腎排泄低下(RUE; renal underexcretion)型、 $FE_{UA} \geq 5.5\%$ かつ $UUE > 25 \text{ mg/h/1.73 m}^2$ (600 mg/day/1.73 m²)を腎負荷(ROL; renal overload)型と分類した²²⁾(図5)。

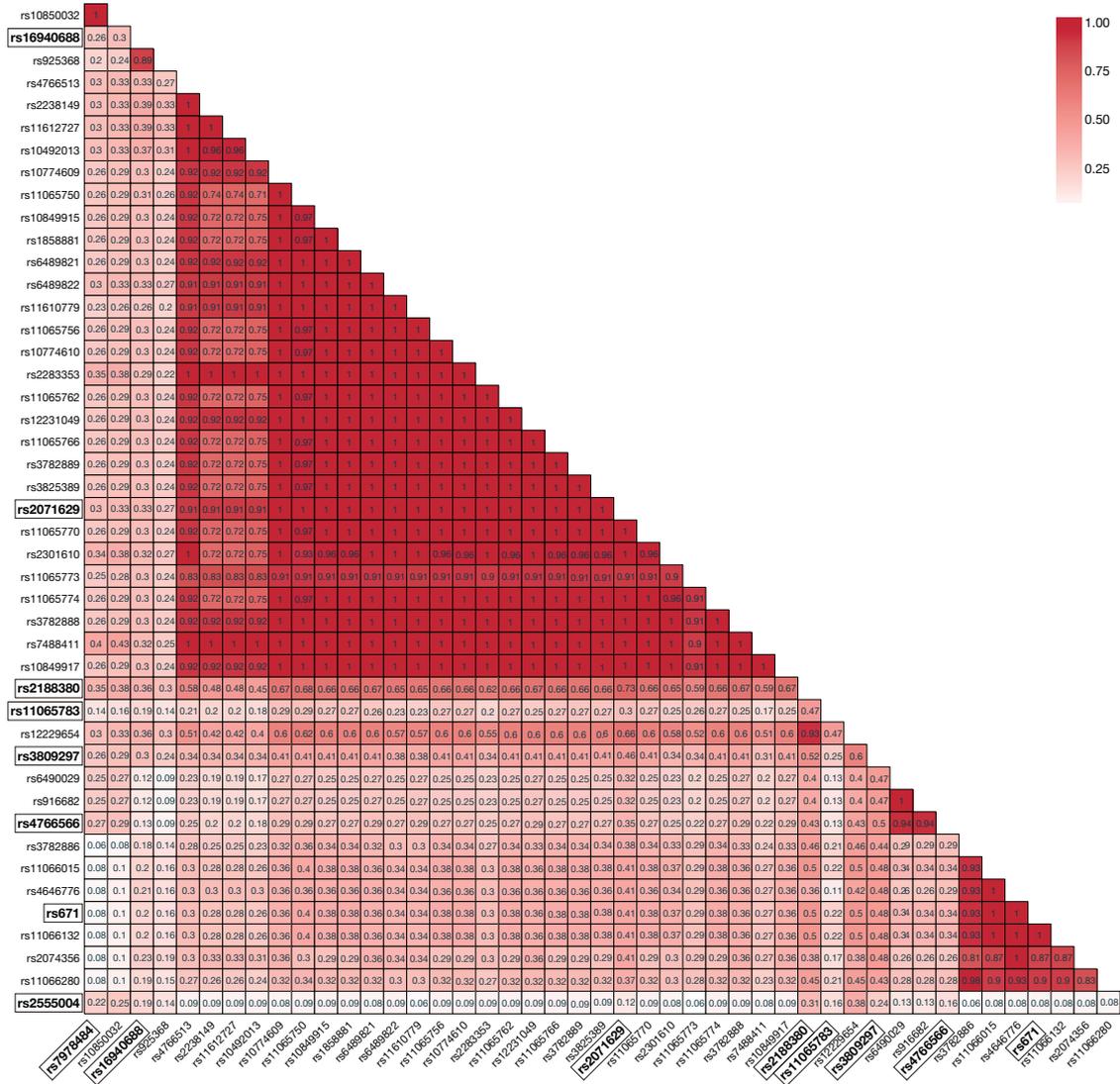


図4. MYL2-CUX2 領域の 46 SNPs の LD についての検討
 46 SNPs の全組み合わせの r^2 値を示した。赤色が濃いほど、 r^2 値が大きい、すなわち強い LD にあることを示している。その結果、四角で囲った 9 SNPs (rs2188380, rs7978484, rs16940688, rs2071629, rs11065783, rs3809297, rs4766566, rs671, rs2555004) を tag SNPs として遺伝子解析した。(LD; linkage disequilibrium) (文献12より引用, 改変)

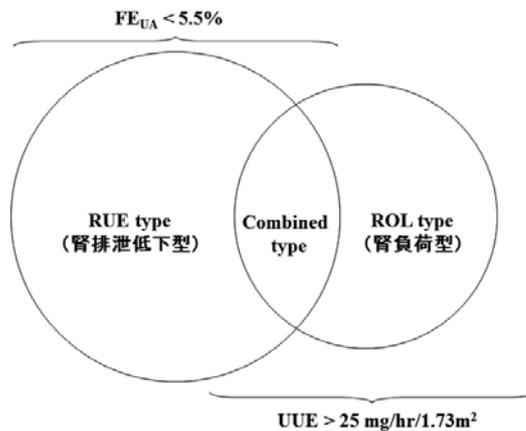


図5. 痛風・高尿酸血症の臨床病型分類
 痛風・高尿酸血症は、尿中尿酸排泄量 (UUE; urinary urate excretion) と尿中尿酸排泄率 (FEUA; fractional excretion of urate) によって分類される。(ROL: renal overload, RUE; renal underexcretion.) (文献11より引用, 改変)

4. 統計解析

GWASの関連解析は、症例群、対照群それぞれの疾患リスクアレル頻度を比較するカイ二乗検定で実施し、オッズ比 (OR; odds ratio), 95%信頼区間 (95% CI; confidence interval) とともに評価した。一次解析と二次解析の結果をあわせたメタ解析²³⁾を行うにあたっては、Cochran's Q検定²⁴⁾のp値とI²値^{25, 26)}で一次解析と二次解析の間に異質性がないかどうかをまず判定した。Cochran's Q検定の $p < 0.05$, もしくは $I^2 > 50\%$ の場合は異質性があると判断し、メタ解析にはランダム効果モデル (DerSimonian-Laird法)²⁷⁾を用い、それ以外の場合は固定効果モデル (inverse-variance法)を用いた。多重検定を考慮し、GWASの一次解析とメタ解析では $p < 5.0 \times 10^{-8}$, 二次解析ではBonferroni法による補正を行った $p < 3.1 \times 10^{-3}$ ($= 0.05/16$)を、統計学的有意水準とした。

Fine mappingでは、関連解析はロジスティック回帰分析で行った。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とし、多重検定を行う場合はBonferroni法による補正を用いた。すなわち、9 SNPsの解析の際は $p < 5.6 \times 10^{-3}$ ($= 0.05/9$), 8 SNPsの解析の際は $p < 6.3 \times 10^{-3}$ ($= 0.05/8$)を有意水準とした。

痛風の病型分類ごとの解析では多変量ロジスティック回帰分析、痛風関連遺伝子が臨床検査情報 (FE_{UA}とUUE) に与える影響については線形回帰分析、病型分類と臨床検査情報 (FE_{UA}

とUUE)の解析にはPearsonの相関係数の検定を用いた。

全ての統計解析はSTATA v.11.0 (Light Stone社), PLINK v.1.07²⁸⁾, SPSS v.22.0J (IBM社), R v.3.1.1²⁹⁾とそのGenABELパッケージを用いて実施した。

結 果

1. 痛風のGWASによる新規関連遺伝子座の同定

GWASの一次解析でゲノムワイド有意水準 ($p < 5.0 \times 10^{-8}$) に達したのは、*ABCG2*領域、*SLC2A9*領域、*MYL2-CUX2*領域の、合計3か所であった (図6)。それぞれの領域で最もp値が低かったSNPは、*ABCG2*領域ではrs2728125 ($p = 1.5 \times 10^{-27}$; OR = 2.05; 95% CI: 1.80-2.34), *SLC2A9*領域ではrs3775948 ($p = 6.7 \times 10^{-15}$; OR = 1.64; 95% CI: 1.45-1.86), *MYL2-CUX2*領域ではrs2188380 ($p = 5.7 \times 10^{-13}$; OR = 1.78; 95% CI: 1.52-2.08)であった (表1)。

