

平成26年度「統合化推進プログラム（統合データ解析トライアル）」

研究開発課題名：

# HLA遺伝子完全配列決定 パイプラインの構築

国立遺伝学研究所 総合遺伝研究系

人類遺伝研究部門

細道一善

# 研究開発内容

1. 研究開発の必要性
2. 予備的な知見
3. 研究項目とその進め方
  - haplotype phasingプログラムの開発
  - 解析手法のパイプライン化
4. 期待される成果

# 研究開発内容

1. 研究開発の必要性

2. 予備的な知見

3. 研究項目とその進め方

– haplotype phasingプログラムの開発

– 解析手法のパイプライン化

4. 期待される成果

# HLAとは

- HLA (Human Leukocyte Antigen

= ヒト白血球抗原)

– 1954年、白血球の血液型として発見

- 組織適合性抗原

(MHC; Major Histocompatibility Complex)

- ヒトに関しては MHC = HLA

# MHC分子

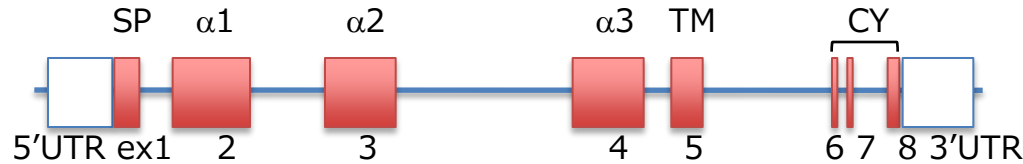
## MHCクラスI

ex) HLA-A, -C, -B

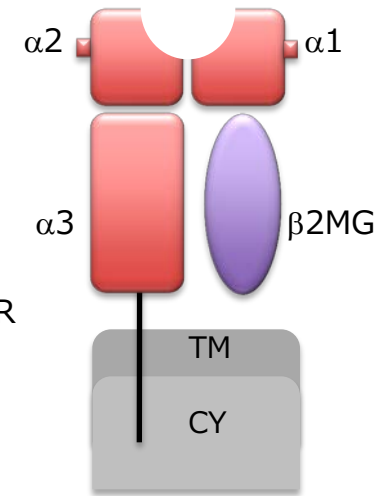
### 内在抗原提示

細胞性免疫

- 細胞障害、異物除去



### HLAクラスI分子



## MHCクラスII

α鎖遺伝子

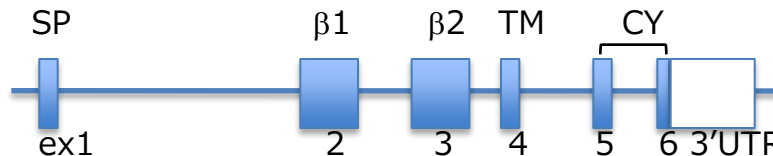
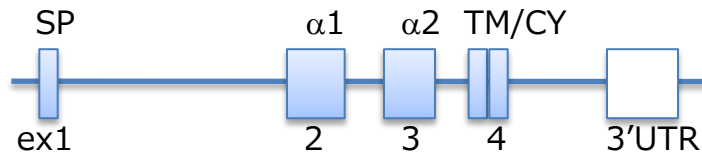
ex) HLA-DRA, -DQA

β鎖遺伝子

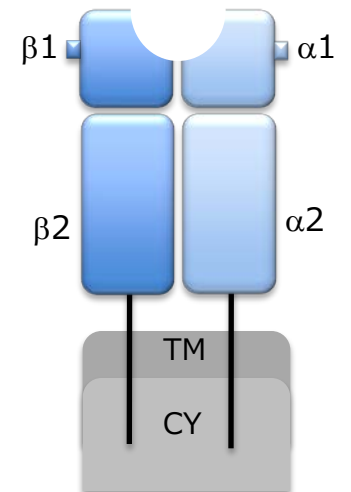
ex) HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1

### 外来性抗原提示

液性免疫 - 抗体産生



### HLAクラスII分子





# HLA領域の多様性

Variations Between the PGF and COX MHC Haplotypes

Context	SNPs	Indels	Total	bp	kb <sup>-1</sup>
Coding <sup>a,b</sup>	341	8	349	247,604	1.41
Exonic UTR	308	26	334	128,976	2.59
Intronic	2552	472	3024	1,052,077	2.87
Pseudogenic	460	33	493	107,079	4.60
Microsatellite <sup>c</sup>	262	230	492	28,788	17.09
Interspersed repeats <sup>d</sup>	3616	719	4335	1,092,788	3.97
Other intergenic	8474	913	9387	2,097,517	4.48
Total	16,013	2401	18,414	4,754,829	3.87
kb <sup>-1</sup>	3.37	0.51			
Transversions	5189				
Transitions	10,824				

個人ゲノムのSNP数(kb<sup>-1</sup>)

