

平成10年度厚生科学研究費補助金  
(ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

ヒトゲノム解析法にもとづく  
難治性疾患原因遺伝子の解明

(課題番号 H10-ゲノム-022)

研究報告書

主任研究者 中村 祐輔

(東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター)

## ヒトゲノム解析法にもとづく難治性疾患原因遺伝子の解明

主任研究者 中村 祐輔 東京大学医科学研究所 教授・ヒトゲノム解析センター長

研究要旨 後縦靭帯骨化症モデルマウス $ttw$ の原因遺伝子がヌクレオチドピロフォスファターゼ（NPPS）（軟部組織の骨代謝に関係する酵素）遺伝子であることを明らかにし、これがヒトの後縦靭帯骨化症の発症にも関連していることを証明した。ムチン3遺伝子（MUC3）のムチンタンパクのバックボーンの繰り返し配列（VNTR）の差が潰瘍性大腸炎の発症に関連していることを明らかにした。膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子を単離した。Graves病、橋本病の発症に関与する遺伝子が第5染色体、第8染色体に存在する可能性を示した。白内障およびEngelman症候群の原因遺伝子が第20番染色体、第19番染色体に存在することを明らかにした。マウスモデルを用いて、腎炎・関節炎・血管炎・唾液腺炎のそれぞれについて複数の原因遺伝子の染色体局在を決定した。

### 分担研究者氏名

能勢 真人（愛媛大学医学部病理学・教授）  
新川 詔夫（長崎大学医学部原研遺伝・教授）  
田野 保雄（大阪大学医学部眼科・教授）  
二瓶 宏（東京女子医科大学 第四内科・教授）  
福岡 義光（信州大学医学部衛生学・教授）  
塩沢 俊一（神戸大学医学部保健学科・教授）  
天野 殖（滋賀医科大学第2病理学・助教授）  
名川 弘一（東京大学医学部腫瘍外科・助教授）  
白澤 専二（九州大学生体防御医学研・助手）  
福島 邦博（岡山大学医学部耳鼻咽喉科学・助手）

### A. 研究目的

平成10年度の目標・目的は、中村（東大・医科研）は、後縦靭帯骨化症について $ttw$ マウス原因遺伝子に相当するヒト遺伝子を単離し、ヒト後縦靭帯骨化症との関連について検討する。また、この原因遺伝子産物は骨の代謝に関連すると推測されることから、この代謝経路に関係する遺伝子と後縦靭帯骨化症との関連についても検討を加える。潰瘍性大腸炎の候補遺伝子MUC3における患者とコントロール群におけるアミノ酸の繰り返しの数の違いを比較し、発症との関連を検索する。また、この遺伝子構造の違いについて詳細に検討を加える。田野（阪大医）は血族結婚症例を用いて角膜変性症、天野（滋賀医大）はラットモデルを用いて側頭葉てんかん、能勢（愛媛大医）はマウスモデルを用いて血管炎症候群の疾患原因遺伝子の染色体部位を決定したが、本年度は原因遺伝子の存在部位をさらに限局化することを行う。研究が順調に進み、数百kb以内に特定された時点でその領域内に存在する遺伝子の単離と遺伝子異常

の検索を行い、原因遺伝子をつきとめる。塩沢（神戸大）、福島（岡山大）はリウマチ性関節炎、遺伝性難聴の原因遺伝子のマッピングを行う。新川（長崎大）は原因不明遺伝子病のマッピングを行う。福岡（信州大）は細胞株の樹立等を行い、研究グループを支援する。二瓶（東京女子医）、白澤（九大医）はIgA腎症、Graves病の症例が解析に必要なだけ集まった時点で、多型性マーカーによる解析をすすめ、原因遺伝子の染色体局在を明らかにする。

### B. 研究結果と考察

中村らは、後縦靭帯骨化症モデルマウス $ttw$ の原因遺伝子がヌクレオチドピロフォスファターゼ（NPPS）（軟部組織の骨代謝に関係する酵素）遺伝子であることを明らかにした。また、ヒトNPPS遺伝子を単離して遺伝子多型を見つけだし、連鎖解析を行った結果、ヒトの後縦靭帯骨化症の発症にも関連していることを証明した。さらに、 $ttw$ マウスの食餌中のリン酸量を増大すると急速に（3-4週間）全身の軟骨・靭帯の骨化の進展することを見出した。リン酸だけでなくカルシウムも負荷するとさらに病態が進行するが、カルシウム単独の負荷ではこのような傾向が全く認められないことから、リン酸代謝が異所性骨化に重要な役割を果たしていることが確認された。潰瘍性大腸炎については、ムチン3遺伝子（MUC3）のムチンタンパクのバックボーンの繰り返し配列（VNTR）の長さについて約300人（100人の日本人と200人の白人）の潰瘍性大腸炎患者および約300人のコントロールについて検討した結果、このVNTRの差が潰瘍性大腸炎の発症に

関連していることを明らかにした。

能勢らは、ヒトの病態に極似する膠原病疾患群を自然発症するMRL/lpr マウスをモデルとし、非発症マウスC3H/lpr との戻し交配系を作製した。これらについて染色体を約10 cM 断片レベルでカバーする多型性マイクロサテライトマーカーを用いてのゲノムワイドスキャンを行い、腎炎・関節炎・血管炎・唾液腺炎のそれぞれについて複数の原因遺伝子の染色体局在を決定した。とくに関節炎については詳細なマッピングを行い、5 座の感受性遺伝子座と1 座の抵抗性遺伝子座を明らかにした。これらの遺伝子座群間には、相加性のみならず階層性が存在することが明らかとなった。また、野生マウスMSM/Msf との交配系を用いての解析から、新たな関節病変が発症することを見出した。これらは、慢性関節リウマチをポリジーン系疾患として位置づける上で、またその病像多様性を説明する上で重要な所見であると考えられた。

天野らは、遺伝性てんかんラット(IER)におけるてんかん遺伝子のクローニングを最終目標として、その前段階のてんかん発作関連遺伝子と海馬に見られる微小神経形成異常(このミュータントのてんかん原性との関連が注目されている)関連遺伝子の染色体マッピングを行った。てんかん発作関連遺伝子はマーカーD15Rat52とD15Mgh3の間に存在することが明らかとなったが、狭い範囲に挟み込むことは出来なかった。マッピングが不十分なのは表現型の確認に問題があり、発作の発現をより客観的に評価する方法の開発が今後の課題となると考えた。微小神経形成異常の関連遺伝子は8番染色体上のマーカーD8rat68とThy1の間にマッピングされた。微小形成異常とてんかん発作との関連については現在検討中である。

白澤らは、自己免疫性甲状腺疾患であるGraves病、橋本病の罹患同胞対48組に対して計400個のマイクロサテライトマーカーによる全ゲノムスキャンを行い、そのデータの統計学的解析をMAPMAKER/SIBSのソフトを用いて行った結果、第5染色体、第8染色体でそれぞれロッドスコアが3.2、2.8と有意な値を得たことからこれらの染色体に発症に関与する遺伝子の存在が示唆された。

名川らは、クローン病の感受性遺伝子のマッピングを目的とし、360のマーカーによる罹患同胞対法を行った。本年度は18組の同胞発症例の血液を収集し、現在までに合計42組のタイピングを終了した。解析の結果、D7S630(第7染色体)とD9S161(第9染色体)の二つのマーカー座位に

おいて、同胞間のアレル共有率は日本人のアレル頻度にもとづく予測値より有意に高い傾向がみられ、連鎖の可能性が示唆された( $P < 0.05$ )。これらの近傍にはMUC3遺伝子(第7染色体)、T cell receptor V $\beta$ 遺伝子(第9染色体)が存在し、有力な候補遺伝子と考えられる。

福嶋らは、樹立率の高いBリンパ芽球様細胞株樹立法を確立し、この方法を用いて10数カ所の研究室との間で種々の領域にわたって共同研究を推進しており、今までに約700例の疾患患者細胞株を樹立し、保存している。これらのうち、Mesomelic dysplasia Kantaputra typeにおいては連鎖解析によりその責任遺伝子の局在を2q24-q32に決定した。またLowe症候群および多発性内分泌腫瘍症1型家系において、従来報告のない遺伝子変異を同定した。

二瓶らは、昨年度の研究結果をもとに、検討症例の選択基準の見直し、150症例について登録を行った。発症時の年齢を35歳以前と35歳以降に分けた場合、あるいは腎機能が正常の群と腎障害が進行した群に分けて、IgA腎症のデータベースの作製とDNAサンプルの採取を行った。これらについて、腎障害の修飾因子およびp27Kip1遺伝子多型の関与について検討したが、有意な結果は見い出せなかった。

