

ローナル抗体で染色すると、糸球体上皮における発現は明らかであったが、半月体を構成しているボウマン嚢上皮やメサンギウム細胞における p27^{Kip1} の発現は低く (図 2)、癌などの増殖性疾患のような遺伝子多型は存在しない可能性があると考えられた。今後は、他の微小変化群、膜性腎症、膜性増殖性糸球体腎炎、ループス腎炎などの症例も検討対象に加え検討を進めるとともに、IL-4、IL-6、ICAM-1、HLA-DR、FcγR などの候補遺伝子の多型との関連性についても検討する予定である。

E. 結論

糸球体における半月体形成率は IgA 腎症の予後を規定する因子であるが、その半月体形成に関与すると考えられる p27^{Kip1} 遺伝子多型の存在は見い出せなかった。

F. 研究発表

特になし。

p27 ^{Kip1} (Nephritis)				
Location	Nucleotide change	Amino acid change	allelic frequency (%)	Number of chromosomes examined
Exon 1	326 (T→G)	V109G	120(96.8):4(3.2)	124
p27 ^{Kip1} (Control)				
Location	Nucleotide change	Amino acid change	allelic frequency (%)	Number of chromosomes examined
Exon 1	326 (T→G)	V109G	97(97):3(3)	100

図 1 IgA 腎症における p27^{Kip1} の遺伝子多型

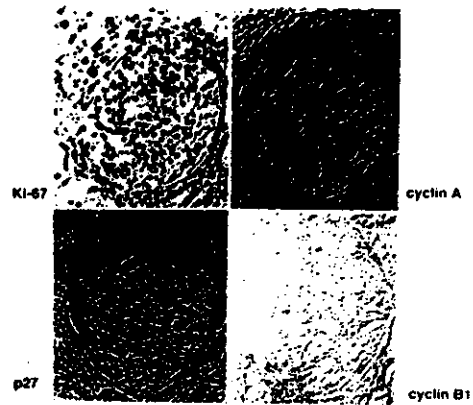


図 2 半月体を伴う糸球体における p27^{Kip1} の発現

ヒトゲノム解析研究における細胞バンクの設立

分担研究者 福嶋義光 信州大学医学部教授（衛生学）

研究要旨

樹立率の高いBリンパ芽球様細胞株樹立法を確立するとともに、インフォームドコンセントおよび臨床医・研究者間の種々のルール作りを行い遺伝疾患細胞バンクのシステムを構築した。現在までに種々の遺伝疾患患者・家族約700例の細胞株を樹立し、10数カ所の研究室と共同研究を行った。本年度における細胞株樹立率は約97%であった。

A. 研究目的

疾患の原因遺伝子を単離するための研究においても、あるいは遺伝子が単離された後、各々の患者の遺伝子変異を明らかにする研究においても患者・家族の検体を採取、保存、輸送することが必要になる。そのためには末梢血リンパ球より細胞株を樹立し、保存・輸送するのが有利である。我々はすでに細胞株の樹立・保存・輸送方法を確立し、細胞バンクとして機能するべく研究活動を行っている。本年度は細胞株樹立率の向上をめざした技術面での工夫を行うとともにインフォームドコンセントおよび臨床医・研究者間の種々のルール作りを行い遺伝疾患細胞バンクシステムの構築を目指した。

B. 方法および C. 結果

I. 細胞株樹立率向上のための試み

Bリンパ芽球様細胞株樹立のための簡易法（Fukushima Y et al. Jpn J Human Genet 37:149-150, 1992）に加えて、昨年度は抗凝固剤の検討を行い、血液検体を採血から2日（48時間）以内に培養を開始すれば樹立率に影響しないが、検体採取から培養開始までの時間が長くなる場合は通常のヘパリン採血でなく、抗凝固剤としてACD-A液とヘパリンを併用した採血を行うことにより細胞株樹立率の低下を防ぐことができることを明らかにした。さらに細胞培養途中で細胞増殖が思わしくなくなった場合にはFicoll-Parqueで細胞を分離し、死滅した細胞を取り除くこと、EB virus ろ液の力価をチェックすることおよび洗浄液をPBSから生理食塩水に変更することにより、細胞株樹立率を向上させることができ、本年度は約97%の樹立率を達成することができた。

II. インフォームドコンセントおよび臨床医・研究者間のルール作り

患者・家族に協力を依頼する場合のインフォームドコンセントの書式を考案した。その書式には以下の内容が記載されている。

1. 末梢血を信州大学医学部衛生学教室にある細胞バンクに送ること。
2. 細胞バンクではこの末梢血からBリンパ芽球様細胞株を樹立し、これを凍結保存すること。
3. 種々の遺伝医学的研究にこの細胞株が用いられることがあること。
4. 第三者の研究者に対して、保存された細胞あるいは供与者についての医学的情報を提供するときは個人が特定されない形で行われること。またこの研究により供与者に不利益となることはないこと。
5. 研究の進展により、供与者あるいは供与者の家族に何らかの恩恵がもたらされる可能性が生じた場合には、主治医を通じて連絡をとる場合があること。
6. 細胞供与者あるいはその代理人が細胞の保存の中止を希望するときは、信州大学医学部衛生学教室に文書で通知すること。

研究者、臨床医および細胞バンク間の検体および情報の流れを以下のように整理した。

1. 研究者が細胞バンクに研究プロジェクトの提案を行う。
2. 細胞バンクから、同意書および採血・輸送方法の説明書を研究者に送る。
3. 研究者が臨床医に患者・家族の採血を依頼する（同意書、採血・輸送方法の情報とともに）。
4. 臨床医は同意書を得たのち、患者・家族より採血し、細胞バンクに送る。
5. 細胞バンクではBリンパ芽球様細胞株を樹立し、凍結保存（-135℃、液体窒素）する。
6. 細胞バンクでは研究者の要望により、保存細胞株

を適宜、解凍・再培養・増殖させ、研究者に送る。

III. 樹立細胞株を用いた共同研究

今までに以下に記載する約700例の細胞株を樹立し、保存した。これらの細胞株を用いて、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いる。

ASD&PS: 1家系20例, Autism: 63家系64例, Cataract: 2家系19例, Charcot-Marie-Tooth disease: 77家系94例, Congenital Fibrosis of the Extraocular Muscles: 1家系7例, Crohn's disease: 36家系36例, Engelmann disease: 2家系24例, Epidermolysis bullosa: 2家系5例, Exostosis: 9家系16例, HNPPC: 9例, Kawasaki Disease: 14家系55例, Lowe syndrome: 2家系6例, MEN1: 22家系24例, Mesomelic Dysplasia: 2家系32例, Myotonic Dystrophy: 4例, Paroxysmal Kinesigenic Choreoathetosis: 8家系45例, Sitosterolemia: 2家系12例(以上ABC順), Chromosome abnormality: 129例, Multiple congenital anomaly and Mental retardation: 48例, その他の疾患: 41例, Normal Control: 9例。