C. Venter 0.22

J. Watson 0.23

NA18507 0.42

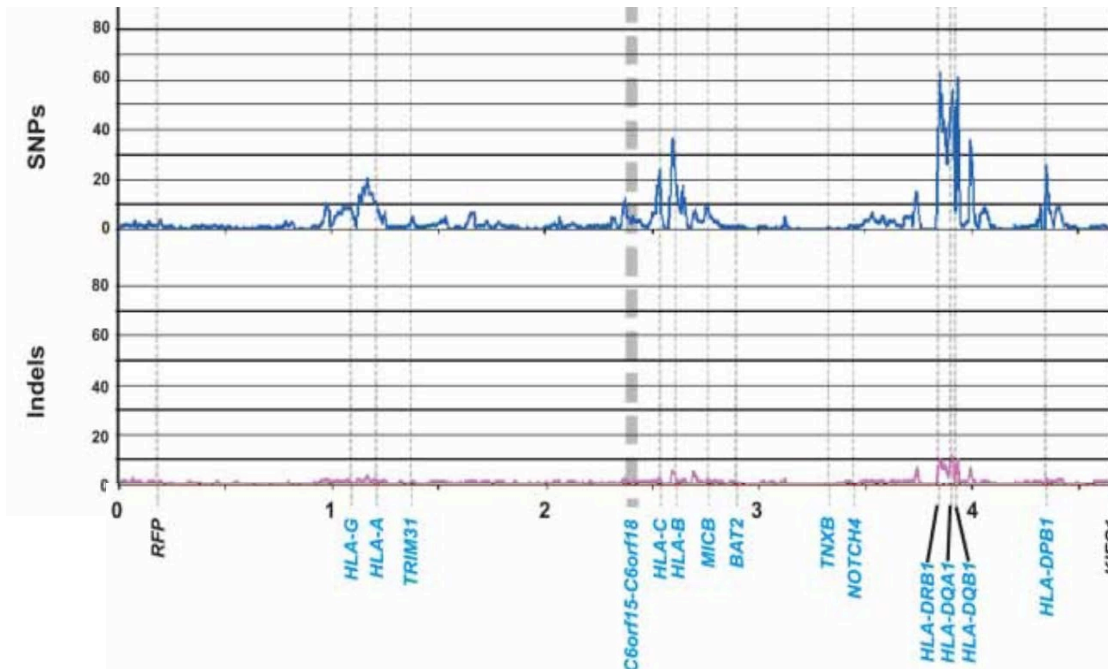
YH

0.15

AK1

0.25

HLA領域のSNP密度はゲノム全体の10倍以上高い



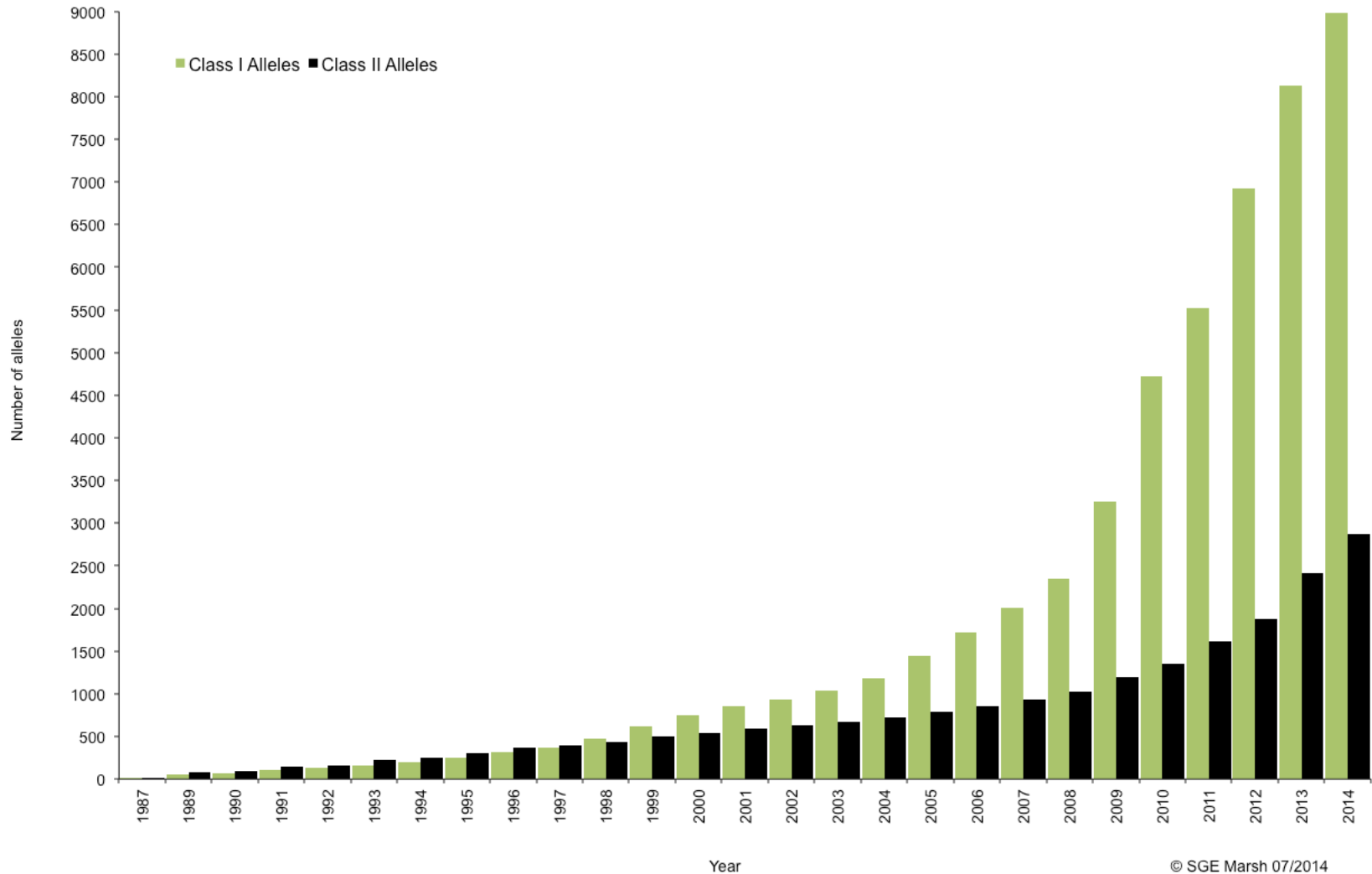




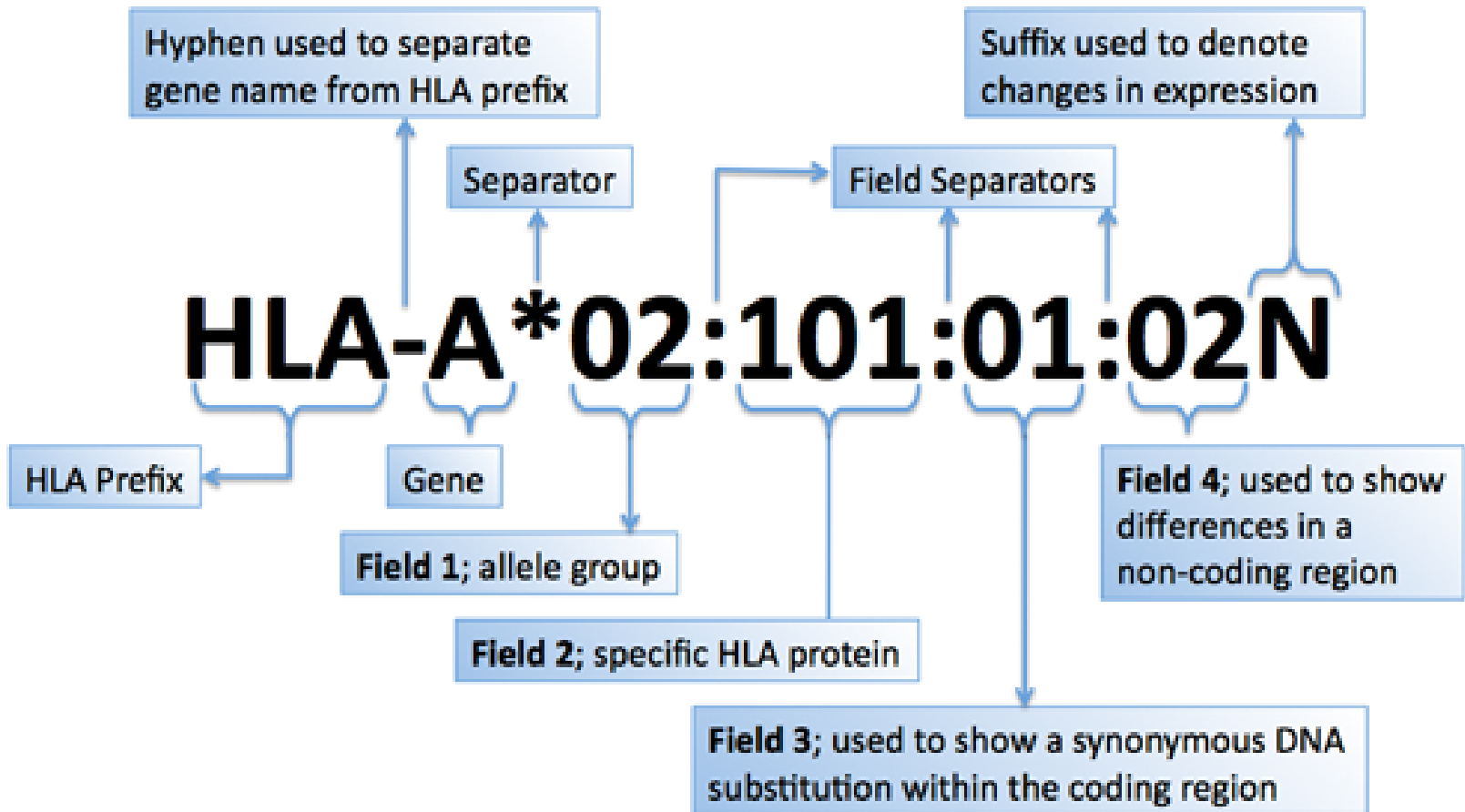
# IMGT/HLAデータベースに登録されているHLAアレル数

Numbers of HLA Alleles			
HLA Class I Alleles			8,976
HLA Class II Alleles			2,870
HLA Alleles			11,846
HLA Class I			
Gene	A	B	C
Alleles	2,884	3,589	2,375
Proteins	2,041	2,668	1,677
Nulls	133	119	71
HLA Class II			
Gene	DRB	DQB1	DPB1
Alleles	1,642	664	422
Proteins	1,211	435	351
Nulls	37	16	10

# IMGT/HLAデータベースに登録されている HLAアレル数



# HLAアレルの命名法



# HLAと疾患

- 生活習慣病
- 自己免疫疾患
- がん
- 造血幹細胞移植に伴う移植片対宿主病
- ウイルス感染症における防御と重症化
- 薬剤副作用

# 日本人における疾患とHLAの関連

疾患	関連を示すHLA型	患者集団中の頻度(%)	一般集団中の頻度(%)	オッズ比
ナルコレプシー	<i>HLA-DRB1*15:01</i> <i>HLA-DQB1*06:02</i>	100	12.4	1372.7
強直性脊椎炎	<i>HLA-B27</i>	83.3	0.5	1056.3
ベーチェット病	<i>HLA-B51:01</i>	59.4	13.6	9.3