一次解析でゲノムワイド有意であった3つの遺伝子領域は二次解析でも有意であり、再現性が確認できた。これらに加え、glucokinase regulatory protein (*GCKR*) 遺伝子領域のrs1260326 ($p = 2.8 \times 10^{-6}$; OR = 1.32; 95% CI: 1.18-1.49)とcornichon family AMPA receptor auxiliary protein 2 (*CNIH-2*) 遺伝子領域のrs4073582 ($p = 1.6 \times 10^{-4}$; OR = 1.55; 95% CI: 1.23-1.96)も二次解析では有意 ($p < 3.1 \times 10^{-3}$)であった (表1)。

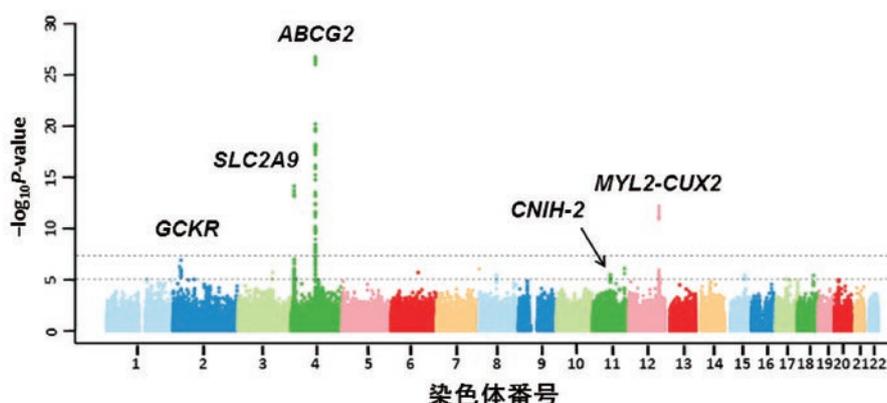


図6. 痛風のゲノムワイド関連解析におけるマンハッタンプロット

X軸の数値は染色体の番号を示し、Y軸は $-\log_{10} p$ 値を示す。上と下の点線はそれぞれ、ゲノムワイド有意水準 ($p = 5.0 \times 10^{-8}$) と二次解析前のSNPの選別を行うカットオフ値 ($p = 1.0 \times 10^{-5}$)を示す。一次解析と二次解析の結果を統合したメタ解析から、図示した5遺伝子領域でゲノムワイド有意な関連が同定された。(文献11より引用、改変)

表1. 痛風のゲノムワイド関連解析結果

SNP	Chr.	Gene	GWAS*		Replication study†		Meta-analysis‡	
			OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)	p value
rs2728125	4	<i>ABCG2</i>	2.05 (1.80-2.34)	1.5×10^{-27}	2.03 (1.79-2.30)	8.3×10^{-29}	2.04 (1.86-2.23)	7.2×10^{-54}
rs3775948	4	<i>SLC2A9</i>	1.64 (1.45-1.86)	6.7×10^{-15}	1.57 (1.40-1.77)	7.6×10^{-14}	1.61 (1.47-1.75)	5.5×10^{-27}
rs2188380	12	<i>MYL2-CUX2</i>	1.78 (1.52-2.08)	5.7×10^{-13}	1.73 (1.48-2.02)	2.0×10^{-12}	1.75 (1.57-1.96)	1.6×10^{-23}
rs1260326	2	<i>GCKR</i>	1.39 (1.23-1.57)	1.2×10^{-7}	1.32 (1.18-1.49)	2.8×10^{-6}	1.36 (1.25-1.48)	1.9×10^{-12}
rs4073582	11	<i>CNIH-2</i>	1.78 (1.39-2.29)	5.3×10^{-6}	1.55 (1.23-1.96)	1.6×10^{-4}	1.66 (1.40-1.96)	6.4×10^{-9}
rs10791821	11	<i>MAP3K11</i>	1.75 (1.38-2.22)	2.8×10^{-6}	1.41 (1.12-1.77)	3.4×10^{-3}	1.57 (1.33-1.85)	1.0×10^{-7}

*痛風患者945人と対照者1,213人による一次解析。

†痛風患者1,048人と対照者1,334人による二次解析。

‡一次解析と二次解析をあわせたメタ解析。

(GWAS; genome-wide association study, SNP; single nucleotide polymorphism, Chr.; chromosome, OR; odds ratio, CI; confidence interval) (文献11より引用, 改変)

一次解析と二次解析をあわせたメタ解析では、先述の5つの遺伝子領域 (*ABCG2*, *SLC2A9*, *MYL2-CUX2*, *GCKR*及び*CNIH-2*) のSNPであるrs2728125 ($p_{\text{meta}} = 7.2 \times 10^{-54}$; OR=2.04; 95% CI: 1.86-2.23), rs3775948 ($p_{\text{meta}} = 5.5 \times 10^{-27}$; OR=1.61; 95% CI: 1.47-1.75), rs2188380 ($p_{\text{meta}} = 1.6 \times 10^{-23}$; OR=1.75; 95% CI: 1.57-1.96), rs1260326 ($p_{\text{meta}} = 1.9 \times 10^{-12}$; OR=1.36; 95% CI: 1.25-1.48), rs4073582 ($p_{\text{meta}} = 6.4 \times 10^{-9}$; OR=1.66; 95% CI: 1.40-1.96) の全てが有意であり (表1), 最終的にこれらを痛風関連遺伝子領域と考えた。また, mitogen-activated protein kinase kinase 11 (*MAP3K11*) 遺伝子領域のrs10791821は, メタ解析で $p_{\text{meta}} = 1.0 \times 10^{-7}$ とゲノムワイド有意水準 ($p < 5.0 \times 10^{-8}$) に近かったため (表1), 痛風関連遺伝子領域の可能性があると考えた。

2. *ABCG2*遺伝子の機能低下型多型についての検討

尿酸トランスポーター *ABCG2*は, 2つのSNPsの組み合わせによって機能低下が生じ, 痛風の発症のしやすさに関与していることが解明されている⁵⁾。すなわち, 日本人痛風男性症例の約8割に尿酸輸送能が消失するrs72552713 (Gln126Ter) もしくは尿酸輸送能が半分に低下するrs2231142 (Gln141Lys) のリスクアレルがみられ, 発症リスクを約3倍以上高めていることが, これまでに報告されている⁵⁾。このた

め, 今回のGWASにおいて*ABCG2*遺伝子領域で最も痛風と関連の強いSNPとして同定されたrs2728125は, 尿酸輸送機能低下をきたすこれら2つのSNP (rs72552713とrs2231142) の surrogate markerである可能性を考えた。

これら2つのSNPsはHumanOmniExpress v1.0に搭載されておらず, 一次解析ではタイピングされていなかった。そこで, TaqMan法により追加でこれら2つのSNPをタイピングしたところ, rs72552713, rs2231142とも痛風と有意な関連を認めた (それぞれ $p = 1.4 \times 10^{-7}$, 2.9×10^{-51})。さらに, rs2231142はrs2728125と強いLD ($r^2 = 0.76$) にあることが判明した。このためrs72552713, rs2231142およびrs2728125の3つのSNPsによる多変量ロジスティック回帰分析を行うことで互いに補正し, 再度評価を行った。その結果, rs72552713とrs2231142は単変量解析と同じく統計学的に有意 (それぞれ $p = 1.8 \times 10^{-18}$, 1.9×10^{-12})であったが, rs2728125は $p = 0.19$ となり有意性は消失した。以上より, *ABCG2*遺伝子領域の真に痛風発症と関連するSNPはrs72552713とrs2231142であると考え, 以後の解析にはこれら2つのSNPsを用いた。

3. *MYL2-CUX2*遺伝子領域における痛風関連遺伝子座の同定

続いて*MYL2-CUX2*領域のfine mappingを行った。痛風患者1,048人と対照者1,334人における9個のtag SNPsのタイピング結果を, 表2に示

表 2. *MYL2-CUX2* 領域の 9 つの tag SNPs の関連解析

SNP	Gene	r^2 *	A1/A2†	MAF		p value‡	OR (95% CI)
				Cases	Controls		
rs2188380	<i>MYL2-CUX2</i>	-	T/C	0.14	0.22	7.1×10^{-12}	0.58 (0.50-0.68)
rs7978484	<i>FOXN4</i>	0.35	G/A	0.14	0.17	4.8×10^{-3}	0.79 (0.67-0.93)
rs16940688	<i>TCHP-GIT2</i>	0.36	G/A	0.07	0.13	6.2×10^{-9}	0.55 (0.45-0.67)
rs2071629	<i>MYL2</i>	0.73	G/A	0.17	0.25	3.7×10^{-11}	0.60 (0.52-0.70)
rs11065783	<i>MYL2-CUX2</i>	0.47	A/G	0.25	0.31	2.8×10^{-5}	0.76 (0.66-0.86)
rs3809297	<i>CUX2</i>	0.52	G/T	0.17	0.28	6.7×10^{-16}	0.55 (0.48-0.64)
rs4766566	<i>CUX2</i>	0.43	T/C	0.25	0.36	1.2×10^{-15}	0.59 (0.52-0.67)
rs671	<i>ALDH2</i>	0.50	G/A	0.18	0.29	1.7×10^{-18}	0.53 (0.46-0.61)
rs2555004	<i>RBM19-TBX5</i>	0.31	A/G	0.21	0.20	0.22	1.09 (0.95-1.26)