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(Fujimoto et al.)。またLowe症候群(Kubota et al.)および多発性内分泌腫瘍症候群I型家系(Sakurai et al.)において、従来報告のない遺伝子変異を同定した。

D. 考案

遺伝病患者細胞バンクが設立され、有効に利用されれば、患者・家族、臨床医、基礎研究者にとって、その意義は極めて大きい。基礎研究者は臨床症例の遺伝子解析が容易に行えることにより、疾患の分子遺伝学研究を飛躍的に推進することができる。臨床医は共同研究者として分子遺伝学研究に関与することができ、疾患の理解を深めることができる。その疾患の研究が円滑に進められれば、新しい診断法、治療法の開発も進められることになり、いずれは患者・家族に大きな恩恵を与えることができるようになるであろう。さらに共同研究を推進することにより、お互いの信頼関係が強固なものとなると共に、全国的な情報ネットワークが構築され、基礎研究で得られた成果を臨床の場で生かしていくことも円滑に進められるようになるであろう。現在この細胞バンクは主に1) 遺伝病家系を用いた連鎖解析, 2) 染色体構造異常症例の転座点の解析, 3) 既知の遺伝病症例の変異部位の解明 に利用されており、この

細胞バンクは特定疾患遺伝子解析プロジェクト研究を草の根的に支える機能を果たしていると考えられる。

E. 結論

樹立率の高い方法を確立するとともにインフォームドコンセントの書式および研究者間のルールを整え、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た。本細胞バンクはヒトゲノム解析プロジェクト研究を草の根的に支える機能を果たしている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Fujimori M, Shirahama S, Sakurai A, Hashizume K, Hama Y, Ito K, Shingu K, Kobayashi S, Amano J, Fukushima Y: Novel V184E *MEN1* germline mutation in a Japanese kindred with familial hyperparathyroidism. *Am J Med Genet* 80:221-222, 1998
- Ikegawa S, Ohashi H, Nishimura G, Kim KC, Sannohe A, Kimizuka M, Fukushima Y, Nagai T, Nakamura Y: Novel and recurrent COMP (cartilage oligomeric matrix protein) mutations in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia. *Hum Genet* 103:633-638, 1998
- Sakurai A, Shirahama S, Fujimori M, Katai M, Itakura Y, Kobayashi S, Amano J, Fukushima Y, Hashizume K: Novel *MEN1* gene mutations in familial multiple endocrine neoplasia type 1. *J Hum Genet* 43:199-201, 1998
- Kubota T, Sakurai A, Arakawa K, Shimazu M, Wakui K, Furihata K, Fukushima Y: Identification of two novel mutations in the *OCRL1* gene in Japanese families with Lowe syndrome. *Clin Genet* 54:199-202, 1998
- Ogata T, Wakui K, Muroya K, Ohashi H, Matsuo N, Brown DM, Ishii T, Fukushima Y: Microphthalmia with linear skin defects syndrome in a mosaic female infant with monosomy for the Xp22 region: molecular analysis of the Xp22 breakpoint and the X-inactivation pattern. *Hum Genet* 103:51-56, 1998
- Suzumori K, Tanemura M, Oya N, Suzumori N, Kim KC, Ohashi H, Fukushima Y: Minute chromosomal rearrangements detected prenatally by fluorescence in situ hybridization. *Prenat Diagn* 18:725-730, 1998.
- Ikegawa S, Ohashi H, Hosoda F, Fukushima Y, Ohki M, Nakamura Y: Pseudoachondroplasia with de novo deletion [del(11)(q21q22.2)]. *Am J Med Genet* 77: 356-359, 1998.
- Aoyama T, Wakui K, Orii KE, Hashimoto T, Fukushima Y: Fluorescence in situ hybridization mapping of the α and β subunits (HADHA and HADHB) of human mitochondrial fatty acid β -oxidation multienzyme complex to 2p23 and their evolution. *Cytogenet Cell Genet* 79:221-224, 1997
- Imamura K, Tonoki H, Wakui K, Fukushima Y, Sasaki S, Yausda K, Takekoshi Y, Tochimaru H. 4q33-qter deletion and absorptive hypercalciuria: report of two unrelated girls. *Am J Med Genet* 78:52-54, 1998
- Nishimura G, Fukushima Y, Aihara T, Ohashi H, Nishimoto H, Nishimura J: Previously undescribed spondyloepiphyseal dysplasia associated with craniosynostosis, cataracts, cleft

palate, and mental retardation: Report of four sibs. *Am J Med Genet* 77:1-7, 1998

Fujimoto M, Kantaputra PN, Ikegawa S, Fukushima Y, 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 inosomelic dysplasia Kantaputra type is mapped to chromosome 2q24-q32. *J Hum Genet* 43:32-36, 1998

Wakui K, Aoyama T, Uchiyama A, Hashimoto T, Fukushima Y: Assignment of human fatty-acid-Coenzyme A ligase, very long-chain 1 (hFACVLI) gene to human chromosome band 15q21.2 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 81:292-293, 1998

福嶋義光: 染色体検査 (第13章). 「臨床検査法提要」 (金井正光 編). 金原出版pp.1213-1277, 1998

福嶋義光: 遺伝子診断と疾患予知—信州大学病院遺伝子診療部の試み—. *PharmaMedica* 16:39-43, 1998

福嶋義光: 遺伝子診療について. *BIO Clinica* 13(1):83-87, 1998

福嶋義光: 家族性腫瘍 専門外来—信州大学病院の取り組み. *Molecular Medicine* 別冊 「家族性腫瘍 新しい研究動向と診療指針」 pp.122-127, 1998

2. 学会発表

久保田健夫, 涌井敬子, 野々山恵章, 矢田純一, 松永健司, 吉岡章, 福嶋義光: DNAメチレーションを利用した新しいPCR法によるX染色体不活化現象の解析. 第101回日本小児科学会 (1998.5.15, 米子)

久保田健夫, 新川一雄, 福嶋義光: Lowe 症候群: OCRL遺伝子内に新しい遺伝子変異を認めた2例. 第40回日本小児神経学会 (1998.6.6, 横浜)

五石圭司, 古庄知己, 岩田吹介, 松澤重行, 笹野拓也, 中村友彦, 杉浦正俊, 田村正徳, 江木晋三, 小木曾嘉文, 福嶋義光: 9番染色体短腕端部の欠失で性分化異常 (46,XY female) をきたした一例. 第34回日本新生児学会 (1998.7.13, 福岡)