関節リウマチ	<i>HLA-DRB1*04:05</i> <i>HLA-DQB1*04:01</i>	58.8	24.7	4.4
1型糖尿病	<i>HLA-B*54:01</i>	44.1	14	4.8
	<i>HLA-DRB1*04:05</i>	56.6	24.7	4
	<i>HLA-DQB1*04:01</i>	58.3	24.7	4.3
グレーヴス病	<i>HLA-DPB1*05:01</i>	87.2	61.8	4.2
橋本病	<i>HLA-DRB4*01:01</i>	88.7	63.7	4.5
多発性硬化症(大脳、小脳型)	<i>HLA-DRB1*15:01</i>	30.7	12.4	3.1
多発性硬化症(眼神経、脊髄型)	<i>HLA-DPB1*05:01</i>	93.6	61.8	9
潰瘍性大腸炎	<i>HLA-B*52:01</i>	56.4	24.1	4.1
	<i>HLA-DRB1*15:02</i>	59.3	24.4	4.5
	<i>HLA-DPB1*09:01</i>	55.6	20.6	4.8
原発性胆汁性肝硬変	<i>HLA-DRB1*08:03</i>	3.4	0.6	5.9
SLE	<i>HLA-B39</i>	16.7	3.1	6.3
	<i>HLA-DRB1*15:01</i>	29.6	12.4	3
混合結合組織病(MCTD)	<i>HLA-DRB1*04:01</i>	18.8	4.4	5
亜急性甲状腺炎	<i>HLA-B*35:01</i>	71.4	12.2	18
	<i>HLA-B*67:01</i>	16.1	1.7	11.2
高安動脈炎(高安病)	<i>HLA-B*52:01</i>	50.5	24.1	3.2
	<i>HLA-B*39:02</i>	4.1	0.5	8.5
バージャー病	<i>HLA-DRB1*15:01</i>	6	0.6	10.7
川崎病	<i>HLA-DPB1*02:02</i>	17.2	5.3	3.7