田野らは、中村らと共同研究を行い、ポジショナルクローニング法により膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子の単離を目指した。まず、日本人近親婚家系10家系13人の患者を対象としたホモ接合性マッピング法を施行し、疾患原因遺伝子座を第1番染色体短腕に同定した。更に、家系においてはマーカーD1S220とその遠位に隣接する2つのマーカーD1S2648、D1S2752において疾患との間に有意な連鎖不平衡を認めた。次いで、この連鎖不平衡を認めた領域、約400kbにわたるコスミド、BACコンテイングを構築し、ショットガン法でその塩基配列を決定し、コンピュータープログラムにより疾患原因遺伝子の検索を行った。その結果、単離した候補遺伝子の一つにおいて患者に特有な3つのナンセンス変異と1つのフレームシフト変異を同定した。また、正常日本人100家系においてはこれらの変異を認めず、この遺伝子がGDLNの疾患原因遺伝子であると結論した。

新川らは、未知遺伝病の責任遺伝子のゲノム上の局在を知るために、遺伝性白内障、発作性運動誘発性コレオアテトーシス(PKC)、およびEngelmanr症候群家系について連鎖解析を行った。

白内障座は20番染色体（浸透率=1.0, ロッド得点 = 3.30, 組換率 = 0.00）、Engelmann症候群座は19番染色体（浸透率 = 0.9, ロッド得点 = 4.50, 組換率 = 0.00）にマップしたが、PKCは浸透率 = 0.6 のとき13q座とロッド得点 = 2.82, 組換率 = 0.00 を得たが、単一遺伝子病ではなく多遺伝子疾患の可能性もある。

福島らは、難聴家系を用いた遺伝性難聴のマップングを行い、第2番染色体のD2S2380 からD2S335の間、10 cMの領域に遺伝子が存在すること明らかにした。

塩澤らは、リウマチ性関節炎の発症に関連する因子を明らかにする目的で、全染色体に分布する総計358箇所のマイクロサテライトマーカー部位を指標にマイクロサテライトマーカーによる家系解析を行い、Lod値が3を越えて有意である第1染色体D1S214、第8染色体D8S556、X染色体DXS1232の合計3つにRAの疾患遺伝子座位を特定した。

### C. 結論

後縦靭帯骨化症の発症にヌクレオチドピロフォスファターゼ（NPPS）（軟部組織の骨代謝に関係する酵素）が関与することやムチン3遺伝子（MUC3）のムチンタンパクのバックボーンの繰り返し配列（VNTR）の差が潰瘍性大腸炎の発症に関連していることを明らかにした。また、膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子を単離するなど疾患原因遺伝子の解明が進んでいる。さらに、Graves病、橋本病、白内障、Engelmann症候群、リウマチ性関節炎、遺伝性難聴などもマップングも行われ、原因遺伝子の単離に向けての準備が整ってきている。マウスやラットモデルを用いての、腎炎・関節炎・血管炎・唾液腺炎・てんかん原因遺伝子の染色体局在も決定しており、これらの病態解析のヒトへの応用も期待される。

ヒトゲノム解析法にもとづく後縦靭帯骨化症・潰瘍性大腸炎・  
膠様滴状角膜変性症原因遺伝子の解明に関する研究

分担研究者 中村 祐輔 東京大学医科学研究所 教授・ヒトゲノム解析センター長

研究要旨 後縦靭帯骨化症モデルマウス $ttw$ の原因遺伝子がヌクレオチドピロフォスファターゼ（NPPS）（軟部組織の骨代謝に関係する酵素）遺伝子であることを明らかにし、これがヒトの後縦靭帯骨化症の発症にも関連していることを証明した。ムチン3（MUC3）遺伝子のムチンタンパクのバックボーンの繰り返し配列（VNTR）の差が潰瘍性大腸炎の発症に関連していることを明らかにした。膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子を単離した。

A. 研究目的

（1）脊椎の後縦靭帯に異所性の骨化をきたし脊柱管の狭窄、圧迫性脊髄障害を起こす原因不明の疾患である後縦靭帯骨化症（OPLL）は遺伝的要因と後天的な要因の複合によっておこる多因子疾患である。近年、糖尿病・高血圧などの多因子疾患の発症に関与する遺伝的な因子を明らかにする目的で、動物モデルを用いた研究が盛んに行われている。この理由は、ヒトの症例を用いる場合に派生する（1）疾患家系の協力を得て血液を収集する難しさ・（2）複雑な遺伝的背景の相違・（3）大きく異なる環境要因の影響などの問題点を乗り越えられる点にある。OPLLについても、その遺伝的要因を明らかにするために、モデルマウスである $ttw$ の原因遺伝子を単離することが極めて有用であると考え、ポジショナルクローニング法によって $ttw$ 遺伝子を単離するとともに病態解析を行う。マウス $ttw$ 遺伝子が単離されれば、ヒトTTW遺伝子の単離は容易であり、この遺伝子とヒトOPLL発症との関係についても検討する。また、クローン病、潰瘍性大腸炎については、第7染色体長腕に原因遺伝子の存在が示唆されており、その候補領域に位置しているMUC3（ムチン3）遺伝子とこれらの疾患との関連について検討する。膠様滴状角膜変性症については、昨年度に引き続き、原因遺伝子のクローニングを目指す。

B. 研究方法

（1）ポジショナルクローニング法によって $ttw$ 遺伝子を単離する。方法としては、候補領域をカバーするクローンのDNAシーケンスを行い、コンピューター解析と遺伝子解析の組み合わせにより遺伝子を単離する。単離された個々の遺伝子について順次、異常の有無を検索する。

（2）年度内に遺伝子が発見され、この遺伝子産物がリン酸代謝に重要な鍵を握っていることが明らかになったため、食餌中のリン酸濃度を変化させて、異所性骨化に対する影響を検討した。

（3） $ttw$ マウス原因遺伝子に相当するヒト遺伝子を単離して、遺伝子内の多型を調べ、これとヒト後縦靭帯骨化症との関連について検討した。

（4）潰瘍性大腸炎・クローン病の候補遺伝子のひとつであるムチン3遺伝子内には51塩基（17アミノ酸）の繰り返し配列が存在している。この繰り返し配列に個人差のあることを見いだし、患者とコントロール群においてこのアミノ酸の繰り返しの数の違いを比較し、発症リスクの関連について検討を加える。

（5）血族結婚症例を用いて膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子が第1染色体に存在することを明らかにしたが、この候補領域をカバーするクローンを単離し、それらクローンのDNAシーケンスを行い、コンピューター解析と遺伝子解析の組み合わせにより遺伝子を単離する。単離された個々の遺伝子について順次、異常の有無を検索する。

C. 結果・考察

（1）後縦靭帯骨化症モデルマウス $ttw$ について、約1000匹からなるバッククロスを作製し、それらをもとに連鎖解析を行って、その原因遺伝子が第10染色体に存在することを明らかにした。この情報をもとに原因遺伝子近傍の詳細な物理的地図およびYAC（酵母人工染色体）・コスミド・BACによる整列化地図を作製し、最終的には、この領域に存在したヌクレオチドピロフォスファターゼ（NPPS）（軟部組織の骨代謝に関係する酵素）遺伝子に蛋白の合成が中断する遺伝子変異の存在

することを明らかにした。引き続いて、ヒト NPPS遺伝子を単離して遺伝子多型を見つけだし、連鎖解析を行った結果、ヒトの後縦靭帯骨化症の発症にも関連していることを証明した。さらに、ttwマウスの食餌中のリン酸量を増大すると急速に（3-4週間で）全身の軟骨・靭帯の骨化の進展することを見出した。リン酸だけでなくカルシウムも負荷するとさらに病態が進行するが、カルシウム単独の負荷ではこのような傾向が全く認められないことから、リン酸代謝が異所性骨化に重要な役割を果たしていることが確認された。

(2) 潰瘍性大腸炎については、ムチン3遺伝子(MUC3)のムチンタンパクのバックボーンの繰り返し配列(VNTR)の長さについて約300人(100人の日本人と200人の白人)の潰瘍性大腸炎患者および約300人のコントロールについて検討した。その結果、患者群においては正常者集団において認められないような特異的なサイズのもの頻度が有意に高いことが明らかとなり、この繰り返し配列(VNTR)の差が潰瘍性大腸炎の発症に関連していることが強く示唆された。