五石圭司, 古庄知己, 岩田吹介, 松澤重行, 笹野拓也, 中村友彦, 杉浦正俊, 田村正徳, 江木晋三, 小木曾嘉文, 福嶋義光: 副腎不全症状と高CK血症の合併を契機に診断されたX染色体短腕隣接遺伝子症候群の一例. 第34回日本新生児学会 (1998.7.13, 福岡)

當間隆也, 松嶋一成, 三井規雅, 鍵本聖一, 岸本宏志, 小川恵弘, 大橋博文, 涌井敬子, 福嶋義光: 肝硬変を伴った4p-症候群の女兒. 第8回Medical Genetics 研究会 (1998.7.18-19, 東京)

當間隆也, 松嶋一成, 三井規雅, 大橋博文, 長谷川奉延, 成富研二, 涌井敬子, 福嶋義光: 無動原体性マーカー染色体の3例. 第8回Medical Genetics 研究会 (1998.7.18-19, 東京)

新川詔夫, 三好修, 藤本正博, 富田博秋, 近藤達郎, 種田寛, 林聡, 原田直樹, 阿部京子, 涌井敬子, 福嶋義光, 中村祐輔, 梶井正: 表現型異常を示す片親性ダイソミー3例. 第8回Medical Genetics 研究会 (1998.7.18-19, 東京)

大橋博文, 當間隆也, 松嶋一成, 三井規雅, 西村玄, 涌井敬子, 福嶋義光: 均衡型相互転座

[46,XX,t(9;12)(p10;q10)] を伴ったStickler 症候群の女兒. 第8回Medical Genetics 研究会 (1998.7.18-19, 東京)

新川詔夫, 富田博秋, 山田浩喜, 辻田高広, 中根充文, 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: 他亜型座の除外. 第8回Medical Genetics 研究会 (1998.7.18-19, 東京)

當間隆也, 大橋博文, 今泉了彦, 西村二郎, 坂田英明, 大野卓次, 岡本伸彦, 福嶋義光: Simpson-Golabi-Behmel syndrome の1例. 第38回日本先天異常学会 (1998.7.22, 名古屋)

室谷浩二, 緒方勤, 松尾真理, 大橋博文, 涌井敬子, 福嶋義光: Xp22領域のモノソミーを有する女兒における小眼球・線状皮膚異形性症: Xp22の切断点とX染色体不活化パターンの解析. 日本人類遺伝学会第43回大会 (1998.10.14-16, 山梨)

久保田健夫, 小嶋牧子, 涌井敬子, 福嶋義光, 島津光伸, 外木秀文, 升野光雄, David H. Ledbetter: メチレーション特異的PCR技術を用いた新しいX染色体不活化パターンの解析法. 日本人類遺伝学会第43回大会 (1998.10.14-16, 山梨)

富田博秋, 山田浩喜, 新川詔夫, 辻田高広, 中根充文, 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. 日本人類遺伝学会第43回大会 (1998.10.14-16, 山梨)

石川雅世, 日高恵以子, 涌井敬子, 中山邦章, 高木靖, 清水敏夫, 勝山努, 福嶋義光: 習慣流産とX染色体異数性低頻度モザイク. 日本人類遺伝学会第43回大会 (1998.10.14-16, 山梨)

三好修, 吉浦孝一郎, 新川詔夫, 涌井敬子, 福嶋義光, 梶井正, 矢部隆一: Rh+/-のキメラ表現型を示し, 第1染色体の父性片親性ダイソミーをもつ男性. 日本人類遺伝学会第43回大会 (1998.10.14-16, 山梨)

緒方 勤, 室谷浩二, 涌井敬子, 福嶋義光, 山内泰子, 高野貴子, Gudrun Rappold: 異常Y染色体の構造解析と遺伝子型-表現型解析. 日本人類遺伝学会第43回大会 (1998.10.14-16, 山梨)

涌井敬子, 日高恵以子, 石川雅世, 勝山努, 寺内昭子, 久保田健夫, D.H. Ledbetter, 福嶋義光: 各染色体腕特異的テロメアプローブを用いた染色体構造異常の解析: 9番染色体短腕特異的テロメアプローブを用いたFISH法によって正位重複であることを決定できた9pトリソミー [46,XX,add(9)(p24).ish dup(9)(pter → p12::p24 → qter)(wcp9+)]. 日本人類遺伝学会第43回大会 (1998.10.14-16, 山梨)

K. Wakui, T. Ishii, Y. Nashida, M. Inoue, S. Kojima, E. Hidaka, M. Ishikawa, T. Katsuyama, T. Kubota, S. Yamamori, Y. Fukushima: "Interspersed" chromosomal rearrangement: A novel constitutional and structural aberration involving 1q, 2q and 7p. 48th Annual Meeting of the American Society of Human genetics (1998.10.27-31, Denver, USA)

Masayo ISHIKAWA, Eiko HIDAKA, Keiko WAKUI, Kuniaki NAKAYAMA, Yasushi TAKAGI, Tsutomu KATSUYAMA, Yoshimitsu FUKUSHIMA, Norio NIIKAWA: Habitual abortion and low frequent X

- chromosome monosomy mosaicism: Detection by interphase FISH analyses of buccal mucosa cells and lymphocytes.
48th Annual Meeting of the American Society of Human genetics (1998.10.27-31. Denver, USA)
- T. Kubota, S. Nonoyama, H. Tonoki, M. Masuno, M. Kojima, K. Wakui, M. Shimadzu, Y. Fukushima :
A new assay for the X-chromosome inactivation study based on methylation specific PCR.
48th Annual Meeting of the American Society of Human genetics (1998.10.27-31. Denver, USA)
- 三井規雅, 當間隆也, 松嶋一成, 西田俊朗, 鎌本聖一, 岸本宏志, 小川恵弘, 大橋博文, 涌井敬子, 福嶋義光 : 肝硬変を伴った4p-症候群の女兒. 第21回日本小児遺伝医学会学術集会 (1998.11.11-12, 仙台)
- 大橋博文, 當間隆也, 松嶋一成, 三井規雅, 西村玄, 涌井敬子, 福嶋義光 : 均衡型相互転座 [46,XX,t(9;12)(p10;q10)] を伴ったStickler症候群の女兒. 第21回日本小児遺伝医学会学術集会 (1998.11.11-12, 仙台)
- 當間隆也, 松嶋一成, 三井規雅, 大橋博文, 永井敏郎, 成富研二, 涌井敬子, 福嶋義光 : 無動原体性マーカー染色体の3例. 第21回日本小児遺伝医学会学術集会 (1998.11.11-12, 仙台)
- 久保田健夫, 涌井敬子, 福嶋義光, 渡辺順子, 大橋博文 : Functional X disomy によって重度の発達遅滞を呈したと考えられた45,X/46,X,r(X)の2症例. 第21回日本小児遺伝医学会学術集会 (1998.11.11-12, 仙台)