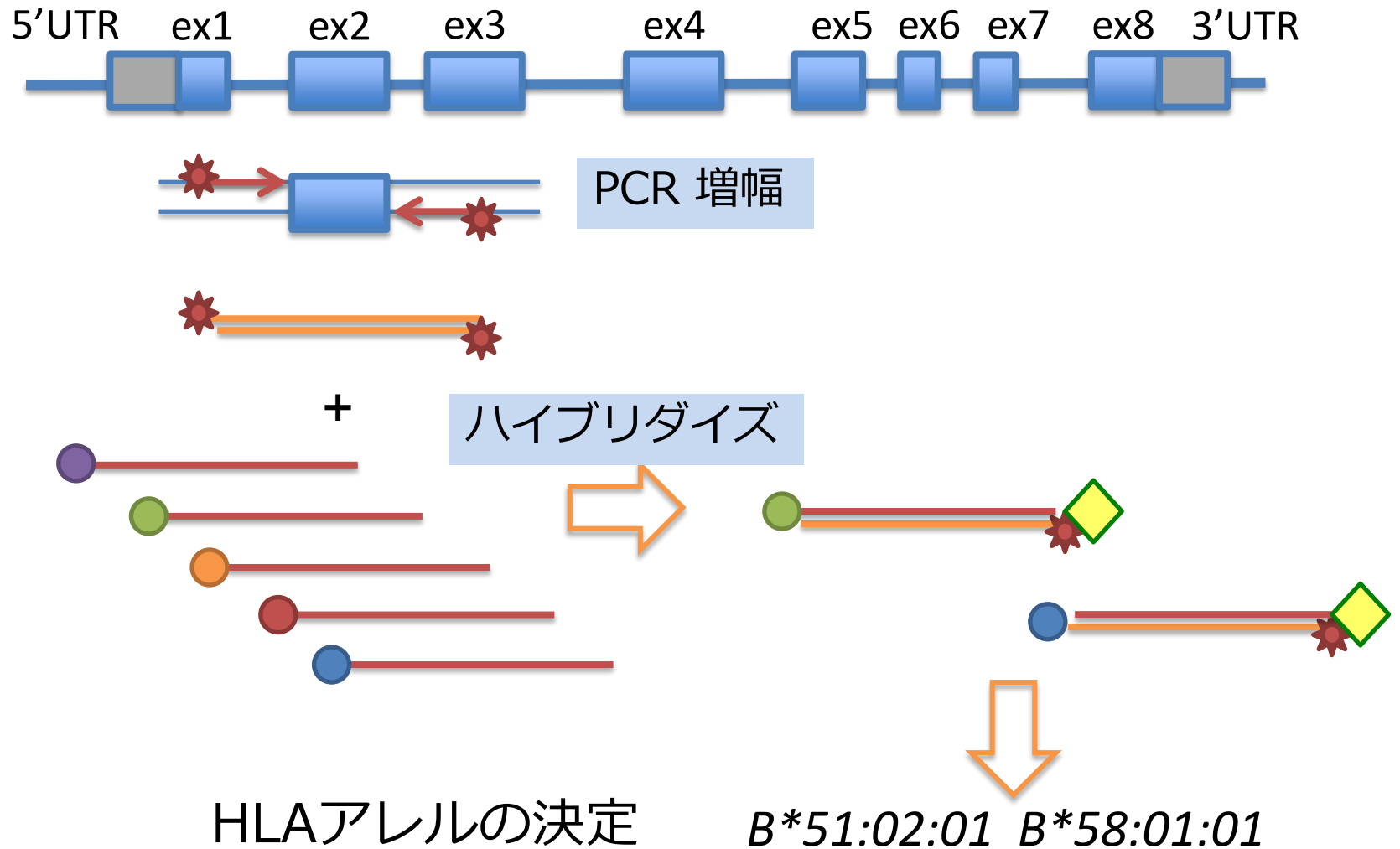
# HLAと薬剤副作用との関連性

薬剤副作用	関連を示すHLA型	陽性率 (%)	オッズ比
○ Tiopronin(重金属)と肝内胆汁うっ滞	<i>HLA-A*33:03</i>	93	41.5
○ Carbamazepine(抗痙攣剤)と Stevens-Johnson 症候群	<i>HLA-B*15:02</i>	100	895.5
Abacavir(抗HIV剤)と胃腸障害、嗜眠、低血圧による致死副作用	<i>HLA-B*57:01</i>	78	117.5
○ Allopurinol(抗痛風、抗尿酸血症剤)と薬疹	<i>HLA-B*58:01</i>	100	393.5
Ticlopidine(抗血小板剤)と肝障害	<i>HLA-A*33:03</i>	86	36.5
Amoxicillin-clavulanate potassium (抗生物質)と肝障害	<i>HLA-DRB1*15:01</i>	57	35.6
Flucloxacillin(抗生物質)と肝障害	<i>HLA-B*57:01</i>	84	80.6

原因がHLA遺伝子そのものであるか、連鎖不平衡によりHLA遺伝子と関連しているようにみえるかはAbacavirを除き不明

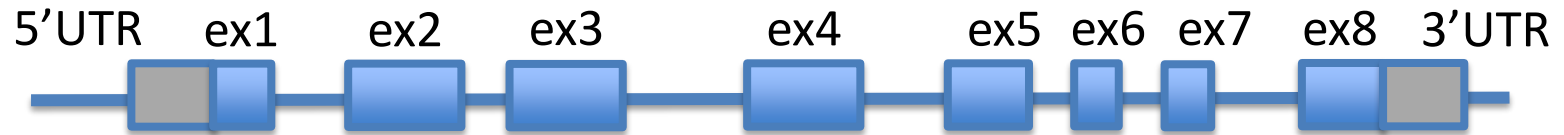
# 現行のHLAタイピング法

## PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide)



# 現行のHLAタイピング法

## PCR-SBT (sequencing based typing)



シーケンス



```
#180 #190 #200 #210 #220
1 G K A G A T T A T G C T G A G R G S Y K G A A G A A T T A C C T G G A G G A A R C C T G Y G T G
2 I G G A G A T T A T G C T G A G A G G C T G A A G A A T T A C C T G G A G G A A R C C T G T G T G
```



HLAアレルの推定

複数の組み合わせ候補

Combination 1  $B^*07:021 + B^*35:011$

Combination 2  $B^*07:18 + B^*35:05$

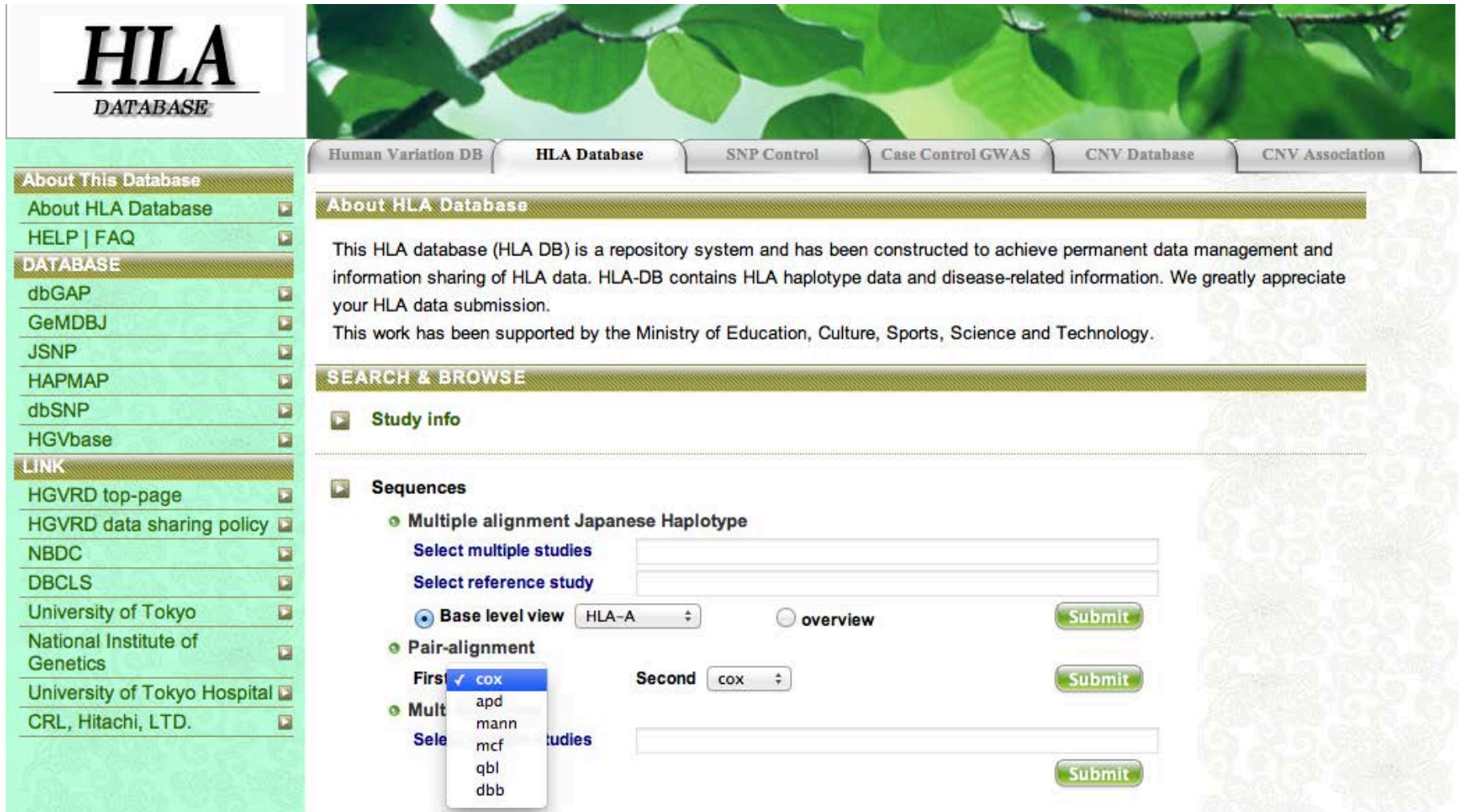
Combination 3  $B^*07:09 + B^*35:34$

Combination 4  $B^*07:24 + B^*35:15$

?