(3) 連鎖解析により、原因遺伝子座を第1番染色体短腕に同定し、その領域の塩基配列を決定し、コンピュータープログラムを利用して疾患原因遺伝子の検索を行った。その結果、単離した候補遺伝子の一つにおいて患者に特有な3つのナンセンス変異と1つのフレームシフト変異を同定した。また、正常日本人100家系においてはこれらの変異を認めなかったことよりこの遺伝子をGDLNの疾患原因遺伝子であると結論した。正常な遺伝子産物と変異によって生ずるC末側の欠失した遺伝子をヒトの培養細胞株の導入したところ、正常産物は細胞室内に均一に分布しているのに対して、異常遺伝子産物は核の周辺に凝集していることを見いだした。

#### D. 結論

後縦靭帯骨化症の発症にヌクレオチドピロホスファターゼ(NPPS)(軟部組織の骨代謝に関係する酵素)が関与することやムチン3遺伝子(MUC3)のムチンタンパクのバックボーンの繰り返し配列(VNTR)の差が潰瘍性大腸炎の発症に関連していることを明らかにした。また、膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子を単離するなど疾患原因遺伝子の解明が進んでいる。今後、これらの病態解析の診断・治療への応用も期待される。

(研究協力者)

池川志郎・中村功・腰塚裕・姜建宇・田中敏博  
東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター  
辻川元一

大阪大学医学部バイオメディカル教育研究センター

#### E. 研究発表

1. S. Ishikawa, M. Kai, Y. Murata, M. Tamari, Y. Daigo, T. Murano, M. Ogawa, and Y. Nakamura: Genomic organization and mapping of the human activin receptor type IIB (hActR-IIB) gene. *J. Hum. Genet.*, 43:132-134, 1998
2. A. Okawa, S. Ikegawa, I. Nakamura, S. Goto, H. Moriya, and Y. Nakamura: Mapping of a gene responsible for twy (tip-toe walking Yoshimura), a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). *Mammalian Genome* 9:155-156, 1998
3. S. Shirahama, K. Ogura, H. Takami, K. Ito, T. Tohsen, A. Miyauchi, and Y. Nakamura: Mutational analysis of the RET proto-oncogene in 71 Japanese patients with medullary thyroid carcinoma. *J. Hum. Genet.* 43:101-106, 1998
4. T. Itoh, T. Tanaka, R. Nagai, T. Kamiya, T. Sawayama, T. Nakayama, H. Tomoike, H. Sakurada, Y. Yazaki, and Y. Nakamura: Genomic organization and mutational analysis of HERG, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Human Genetics* 102:435-439, 1998
5. S. Yamamoto, M. Okada, M. Tsujikawa, Y. Shimomura, K. Nishida, Y. Inoue, H. Watanabe, N. Maeda, H. Kurahashi, S. Kinoshita, Y. Nakamura, and Y. Tano: Kerato-epithelin mutation in Lattice corneal dystrophy type IIIA. *Am. J. Hum. Genet.*, 62:719-722, 1998
6. N. Kanemoto, H. Hishigaki, A. Miyakita, K. Oga, S. Okuno, A. Tsuji, T. Takagi, E. Takahashi, Y. Nakamura, and T. K. Watanabe: Genetic dissection of "OLETF", a rat model for non-insulin dependent diabetes mellitus. *Mammalian Genome*, in press
7. H.-J. Han, T. Tokino and Y. Nakamura: CSR, a scavenger receptor-like gene with a protective role from cell death caused by UV irradiation and oxidative stress. *Hum.*

- Mol. Genet. 7:1-39-1046, 1998
8. H. Kurahashi, M. Sakamoto, J. Ono, A. Honda, S. Okada, and Y. Nakamura: Molecular cloning of chromosomal breakpoint in the LIS1 gene in a balanced t(8;17) patient with an isolated lissencephaly. *Human Genetics* 103:189-192, 1998
  9. Y. Yamane, K. Kogawa, T. Tanaka, Y. Nakamura, and M. Isomura: Heterozygosities and allelic frequencies of 358 dinucleotide-repeat marker loci in the Japanese population. *Journal of Human Genetics* 43:165-168, 1998
  10. T. Shiratsuchi, M. Futamura, K. Oda, H. Nishimori, Y. Nakamura, and T. Tokino: Cloning and characterization of BAP1 (BAI-associated protein 1): a PDZ domain-containing protein that interacts with BAI1. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 247:597-604, 1998
  11. T. Itoh, T. Tanaka, R. Nagai, K. Kikuchi, S. Ogawa, S. Okada, S. Yamagata, K. Yano, Y. Yazaki, and Y. Nakamura: Genomic organization and mutational analysis of KVLQT1, a gene responsible for familial long QT syndrome. *Human Genetics*, 103:290-294, 1998
  12. Y. Nakamura, K. Koyama, and M. Matsushima: VNTR (variable number of tandem repeat) sequences as transcriptional, translational, or functional regulators. *J. Human Genet.* 43:149-152, 1998
  13. S. Matsuura, H. Tauchi, A. Nakamura, N. Kondo, S. Sakamoto, D. Smeets, C. Weemaes, B.H. Belohradsky, M. Oshimura, M. Isomura, Y. Nakamura and K. Komatsu: The gene for Nijmegen breakage syndrome, the ataxia-telangiectasia variant, encodes a novel protein without homology to ATM. *Nature Genet.*, 19:179-181, 1998
  14. O. Maruyama, H. Nishimori, T. Katagiri, Y. Miki, A. Ueno, and Y. Nakamura: Cloning of PPS encoding a novel human basic Helix-Loop-Helix motif protein that is specifically expressed in primary spermatocytes at the pachytene stage. *Cytogenet. Cell Genet.* 82:41-48, 1998
  15. A. Okawa, I. Nakamura, S. Goto, H. Moriya, Y. Nakamura, and S. Ikegawa: Nonsense mutation of nucleotide pyrophosphatase in ttw (tip-toe walking), a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). *Nature Genetics* 19:271-273, 1998
  16. K. Kobayashi, Y. Nakahori, K. Mizuno, M. Miyake, Y. Nakamura, K. Tokunaga and T. Toda: Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Human Genetics*, 108:323-327, 1998
  17. K. Kobayashi, Y. Nakahori, M. Miyake, Y. Nomura, M. Yoshioka, K. Saito, M. Osawa, J. Goto, Y. Nakagome, I. Kanazawa, Y. Nakamura, K. Tokunaga, and T. Toda: Ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Nature* 394:388-392, 1998
  18. S. Okamoto, M. Matsushima and Y. Nakamura: Identification, genomic organization, and alternative splicing of KNSL3, a novel human gene encoding a kinesin-like protein. *Cytogenet. Cell Genet.*, 83:25-29, 1998
  19. M. Sakamoto, J. Ono, S. Okada, M. Masuno, Y. Nakamura, and H. Kurahashi: Alteration of the LIS1 gene in Japanese patients with isolated lissencephaly or Miller-Dieker syndrome. *Human Genetics*, in press
  20. M. Tsujikawa, H. Kurahashi, T. Tanaka, M. Okada, S. Yamamoto, N. Maeda, H. Watanabe, Y. Inoue, A. Kiridoshi, K. Matsumoto, Y. Ohishi, S. Kinoshita, Y. Shimomura, Y. Nakamura, and Y. Tano: Homozygosity mapping of a gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDL) to chromosome 1p. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1073-1077, 1998
  21. S. Ikegawa, H. Ohashi, K. C. Kim, A. Sannohe, G. Nishimura, M. Kimizuka, Y. Fukushima, T. Nagai, Y. Nakamura: Recurrent and Novel Mutations of COMP (cartilage oligomeric matrix protein) in Pseudoachondroplasia and Multiple Epiphyseal Dysplasia. *Human Genetics* 103:633-638, 1998
  22. T. Shiratsuchi, K. Oda, H. Nishimori, M. Suzuki, E. Takahashi, T. Tokino, and Y. Nakamura: Cloning and characterization of