*rs2188380と各SNPにおける r^2 値を示している。

†A1がmajor allele, A2がminor alleleを表す。

‡ 5.6×10^{-3} (Bonferroni補正を行った有意水準) 未満のp値を太字で示した。

(SNP; single nucleotide polymorphism, MAF; minor allele frequency, OR; odds ratio, CI; confidence interval) (文献12より引用, 改変)

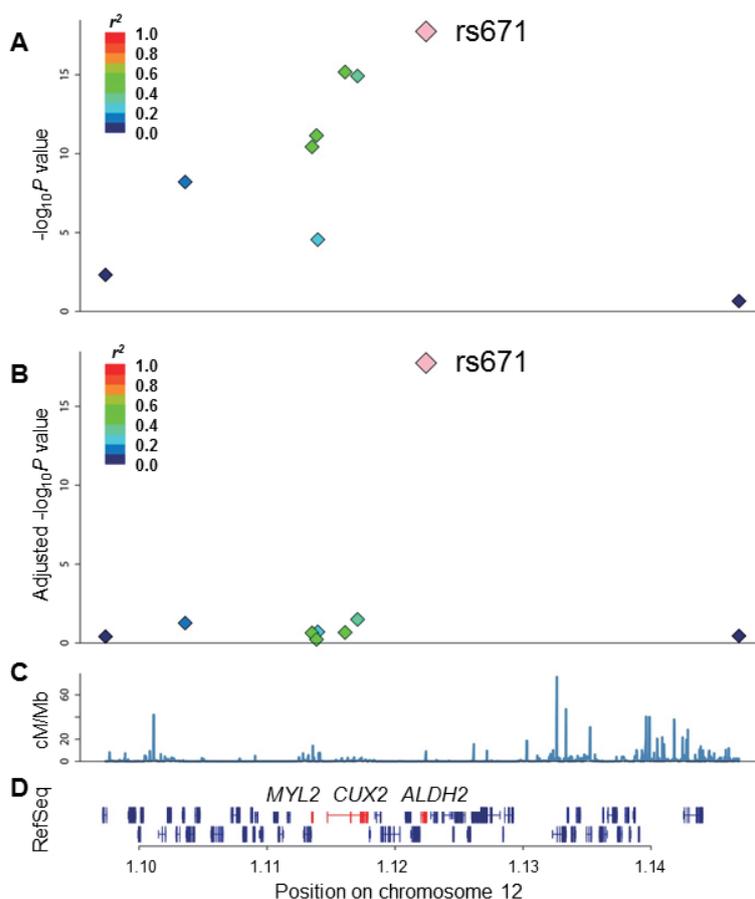


図 7. 日本人男性の痛風患者における *MYL2-CUX2* 領域の 9 SNPs の解析結果
 プロットが上に行くほど痛風との関連が強い SNP であることを表している。*ALDH2* 遺伝子の rs671 が最も強い関連を示した (A)。rs671 で他の 8 SNPs を補正すると, 全て有意性が消失した (B)。HapMap Phase II のデータから推定される組み換え率と (C), 遺伝子の位置を記した (D)。(文献12より引用, 改変)

した。rs2555004を除く8 SNPsが、有意($p < 5.6 \times 10^{-3}$)に痛風に関連していた。有意であったSNPsの中では、aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) 遺伝子のrs671 (Glu504Lys) のp値が最も低かった ($p = 1.7 \times 10^{-18}$; OR = 0.53; 95% CI: 0.46-0.61, 図7A, 表2)。

次に最もp値が低かったrs671でその他の8 SNPsのp値を補正したところ、いずれもp値は有意水準 ($p < 6.3 \times 10^{-3}$) に達しなかった (図7B, 表3)。一方、rs671は8 SNPsのいずれで補正をしても痛風との有意な関連が保たれていた (表3)。

以上の結果と、ALDH2はアルコール代謝で重要な役割を果たす酵素の遺伝子であり (図8), rs671 (Glu504Lys) はその酵素機能に影響を及ぼす遺伝子多型としてよく知られている

ことから³⁰⁾, MYL2-CUX2遺伝子領域の真の痛風関連SNPは、ALDH2遺伝子のrs671であると考えられた。

ALDH2の酵素活性は、rs671がG/G (Glu/Glu)であるのに比べ、G/A (Glu/Lys)は6.25%、A/A (Lys/Lys)はほぼ0%になる³¹⁾。このことを踏まえると、rs671の解析は優性モデル (Glu/Glu対Glu/Lys及びLys/Lys)で行うのがより適切であると考えられ、優性モデルで関連解析を実施したところ、 $p = 2.9 \times 10^{-21}$, OR = 0.44, 95% CI: 0.37-0.52と表2に示した遺伝子型モデルの解析結果よりもp値が低く ($p = 1.7 \times 10^{-18}$), 仮説に矛盾しない結果であった。このため以降のrs671の解析は、優性モデルで検討を行った。

ALDH2遺伝子のrs671は飲酒習慣に影響する

表3. rs671 と他の8つの tag SNPs による多変量ロジスティック回帰分析

SNP A	SNP A		rs671	
	p value*	OR (95% CI)	p value†	OR (95% CI)
rs7978484	0.390	0.94 (0.74-1.19)	2.6×10^{-16}	0.57 (0.46-0.70)
rs16940688	0.054	0.93 (0.78-1.10)	1.6×10^{-11}	0.54 (0.47-0.63)
rs2071629	0.228	0.80 (0.63-1.00)	7.8×10^{-10}	0.57 (0.49-0.67)
rs2188380	0.593	0.89 (0.73-1.08)	2.1×10^{-7}	0.56 (0.47-0.67)
rs11065783	0.195	1.11 (0.95-1.31)	6.8×10^{-16}	0.48 (0.41-0.58)
rs3809297	0.213	0.85 (0.66-1.10)	3.1×10^{-5}	0.59 (0.46-0.76)
rs4766566	0.032	0.82 (0.68-0.98)	3.2×10^{-6}	0.61 (0.50-0.75)
rs2555004	0.353	1.07 (0.93-1.24)	9.4×10^{-19}	0.52 (0.45-0.60)

*rs671で補正をした各8 SNPs (SNP A) のp値。

†各8 SNPs (SNP A) で補正をしたrs671のp値。 6.3×10^{-3} (Bonferroni補正を行った有意水準) 未満のp値を太字で示した。

(SNP; single nucleotide polymorphism, OR; odds ratio, CI; confidence interval)
(文献12より引用, 改変)

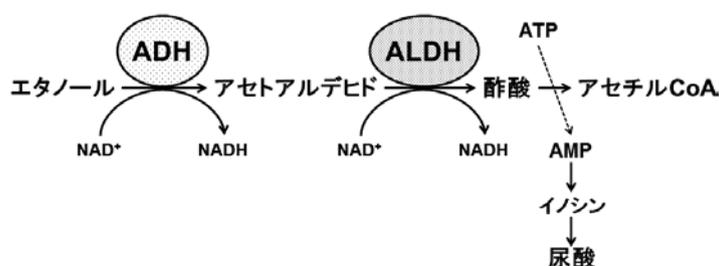


図8. 体内におけるアルコール代謝

体内に摂取されたアルコールは、まずアルコール脱水素酵素 (ADH; alcohol dehydrogenase) によってアセトアルデヒドに代謝され、さらにアセトアルデヒドはアルデヒド脱水素酵素 (ALDH; aldehyde dehydrogenase) によって酢酸へと代謝される。ALDHの中で活性が高く、アルコール代謝に強くかかわっているのは、ALDH2である。酢酸はさらに代謝されてアセチル CoA (acetyl-coenzyme A) へと変換されるが、この反応の際、ATPからAMPが産生される。細胞内のATP/AMP比は一定になるように制御されているため、AMPの分解は促進され、イノシン等を経て、尿酸へと代謝される (AMP; adenosine monophosphate, ATP; adenosine triphosphate, NAD; nicotinamide adenine dinucleotide.)