# 対象データおよび対象データベース



The image shows a screenshot of the HLA Database website. The page features a navigation menu on the left with categories like 'About This Database', 'DATABASE', and 'LINK'. The main content area includes a header with 'HLA DATABASE' and a navigation bar with tabs for 'Human Variation DB', 'HLA Database', 'SNP Control', 'Case Control GWAS', 'CNV Database', and 'CNV Association'. The 'HLA Database' tab is active, displaying an 'About HLA Database' section with a description of the repository and a 'SEARCH & BROWSE' section with a 'Study info' subsection. The 'Sequences' subsection contains a 'Multiple alignment Japanese Haplotype' section with input fields for 'Select multiple studies' and 'Select reference study', a 'Base level view' section with a dropdown menu set to 'HLA-A' and radio buttons for 'overview', and a 'Pair-alignment' section with dropdown menus for 'First' (set to 'cox') and 'Second' (set to 'cox'). A dropdown menu is also visible over the 'Multiple alignment' section, listing study identifiers: 'cox', 'apd', 'mann', 'mcf', 'qbl', and 'dbb'. Each section has a 'Submit' button.

**HLA**  
DATABASE

Human Variation DB | **HLA Database** | SNP Control | Case Control GWAS | CNV Database | CNV Association

### About HLA Database

This HLA database (HLA DB) is a repository system and has been constructed to achieve permanent data management and information sharing of HLA data. HLA-DB contains HLA haplotype data and disease-related information. We greatly appreciate your HLA data submission.

This work has been supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

### SEARCH & BROWSE

Study info

Sequences

- Multiple alignment Japanese Haplotype
  - Select multiple studies
  - Select reference study
  - Base level view   overview
- Pair-alignment
  - First  cox
  - Second
- Multiple alignment studies

# 研究開発内容

1. 研究開発の必要性
2. 予備的な知見
3. 研究項目とその進め方
  - haplotype phasingプログラムの開発
  - 解析手法のパイプライン化
4. 期待される成果

# 予備的な知見

Hosomichi et al. *BMC Genomics* 2013, **14**:355  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/355>



**METHODOLOGY ARTICLE**

**Open Access**

## Phase-defined complete sequencing of the HLA genes by next-generation sequencing

Kazuyoshi Hosomichi<sup>1</sup>, Timothy A Jinam<sup>1</sup>, Shigeki Mitsunaga<sup>2</sup>, Hirofumi Nakaoka<sup>1</sup> and Ituro Inoue<sup>1\*</sup>

Hosomichi et al. *BMC Genomics* 2014, **15**:645  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/645>



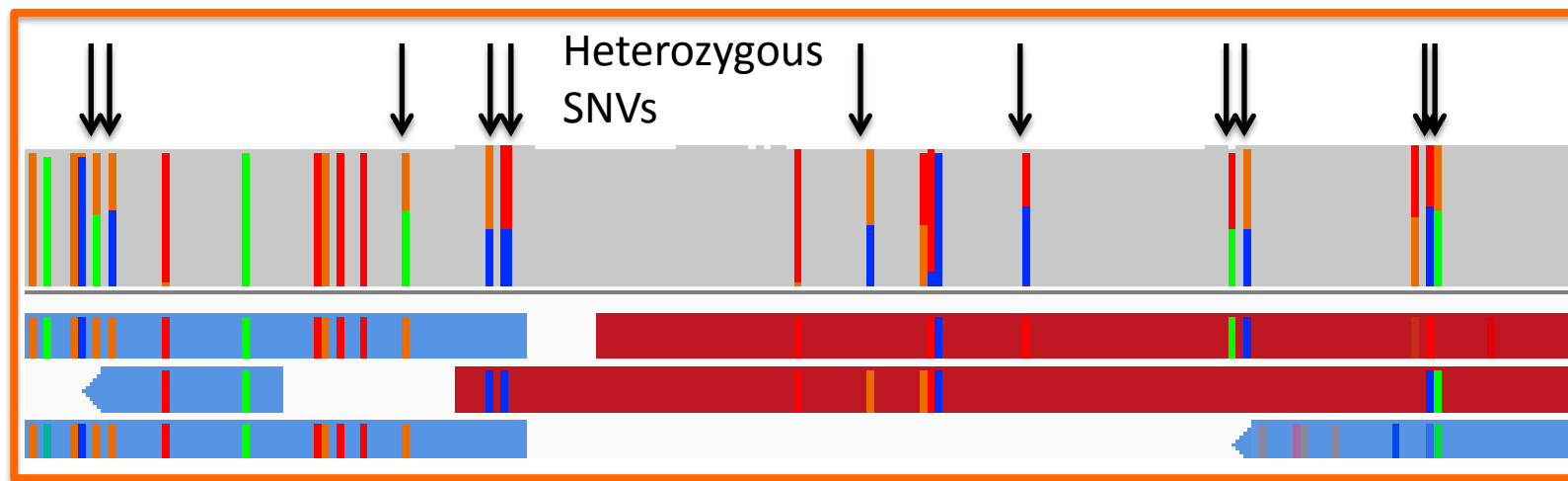
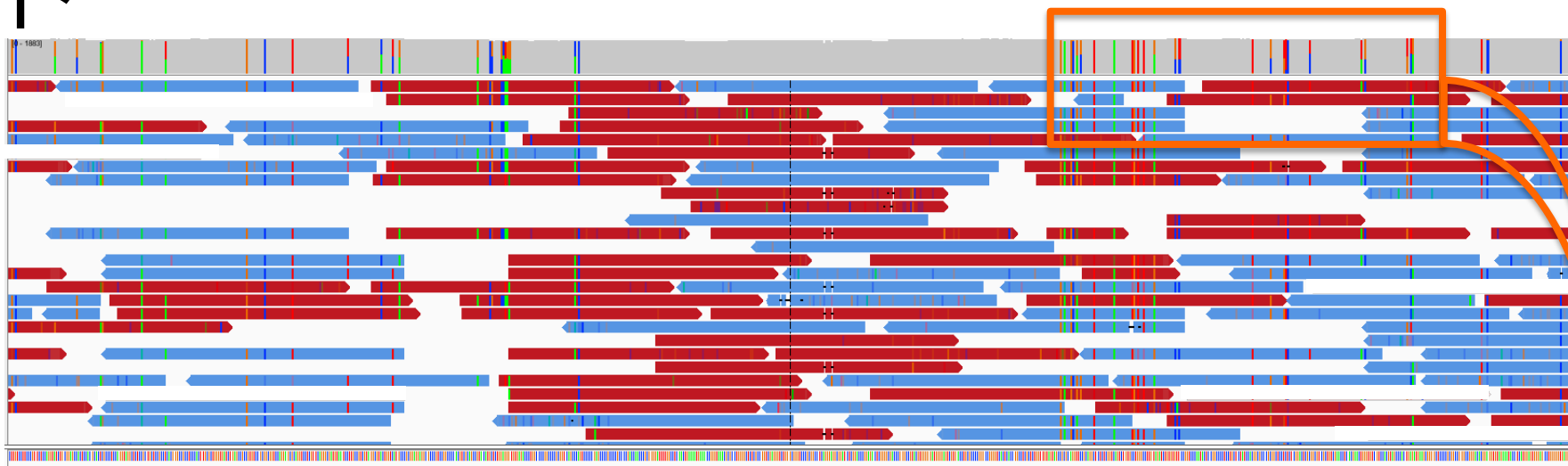
**METHODOLOGY ARTICLE**