- BAP3 (BAI-associated protein 3), a C2 domain-containing protein that interacts with BAI1. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, in press
23. K. Lu, H. Nishimori, Y. Nakamura, K. Shima, M. Kuwajima: Mouse octn2, a sodium-dependent carnitine cotransporter, is responsible for the juvenile visceral steatosis (JVS) mouse. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 252:590-594, 1998
  24. K. Oda, T. Shiratsuchi, H. Nishimori, J. Inazawa, H. Yoshikawa, Y. Taketani, Y. Nakamura, T. Tokino: Identification of BAP2 (BAI-associated protein 2), a novel human homologue of hamster IRSp53, whose SH3 domain interacts with the cytoplasmic domain of BAI1. *Cytogenet. Cell Genet.*, in press
  25. H. Tauchi, S. Matsuura, M. Isomura, T. Kinjo, A. Nakamura, S. Sakamoto, N. Kondo, S. Endo, K. Komatsu, and Y. Nakamura: Sequence analysis of an 800-kb genomic region on chromosome 8q21, which contains the Nijmegen breakage syndrome gene. *NBS1*. *Genomics* 55: 242-247, 1999
  26. S. Ikegawa, G. Nishimura, T. Nagai, T. Hasegawa, H. Ohashi, Y. Nakamura: Mutation of the type X collagen gene (COL10A1) in a family with spondylometaphyseal dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.*, in press
  27. K. Kyo, M. Parkes, Y. Takei, H. Nishimori, H. Nagawa, S. Baba, T. Muto, G. M. Lathrop, Y. Nakamura: Association of ulcerative colitis with rare VNTR alleles of the human intestinal mucin gene, MUC3. *Human Molecular Genetics* 8:307-311, 1999
  28. T. Watanabe, M.-T. Bihoreau, L. C. McCarthy, S. L. Kiguwa, H. Hishigaki, A. Tsuji, J. Browne, Y. Yamasaki, A. Mizoguchi-Miyakita, K. Oga, T. Ono, S. Okuno, N. Kanemoto, E. Takahashi, H. Hayashi, M. Adachi, C. Webber, M. Davis, S. Kiel, C. Knights, A. Smith, R. Critcher, J. R. Hudson, Jr., T. Day, Y. Irie, T. Takagi, Y. Nakamura, P. N. Goodfellow, G. M. Lathrop, A. Tanigami, and M. R. James: A radiation hybrid map of the rat genome containing 4,700 microsatellite markers. *Nature Genetics*, in press
  29. I. Nakamura, A. Okawa, S. Ikegawa, K. Takaoka and Y. Nakamura: Genomic organization, mapping, and polymorphisms of the gene encoding human cartilage intermediatelayer protein (CILP). *J. Human Genetics*, in press
  30. O. Watanabe, K. Natori, M. Tamari, Y. Shiimoto, S. Kubo, and Y. Nakamura: Significantly elevated expression of PF4 (platelet factor 4) and eotaxin in the NOA mouse, a model for atopic dermatitis. *J. Human Genetics*, in press
  31. M. Tsujikawa, H. Kurahashi, T. Tanaka, K. Nishida, Y. Shimomura, Y. Tano, and Y. Nakamura: Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nature Genetics*, in press
  32. S. Ikegawa, M. Masuno, Y. Kumano, A. Okawa, M. Isomura, K. Koyama, K. Okui, K. Imaizumi, and Y. Nakamura: Cloning of translocation breakpoints associated with Shwachman syndrome and identification of a candidate gene. *Clinical Genet.*, in press
  33. I. Nakamura, S. Ikegawa, A. Okawa, S. Okuda, Y. Koshizuka, H. Kawaguchi, K. Nakamura, T. Koyama, S. Goto, J. Toguchida, M. Matsushita, T. Ochi, K. Takaoka, and Y. Nakamura: Association of the human NPPS gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). *Human Genet.*, in press



## 膠原病疾患群モデルマウスのゲノム解析

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部 教授

### 研究要旨

膠原病疾患群モデルマウス MRL/lpr の血管炎、糸球体腎炎、関節炎、唾液腺炎に関わる遺伝子座のすべてをマップした。これらの疾患は1座を除き、互いに異なる複数の遺伝子群に支配されていることに加えて、少なくとも関節炎、唾液腺炎の個々の遺伝子群に相加性が、関節炎のそれらに階層性が存在することを見いだした。また、糸球体腎炎の候補遺伝子としてオステオポンチン遺伝子をマップし、さらにオステオポンチンの構造多型がその発症感受性を規定していると結論し得る事実を得た。

### A. 研究目的

膠原病疾患群は、全身性エリテマトーデス、結節性多発動脈炎、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群などに代表されるが、その病態、病理には、相互の類似性が存在する。そのため、実際的には個々の疾患に対し一定の診断基準をもって特定のカテゴリーを設定しているのが現状である。また、2つ以上の疾患カテゴリーを重複して発症する重複症候群 (Overlap syndrome) も存在する。近年、少なくとも全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチなどは多因子病とされ、その遺伝要因にポリジーン系が関わるということが明らかになりつつある。それ故、ゲノム解析を通じて、これらの疾患のカテゴリーの再検討のみならず、個々の患者の予後決定や的確な治療が可能となることが期待される。しかしそのためには膨大な家系を収集することが必要となるが、近年の家族構成が縮小化しつつある現状では、家系調査に基づく連鎖解析による遺伝子探索は困難である。この障壁を克服する試みとして、近年、解析の対象となる疾患とフェノタイプを共有するモデルマウス（ヒトマウス相同疾患）の連鎖解析から得られた候

補遺伝子座からマウス-ヒト染色体相同領域（シンテニー）を同定し、データベースで位置的候補遺伝子を探索する方法に大きな期待が持たれてきている。

MRL/Mp-lpr/lpr (MRL/lpr) マウスは、重篤な膠原病疾患群、即ち糸球体腎炎、血管炎、関節炎、唾液腺炎、間質性肺炎などを同一個体に発症し、ヒト膠原病疾患群の絶好のモデルとなる。しかもこれらの疾患群は、いずれの膠原病をも発症しない C3H/HeJ-lpr/lpr (C3H/lpr) マウスとのもどし交配実験により、複数の疾患感受性遺伝子座に支配されていることを、昨年来、多型マイクロサテライトマーカーを用いた association study により明らかにしてきた。今年度は、これらの病変発症の遺伝様式における遺伝子群の各相互関係の解明ならびに個々の遺伝子のクローニングを目的として、個々の病変に対応する感受性遺伝子座のさらに詳細なゲノムワイドスキャンとそれから得られた候補遺伝子座の精密なマッピングを行った。

### B. 研究方法

マウス：MRL/Mp-lpr/lpr (MRL/lpr)、C3H/HeJ-lpr/lpr (C3H/lpr) マウスは合衆

国ジャクソン研究所より購入後、東北大学医学部動物実験施設にて維持、繁殖し、これらから、同施設ならびにカワシマ商事動物実験施設にて(MRL/lpr x C3H/lpr) F1、MRL/lpr x (MRL/lpr x C3H/lpr) F1 (N2)、(MRL/lpr x C3H/lpr) F2 マウスを作出した。

組織病理学的解析：4-5ヶ月齢に達した各マウスの諸臓器をホルマリン固定後、パラフィン包埋した組織標本を HE 染色、あるいはエラスティカ・マッソン染色、PAS 染色し、光学顕微鏡下に、血管炎、関節炎、糸球体腎炎、唾液腺炎の有無を判定した。

血管炎は、腎臓の中一動脈周囲の肉芽腫性病変に始まる動脈外弾性板の破壊、それに続く中膜の変性と内膜肥厚、あるいは内弾性板の破壊像を呈するものを、関節炎は、足関節滑膜細胞層の多層化と絨毛状増殖（初期病変）、あるいは滑膜細胞層下の肉芽腫性炎症性病変とそれに伴うパンヌス形成を呈するものを、唾液腺炎は小導管を中心とした単核球の浸潤、小導管の破壊および肉芽腫性病変の形成に伴う腺房実質破壊を呈するものを、それぞれ疾患陽性個体とした。また、糸球体腎炎は、ループス腎炎に類似する管内増殖型病変を有する糸球体が 50%以上を占めるものを陽性個体とした。また、一部では、20個以上の糸球体について、個々の糸球体病変の程度を grading し、各マウスの糸球体腎炎 Index を算定し、QTL 解析に供した。

疾患感受性遺伝子座の解析：マウス各個体の肝あるいは尻尾より抽出した DNA を用いて、常染色体を約 10 cM 断片レベルでカバーする多型性マイクロサテライトマーカー（Research Genetics 社より購入）を選び出し、PCR 法によるゲノムワイドスキャンを行った。個々のマーカー位置における遺伝子型（MRL/MRL、C3H/C3H ホモあるいは MRL/C3H ヘテロ）について、疾患陽性個体数と陰性個体数間での 2 x 2 分割表を用いたカイ二乗検定により association study を行なった。E. Lander ら(1995) の定義に従