分担研究報告書

慢性関節リウマチの滑膜増殖機構と遺伝素因にかかわる疾患遺伝子の探索

分担研究者 塩沢俊一 神戸大学医学部保健学科教授

研究要旨 慢性関節リウマチ (RA) の発症には、環境と遺伝の二つの要因が関与する。前者には、免疫応答系の中心である T 細胞と、関節破壊に直接関与する滑膜間葉系細胞の二つが重要である。RA の遺伝素因について詳細なマッピングにより、第 1 染色体と第 8 染色体の遺伝子座位を確認し、さらに X 染色体については従来の DXS1232 から 0.1cM 近傍の DXS984 に新たに Lod 値が 2.03 の頂値域を見出した。

A. 研究目的 慢性関節リウマチ (RA) の発症には、環境と遺伝の二つの要因が関与する。前者には、免疫応答系の中心である T 細胞と、関節破壊に直接関与する滑膜間葉系細胞の二つが重要である。血流に乗って関節に到達した抗原は、関節滑膜表層の fibroblast-like または macrophage-like の間葉系細胞に補足されて抗原提示され、T 細胞による免疫応答が関節局所で開始する。滑膜間葉系細胞は抗原を提示する他、パンヌスとして関節破壊に直接関与する。パンヌスの一見腫瘍様の強い滑膜増殖や RA 特有の骨粗鬆症状態は、増殖関連 c-fos 遺伝子を滑膜細胞や骨芽細胞に過剰発現させることにより実験的に作成できる。また抗原特異的 T 細胞に c-fos 遺伝子が過剰発現すると、T 細胞は c-fos 遺伝子の高発現下にエネルギーになり難く応答が亢進し、細胞周期の 4C(G2/M)へと移行して腫瘍にも似た異常な細胞周期を営む。

今回私どもは c-fos の動態を細胞周期蛋白との関連で究明するとともに、RA 全体を鳥瞰しこれを駆動する因子を明らかにする目的で、RA の遺伝素因について、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部位を指標にマイクロサテライトマーカによる家系解析を行い、Lod 値が 3 を越えて有意である第一染色体 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、さらに同一手法により部位を詳細に特定した。またさらに、同部位に位置する遺伝子を検索している。

B. 研究方法 c-fos 過剰発現抗原特異的 T 細胞クローンを ConA で前処理し、抗原と APC で刺激 4hr 後 elk-1 の Ser383 のリン酸化を指標に MAPK を測定した。長期培養下に 4C 周期に移行したクローンを限界希釈法で取り出し、抗 CD3 で刺激後、c-fos, cdc2, cyclin B, cdc25B, wee1, chk1, p21, CBP の mRNA 発現を定量 RT-PCR/PCR (ABI7700)法にて、また蛋白をウエスタンブロットとゲルシフト法により調べた。ヒストンのアセチル化は ¹⁴C 標識 acetyl CoA と core histone を用いて測定した。テロメラーゼ活性は TRAP PCR ELISA 法により測定した。wee1 のプロモーターは、アダプターを付加したヒトゲノム DNA から PCR で wee1 kinase の 5'非翻訳領域を単離し塩基配列を決定した。また X 染色体領域の不十分であった位置の同定を、該当範囲のより詳細な遺伝子マッピングをマイクロサテライトマーカ解析を用いて行った。

C. 研究結果 ConA 処理により c-fos 過剰発現 T 細胞では対照に比して MAPK が減少し難く、この細胞のアナジー耐性機序が MAPK の上流への作用であることが示された。4C クローンは mRNA と蛋白量が c-fos, wee1, CBP で高く、p21 で減少しており、ヒストンアセチル化の亢進、テロメラーゼ活性の上昇がみられた。ヒト wee1 のプロモーター配列を決定したところ AP-1 サイトが存在しており、c-fos 遺伝子過剰発現時における wee1 亢進は c-Fos の wee1 プロモーターへの直接作用である可能性が示唆された。

また CBP および p300 は c-fos 過剰発現 T 細胞で

著しく増加していたが、p53には差がなかった。抗p300抗体によりp53が免疫沈降されたことから、c-fos過剰発現T細胞におけるp21発現抑制はCBP/p300とp53の結合による可能性が示された。またc-fos過剰発現T細胞は、抗原刺激後3日目にアポトーシスに陥った。c-fos過剰発現T細胞にはアポトーシスに陥りやすいものとそうでないものがあり、前者はゲルソフト法によるNFκBが元々低く、後者は高値であったが、後者も培養のFCSを10%から0.5%に下げるとNFκBが低下しアポトーシスに陥った。

詳細なマッピングにより、第1染色体と第8染色体の遺伝子座を確認し、さらにX染色体については従来のDXS1232から0.1cM近傍のDXS984に新たにLod値が2.03の頂値域を見出した(図1)。

D. 考察 特定した疾患遺伝子座にある遺伝子をradiation hybrid mappingと定量PCRで詳細に検索しており、候補遺伝子の特定を急いでいる。

F. 結論 RAの遺伝要因について詳細なマッピングにより、第1染色体と第8染色体の遺伝子座を確認し、さらにX染色体については従来のDXS1232から0.1cM近傍のDXS984に新たにLod値が2.03

の頂値域を見出した。

F. 研究発表

Shiozawa S, Hayashi S, Tsukamoto Y et al. Identification of the gene loci that predispose to rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* 10:1891-1895, 1998.

Shiozawa S, Tsukamoto Y, Hayashi S, Shiozawa S. Genetic predisposition to autoimmunity: Implication for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Rheumatol.* 4:156-158, 1998.

塩沢俊一. 慢性関節リウマチの遺伝素因. *遺伝子医学* 2:251-258, 1998.

Xu H, Iijima K, Shiozawa S et al. Platelet-activating factor acetylhydrolase gene mutation in Japanese nephrotic children. *Kidney Int.* 54:1867-1871, 1998.

塩沢俊一, 小西良武, 林幸子, 向江直子, 山本絵理, 駒井浩一郎, 川崎博樹, 塚本康夫, 安田徳一, 塩沢和子, 居村茂明. *遺伝子医学* 3:32-37, 1999.