ことが報告されており³⁰⁾、また飲酒は痛風のリスクとなることも知られている。そこでrs671と痛風の関連が、飲酒習慣で補正した場合にどのようになるのか検討した。飲酒情報はアンケート用紙にて収集し、1か月に1回以上飲酒する人を飲酒者とした。

その結果、飲酒習慣で補正した場合でもrs671と痛風の関連は統計学的に有意であった ($p=4.3 \times 10^{-12}$; OR=0.52; 95% CI: 0.43-0.63)。さらに非飲酒者のみでも解析を行ったところ、rs671と痛風に有意な関連を認めた ($p=0.019$; OR=0.52; 95% CI: 0.30-0.90)。

4. 痛風の臨床病型の解析

GWASの対象症例のうち、FE_{UA}とUUEの臨床検査情報が得られた痛風症例を病型分類し(375例が腎負荷型、509例が腎排泄低下型)、GWASで同定したSNPsの痛風発症に与える影響が病型ごとに異なるか、解析を行った。

ABCG2遺伝子の2つのSNPs (rs72552713とrs2231142) のORは、腎負荷型ではそれぞれOR=4.35, 3.37、腎排泄低下型ではそれぞれOR=1.28, 1.88となり、腎負荷型でより影響力

が強いという結果であった。この病型によるORの差異は、統計学的にも有意であった(それぞれ $p=2.4 \times 10^{-5}$, 1.0×10^{-7})。一方、SLC2A9遺伝子のrs3775948は、腎負荷型ではOR=1.38、腎排泄低下型ではOR=1.94であり、腎排泄低下型で有意に影響力が強いという結果であった ($p=2.7 \times 10^{-4}$)。その一方、他の4つの遺伝子領域 (MYL2-CUX2, GCKR, CNIH-2及びMAP3K11) のSNPsに関しては、病型による影響力に有意な差はみられなかった。

さらに、SNPと臨床検査値 (FE_{UA}とUUE) との関連についても評価を行った。その結果、ABCG2遺伝子の2つのSNPs (rs72552713とrs2231142) のリスクアレルを有するとFE_{UA}とUUEを上昇させ、SLC2A9遺伝子のrs3775948のリスクアレルを有するとFE_{UA}とUUEを低下させることが分かった。

以上の各SNPが痛風の臨床病型に与える影響力を横軸、臨床検査データ (FE_{UA}とUUE) に与える影響力を縦軸にとり、図示すると図9のようになる。臨床病型とFE_{UA}に与える影響力の相関係数は $r=0.96$ ($p=4.8 \times 10^{-4}$)、臨床病

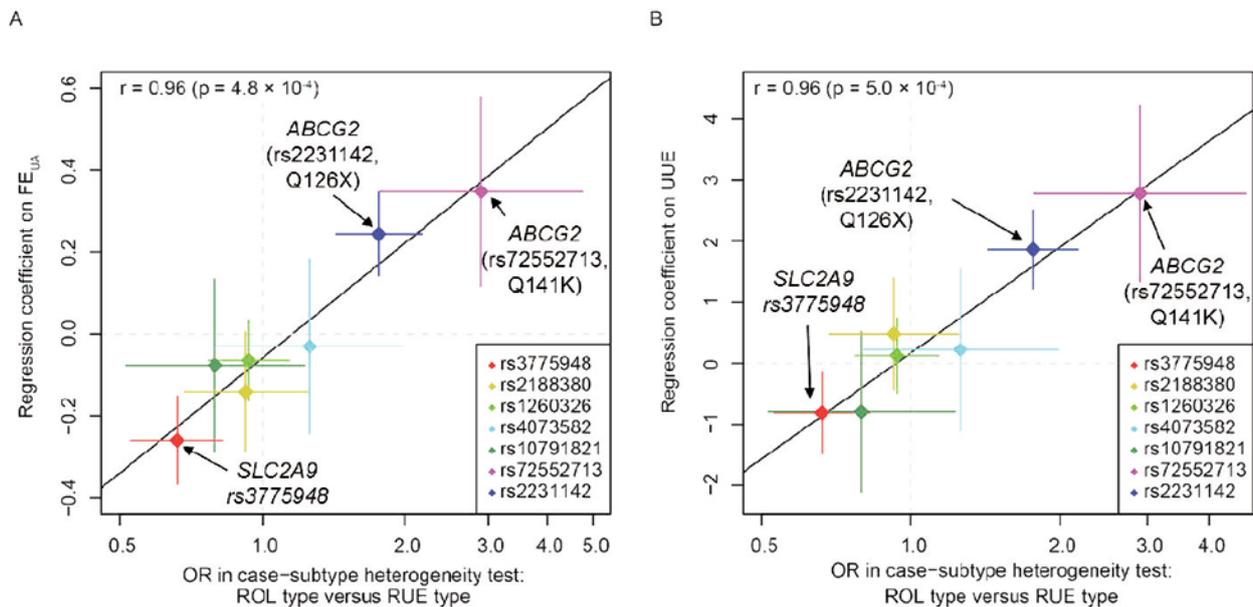


図9. 臨床検査所見と痛風の病型に関する解析

横軸は、腎負荷型 (ROL type) 痛風の OR に対する腎排泄低下型 (RUE type) 痛風の OR の比であり、SNP が腎排泄低下型より腎負荷型に強く影響する場合には、1.0より大きな値をとる。縦軸は回帰係数であり、SNP が (A) FE_{UA}、または (B) UUE の増加に影響する場合には、0より大きな値をとる。各 SNP の値に交差する縦横の直線は95% CIを示す。この図からは、ABCG2の2つのSNPsは腎負荷型痛風の発症に対する影響力が強く、FE_{UA}とUUEの増加に関連する一方、SLC2A9のSNPは腎排泄低下型痛風の発症に対する影響力が強く、FE_{UA}とUUEの減少に関連することがわかる。

(CI; confidence interval, FE_{UA}; fractional excretion of urate, OR; odds ratio, UUE; urinary urate excretion.) (文献11より引用, 改変)

型とUUEに与える影響力の相関係数は $r=0.96$ ($p=5.0 \times 10^{-4}$) であり、いずれも強い相関がみられた。

考 察

痛風のGWAS¹¹⁾とfine mapping¹²⁾を実施し、痛風関連遺伝子領域として5つの遺伝子領域(*ABCG2*, *SLC2A9*, *ALDH2*, *GCKR*及び*CNIH-2*)を同定した。このうち*ABCG2*, *SLC2A9*はいずれも尿酸トランスポーターをコードする遺伝子で、過去の欧米のGWASでも痛風との関連性が同定されていた^{13, 14)}。一方、*ALDH2*, *GCKR*, *CNIH-2*の3つの遺伝子領域は、GWASによる厳しい基準下に痛風発症との強い関連性を示すものとして世界で初めて見いだされた。

*ABCG2*は尿酸排泄トランスポーターであり、腎近位尿細管の他、小腸上皮細胞の管腔側にも局在している。*ABCG2*遺伝子の2つのSNPs(rs72552713とrs2231142)の組み合わせによってその尿酸輸送機能は0~75%に低下し、痛風の発症頻度に関与している⁵⁾。*ABCG2*遺伝子の機能低下型多型は、腸管を主とする腎外の尿酸排泄低下をもたらし、腎負荷型の高尿酸血症をきたすことが知られている^{22, 32)}。このことは、*ABCG2*遺伝子の2つのSNPsが腎排泄低下型痛風よりも腎負荷型痛風への影響が強いという本研究結果に適合する。また*ABCG2*遺伝子の機能低下型多型は、若年性痛風発症のリスクでもあり⁴⁾、さらに「*ABCG2*の尿酸輸送機能が25%低下する遺伝子多型」の影響力は、「身長170 cmの人が5.7 kg太る (BMIとして1.97 kg/m²の上昇)」ことや「毎週1.7 Lのウィスキーを飲む (純エタノール量に換算して552.1 g)」ことに相当することが示され³³⁾、血清尿酸値に対して極めて大きな影響力を持つことも分かっている。この2つのSNPsによる*ABCG2*の尿酸輸送機能低下は、コーカサス人種 (白人) やアフリカ系アメリカ人 (黒人) では約15%であるのに比し、日本人では約半数にみられるという人種差があることも特徴である³⁴⁾。