って、まず  $P < 0.01$  に達したマーカー位置を候補遺伝子座 (confirmed linkage) とし、これらの遺伝子座について、さらにその近傍の多型性マイクロサテライトマーカーを用いて解析し、 $P < 0.0034$  に達したマーカー位置を感受性遺伝子座 (suggestive linkage) としてマップした。この解析に用いた形質は組織病理学的所見で連続形質でないため、準連続変異 (quasi-continuous variation; Wright, 1934) による形質あるいは個別的形質 (discrete traits; Lander et al, 1994) に相当し、LOD score による解析は削除した。一方、糸球体腎炎 Index は MAPMAKER-QTL パッケージにより LOD score を算定した。

### C. 研究結果・考察

1. ゲノムワイドスキャンによる膠原病疾患群感受性遺伝子座の同定：血管炎、糸球体腎炎、関節炎、唾液腺炎の疾患感受性遺伝子 (suggestive linkage) のマッピングを N2 マウス 179 匹を対象に行った結果のまとめを表 1 に示す。

血管炎では、昨年報告した *Lprm 1* *Lprm 2* に加えて新たに、第 4 染色体上に劣性感受性遺伝子座をマップし、まとめてそれぞれ *Vas1*、*Vas2*、*Vas3* とした。

糸球体腎炎に関しては、今回の QTL 解析により、昨年報告した *Lprm3* に加えて、第 4 染色体上に LOD score 7.2 に達する劣性感受性遺伝子座を同定した。加えて、F2 マウスの解析により、第 5 染色体上に劣性感受性遺伝子座を同定し、それぞれ *Gn1*、*Gn2*、*Gn3* とした。

関節炎に関しては、第 1、5、7、2、1 染色体上に、全部で 6 個の関節炎関連遺伝子座が同定され、それぞれ *Ra1*、*Ra2*、*Ra3*、*Ra4*、*Ra5*、*Ra6* とした。うち *Ra4* のみが遺伝子型 MRL/MRL ホモで抵抗性を示し、他の 5 座は劣性感受性遺伝子座であった。第 1、4 染色体上の *Ra7* は confirmed linkage で今後さ

らに解析が必要であるが、関節炎の初期病変と関連する領域であり、関節炎の誘導に係わる遺伝子座であると推定された。

唾液腺炎は、第10, 18, 4, 1染色体上に4座、いずれも劣性感受性遺伝子座としてマップされた。

## 2. 膠原病疾患群の common locus ? :

第4染色体上にマップされた *Vas3*, *Gn2*, *Sjs3* はいずれもほぼ同じ領域に位置し、これらが少なくとも血管炎、糸球体腎炎、唾液腺炎の発症に共通する感受性遺伝子座である可能性が示唆された。この遺伝子座における関節炎との関連はまったく認められなかった。

## 3. 疾患感受性遺伝子座の相加性と階層性 :

関節炎の少なくとも *Ra1*, *Ra4*, *Ra5* 遺伝子座には相加性と階層性が認められた。すなわち、それぞれの遺伝子座の遺伝子型が *MRL/MRL*, *MRL/C3H*, *MRL/MRL* である場合、それぞれ単独では、関節炎の発症率が33-0%であったのに、3座いずれもがこの遺伝子型を有する個体の関節炎発症率は77%に達した。また、2座の組み合わせでその発症率は異なり、各遺伝子座の優位性は *Ra1*>*Ra4*>*Ra5* であった。

唾液腺炎感受性遺伝子座 *Sjs1*, *Sjs2*, *Sjs3* でも相加性が認められた。すなわち、個々の遺伝子座のいずれか1座が *MRL/MRL* ホモである場合には、唾液腺炎の発症率が25%以下であったのに比して、2座が同時にホモの場合には、30%以下、3座いずれもがホモである場合には、80%に至る発症率を示した。しかしこれらの2つの遺伝子座間には階層性は存在しなかった。

これらの結果は、これらの個々の病変の発症の遺伝様式が、それぞれが同義的に補足合って初めて疾病の発症につながるとされるポリジーン系遺伝であると考えられた。さらに、*MRL/lpr* x (*MRL/lpr* x *C3H/lpr*)F1 マウス群に見られる膠原病病像の多様性、すな

わち、血管炎、糸球体腎炎、関節炎、唾液腺炎が種々の組み合わせで発症するという事実は、今回明らかにしたこれらの遺伝子座における対立遺伝子多型の組み合わせに規定されるものと結論される。

## 4. 糸球体腎炎の候補遺伝子 *Opn* :

第5染色体上に糸球体腎炎の劣性感受性遺伝子座としてマップされた *Gn3* はオステオポンチン遺伝子 (*Opn*) の領域に一致した。

*Opn* は活性化リンパ球、マクロファージなどに発現する細胞外マトリックス、接着分子であり、同時に B1 細胞の活性化、マクロファージの分化・活性化に作用するサイトカイン機能をも有するとされている。以前、我々は *MRL* と *C3H* マウス間で、この *Opn* の構造遺伝子に機能的差異を生じ得る多型があることを見いだしており、今回この多型に基づく PCR-RFLP による解析結果とも一致した。さらに RT-PCR により検出 *Opn* mRNA 発現量や、*Opn* レセプター *CD51*, *CD61*, *CD44* 遺伝子座に位置する多型マーカーと糸球体腎炎発症頻度との間に関連がなかったことから、今回の結果は、*Opn* の構造多型が糸球体腎炎の発症に関与しているもの結論し得る。

他の感受性遺伝子座の候補遺伝子については、ほぼ 1 cM 以内に絞り込み得た数座については、BAC clone にて解析中である。

## D. 結論

膠原病疾患群を自然発症する *MRL/lpr* マウスの疾患感受性遺伝子座を、非発症マウス *C3H/lpr* との戻し交配系にて解析した。染色体を約 10 cM 断片レベルでカバーする多型性マイクロサテライトマーカーでの詳細なゲノムワイドスキャンを行ない、個々の疾患(血管炎、糸球体腎炎、関節炎、唾液腺炎)に対応する感受性遺伝子座すべてをマップし終わった。その結果、これらの疾患は1座を除いて互いに異なる複数の遺伝子群に支配さ

れていることに加えて、少なくとも関節炎、唾液腺炎の感受性遺伝子群に相加性が存在すること、関節炎の感受性遺伝子群間にな階層性が存在することが明らかとなった。また、糸球体腎炎の候補遺伝子としてオステオポンチン遺伝子をマップし、さらにオステオポンチンの構造多型が糸球体腎炎発症の感受性を規定していると結論し得る事実を得た。

#### E. 共同研究者

寺田美穂、西原美由紀、鴨川淳二、宮崎龍彦、曲衛敏、路靈敏（愛媛大学医学部病理学第二講座）、森 士朗（東北大学歯学部第二口腔外科）、野崎良美（カワシマ商事動物実験施設）、中鶴修一（カン 研究所）、中村祐輔（東京大学医科学研究所・ヒトゲノム解析センター）

#### F. 研究発表

##### A. 論文発表

1. Nose M, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Mori S, Nishimura M, Wang Y, Kamoto Y and Hiai H. Vasculitis-susceptible genes in mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis. *Int J Cardiol* 1998 66(Suppl.1):s37-s41.
2. Nose M. Genetic basis of collagen disease in MRL mice with a deficit in Fas-mediated apoptosis: Dissection of the complex pathological manifestations. *Connective Tissue* 1998 30: 297-300.
3. 能勢真人 膠原病疾患群における血管炎の遺伝的基盤：MRL/lpr モデルマウスからのアプローチ *最新医学* 1998 53:1454-1465.
4. 能勢真人 血管炎の遺伝的要因：モデル動物からのアプローチ *病理と臨床* 1998 16:292-299.