**Open Access**

## A Bead-based Normalization for Uniform Sequencing depth (BeNUS) protocol for multi-samples sequencing exemplified by *HLA-B*

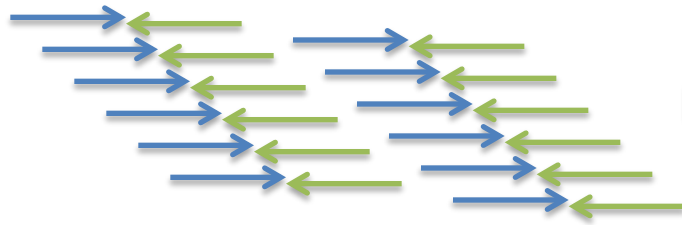
Kazuyoshi Hosomichi<sup>1</sup>, Shigeki Mitsunaga<sup>2</sup>, Hideki Nagasaki<sup>3</sup> and Ituro Inoue<sup>1\*</sup>

# HLA-B エクソン2および3のアライメント

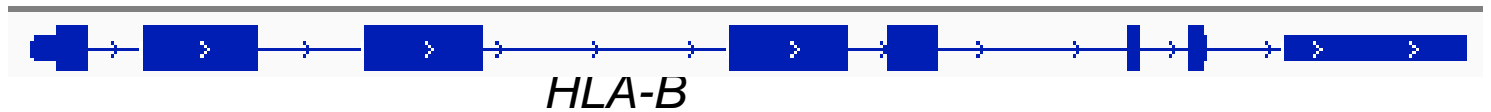


# HLA遺伝子配列完全決定のワークフロー

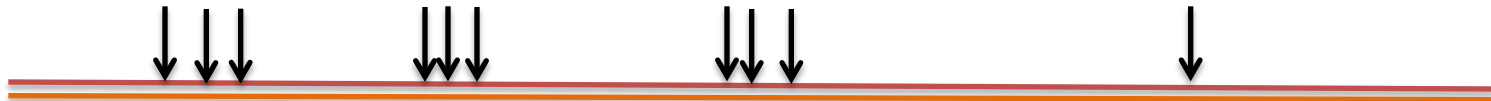
## Sequence reads



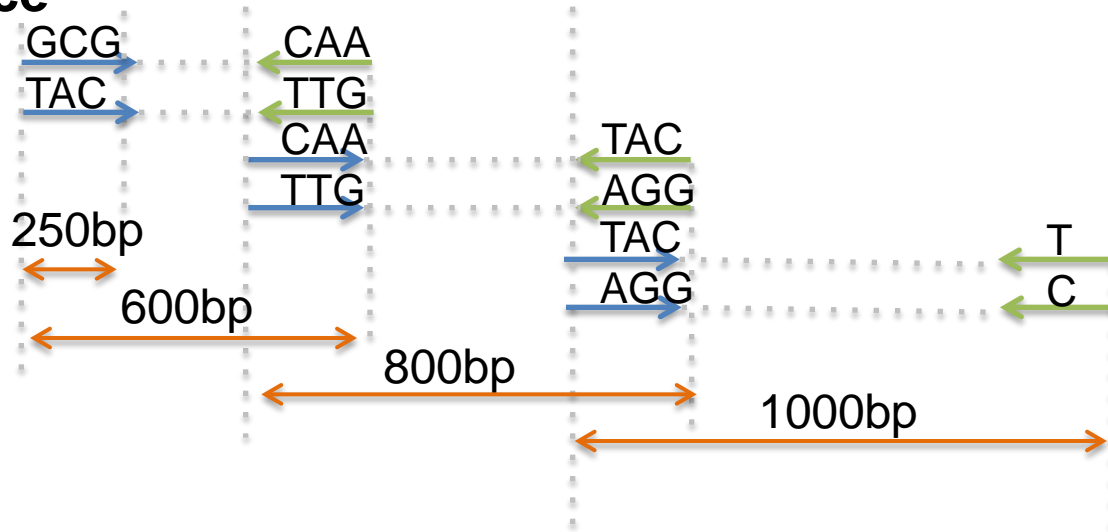
Mapping



SNVs

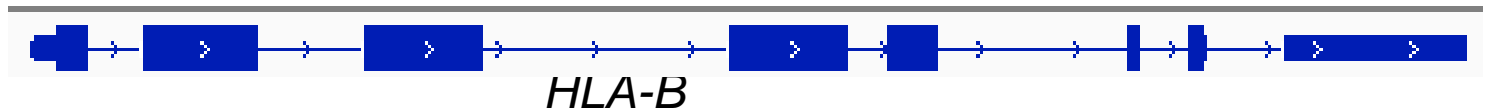
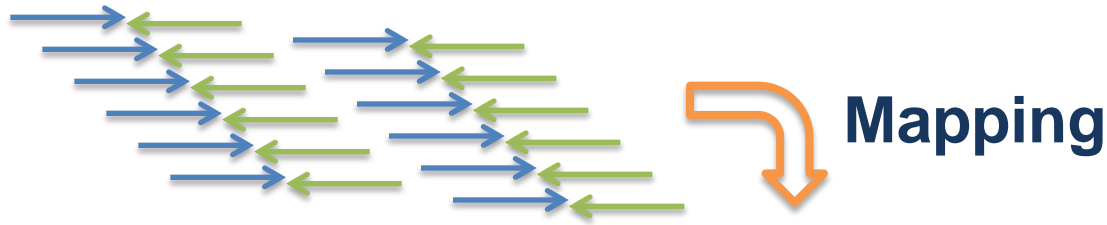