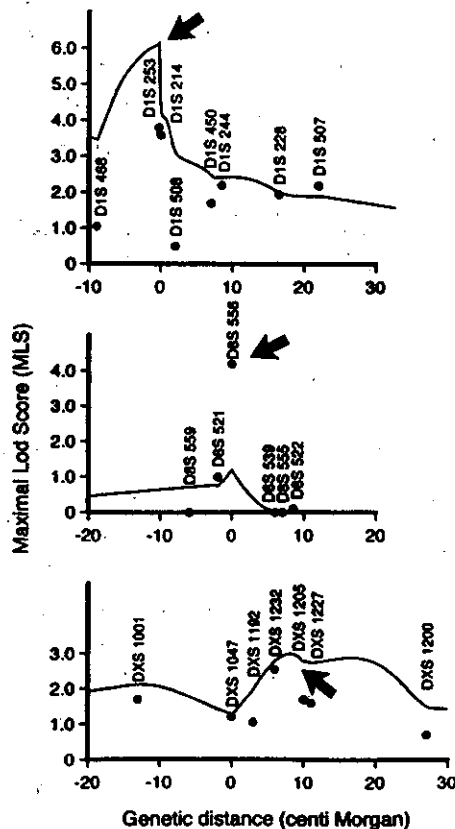


図1. 第一、第8、X染色体の遺伝子マッピング

遺伝性てんかんラット（Ihara epileptic rat: IER）海馬に認められる微小
神経形成異常並びにてんかん発作関連遺伝子の染色体マッピング

分担研究者 天野 殖 滋賀医科大学第二病理 助教授

研究要旨 遺伝性てんかんラット（IER）のてんかん発作並びに海馬微小形成異常一つの病変であるneuronal cluster(NC)に関連する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15番染色体と弱い連鎖を認めたが、マッピングには至らなかった。NC遺伝子は8染色体と強い連鎖を認め、D8Rat68とThy1の間にマッピングされた。微小形成異常の中のNC病変はてんかん発現には直接的には関与していないと結論された。

A. 研究目的

遺伝性てんかんラット（IER）は前庭刺激や光刺激などの外的刺激を全く加えることなく、自然に辺縁系てんかん発作を発症するミュータントでありヒト側頭葉てんかんの良いモデル動物と考えられている¹。このてんかんミュータントでは海馬体に神経細胞の微少な異常配列が認められ、これらの形態異常は遺伝的に決定された神経細胞の増殖・移動・分化の異常に基づく病変（microdysgenesis:MDG）と考えられている^{1, 2}。MDGは錐体細胞の配列の乱れや途絶、更にははCA1の錐体細胞領域下のSt.radiatumとSt.lacunosum moleculareの境界部分に存在する神経細胞の異常集簇（neuronal cluster）などである。我々はこのMDGがIERのてんかん原性としての重要な役割を演じているのではないかと注目してきた。本研究は連鎖解析法によりてんかん発作並びにMDGに関連する異常遺伝子の染色体マッピングを行い、併せててんかん発作とMDGとの相関を明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

IERの発作活動を生後2カ月から12カ月まで、2カ月毎に連続3日間、自動てんかんモニター装置で観察した³。生後2カ月頃から、mouth and facial movement, wet dog shakes, head lobbing jumpingあるいはwild runningなどの異常行動（abnormal behavior）が認められるようになった。3カ月頃から非常に小さい回転半径で回転を繰り返す回転動発作（circling seizure）を併せて生じるようになり、4カ月頃にはcircling seizureが主体となった。5カ月頃より forelimb clonus, rearing, fallingと共に、全身性間代性・

強直性けいれん発作（generalized tonic-clonic convulsion: GTC）が出現するようになり、6カ月頃にはGTCが主体となった。このようにIERのてんかん発作はabnormal behavior, circling seizure, GTCの3段階に加齢と共に進展していくことが明かとなった。

連鎖解析のための交配ラットは、IERとの間で遺伝的多型性に富むウイスターラット（WKY/Izm）を選択した。もどし交配を行いbackcross動物を134個体得た。その内123個体について、生後2カ月から12カ月まで2カ月毎に連続3日間自動てんかんモニター装置3で観察し、発作の有無およびタイプを明らかにし、てんかん発作の表現型を決定した。脳の採取が可能であった106個体の海馬領域の連続凍結切片（30 μ ）を作成し、ニッスル染色を行いMDGの中の一つの病変であるNCの有無並びのその程度を検索し表現型を決定した。遺伝子型のタイピングはSSLPマーカーを使用して行った。backcross動物の耳よりgenomic DNAを抽出し、PCRで増幅、PCR産物を電気泳動し、ethidium bromideで染色、遺伝子型を明らかにした。上記方法でタイピングが不明瞭なマーカーは、蛍光プライマーを作成して、同条件下で反応させシークエンサーを用いて解析した。表現型（てんかん発作並びに海馬NC病変）と遺伝子型間の連鎖解析を行い染色体マッピングを行った。

C. 研究結果

てんかんの初発症状としての発作型であるabnormal behaviorは、backcross動物において123個体中63個体に認められた（表1）。海馬体のNC病変は106個体中32個体に認められ、それ等

の局在あるいは病変の程度に差は認められなかった(表2)。てんかん発作を表現型として連鎖解析した結果、15番染色体と弱い連鎖 ($p < 0.01$) を認めたが、マッピングには至らなかった(表3)。海馬体のNC病変を表現型として連鎖解析を行った結果、8番染色体と強い連鎖 ($p < 0.001$) を認め、D8Rat68とThy1の間にマッピングされ(表4、図1)。

てんかん発作とNC病変の相関についてカイ二乗検定の結果、発作発現とNC病変の間には正の相関は認められなかった(表5)。

	number of off spring	
	seizure(+)	seizure(-)
IER	60	0
F1 IER(♂) × WKY(♀)	0	10
backcross IER(♂) × F1(♀)	63	60

表1 てんかん発作(abnormal behavior以上)の発現頻度

	number of off spring	
	NC(+)	NC(-)
IER	60	0
F1 IER(♂) × WKY(♀)	0	10
backcross IER(♂) × F1(♀)	32	79

NC:neuronal cluster

表2. Neuronal cluster(NC) 病変の発現頻度

D. 考察

ヒトの難治性てんかんに対する切除手術によって得られた外科標本から、MDGを含む脳の形成異常が報告され、これらの形成異常がてんかん原性と深くかかわっていると推察されている⁴⁻⁶。一方動物実験により、胎生期の特定の時期にmethyazoxymethanolacetateを投与することにより⁷、あるいは放射線の外照射を行うことで⁸、海馬体にIERと類似のneuronal migration disorderを生じるラットモデルが報告されている。これらの実験モデルでは、てんかん誘発に対しより過敏であったり、海馬CA1神経細胞の異常興奮が観察されている^{7,8}。この様に、ヒトてんかん患

者の組織所見並びに実験てんかん動物による報告により、海馬のneuronal migration disorderがてんかん原性と密接に関連した構造異常であることが推測され、IER海馬に見られるMDGも、てんかん原性に深く関与していることが推察されてきた^{1,2}。

しかし今回の実験結果より、海馬体のNC関連遺伝子は8番染色体にマッピングされ、一方てんかん発作関連遺伝子は15番染色体との関係が示された。さらにてんかん発作とNC病変の相関についてカイ二乗検定の結果、両者の相関関係を肯定することはできなかった。従ってIERにおけるMDGの一型であるNC病変はてんかん原性とは直接的に関与していないこと結論された。