##### B. 学会発表

1. 宮崎龍彦、寺田美穂、西原美由紀、鴨川淳二、森士朗、能勢真人：膠原病疾患群の発

症・進展機構におけるオステオポンチン遺伝子多型役割、第87回日本病理学会、広島 1998.4.15

2. Wang Y, Nose M, Komoto T, Nishimura M and Hiai H: Host Modifier genes affect mouse autoimmunity induced by the *lpr* gene、第87回日本病理学会、広島 1998.4.15

3. 鴨川淳二、西原美由紀、森士朗、柴田大法、能勢真人：MRL/lpr マウスの関節炎感受性遺伝子群の解析、第42回日本リウマチ学会 東京 1998.5.7

4. 西原美由紀、鴨川淳二、森士朗、大橋裕一、能勢真人：MRL/lpr マウスの自己免疫性唾液腺炎発症における背景遺伝子の解析、第42回日本リウマチ学会 東京 1998.5.7

5. 能勢真人：難治性炎症性疾患と遺伝要因、第19回日本炎症学会、東京、1998.9.4

6. 鴨川淳二、水木伸一、西原美由紀、森士朗、柴田大法、能勢真人：MRL/lpr マウスの関節炎感受性遺伝子群の解析、第9回日本リウマチ学会中国・四国支部学術集会 徳島 1998.10.17

7. 能勢真人：リウマチ性疾患の動物モデル、RAの病態と治療をめぐるミニ・国際シンポジウム 東京 1998.11.22

8. 鴨川淳二、寺田美穂、水木伸一、西原美由紀、森士朗、柴田大法、平田勝豪、田畑栄美、長澤優子、日合弘、中鶴修一、中村祐輔、能勢真人：MRL マウスの関節炎感受性遺伝子群の解析：MSM 野生マウスとの交配による新たな関節炎の発現、第28回日本免疫学会総会・学術集会 神戸 1998.12.2

9. Nishimura H, Nose M, Minato N and Honjo T: PD-1 is involved in the susceptibility of autoimmune symptoms in C57BL/6 *lpr/lpr* mice. 第28回日本免疫学会総会・学術集会 神戸 1998.12.2

10. Lu L, Qu W, Miyazaki T, Kamogawa J, Mizuki S, Nishihara M, Terada M, Nose M: QTL analysis of susceptibility loci to lupus-like glomerulonephritis in MRL/lpr mice. 第28回日本免疫学会総会・学術集会 1998.12.2

11. 宮崎龍彦、曲衛敏、路靈敏、森士朗、能

勢真人：膠原病疾患群の発症・進展機構におけるオステオポンチン遺伝子多型の役割、第28回日本免疫学会総会・学術集会 神戸 1998.12.3

12. Nose M, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Mori S, Wang Y, Hiai H, Nakamura Y and Nakaturu S: Genetic Dissection of the complex pathological manifestations of autoimmune disease in MRL/lpr mice. 10th International Congress of Immunology. New Delhi, India 1998.11.3

13. Kamogawa J, Mizuki S, Nishihara M, Terada M, Miyazaki T, Mori S, Okumura H, Shibata T, Nakaturu S, Nakamura Y and Nose M: Susceptible and resistant genes for autoimmune arthritis in MRL/lpr mice. 10th International Congress of Immunology. New Delhi, India 1998.11.3

表1 ゲノムワイドスキャンによるMRLマウスの膠原病感受性遺伝子座

病理	遺伝子座	染色体番号
関節炎	<i>Ra1</i>	15
	<i>Ra2</i>	
	<i>Ra3</i>	
	<i>Ra4</i>	7
	<i>Ra5</i>	2
	<i>Ra6</i>	1
	<i>Ra7</i>	14
唾液腺炎	<i>Sjs1</i>	10
	<i>Sjs2</i>	18
	<i>Sjs3</i>	4
	<i>Sjs4</i>	1
血管炎	<i>Vas1(Lprm1)</i>	4
	<i>Vas2(Lprm2)</i>	3
糸球体腎炎	<i>Gn1(Lprm3)</i>	14
	<i>Gn2</i>	4
	<i>Gn3 (Opn)</i>	5

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

未知遺伝病における連鎖解析

分担研究者 新川 詔夫 長崎大学医学部 教授

研究要旨 以下の3種の常染色体優性遺伝病においてゲノムスキャンによる2点連鎖解析を行った。(1) 家族性白内障 [罹患者8名(4世代)]は既知白内障座との連鎖は否定され、Aマーカース座と連鎖した (ロッド得点  $Z_{max} = 3.31$ ,  $q_{max} = 0.00$ )。ハプロタイプ解析では33.9 cMにわたる5マーカ領域内にマップされた。(2) Engelmann病 [13名(3世代)]はB座と連鎖した ( $Z_{max} = 4.54$ ,  $q_{max} = 0.00$ ,  $p = 0.9$ )。 (3) 2家族 [罹患者4世代16名と3世代5名]の発作性運動誘発性コレオアテトーシスはC座との連鎖を認めた ( $Z_{max} = 4.34$ ,  $q_{max} = 0.00$ ,  $p = 0.9$ )。

A. 研究目的

ヒトゲノム解析の1つの柱は疾患遺伝子の同定であるが、それは全塩基配列の決定・未決定にかかわらず、疾患座の局在決定が重要な役割を担う。本研究は、マイクロサテライト多型マーカーを利用したゲノムスキャンによる連鎖解析で未知の遺伝病座のゲノム上の局在を明かにしようとするものである。

B. 研究方法

以下の3種の未知の常染色体優性遺伝病を対象とした。(1) 家族性白内障：本疾患は長崎県地方在住の1家系(4世代にわたる8名の罹患者を含む)にみられるもので、両側性後極型の先天性白内障である(図1)。臨床所見は既知の家族性白内障には合致せず、新しいタイプの疾患だと考えられる。7名の罹患者および9名の非罹患者の末梢血

図1 家族性白内障の家系図とハプロタイプ

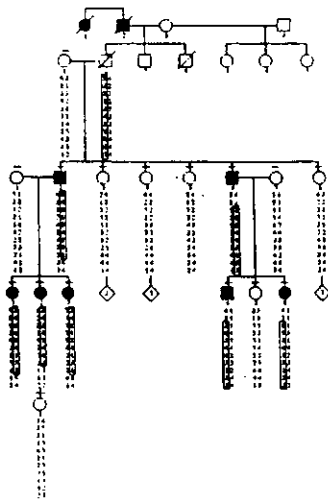


図2 Engelmann病の家系図とハプロタイプ

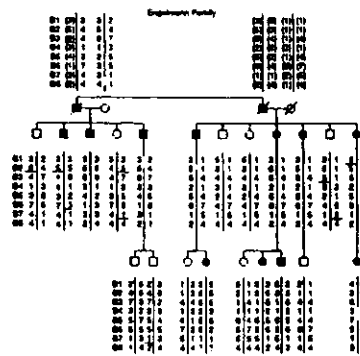
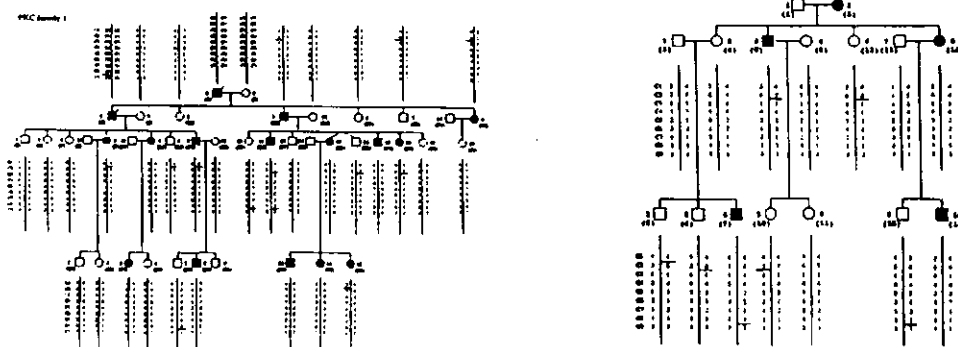


図3 PKCの家系図(家系1、2)とハプロタイプ



白血球から抽出したDNAを検体とした。(2) Engelmann病(進行性骨幹異形成症):北海道地方に在住の3世代にわたる13名の罹患者を含む家系にみられた疾患である(図2)。罹患者はすべて骨レントゲン検査により判定した。11名の罹患者と11名の非罹患者からDNAを抽出し検体とした。(3) 発作性運動誘発性コレオアテトーシス(PKC):4世代16名の罹患者を含む家系および3世代5名にみられる疾患である(図3)。罹患者はPKCの既往エピソードの聞き取りで診断した。34名の家系構成員から抽出したDNAを用いた。

上記3家系の構成員からの血液採取はすべてインフォームドコンセントを得た後に行った。

Genethonのマイクロサテライト(CAリピート)多型マーカーから450種を選択し、各々のPCRプライマーを合成し、片鎖を蛍光色素Cy5でラベルした。PCR産物をPharmaciaオートシケンサ中で電気泳動し、泳動パターンをコンピュータソフトウェア(Fragment Manager)で解析し、各アレル型を同定した。連鎖の検定はコンピュータで解析し、最大ロッド得点を算定した。

表1

Marker	.00	.05	.10	.150	.20	.30	.40
A1	-∞	1.77	1.81	1.71	1.55	1.10	0.55
A2	0.60	0.56	0.51	0.46	0.41	0.29	0.16
A3	2.11	1.93	1.74	1.54	1.33	0.87	0.37
A4	3.31	3.04	2.76	2.46	2.15	1.46	0.67
A5	2.71	2.49	2.25	2.00	1.74	1.16	0.53
A6	1.51	1.37	1.23	1.08	0.92	0.58	0.21
A7	-∞	1.49	1.55	1.48	1.34	0.94	0.43