*SLC2A9*は、主に腎近位尿細管上皮細胞の血管側の細胞膜に位置する尿酸トランスポーターであり、尿酸の再吸収に関わっている。*SLC2A9*遺伝子は腎性低尿酸血症2型 (RHUC2;

renal hypouricemia type 2) の原因遺伝子であり、rs121908321 (Arg380Trp) やrs121908322 (Arg198Cys) などの変異が尿酸輸送機能を著しく低下させることが報告されている^{8, 35, 36)}。本研究において、*SLC2A9*遺伝子のrs3775948は腎負荷型痛風よりも腎排泄低下型痛風への影響が強いという結果は、上記の知見と矛盾しない。

*ALDH2*は、アルコール代謝で重要な役割を果たす酵素である。体内に摂取されたアルコールは、まずアルコール脱水素酵素 (ADH; alcohol dehydrogenase) によってアセトアルデヒドに代謝され、さらにアセトアルデヒドはアルデヒド脱水素酵素 (*ALDH*; aldehyde dehydrogenase) によって酢酸へと代謝される (図8)。ADH, *ALDH*ともアイソザイムの存在が知られているが、その中で活性が高く、アルコール代謝に強くかかわっているのは、ADH1Bと*ALDH2*である。酢酸はさらに代謝されてacetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) へと変換されるが、この反応の際、ATPからアデノシン一リン酸 (AMP; adenosine monophosphate) が産生される。細胞内のATP/AMP比は一定になるように制御されているため、AMPの分解は促進され、イノシン、ヒポキサンチン、キサンチンを経て、尿酸へと代謝される³⁷⁾。以上の代謝経路が、飲酒が血清尿酸値を上昇させると考えられている機序のひとつである。

*ALDH2*はrs671 (Glu504Lys) によって酵素活性に個人差が生じる。日本人の約4割はrs671がG/A (Glu/Lys) もしくはA/A (Lys/Lys) である一方、白人や黒人ではこれらの遺伝子型は極めて稀であり、ほぼすべての人がG/G (Glu/Glu) である³⁸⁾。これまでの白人や黒人での痛風の遺伝子研究で*ALDH2*遺伝子が同定されなかったのは、このためだと考える。rs671がG/G (Glu/Glu) で酵素活性が高い人はアセトアルデヒドが早く代謝されるためアルコールに強く、rs671がG/A (Glu/Lys) やA/A (Lys/Lys) の人はアルコールに弱く、飲酒による顔面紅潮や頭痛、嘔気といったフラッシング反応を起こしやすい。

以上のことから、今回見出された*ALDH2*遺伝子のrs671と痛風の関連は、rs671がG/G (Glu/Glu) の人はG/A (Glu/Lys) やA/A (Lys/Lys)

Lys) の人よりも多くアルコールを摂取するために尿酸値が高くなりやすく痛風を発症しやすいという、飲酒による影響をみている可能性がある。このため飲酒習慣による補正を加えた解析も行ったところ、ORは1に近づいた(補正なしのOR=0.44に対し、補正ありのOR=0.52)もののrs671と痛風の関連は統計学的に有意であった。また、非飲酒者のみでの解析でも、rs671と痛風の関連は統計学的に有意であった。今回用いた飲酒習慣に関する情報は、頻度のみであり量は含まれていない。また非飲酒者の解析は少数例であるため飲酒による影響を完全に否定することは難しいが、*ALDH2*遺伝子が飲酒以外の機序で痛風発症へ影響を及ぼしている可能性がある。

GCKRはグルコキナーゼ(GCK; glucokinase)の活性を調整する制御因子である。GCKは、解糖系の最初の段階であるグルコースからグルコース6-リン酸への変換を触媒する酵素であり、膵β細胞においてはインスリン分泌におけるグルコースセンサーとして機能しており、糖代謝の重要な役割を果たしている^{39, 40)}。GCKRがGCKへ結合するとGCKの活性は低下し、解離するとGCKの活性は上昇し解糖系は促進される⁴¹⁾。解糖系で産生されたグルコース6-リン酸からは、ペントースリン酸経路によって核酸の合成に必要なリボース5-リン酸が産生される。この代謝経路を介して、*GCKR*遺伝子が痛風の発症と関連している可能性が考えられる。また、今回のGWASで同定されたSNPであるrs1260326(Leu446Pro)のリスクアレルは、空腹時血糖値を低下させるという報告^{41, 42)}がある一方、血清中性脂肪値^{41, 42)}や血清尿酸値を上昇させるという報告がある^{13, 43, 44)}。これらのことから、*GCKR*遺伝子のrs1260326が糖代謝だけでなく中性脂肪の代謝の個人差にも影響を及ぼし、痛風・高尿酸血症の発症に関与している可能性も考えられる。

CNIH-2は神経細胞やグリア細胞に発現し、AMPA(α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate)型グルタミン酸受容体に結合する補助サブユニットとして機能しており、グルタミン酸シグナリングに関連する^{45, 46)}。この*CNIH-2*遺伝子が痛風発症に影響を及ぼす機序

は現在のところ不明であるが、AMPA型グルタミン酸受容体は中枢神経系に広く分布し記憶や学習に関与することから、*CNIH-2*遺伝子多型が食生活や飲酒習慣の個人差に影響することで、痛風の発症に関与している可能性も考えられる。

MAP3K11はMAPキナーゼ(mitogen-activated protein kinase)の一種で、酸化ストレスや炎症性サイトカインなどに反応して様々な細胞の機能を発現させるc-Jun N-terminal kinase(JNK)の活性化に重要な役割を果たしている⁴⁷⁾。興味深いことに、尿酸結晶を単球が貪食すると、このJNK経路が活性化されることが報告されている⁴⁸⁾。また、今回同定された*MAP3K11*遺伝子のSNP(rs10791821)は単球におけるMAP3K11の発現レベルにも関連することが分かっている⁴⁹⁾。このような過去の知見を考慮すると、今回のGWASではrs10791821はゲノムワイド有意水準には達しなかったが、痛風関連遺伝子の可能性があると考えられる。

総 括

痛風のGWASと12番染色体の*MYL2-CUX2*領域におけるfine mappingを実施し、5つの痛風関連遺伝子領域(*ABCG2*, *SLC2A9*, *ALDH2*, *GCKR*及び*CNIH-2*)を同定した。この発見は、痛風を発症する遺伝的リスクが高い人を早期に見つけ出し、生活指導や投薬により予防を可能とするもので、QOL(quality of life)の維持・向上につながるものと考えられる。

また本研究は、医師により確実に診断された痛風症例のみを選別した。このため、痛風の病型ごとの違いを見る詳細な解析が可能であり、病型と遺伝子領域との関連性について検討できた。その結果、*ABCG2*領域は腎負荷型の痛風、*SLC2A9*領域は腎排泄低下型の痛風にそれぞれ関連が強いことが発見された。痛風・高尿酸血症は病型分類ごとに使用する薬剤が異なるが、ガイドラインに従うとその分類の確定には蓄尿検査を要する¹⁾。しかし、診療現場での蓄尿検査は非常に手間がかかるため、一般にその実施は現実的な選択ではない。本研究成果は、このような臨床上の問題点を解決し、蓄尿検査に代わるコンパニオン診断の開発につながる可能性

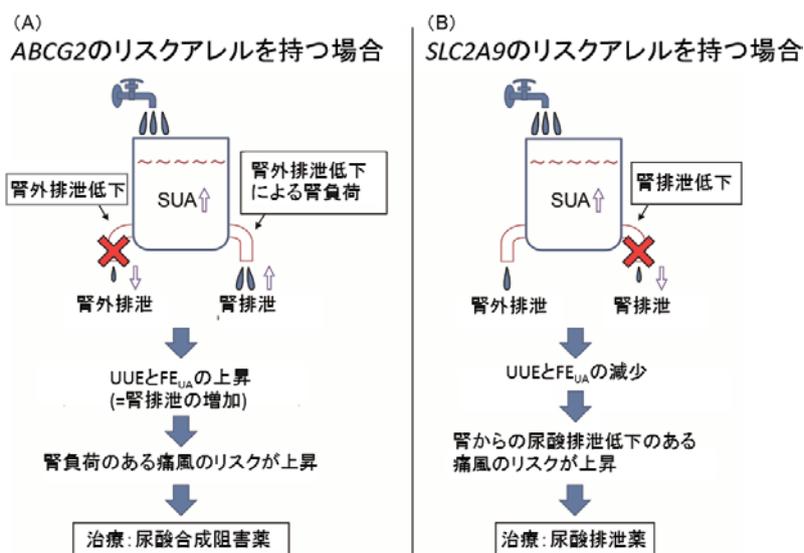


図10. トランスポーターの遺伝子多型によるコンパニオン診断の可能性
 (A) ABCG2のリスクアレルはUUEとFE_{UA}を上昇させる。これは腎臓の尿酸排泄の増加を引き起こし、腎負荷のある痛風リスクが上昇する。そのため、ABCG2のリスクアレルを持つ患者は尿酸合成阻害薬の適応となる可能性が考えられる。
 (B) SLC2A9のリスクアレルはUUEとFE_{UA}を減少させる。これは腎臓の尿酸排泄の減少を示し、腎排低下のある痛風リスクが上昇する。SLC2A9のリスクアレルを持つ患者は尿酸排泄促進薬の適応となる可能性が考えられる。
 (SUA; serum uric acid, UUE; urinary urate excretion, FE_{UA}; fractional excretion of urate.) (文献11より引用, 改変)