微量神経形成異常(MDG)は、中枢神経系の発生段階における神経細胞の増殖/消滅/移動を調節している遺伝子異常に基づく可能性が予測されている⁹。IERにおいてNC病変はがてんかん発作発症と直接的に関連しているという証拠は得られなかった。他のMDG病変については現在マッピングを進めておりてんかん原性との関連を検索中である。IERはてんかんモデルとして重要であると共に、中枢神経発生期における神経形成異常のモデル動物になるとも考えられる。

Chr	Locus name	Distance (cM)	epilepsy(+)		epilepsy(-)		χ^2	P value
			Ho	He	Ho	He		
15	D15Kyo1		38	25	27	33	2.894	0.0884
	D15Mgh7	40.65	39	24	26	34	4.253	0.0392
	D15Rat3	39.02	39	24	24	36	5.902	0.0151
	D15Rat52	34.15	44	19	23	37	12.302	0.0005
	D15Rat72	34.15	44	19	23	37	12.302	0.0005
	D15Mgh2	33.33	45	18	23	37	13.616	0.0002
	D15Mgh3	34.15	44	19	23	37	12.302	0.0005
	D15Rat29	34.15	44	19	23	37	12.302	0.0005
	D15Rat23		41	23	32	28	1.757	0.1849
	D15Rat40		39	24	31	29	1.314	0.2514
	Edvb		40	23	33	27	0.919	0.3378
	D15Mgh6		36	26	27	33	2.084	0.1849

Ho: homozygote He: heterozygote

表3. てんかん発作と15番染色体マーカーとの連鎖解析

Chr	Locus name	Distance (cM)	NC(+)		NC(-)		χ^2	P value
			Ho	He	Ho	He		
8	DBRat55	27.36	24	8	23	36	19.642	<0.0001
	DBRat68	18.97	26	6	16	63	36.026	<0.0001
	Thy1	5.71	32	0	6	72	85.506	<0.0001
	Apoc3	5.66	32	0	7	72	83.007	<0.0001
	DBRat80	6.73	31	0	8	70	77.755	<0.0001
	DBRat43	7.55	32	0	9	70	76.764	<0.0001
	DBM42	9.52	31	1	10	68	68.569	<0.0001
	Cyp1a1	10.89	30	1	11	64	63.572	<0.0001
	DBN136	26.92	27	5	24	53	25.704	<0.0001
	DBM41	29.52	26	5	28	51	20.893	<0.0001

表4. NC病変と8番染色体マーカーとの連鎖解析

	NC(+)	NC(-)
seizure(+)	15	39
seizure(-)	17	40

NC:neuronal cluster $\chi^2 = 0.057$

表5. てんかん発作とNC病変の相関

E. 結論

IERのてんかん関連遺伝子並びに海馬体に見られる微小形成異常関連遺伝子座の染色体マッピングを連鎖解析法で行った。てんかん関連遺伝子は15番染色体上のマーカーに有意な連鎖が認められたが、特定のマーカー間にマッピングは出来なかった。微小形成異常の中で異常神経集簇病変に関与する遺伝子は8番染色体上に強い連鎖が見られ、D8rat68とTyh1の間にマッピングされた。

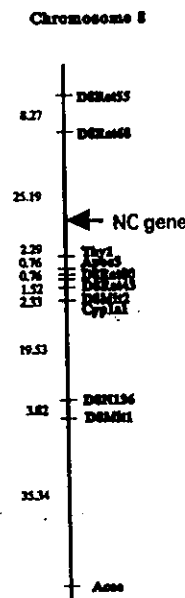


図1. NC遺伝子を含む8番染色体の遺伝子

F. 参考文献

1) Amano S, Ihara N, Uemura S, Yokoyama M, Ikeda M, Serikawa T, Sasahara M, Kataoka H, Hayase Y, Hazama F: Development of a novel rat mutant with spontaneous limbic-like seizures. *Am. J. Pathol.* 149:

329-336, 1996

2) Amano S, Ihara N, Uemura S, Ikeda M, Yokoyama M, Sasahara M, Kataoka H, Hazama F: Hippocampal lesions on a newly developed epileptic rat mutant with spontaneous limbic-like seizures. The hippocampus: Function and Clinical Relevance. in Kato N(ed): 161-164, Amsterdam, Elsevier, 1996

3) Amano S, Yokoyama M, Torii R, Fukuoka J, Tanaka K, Ihara N, Hazama F: High performance seizure-monitoring system using a vibration sensor and videotape recording: behavioral analysis of genetically epileptic rats. *Laboratory Animal Science* 47: 317-320, 1997

4) Andermann F, Guerrini R: The cortical dysplasias and epilepsy: an overview. *Dysplasias of cerebral cortex and epilepsy*, in Guerrini R(ed): 441-450, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996

5) Hardiman O, Burke T, Phillips J, Murphy S, O' Moore B, Staunton H, Farrell MA: Microdysgenesis in resected temporal neocortex: incidence and clinical significance in focal epilepsy. *Neurol.* 38: 1041-1047, 1988

6) Vital A, Marchal C, Loiseau H, Rougier A, Pedespan JM, Rivel J, Vital C: Glial and neuronogial malformative lesions associated with medically intractable epilepsy. *Acta Neuropathol* 87: 196-201, 1994

7) Baraban SC, Schwartzkroin PA: Electrophysiology of CA1 pyramidal neurons on an animal model of neuronal migration disorders: prenatal methyl-azoxymethanol treatment. *Epilepsy Research* 22: 145-156, 1995

8) Roper SN, Gilmore RL, Houser CR: Experimentally induced disorders of neuronal migration produce an increased propensity for electrographic seizures in rats. *Epilepsy Research* 21: 205-219, 1995

9) Rorke LB: A perspective: the role of disorder genetic control of neurogenesis in the pathogenesis of migration disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 53: 105-117, 1994