Diplotype sequence



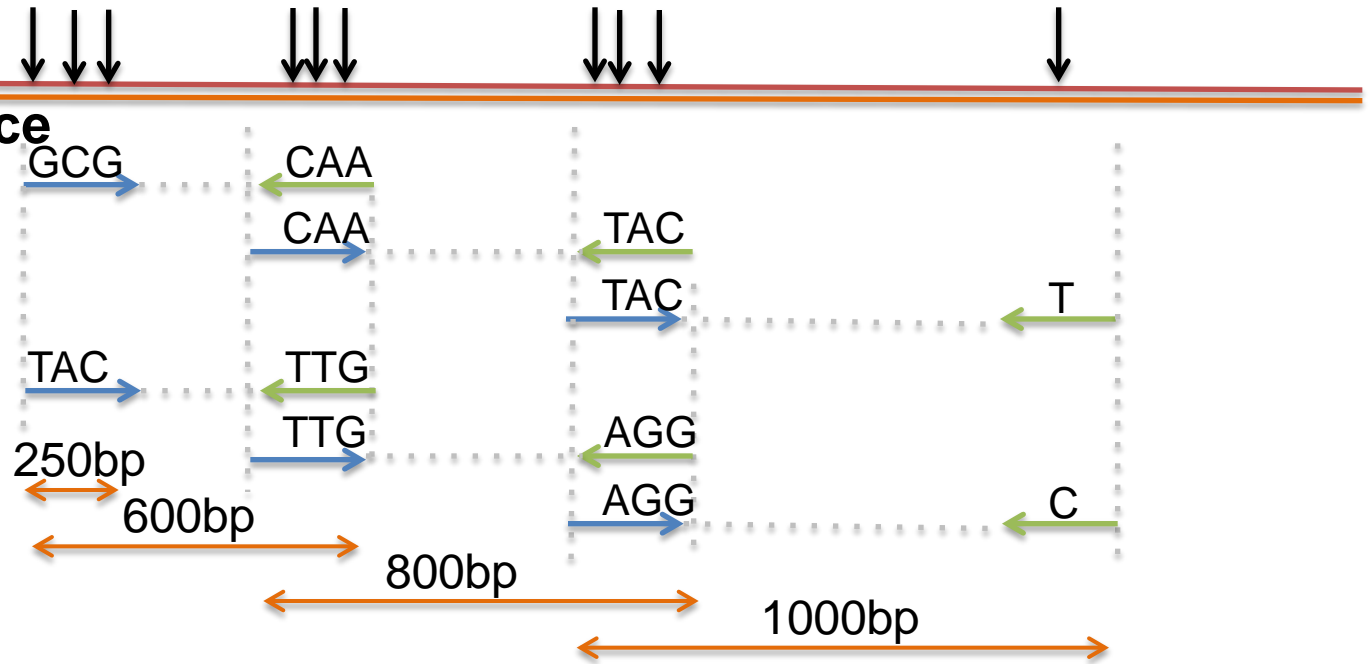
# HLA遺伝子配列完全決定のワークフロー

## Sequence reads



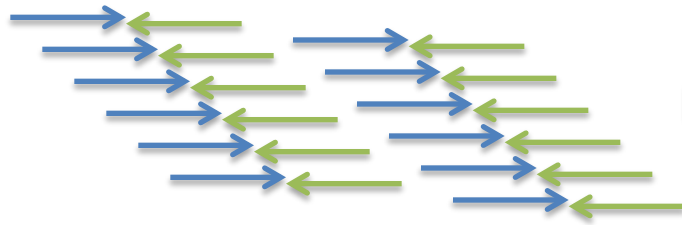
SNVs

Diplotype sequence

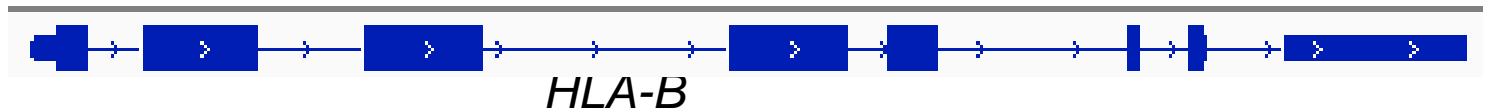


# HLA遺伝子配列完全決定のワークフロー

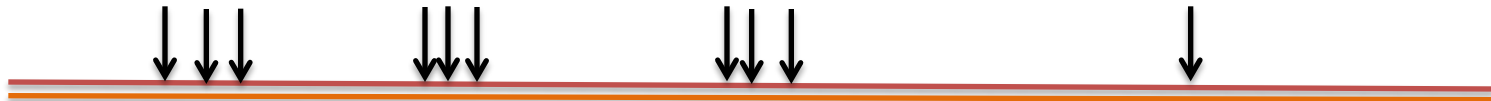
## Sequence reads



Mapping



SNVs



Diplotype sequence

GCG ..... CAA ..... TAC ..... T

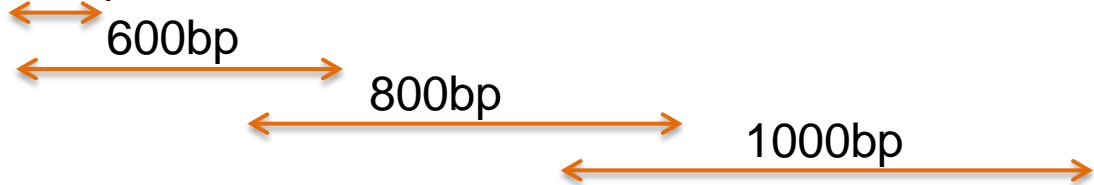
TAC ..... TTG ..... AGG ..... C

250bp

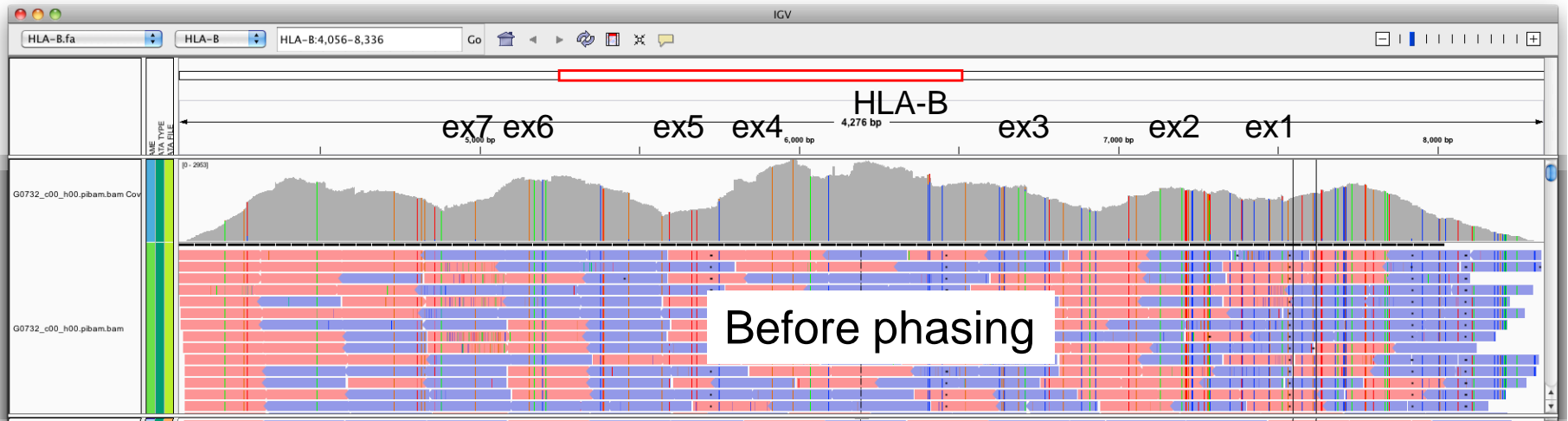
600bp

800bp

1000bp



# HLA遺伝子配列完全決定のワークフロー



Phased haplotype 1 → *B\*51:01:01*

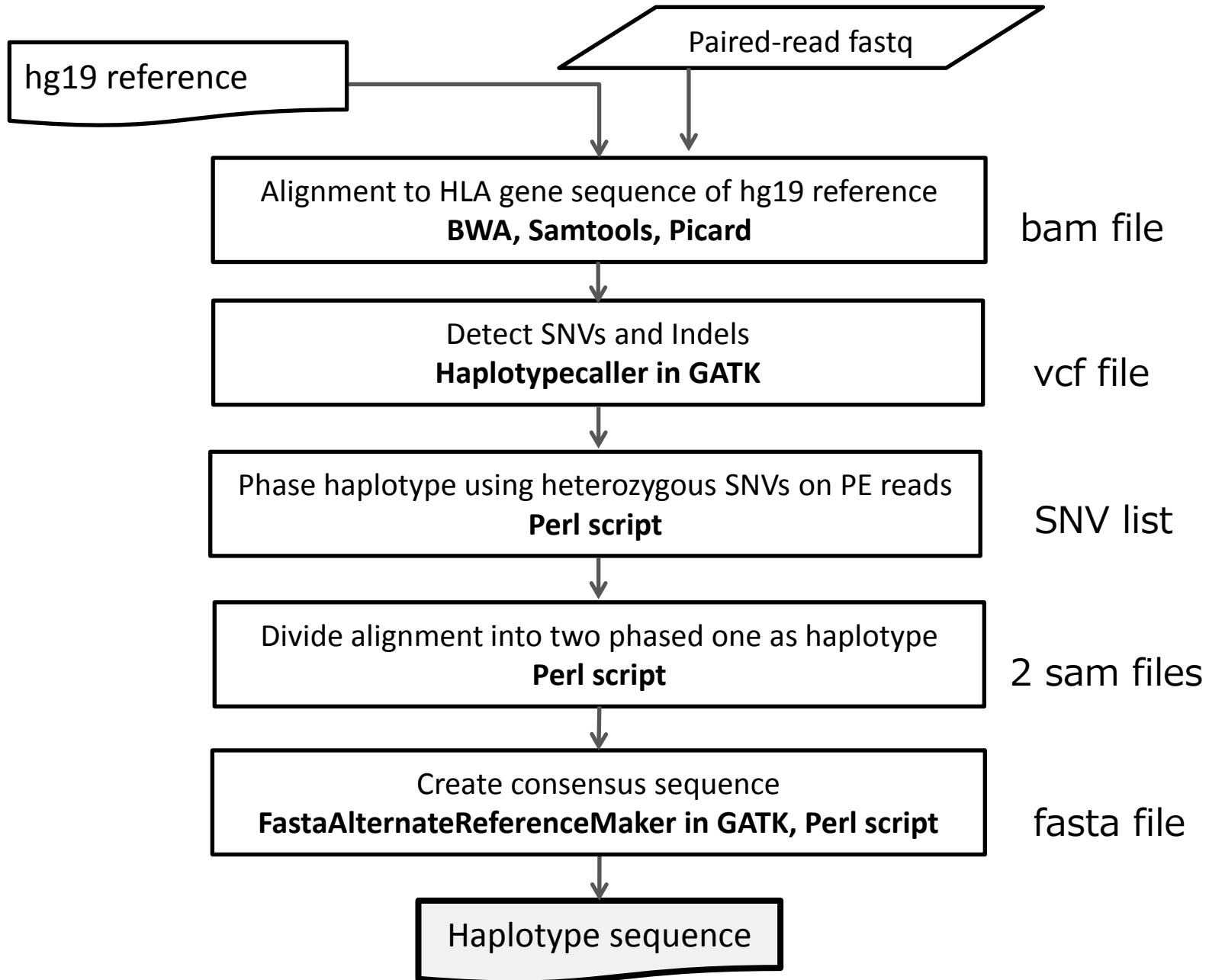
Phased haplotype 2 → *B\*15:02:01*



# 研究開発内容

1. 研究開発の必要性
2. 予備的な知見
3. 研究項目とその進め方
  - haplotype phasingプログラムの開発
  - 解析手法のパイプライン化
4. 期待される成果

# Workflow of phase-defined sequencing



# 研究開発内容

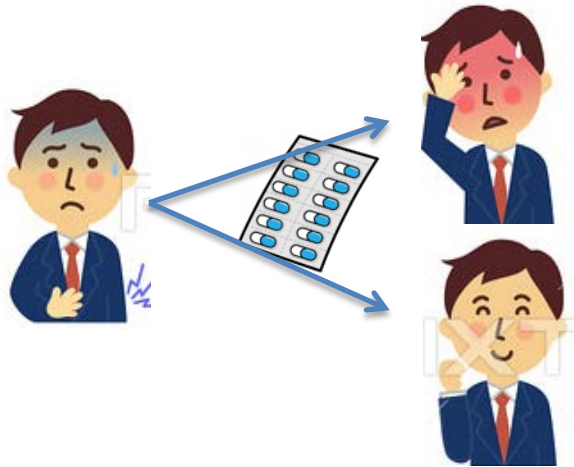