が期待できる結果である (図10)。

謝 辞

稿を終えるにあたり、トランスポーター研究に関してご助言頂きました東京大学薬剤部講師 高田龍平先生、症例解析をご指導いただきました東京薬科大学病態生理学教室教授 市田公美先生、遺伝子解析のご支援を頂きました久留米大学医化学教授 山本健先生、統計解析においてご支援を頂きました国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門助教 中岡博史先生、防衛医科大学校数学研究室准教授 中村好宏先生、同衛生学公衆衛生学講座講師 中島宏先生、その他多くの共同研究者の皆様、多大なご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、心より御礼申し上げます。

最後に平成28年度学術集会優秀賞に選出して頂きました選考委員の先生方はじめ関係各位に、この場をかりて御礼申し上げます。

文 献

1) The guideline revising committee of the Japanese Society of Gout and Nucleic Acid Metabolism. Diagnosis of hyperuricemia and gout. In: The

guideline revising committee of the Japanese Society of Gout and Nucleic Acid Metabolism, ed. Guideline for the Management of Hyperuricemia and Gout. 2nd ed. Medical Review, Osaka, 2010, pp. 60-72.

- 2) Feig, D. I., Kang, D. H. and Johnson, R. J.: Uric acid and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 359: 1811-1821, 2008.
- 3) 崎山真幸, 松尾洋孝: 若くして痛風を発症する遺伝子要因. *Bio Clinica* 30: 493-496, 2015.
- 4) Matsuo, H., Ichida, K., Takada, T., Nakayama, A., Nakashima, H., Nakamura, T., Kawamura, Y., Takada, Y., Yamamoto, K., Inoue, H., Oikawa, Y., Naito, M., Hishida, A., Wakai, K., Okada, C., Shimizu, S., Sakiyama, M., Chiba, T., Ogata, H., Niwa, K., Hosoyamada, M., Mori, A., Hamajima, N., Suzuki, H., Kanai, Y., Sakurai, Y., Hosoya, T., Shimizu, T. and Shinomiya, N.: Common dysfunctional variants in ABCG2 are a major cause of early-onset gout. *Sci. Rep.* 3: 2014, 2013.
- 5) Matsuo, H., Takada, T., Ichida, K., Nakamura, T., Nakayama, A., Ikebuchi, Y., Ito, K., Kusanagi, Y., Chiba, T., Tadokoro, S., Takada, Y., Oikawa, Y., Inoue, H., Suzuki, K., Okada, R., Nishiyama, J., Domoto, H., Watanabe, S., Fujita, M., Morimoto, Y., Naito, M., Nishio, K., Hishida, A., Wakai, K., Asai, Y., Niwa, K., Kamakura, K., Nonoyama, S., Sakurai, Y., Hosoya, T., Kanai, Y., Suzuki, H., Hamajima, N. and Shinomiya, N.: Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci. Transl. Med.* 1: 5ra11, 2009.

- 6) Woodward, O. M., Köttgen, A., Coresh, J., Boerwinkle, E., Guggino, W. B. and Köttgen, M.: Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 10338-10342, 2009.
- 7) Enomoto, A., Kimura, H., Chairoungdua, A., Shigeta, Y., Jutabha, P., Cha, S. H., Hosoyamada, M., Takeda, M., Sekine, T., Igarashi, T., Matsuo, H., Kikuchi, Y., Oda, T., Ichida, K., Hosoya, T., Shimokata, K., Niwa, T., Kanai, Y. and Endou, H.: Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 417: 447-452, 2002.
- 8) Matsuo, H., Chiba, T., Nagamori, S., Nakayama, A., Domoto, H., Phetdee, K., Wiriyasermkul, P., Kikuchi, Y., Oda, T., Nishiyama, J., Nakamura, T., Morimoto, Y., Kamakura, K., Sakurai, Y., Nonoyama, S., Kanai, Y. and Shinomiya, N.: Mutations in glucose transporter 9 gene SLC2A9 cause renal hypouricemia. *Am. J. Hum. Genet.* 83: 744-751, 2008.
- 9) Yeldandi, A. V., Wang, X. D., Alvares, K., Kumar, S., Rao, M. S. and Reddy, J. K.: Human urate oxidase gene: cloning and partial sequence analysis reveal a stop codon within the fifth exon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 641-646, 1990.
- 10) Sakiyama, M., Matsuo, H., Shimizu, S., Chiba, T., Nakayama, A., Takada, Y., Nakamura, T., Takada, T., Morita, E., Naito, M., Wakai, K., Inoue, H., Tatsukawa, S., Sato, J., Shimono, K., Makino, T., Satoh, T., Suzuki, H., Kanai, Y., Hamajima, N., Sakurai, Y., Ichida, K., Shimizu, T. and Shinomiya, N.: Common variant of leucine-rich repeat-containing 16A (LRRC16A) gene is associated with gout susceptibility. *Hum. Cell* 27: 1-4, 2014.
- 11) Matsuo, H., Yamamoto, K., Nakaoka, H., Nakayama, A., Sakiyama, M., Chiba, T., Takahashi, A., Nakamura, T., Nakashima, H., Takada, Y., Danjoh, I., Shimizu, S., Abe, J., Kawamura, Y., Terashige, S., Ogata, H., Tatsukawa, S., Yin, G., Okada, R., Morita, E., Naito, M., Tokumasu, A., Onoue, H., Iwaya, K., Ito, T., Takada, T., Inoue, K., Kato, Y., Nakamura, Y., Sakurai, Y., Suzuki, H., Kanai, Y., Hosoya, T., Hamajima, N., Inoue, I., Kubo, M., Ichida, K., Ooyama, H., Shimizu, T. and Shinomiya, N.: Genome-wide association study of clinically defined gout identifies multiple risk loci and its association with clinical subtypes. *Ann. Rheum. Dis.* 75: 652-659, 2016.
- 12) Sakiyama, M., Matsuo, H., Nakaoka, H., Yamamoto, K., Nakayama, A., Nakamura, T., Kawai, S., Okada, R., Ooyama, H., Shimizu, T. and Shinomiya, N.: Identification of rs671, a common variant of ALDH2, as a gout susceptibility locus. *Sci. Rep.* 6: 25360, 2016.
- 13) Köttgen, A., Albrecht, E., Teumer, A., Vitart, V., Krumsiek, J., Hundertmark, C., Pistis, G., Ruggiero, D., O'Seaghdha, C. M., Haller, T., Yang, Q., Tanaka, T., Johnson, A. D., Kutalik, Z., Smith, A. V., Shi, J., Struchalin, M., Middelberg, R. P., Brown, M. J., Gaffo, A. L., Pirastu, N., Li, G., Hayward, C., Zemunik, T., Huffman, J., Yengo, L., Zhao, J. H., Demirkan, A., Feitosa, M. F., Liu, X., Malerba, G., Lopez, L. M., van der Harst, P., Li, X., Kleber, M. E., Hicks, A. A., Nolte, I. M., Johansson, A., Murgia, F., Wild, S. H., Bakker, S. J., Peden, J. F., Dehghan, A., Steri, M., Tenesa, A., Lagou, V., Salo, P., Mangino, M., Rose, L. M., Lehtimäki, T., Woodward, O. M., Okada, Y., Tin, A., Muller, C., Oldmeadow, C., Putku, M., Czamara, D., Kraft, P., Frogger, L., Thun, G. A., Grotevendt, A., Gislason, G. K., Harris, T. B., Launer, L. J., McArdle, P., Shuldiner, A. R., Boerwinkle, E., Coresh, J., Schmidt, H., Schallert, M., Martin, N. G., Montgomery, G. W., Kubo, M., Nakamura, Y., Munroe, P. B., Samani, N. J., Jacobs, D. R., Jr., Liu, K., D'Adamo, P., Ulivi, S., Rotter, J. I., Psaty, B. M., Vollenweider, P., Waeber, G., Campbell, S., Devuyst, O., Navarro, P., Kolcic, I., Hastie, N., Balkau, B., Froguel, P., Esko, T., Salumets, A., Khaw, K. T., Langenberg, C., Wareham, N. J., Isaacs, A., Kraja, A., Zhang, Q., Wild, P. S., Scott, R. J., Holliday, E. G., Org, E., Viigimaa, M., Bandinelli, S., Metter, J. E., Lupo, A., Trabetti, E., Sorice, R., Doring, A., Lattka, E., Strauch, K., Theis, F., Waldenberger, M., Wichmann, H. E., Davies, G., Gow, A. J., Bruinenberg, M., Stolk, R. P., Kooner, J. S., Zhang, W., Winkelmann, B. R., Boehm, B. O., Lucae, S., Penninx, B. W., Smit, J. H., Curhan, G., Mudgal, P., Plenge, R. M., Portas, L., Persico, I., Kirin, M., Wilson, J. F., Mateo Leach, I., van Gilst, W. H., Goel, A., Ongen, H., Hofman, A., Rivadeneira, F., Uitterlinden, A. G., Imboden, M., von Eckardstein, A., Cucca, F., Nagaraja, R., Piras, M. G., Nauck, M., Schurmann, C., Budde, K., Ernst, F., Farrington, S. M., Theodoratou, E., Prokopenko, I., Stumvoll, M., Jula, A., Perola, M., Salomaa, V., Shin, S. Y., Spector, T. D., Sala, C., Ridker, P. M., Kahonen, M., Viikari, J., Hengstenberg, C., Nelson, C. P., Meschia, J. F., Nalls, M. A., Sharma, P., Singleton, A. B., Kamatani, N., Zeller, T., Burnier, M., Attia, J., Laan, M., Klopp, N., Hillege, H. L., Kloiber, S., Choi, H., Pirastu, M., Tore, S., Probst-Hensch, N. M., Volzke, H., Gudnason, V., Parsa, A., Schmidt, R., Whitfield, J. B., Fornage, M., Gasparini, P., Siscovick, D. S., Polasek, O., Campbell, H., Rudan, I., Bouatia-Naji, N., Metspalu, A., Loos, R. J., van Duijn, C. M., Borecki, I. B., Ferrucci, L., Gambaro, G., Deary, I. J., Wolfenbutter, B. H., Chambers, J. C., Marz, W., Pramstaller, P. P., Snieder, H., Gyllenstein, U., Wright, A. F., Navis, G., Watkins, H., Witteman, J. C., Sanna, S., Schipf, S., Dunlop, M. G., Tonjes, A., Ripatti, S., Soranzo, N., Toniolo, D., Chasman, D. I., Raitakari, O., Kao, W. H., Ciullo, M., Fox, C. S., Caulfield, M., Bochud, M. and Gieger, C.: Genome-wide association analyses identify 18 new loci associated with serum urate concentrations. *Nat. Genet.* 45: 145-154, 2013.
- 14) Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Walters, G. B., Helgadóttir, H. T., Helgason, A., Gudjonsson, S. A., Zanon, C., Besenbacher, S., Bjornsdóttir, G., Magnusson, O. T., Magnusson, G., Hjartarson, E., Saemundsdóttir, J., Gylfason, A., Jonasdóttir, A., Holm, H., Karason, A., Rafnar, T., Stefansson, H.,