G. 研究発表

論文発表

1) 花井一光、天野 殖、植村秀治、伊原信夫、横山正男、挟間章忠、ヒドラを利用した生物学的活性因子検出法で検出される遺伝性てんかん

- ラット脳内因子異常、てんかん治療研究振興財団研究年報 1998, 10:30-35
- 2) Takamori Y., Amano S., Nakasu Y., Ito R., Ihara N., Hazama F., Morita R. Volumetric investigation of the hippocampal formation in Ihara's genetically epileptic rats with magnetic resonance images, *Neuropathology* (in press)
 - 3) Anmano S., Suitability of Suitability of Ihara's genetically epileptic rat as a model for studying human temporal lobe epilepsy, *Neuropathology* (in press)
 - 4) Tsuji A., Amano S., Yokoyama M., Fukuoka J. Hereditary neuronal microdysgenesis and acquired lesions in the hippocampal formation of Ihara epileptic rat, *Epilepsia* (in press)
- 学会発表
- 1) 高森庸江、天野 殖、中洲庸子、井藤隆太、伊原信夫、挟間章忠、森田陸司、MRIによる遺伝性てんかんラット(IGER)の海馬体の経時的観察、第36回京滋てんかん懇話会、1998
 - 2) 横山正男、天野 殖、辻 篤司、笹原正清、伊原信夫、芹川忠夫、挟間章忠、半田譲二、遺伝性てんかんラット(IGER)におけるてんかん遺伝子の染色体マッピング、第87回日本病理学会、1998
 - 3) 辻 篤司、天野 殖、横山正男、挟間章忠、半田譲二、遺伝性てんかんラット(IGER)の海馬の神経病理学的異常における遺伝因子と2次性変化について、第87回日本病理学会、1998
 - 4) 天野 殖、新しく開発された遺伝性白内障ラット(Ihara's genetically epileptic rat:IGER)ーヒト側頭葉てんかんモデルとしての適格性の検証ー、第39回日本神経病理学会、1998(シンポジウム)
 - 5) 天野 殖、北原浩幸、三浦義記、横山正男、鳥居隆三、石橋国男、植村秀治、遺伝性てんかんラット(IGER)の2つの異なる発作型(回転運動発作並びに全身性間代・強直けいれん発作)に対するゾニサミドの抗てんかん作用について、第32回日本てんかん学会、1998
 - 6) 王 妍、天野 殖、今本喜久子、片岡秀夫、福岡順也、笹原正清、早瀬ヨネ子、石橋国男、伊原信夫、遺伝性てんかんラット(IGER)海馬に見られる微小神経形成異常の電顕的研究。I. Neuronal cell clusterの超微細構造、第32回日本てんかん学会、1998
 - 7) 福岡順也、笹原正清、片岡秀夫、早瀬ヨネ子、天野 殖、遺伝性てんかんラット(IGER)海馬の微小神経形成異常の病理発生: BrdUを用いた神経細胞の移動トレース実験、第32回日本てんかん学会、1998
 - 8) 片岡秀夫、天野 殖、福岡順也、笹原正清、早瀬ヨネ子、伊原信夫、鳥居隆三、石橋国男、遺伝性てんかんラット(IGER)脳のミクログリア反応、第32回日本てんかん学会、1998
 - 9) 辻 篤司、天野 殖、福岡順也、横山正男、伊原信夫、半田譲二、遺伝性てんかんラット(Ihara's genetically epileptic rat:IGER)の海馬領域に認められる形態異常: 微小神経形成異常と2次性変化第32回日本てんかん学会、1998
 - 10) 横山正男、天野 殖、辻 篤司、笹原正清、伊原信夫、芹川忠夫、遺伝性てんかんラット(IGER)における原因遺伝子の染色体マッピング、第32回日本てんかん学会、1998
 - 11) 天野 殖、横山正男、笹原正清、種井忠博、福岡順也、伊原信夫、石橋国男、芹川忠夫、遺伝性白内障ラット(ICR)からの白内障晩期発症群の分離、第15回日本疾患モデル動物学会、1998

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

クローン病の原因遺伝子の解析

分担研究者 名川 弘一 東京大学医学部腫瘍外科 助教授

研究要旨

クローン病の感受性遺伝子のマッピングを目的とし、罹患同胞対法による連鎖解析を行った。全国より収集した 42 組の同胞発症例を対象とし、ゲノム全体にわたる 360 のマーカーを用い、GAS および SPLINK プログラムにより解析を行った。D7S492、D9S161 において、同胞間の allele 共有率は正常日本人の allele 頻度に基づく予測値より高い傾向がみられ、連鎖の可能性が示唆された。現在までの欧米からの報告で連鎖が指摘されている第 3、12、16 染色体上の領域のマーカーでは、連鎖は否定的であった。

A. 研究目的

クローン病は若年者に好発し、消化管、主として小腸、大腸の全層を侵す炎症性腸疾患である。原因としては、免疫系の異常、感染、環境および食餌性因子の関与が想定されているが、依然として多くは不明である。以前より、遺伝疫学的研究により遺伝的要素の関与が指摘されていたが、1996 年には感受性遺伝子のマッピングに関する報告がみられた。その後も、欧米各国より報告がみられているが、統一した見解は得られておらず、未だ、感受性遺伝子の特定には至っていない。

本研究では、日本人におけるクローン病の感受性遺伝子の局在を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

全国よりクローン病同胞発症例の血液を収集し、DNA を抽出した。ゲノム全体にわたる 360 のマイクロサテライトマーカーを用いて、罹患同胞対法による連鎖解析を行った。データの解析は GAS および SPLINK プログラムにより行った。各マーカーについて、患者同胞間の allele 共有率と正常日本人の allele frequency より算出される予測値の偏りを χ^2 test および Lange's Z-statistic により検定した。

C. 研究結果

全国調査により 60 組のクローン病同胞発症例が抽出され、現在までに、42 組の解析を終了した。

D7S492 および D9S161 において、患者同胞間の allele 共有率は正常日本人の allele 頻度に基づく予測値より高い傾向がみられ、感受性遺伝子との連鎖の可能性が示唆された。

現在までの欧米からの報告で連鎖が指摘されている第 3、12、16 染色体上の領域のマーカーでは、連鎖は否定的であった。

Marker	$P \chi^2$	P Z	P MLS
D3S1289	0.14	0.13	0.065
D7S492	0.025	0.028	0.018
D9S161	0.078	0.046	0.020
D12S83	0.6	0.33	0.561
D16S411	0.96	0.11	0.403

D. 考察

クローン病の感受性遺伝子について、Hugot らは第 16 染色体に、Satsangi らは第 3、7、12 染色体に存在すると報告している。本研究では、D7S492 および D9S161 において連鎖を示唆する結果が得られている。D7S492 は Satsangi の指摘した領域に存在する。D9S161 の近傍のマーカーについては、現在までに連鎖は指摘されていない。これらの近傍には、それぞれ MUC3 遺伝子、T cell receptor V β 遺伝子が存在し、有力な候補遺伝子と考えられる。今後、症例を追加し、詳細に検討することが必要である。

E. 結論

クローン病の感受性遺伝子が第 7、9 染色体上に存在する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子座の同定に関する研究

分担研究者 白澤 専二 九州大学生体防御医学研究所・助手

研究要旨

甲状腺特異的な自己免疫疾患であるGraves病、橋本病は遺伝要因の強く関与した多因子疾患である。この研究では、インフォームド・コンセントのもとに48組の自己免疫性甲状腺疾患の罹患同胞対の末梢血よりDNAを抽出し、マーカー間の平均距離が約10 cMである400個のmicrosatelliteマーカーを利用して、罹患同胞対法による連鎖解析を行い、自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子座を同定することを試みた。これまでに、第5、第8染色体でそれぞれMLSが3.2、2.8を示す遺伝子座を同定することに成功した。