1. 研究開発の必要性
2. 予備的な知見
3. 研究項目とその進め方
  - haplotype phasingプログラムの開発
  - 解析手法のパイプライン化
4. 期待される成果

# HLAと薬剤副作用との関連性

薬剤副作用	関連を示すHLA型	陽性率 (%)	オッズ比
Tiopronin(重金属)と肝内胆汁うっ滞	<i>HLA-A*33:03</i>	93	41.5
Carbamazepine(抗痙攣剤)と Stevens-Johnson 症候群	<i>HLA-B*15:02</i>	100	895.5
Abacavir(抗HIV剤)と胃腸障害、嗜眠、低血圧による致死副作用	<i>HLA-B*57:01</i>	78	117.5
Allopurinol(抗痛風、抗尿酸血症剤)と薬疹	<i>HLA-B*58:01</i>	100	393.5
Ticlopidine(抗血小板剤)と肝障害	<i>HLA-A*33:03</i>	86	36.5
Amoxicillin-clavulanate potassium (抗生物質)と肝障害	<i>HLA-DRB1*15:01</i>	57	35.6
Flucloxacillin(抗生物質)と肝障害	<i>HLA-B*57:01</i>	84	80.6

原因がHLA遺伝子そのものであるか、連鎖不平衡によりHLA遺伝子と関連しているようにみえるかはAbacavirを除き不明

# HLAタイピングによる予防的診断



	HLA-B*57:01 positive	HLA-B*57:01 negative
ADR positive	23	0
ADR negative	25	794
ADR Positive %	48%	0%

Mallal S et al. N Engl J Med. 2008

# NGSによる骨髄バンクサンプルの HLAタイピング



日本骨髄バンク

## 日本骨髄バンク



40万検体

移植