- Andreassen, O. A., Pedersen, J. H., Pack, A. I., de Visser, M. C., Kiemeny, L. A., Geirsson, A. J., Eyjolfsson, G. I., Olafsson, I., Kong, A., Masson, G., Jonsson, H., Thorsteinsdottir, U., Jonsdottir, I. and Stefansson, K.: Identification of low-frequency variants associated with gout and serum uric acid levels. *Nat. Genet.* 43: 1127-1130, 2011.
- 15) Wallace, S. L., Robinson, H., Masi, A. T., Decker, J. L., McCarty, D. J. and Yu, T. F.: Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum.* 20: 895-900, 1977.
- 16) Kamatani, Y., Matsuda, K., Okada, Y., Kubo, M., Hosono, N., Daigo, Y., Nakamura, Y. and Kamatani, N.: Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat. Genet.* 42: 210-215, 2010.
- 17) Asai, Y., Naito, M., Suzuki, M., Tomoda, A., Kuwabara, M., Fukada, Y., Okamoto, A., Oishi, S., Ikeda, K., Nakamura, T., Misu, Y., Katase, S., Tokumasu, S., Nishio, K., Ishida, Y., Hishida, A., Morita, E., Kawai, S., Okada, R., Wakai, K., Tamakoshi, A. and Hamajima, N.: Baseline data of Shizuoka area in the Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study (J-MICC Study). *Nagoya J. Med. Sci.* 71: 137-144, 2009.
- 18) Hamajima, N. and J-MICC Study Group. The Japan Multi-Institutional Collaborative Cohort Study (J-MICC Study) to detect gene-environment interactions for cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 8: 317-323, 2007.
- 19) International HapMap, C.: The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-796, 2003.
- 20) Patterson, N., Price, A. L. and Reich, D.: Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2: e190, 2006.
- 21) Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A. and Reich, D.: Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38: 904-909, 2006.
- 22) Ichida, K., Matsuo, H., Takada, T., Nakayama, A., Murakami, K., Shimizu, T., Yamanashi, Y., Kasuga, H., Nakashima, H., Nakamura, T., Takada, Y., Kawamura, Y., Inoue, H., Okada, C., Utsumi, Y., Ikebuchi, Y., Ito, K., Nakamura, M., Shinohara, Y., Hosoyamada, M., Sakurai, Y., Shinomiya, N., Hosoya, T. and Suzuki, H.: Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat. Commun.* 3: 764, 2012.
- 23) Nakaoka, H. and Inoue, I.: Meta-analysis of genetic association studies: methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse. *J. Hum. Genet.* 54: 615-623, 2009.
- 24) Cochran, W. G.: The combination of estimates from different experiments. *Biometrics* 10: 101-129, 1954.
- 25) Higgins, J. P. and Thompson, S. G.: Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* 21: 1539-1558, 2002.
- 26) Higgins, J. P., Thompson, S. G., Deeks, J. J. and Altman, D. G.: Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327: 557-560, 2003.
- 27) DerSimonian, R. and Laird, N.: Meta-analysis in clinical trials. *Control. Clin. Trials* 7: 177-188, 1986.
- 28) Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J. and Sham, P. C.: PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 559-575, 2007.
- 29) R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R. Foundation for Statistical Computing, 2014.
- 30) Takeuchi, F., Isono, M., Nabika, T., Katsuya, T., Sugiyama, T., Yamaguchi, S., Kobayashi, S., Ogihara, T., Yamori, Y., Fujioka, A. and Kato, N.: Confirmation of ALDH2 as a major locus of drinking behavior and of its variants regulating multiple metabolic phenotypes in a Japanese population. *Circ. J.* 75: 911-918, 2011.
- 31) Matsuo, K., Wakai, K., Hirose, K., Ito, H., Saito, T. and Tajima, K.: Alcohol dehydrogenase 2 His47Arg polymorphism influences drinking habit independently of aldehyde dehydrogenase 2 Glu487Lys polymorphism: analysis of 2,299 Japanese subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15: 1009-1013, 2006.
- 32) Matsuo, H., Takada, T., Nakayama, A., Shimizu, T., Sakiyama, M., Shimizu, S., Chiba, T., Nakashima, H., Nakamura, T., Takada, Y., Sakurai, Y., Hosoya, T., Shinomiya, N. and Ichida, K.: ABCG2 dysfunction increases the risk of renal overload hyperuricemia. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 33: 266-274, 2014.
- 33) Nakayama, A., Matsuo, H., Nakaoka, H., Nakamura, T., Nakashima, H., Takada, Y., Oikawa, Y., Takada, T., Sakiyama, M., Shimizu, S., Kawamura, Y., Chiba, T., Abe, J., Wakai, K., Kawai, S., Okada, R., Tamura, T., Shichijo, Y., Akashi, A., Suzuki, H., Hosoya, T., Sakurai, Y., Ichida, K. and Shinomiya, N.: Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on hyperuricemia progression than typical environmental risk factors. *Sci. Rep.* 4: 5227, 2014.
- 34) Sakiyama, M., Matsuo, H., Takada, Y., Nakamura, T., Nakayama, A., Takada, T., Kitajiri, S., Wakai, K., Suzuki, H. and Shinomiya, N.: Ethnic differences in ATP-binding cassette transporter, sub-family G, member 2 (ABCG2/BCRP): Genotype combinations and estimated functions. *Drug Metab. Pharmacokin.* 29: 490-492, 2014.
- 35) Kawamura, Y., Matsuo, H., Chiba, T., Nagamori, S., Nakayama, A., Inoue, H., Utsumi, Y., Oda, T., Nishiyama, J., Kanai, Y. and Shinomiya, N.: Pathogenic GLUT9 mutations causing renal hypouricemia type 2 (RHUC2). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 30: 1105-1111, 2011.
- 36) Chiba, T., Matsuo, H., Nagamori, S., Nakayama, A., Kawamura, Y., Shimizu, S., Sakiyama, M., Hosoyamada, M., Kawai, S., Okada, R., Hamajima, N., Kanai, Y. and Shinomiya, N.: Identification of a hypouricemia patient with SLC2A9 R380W, a pathogenic mutation for renal hypouricemia type 2. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 33: 261-265, 2014.
- 37) Faller, J. and Fox, I. H.: Ethanol-induced