### C. 研究結果

(1) 家族性白内障:10種の既知の白内障座および数種の候補座との連鎖を否定した後、それらを除くゲノムスキニングを行った結果、本家系における白内障は、A染色体のAマーカー座との連鎖を認めた(表1)。A座との間の最大ロッド得点( $Z_{max}$ )=3.31,  $\theta_{max}$ =0.00であった。ハプロタイプ解析により、白内障座はA2座とA3座間(33.9 cM)にマップされた。しかし、同領域に局在する水晶体特異的フィラメント構造タンパク遺伝子内には塩基置換や欠失は同定されなかった。

(2) Engelmann病:CAリピート多型マーカーを用いたゲノムスキニングによって、疾患座はBマーカー座と高い連鎖値を示した( $Z_{max}$ =4.54,  $\theta_{max}$ =0.00,  $p$ =0.90)(表2)。ハプロタイプ解析では26.3 cMにわたる領域にマップされた。

(3) 発作性運動誘発性コレオアテトーシス(PKC):ゲノムスキニングにより、PKC座はCマーカー座(17.3 cM)と連鎖した( $Z_{max}$ =4.34,  $\theta_{max}$ =0.00,  $p$ =0.9)(表3)。一種類の既知のイオンチャンネル関連遺伝子座との連鎖は否定した。

表2

Locus	0.000	0.001	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	0.50
B1	-2.79	-0.80	0.82	0.99	1.00	0.93	0.63	0.25	0.00
B2	2.67	2.67	2.62	2.46	2.24	1.96	1.31	0.57	0.00
B7	-3.17	-2.11	-0.03	0.36	0.51	0.56	0.48	0.26	0.00
B8	-3.04	0.48	1.96	1.99	1.85	1.63	1.05	0.38	0.00

表3

Locus	P=	0.0	0.001	0.05	0.1	0.15	0.2	0.3	0.4
C4	0.9	4.09	4.09	3.94	3.69	3.36	2.97	2.04	0.94
	0.8	4.33	4.32	4.04	3.70	3.33	2.91	1.97	0.89
	0.7	4.35	4.35	4.02	3.66	3.26	2.84	1.89	0.85
C6	0.9	2.80	2.79	2.61	2.38	2.09	1.79	1.12	0.48
	0.8	2.75	2.74	2.51	2.25	1.96	1.66	1.03	0.43
	0.7	2.61	2.60	2.37	2.09	1.82	1.53	0.94	0.39
C7	0.9	4.34	4.34	3.97	3.58	3.17	2.74	1.85	0.94
	0.8	4.00	3.99	3.64	3.27	2.89	2.49	1.68	0.85
	0.7	3.68	3.68	3.35	3.00	2.65	2.27	1.53	0.77
C8	0.9	1.80	1.80	1.88	1.84	1.76	1.62	1.22	0.68
	0.8	2.02	2.02	1.96	1.84	1.70	1.54	1.14	0.62
	0.7	2.02	2.02	1.92	1.78	1.62	1.46	1.06	0.58

## D. 考 察

本研究で扱った家族性白内障は従来報告がない新しい型の白内障であり、その疾患座も従来報告のない領域にマップされた。局在染色体上には水晶体特異的フィラメント構造タンパク遺伝子がマップされていたので、radiation hybrid panel法で同遺伝子がこの領域内に存在することを確認した後、家系内患者における同遺伝子内の変異を調べたが、変異はいずれのエキソンにも同定されなかった。したがって、同遺伝子は候補遺伝子から除外されると考える。局在領域は33.9 cMと非常に幅が広いので、責任遺伝子の同定にはさらに範囲を狭める必要がある。

Engelmann病においても疾患座は26.3cM範囲内にマップされ範囲が広い。しかも、いずれのマーカー間にも組換えが生じている。現在、局在領域内にそれ以上の有効な多型マーカーがないが、他の家系が利用できれば、さらに範囲を狭められると考える。本症は早期発症型の骨幹異形成を特徴とするが、遅発性の骨幹異形成としてRibbing病が知られている。両者がallelicな疾患か否かは、同様の連鎖解析で明かにすることができると考える。

同様に、マップしたPKC座はまだ範囲が広く、局在領域にはイオンチャネル関連遺伝子は知られていない。しかし連鎖解析に利用できるほかの数家系が知られているので、さらに狭めることが可能であり、ポジショナルクローニングも可能であると思われる。

## E. 結 論

ゲノムスキャンによる2点連鎖解析を行い、3種の常染色体優性遺伝病の疾患座の局在を明かにした。本研究結果は、同疾患のポジショナルクローニングにおける位置情報として有用である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Fujimoto M, Kntaputra PN, Ikegawa S, Fukushima Y, Wakui K, Sonta S, Matsuo M, Ishida T, Matsumoto T, Kondo S, Tomita H, Deng H-X, D'Urso M, Rinaldi MM, Ventruto V, Takagi T, Nakamura Y, Niikawa N: The gene for mesomelic dysplasia Kantaputra type is mapped to 2q24-q32. *J Hum Genet* 43: 32-36, 1998.

### 2. 学会発表

富田博秋、山田浩喜、新川詔夫、辻田高宏、中根允文、涌井敬子、福嶋義光、高木利久、中村祐輔：発作性運動誘発性コレオアテトーシスの連鎖解析：他亜型の疾患座の除外。第43回日本人類遺伝学会大会、1998。



膠様滴状角膜変性症（GDL D）原因遺伝子に関する研究

分担研究者 田野 保雄 大阪大学医学部眼科学教室 教授

研究要旨 ポジショナルクローニング法により膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子の単離を目指した。方法はHomozygosity Mapping法による原因遺伝子座の同定、その領域の塩基配列の決定、コンピュータプログラムによる候補遺伝子の検索によった。その結果、単離した候補遺伝子の一つにおいて患者に特有な4種類の変異を同定した。これらの変異は正常日本人100家系においては認められず、我々はこの遺伝子がGDL Dの疾患原因遺伝子であると結論した。

A. 研究目的

膠様滴状角膜変性症、gelatinous drop-like corneal dystrophy(GDL D)は常染色体劣性遺伝の遺伝形式をとる最も重篤な角膜変性症の一つである1),2)。患者の多くは日本人であり、その罹病率は約1/300000とされている3)。治療は角膜移植によるが、術後再発を繰り返すため再移植が必要な症例も多く、角膜変性症による角膜移植の内、GDL Dによるものの占める割合は少なくない3)。また、その病因は多くがまだ不明のままである。今回我々は、ポジショナルクローニング法によるこの疾患の原因遺伝子の単離を目指した。

B. 研究方法

まず、疾患遺伝子座の同定を目指し、全国の近親婚家系における患者10家系13人を対象としてHomozygosity Mappingを施行した。方法は患者白血球よりDNAを抽出し、染色体上のマイクロサテライトマーカーをPCRにて増幅し、変性ポリアクリルアミドゲルにて泳動し、その長さを測定することによった。まず、全染色体上のマーカーを約10cM間隔で検索し、患者の70%以上がホモを示すマーカーが見出された場合、その付近のマーカーを更に細かい間隔で検索した。結果は正常日本人64染色体におけるデータを対照とし、コンピューター解析を行った。

次に、この様にして同定された疾患原因遺伝子領域のGenome ContigをBACおよび、Cosmidにより作成し、各々のクローンに対してショットガンシーケンスを施行し、その全塩基配列を決定した。そして得られた情報をエクソン予測プログラムにかけ、予測されたエクソンに対しては角膜のcDNAを鋳型にRT-PCRを施行し、角膜での発

現の確認を行った。また、同様に、得られた塩基配列を相同性検索プログラムにかけこのContigにマップされるESTを検索し、同様に角膜での発現を確認した。

このようにして角膜での発現が確認された遺伝子断片に関してはcDNA ScreeningやRACE法によりその全長を決定した。次に、これら同定された候補遺伝子において患者に特有な変異を検索した。方法は非近親婚家系を加えた日本人GDL D20家系26人の患者を対象とし、患者白血球よりDNAを抽出し、候補遺伝子の各エクソンをPCR法を用いて増幅し、SSCP法および、直接塩基配列決定により、患者に特有な塩基変異を検索することによった。