- hyperuricemia: evidence for increased urate production by activation of adenine nucleotide turnover. *N. Engl. J. Med.* 307: 1598-1602, 1982.
- 38) Goedde, H. W., Agarwal, D. P., Fritze, G., Meier-Tackmann, D., Singh, S., Beckmann, G., Bhatia, K., Chen, L. Z., Fang, B., Lisker, R. and et al.: Distribution of ADH2 and ALDH2 genotypes in different populations. *Hum. Genet.* 88: 344-346, 1992.
- 39) Brown, K. S., Kalinowski, S. S., Megill, J. R., Durham, S. K. and Mookhtiar, K. A.: Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* 46: 179-186, 1997.
- 40) Slosberg, E. D., Desai, U. J., Fanelli, B., St Denny, I., Connelly, S., Kaleko, M., Boettcher, B. R. and Caplan, S. L.: Treatment of type 2 diabetes by adenoviral-mediated overexpression of the glucokinase regulatory protein. *Diabetes* 50: 1813-1820, 2001.
- 41) Hishida, A., Morita, E., Naito, M., Okada, R., Wakai, K., Matsuo, K., Nakamura, K., Takashima, N., Suzuki, S., Takezaki, T., Mikami, H., Ohnaka, K., Watanabe, Y., Uemura, H., Kubo, M., Tanaka, H. and Hamajima, N.: Associations of apolipoprotein A5 (APOA5), glucokinase (GCK) and glucokinase regulatory protein (GCKR) polymorphisms and lifestyle factors with the risk of dyslipidemia and dysglycemia in Japanese - a cross-sectional data from the J-MICC Study. *Endocr. J.* 59: 589-599, 2012.
- 42) Vaxillaire, M., Cavalcanti-Proenca, C., Dechaume, A., Tichet, J., Marre, M., Balkau, B. and Froguel, P.: The common P446L polymorphism in GCKR inversely modulates fasting glucose and triglyceride levels and reduces type 2 diabetes risk in the DESIR prospective general French population. *Diabetes* 57: 2253-2257, 2008.
- 43) Kolz, M., Johnson, T., Sanna, S., Teumer, A., Vitart, V., Perola, M., Mangino, M., Albrecht, E., Wallace, C., Farrall, M., Johansson, A., Nyholt, D. R., Aulchenko, Y., Beckmann, J. S., Bergmann, S., Bochud, M., Brown, M., Campbell, H., Connell, J., Dominiczak, A., Homuth, G., Lamina, C., McCarthy, M. I., Meitinger, T., Mooser, V., Munroe, P., Nauck, M., Peden, J., Prokisch, H., Salo, P., Salomaa, V., Samani, N. J., Schlessinger, D., Uda, M., Volker, U., Waeber, G., Waterworth, D., Wang-Sattler, R., Wright, A. F., Adamski, J., Whitfield, J. B., Gyllensten, U., Wilson, J. F., Rudan, I., Pramstaller, P., Watkins, H., Doering, A., Wichmann, H. E., Spector, T. D., Peltonen, L., Volzke, H., Nagaraja, R., Vollenweider, P., Caulfield, M., Illig, T. and Gieger, C.: Meta-analysis of 28,141 individuals identifies common variants within five new loci that influence uric acid concentrations. *PLoS Genet.* 5: e1000504, 2009.
- 44) Yang, Q., Kottgen, A., Dehghan, A., Smith, A. V., Glazer, N. L., Chen, M. H., Chasman, D. I., Aspelund, T., Eiriksdottir, G., Harris, T. B., Launer, L., Nalls, M., Hernandez, D., Arking, D. E., Boerwinkle, E., Grove, M. L., Li, M., Linda Kao, W. H., Chonchol, M., Haritunians, T., Li, G., Lumley, T., Psaty, B. M., Shlipak, M., Hwang, S. J., Larson, M. G., O'Donnell, C. J., Upadhyay, A., van Duijn, C. M., Hofman, A., Rivadeneira, F., Stricker, B., Uitterlinden, A. G., Pare, G., Parker, A. N., Ridker, P. M., Siscovick, D. S., Gudnason, V., Witteman, J. C., Fox, C. S. and Coresh, J.: Multiple genetic loci influence serum urate levels and their relationship with gout and cardiovascular disease risk factors. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 3: 523-530, 2010.
- 45) Herring, B. E., Shi, Y., Suh, Y. H., Zheng, C. Y., Blankenship, S. M., Roche, K. W. and Nicoll, R. A.: Cornichon proteins determine the subunit composition of synaptic AMPA receptors. *Neuron* 77: 1083-1096, 2013.
- 46) Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., Chisaka, O., Jonas, P., Schulte, U., Fakler, B. and Klocker, N.: Functional proteomics identify cornichon proteins as auxiliary subunits of AMPA receptors. *Science* 323: 1313-1319, 2009.
- 47) Teramoto, H., Coso, O. A., Miyata, H., Igishi, T., Miki, T. and Gutkind, J. S.: Signaling from the small GTP-binding proteins Rac 1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3 /protein-tyrosine kinase 1, a novel member of the mixed lineage kinase family. *J. Biol. Chem.* 271: 27225-27228, 1996.
- 48) Liu, R., O'Connell, M., Johnson, K., Pritzker, K., Mackman, N. and Terkeltaub, R.: Extracellular signal-regulated kinase 1/extracellular signal-regulated kinase 2 mitogen-activated protein kinase signaling and activation of activator protein 1 and nuclear factor kappaB transcription factors play central roles in interleukin-8 expression stimulated by monosodium urate monohydrate and calcium pyrophosphate crystals in monocytic cells. *Arthritis Rheum.* 43: 1145-1155, 2000.
- 49) Zeller, T., Wild, P., Szymczak, S., Rotival, M., Schillert, A., Castagne, R., Maouche, S., Germain, M., Lackner, K., Rossmann, H., Eleftheriadis, M., Sinning, C. R., Schnabel, R. B., Lubos, E., Mennerich, D., Rust, W., Perret, C., Proust, C., Nicaud, V., Loscalzo, J., Hubner, N., Tregouet, D., Munzel, T., Ziegler, A., Tiret, L., Blankenberg, S. and Cambien, F.: Genetics and beyond - the transcriptome of human monocytes and disease susceptibility. *PLoS One* 5: e10693, 2010.

Identification of gout susceptibility loci by GWAS and fine mapping

Masayuki SAKIYAMA* **, Hiroataka MATSUO ** and Nariyoshi SHINOMIYA **

J. Natl. Def. Med. Coll. (2017) 42 (4) : 153 – 169

Abstract: Environmental factor is a well-known risk factor for gout. Several genes associated with gout were also reported; however, the whole picture of genetic factors for gout is still unknown. Here, we performed a genome-wide association study (GWAS) of clinically-defined gout. GWAS was conducted with 945 male gout patients and 1,213 controls in a Japanese male population, followed by replication study of 1,048 cases and 1,334 controls. As results, five gout susceptibility loci were identified, including well-known urate transporter genes (*ABCG2* and *SLC2A9*), *GCKR* (a gene for glucose and lipid metabolism) and *CNIH-2* (a gene for regulation of glutamate signaling). The other one is located on an intergenic region between *MYL2* and *CUX2*. Therefore, we performed a fine-mapping study. From 8,595 SNPs in the *MYL2-CUX2* region, 8,550 SNPs in weak linkage disequilibrium (LD) were excluded. Next, after SNPs that were tagging other SNPs with strong LD were excluded, 9 tag SNPs were selected for association analysis. Genotyping of 1,048 gout patients and 1,334 controls was conducted by TaqMan method. As a result, *ALDH2* was identified for gout susceptibility locus. These findings could serve to stratify patients at risk for gout, and will be useful for future personalized medicine.

Key words: genome-wide association study / gout/hyperuricemia /
companion diagnostics / SNP / gene / ABCG2 / SLC2A9
/ ALDH2 / GCKR / CNIH-2