C. 研究結果

Homozygosity Mappingの第1番染色体短腕のマーカーD1S220において13人の患者全員がホモを示し、ヘテロザイゴシティーは0%であったのに対して正常日本人のこのマーカーにおけるヘテロザイゴシティーは78%であった。よって、この付近に存在する14マーカーについても検索をおこなったところ、このマーカーを含め8つのマイクロサテライトマーカーD1S2650,2869、2700、2752、2648、220、2831、2741において患者全員がホモであった。連鎖解析の結果、これらのD1S2650からD1S2741の8つのマーカーにおいて組み替え率0において最大10.43のいずれも有意なロッドスコアを得た。続いて、ハプロタイプ解析の結果より、GDL D原因遺伝子はD1S2869とD1S2801との間、約1.5cMの範囲にあると推測された。さらに、患者においてD1S220および、その遠位の二つのマーカーD1S2648,D1S2752にお

いて有意な連鎖不平衡を認めた (D1S220:  $\chi^2=36.24$ ,  $p<0.001$ ; D1S2648:  $\chi^2=12.90$ ,  $p=0.032$ ; D1S2752:  $\chi^2=19.77$ ,  $p=0.012$ )。このため我々はこの領域に疾患遺伝子が存在する可能性がきわめて高いと判断し、この領域約400kbのGenomeContigを作成し、前項で述べた方法にて幾つかの疾患候補遺伝子を単離した。そのうちの1つにおいて患者特有な変異を4種類認めた。まず患者において、この遺伝子の118番目のコドンのグルタミン (CAG)がストップ (TAG)コドンに変異していた。GDLD20家系中16家系の患者はこの変異のホモ接合体であり、残る4家系の内1家系がこの変異と次に述べるフレームシフト変異のコンパウンドヘテロ接合体であった。よってこの変異は全GDLD染色体の82.5%に認められた。また、この変異はこれら解析可能な家系においてはすべて疾患との家系内連鎖を認めた。次に、2家系の患者においてこの遺伝子の632番目の塩基アデニンが欠失したフレームシフト変異を認めた。この変異も家系内連鎖を認めた。三番目の変異は1家系の患者においてこの遺伝子の207番目のコドン、グルタミンがストップコドンに変異しているものであった。この変異も家系内連鎖を認めた。最後に1家系1人の患者においてこの遺伝子の170番目のコドン、セリンがストップコドンに変異しているを認めた。以上の結果より我々が検索した日本人GDLD20家系26人の患者すべてがこれら4つの変異のホモ接合体、もしくはコンパウンドヘテロ接合体であり、さらにこれらの変異はいずれも正常日本人100人には認められなかった。

#### D. 考察

膠様滴状角膜変性症は比較的まれな疾患であり、家系の収集には困難を伴った。そのため、我々はHomozygosity Mapping法を用いて疾患原因遺伝子座の同定を行った。結果は非常に良好であり、わずか13人の近親婚家系における患者の解析により疾患原因遺伝子座を特定できた4)。この方法は以前に疾患遺伝子が同定された福山型筋ジストロフィーにおいても用いられたが5)、比較的近親婚の多い我が国において疾患遺伝子座の同定を行う際、有力な手法であると考えられる。

我々は、疾患遺伝子存在領域を更に連鎖不均衡の存在により400kbまで狭め、その領域の塩基配列を決定し、コンピュータープログラムを用いて疾患原因候補遺伝子を単離した。そのうちの1つにおいて我々が検索した日本人GDLD20家系26人の

患者すべてが3つのナンセンス変異および、1つのフレームシフト変異のホモ接合体、もしくはコンパウンドヘテロ接合体であり、さらにこれらの変異はいずれも正常日本人100人には認められなかった。このことより我々はこの遺伝子がGDLDの疾患原因遺伝子であると結論した。また、上記のナンセンス変異の内の1つは病因染色体の82.5%に認められ、創始者変異であると考えられ、認められた連鎖不平衡の原因であると考えられた。

#### E. 結論

ポジショナルクローニングにより膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子を単離した。これにより、不明であったこの疾患の病因の解明、さらにはより効果的な治療法の開発が加速されると考えられる。

#### F. 参考文献

1. Mondino, B., Rapp, M., Sugar, J., Sundar Raj, C., Brown, S. Primary familial amyloidosis of the cornea. *Am. J. Ophthalmol.* 92, 732-736 (1981).
2. Weber, F., Bable, J. Gelatinous drop-like dystrophy: A form of primary corneal amyloidosis. *Arch. Ophthalmol.* 98, 144-148 (1980).
3. Santo, R.M., Yamaguchi, T., Kanai, A., Okisaka, S., Nakajima, A. Clinical and histopathologic features of corneal dystrophies in Japan. *Ophthalmology* 102, 557-567 (1994).
4. Tsujikawa, M., Kurahashi, H., Tanaka, T., Okada, M., Yamamoto, S., Maeda, N., Watanabe, H., Inoue, Y., Kiridoshi, A., Matsumoto, K., Ohashi, Y., Kinoshita, S., Shimomura, Y., Nakamura, Y., Tano, Y. Homozygosity mapping of a gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDLD) to chromosome 1p. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1073-1077 (1998).
5. Toda, T., Segawa, M., Nomura, Y., Nonaka, I., Masuda, K., Ishihara, T., Suzuki, M., Tomita, I., Origuchi, Y., Ohno, K., Misugi, N., Sasaki, Y., Takada, K., Kawai, M., Otani, K., Murakami, T., Saito, K., Fukuyama, Y., Shimizu, T., Kanazawa, I., Nakamura, Y. Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nature Genet.* 5, 283-286 (1993).

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka T, Okada M, Yamamoto S, Maeda N, Watanabe H, Inoue Y, Kiridoshi A, Matsumoto K, Ohashi Y, Kinoshita S, Shimomura Y, Nakamura Y, Tano Y. Homozygosity mapping of a gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy (GDL) to chromosome 1p. *Am. J. Hum. Genet.* 63,1073-1077 (1998).

### 2. 学会発表

辻川元一、倉橋浩樹、田中敏博、下村嘉一、田野保雄、中村祐輔

膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子の単離

日本人類遺伝学会第43回大会(甲府, 1998年10月)

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）  
分担研究報告書

IgA 腎症の組織障害と遺伝子多型に関する研究

分担研究者 二瓶 宏 東京女子医科大学第四内科教授

研究要旨

今年度までの IgA 腎症の登録は 82 症例に達した。発症時の年齢を 35 歳以前と 35 歳以降に分けた場合、あるいは腎機能が正常の群と腎障害が進行した群に分けて、IgA 腎症の data base の作製と DNA サンプルの採取を行い、腎障害の修飾因子および p27<sup>Kip1</sup> 遺伝子多型の関与について検討した。しかし、association study が施行できる症例はほとんどなく、関連のある p27<sup>Kip1</sup> 遺伝子多型は見い出せなかった。

A. 研究目的

慢性腎不全の原因疾患として最も頻度が高い IgA 腎症に焦点をあて、その発症要因、増悪因子および背景にある遺伝的要因を調査するのが、当該研究期間の目的であった。その中でも、糸球体に半月体を形成する症例が特に予後が不良であり、その遺伝的背景と関連のある遺伝子多型について検討した。

B. 研究方法

厚生省特定疾患調査研究班の IgA 腎症分科会の調査をベースに、当教室における外来患者から発症時の年齢を 35 歳以前と 35 歳以降に分けた場合、あるいは腎機能が正常の群と腎障害が進行した群に分けて、IgA 腎症の data base の作製と DNA サンプルの採取を行い、腎障害の修飾因子および p27<sup>Kip1</sup> 遺伝子多型の関与について検討した。Primer としては、SS3 と AA3 の 2 種類を使用し、該当部位に酵素サイトがみつからなかったので、ASO で検索した。

C. 研究結果

今年度までの IgA 腎症の登録は 82 症例に達した。発症時の年齢を 35 歳以前と 35 歳以降に分けた場合には後者のほうが腎死に至る頻度は高率であった。また、腎機能が正常の群と腎障害が進行した群に分けた場合、明らかに半月体を形成する症例の予後は不良であった。腎死の割合を比較すると、半月体を形成しない群の 10 年腎生存率と半月体を形成した群の 5 年生存率がほぼ同じであった。IgA 腎症における p27<sup>Kip1</sup> 遺伝子多型の関与について検討したが、図 1 に示すように有意な関連性は見い出せなかった。

D. 考察

p27<sup>Kip1</sup> ノックアウトマウスに腎炎を惹起した場合に、糸球体における半月体形成率が有意に増加したことから、IgA 腎症における p27<sup>Kip1</sup> 遺伝子多型の関与について検討したが、有意な関連性は見い出せなかった。IgA 腎症の腎生検標本を p27<sup>Kip1</sup> に対するモノク