A. 研究目的

Common diseaseの発症には、複数の遺伝要因と複数の環境要因の相互作用が重要な役割を果たしており、多因子疾患とも呼ばれる。免疫システムにおける自己寛容の破綻した状態として捉えられる自己免疫病は、そのような多因子疾患であると考えられる。これまでに、多数の自己免疫病において、第1の遺伝要因としてHLAとの連鎖あるいはHLAの特定のハプロタイプとの相関が報告されているが、HLAのみで自己免疫病を説明することは不可能である。甲状腺特異的な自己免疫疾患であるGraves (Basedow) 病、橋本病においては、多発家系の存在およびtwin studyにより遺伝要因の存在が強く示唆される。又、Graves病、橋本病の混在する家系、又、Graves病から橋本病に移行する症例も存在することより両者に共通の遺伝要因が存在することが推定される。この研究では、罹患同胞対法による連鎖解析により、自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子座の同定を行うことを目的とした。

B. 研究方法

甲状腺専門病院である伊藤病院（東京）、隈病院（神戸）の協力により、自己免疫性甲状腺疾患の罹患同胞対の情報収集を行った。末梢血の採取に際しては、主治医が患者に対して研究の目的および期待される成果につき書面・口頭にて説明を行い、患者がこの研究の趣旨を理解し、賛同する場合に、所定のインフォームド・コンセントの要旨に署名捺印してもらった後に、末梢血が採取された。その際に検体情報は全て記号化し、プライバシーの保護を遵守した。送付された血液より

DNAを抽出し、-20℃のREVC0で保存管理を行った。

FAM、HEX、NEDの3種類のいずれかの蛍光色素によりラベルされたプライマーを用いて、各マーカーの平均距離が、約10 cMである400個のCA repeatを有するmicrosatelliteマーカーを増幅させ、アガロースゲルにてPCR産物を確認後、各個人のマーカーを長さ及び蛍光色素により28個のパネルにした後、泳動させ、GeneScan、Genotyperのソフトを用いたアレルの同定を行った。罹患同胞対法による連鎖の検定は、Lander E.らの開発したMAPMAKER/SIBSにより、1) Exclusion Mapping、2) Maximum Likelihood Mapping、3) Information-content Mappingを行うことによりなされた。

C. 研究結果

これまでに1) Graves病のみの罹患同胞対32組、2) 橋本病のみの罹患同胞対6組、および3) 両者の混在する同胞対10組、の計48組、96人の患者に対して、計400個のDNAマーカーを用いての、連鎖解析を終了させた。

罹患同胞対法は、罹患同胞対において共有するアレルの数が有意に高い時に連鎖ありと判定されるものであるが、図1に示す様に共有アレル頻度は第5番染色体の短腕側では、 $z0$ 、 $z1$ 、 $z2$ がそれぞれ0.25、0.50、0.25と期待値とほぼ一致している。一方、長腕のD5S471、D5S2115、D5S436、D5S410では明らかに $z0$ の値が極端に減少していることが判明した。これら第5番染色体のマーカーについてLod Scoreを算出したものが図2である。罹患同胞対でアレルの共有が期待値より明らかに

高かった領域（D5S2115、D5S436、D5S410）でLod Scoreがピークを形成し、マーカーD5S2115でMLS 3.25を示した。同様の解析を22個の常染色体とX染色体に対して行った結果、MLSが2.80（第8染色体）、1.53（第9染色体）、1.33（第15染色体）、1.87（X染色体）、1.68（X染色体）を示す遺伝子座を同定することができた。

D. 考察

今回の研究ではGraves病、橋本病に共通の遺伝要因を検出するという目的で、両者を混合して解析を行った。混合することにより、罹患同胞対の数を増やす利点はあったが、Graves病（あるいは橋本病）のみに存在する遺伝要因の検出効率を低くしたと考えられる。現在、さらなる自己免疫性甲状腺疾患の罹患同胞対の検体の収集を行っているので、来年度はGraves病のみの解析も充分に行うことが可能であると考えられる。又、第5染色体におけるMLSは3.25であるが、このような解析を行う時の一つの指針として、 $MLS \geq 3.6$ であれば、significant linkageであると提示されている。今後、罹患同胞対の数を増やすことにより、この値を越えるLod Scoreを示す遺伝子座を同定することが1つの目標となる。今回の解析においては、各マーカーのアリル頻度を患者集団で行ったため、今回の結果はまだ不十分なものである。日本人健康集団における各マーカーのアリル頻度の同定を行い、それを基にして再度解析することにより、連鎖解析をより強固なものにする必要がある。

E. 結論

自己免疫性甲状腺疾患の罹患同胞対48組を対象として、400個のmicrosatellite markerを用いてwhole-genom Scanを行い、罹患同胞対法（MAPMAKER/SIBS）により連鎖解析を行った。その結果、第5染色体、第8染色体でそれぞれMLSが3.25、2.80を示す遺伝子座を同定することに成功した。これらの領域に自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子が存在することが推定された。

F. 研究発表

1. 論文発表
特になし。

遺伝性難聴のマッピング—難聴家系を用いた遺伝子解析による難聴原因究明の試み

分担研究者 福島 邦博 岡山大学医学部耳鼻咽喉科 助手

研究要旨 本研究年度において、われわれは今までに検討を加えてきた家系に対してさらに詳細な調査を加えることによって、検討対象者を増やし、最終的には第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を報告した。この領域には、膜電位依存性ナトリウムチャンネルSCN2Aやカリウムイオンチャンネルと相同性を示すESTなどのイオンチャンネルが多く存在していることがすでに報告されているが、現在こうした遺伝子を候補遺伝子として、これらの遺伝子について内耳での発現および患者試料での異常の同定を試みている。

A. 研究目的

遺伝性難聴は約2000人の新生児につき一人の割合で発生するといわれている比較的頻度の高い遺伝子異常である(1)。本研究では、常染色体優性の遺伝形式で発生している遺伝性難聴家系において連鎖解析を行い、原因遺伝子の遺伝子座を推定し、さらにその領域に存在する候補遺伝子について検討する。

B. 研究方法

我々は昨年度までの報告で、1)最初明らかな難聴が高音部に限局して認められるが、2)経過観察中にしばしば精神的・肉体的ストレスを契機に急性の聴力低下を来し、3)こうした急性増悪を反復しながら難聴が高度になってくる進行性難聴の病態をとる、という特徴的な臨床経過を示す一家系についての報告をしてきた。昨年度までの検討では、この家系は第2番染色体に連鎖する可能性が示されていたため、引き続き本年度は、対象家系における検討人数を拡大し、1)さらに連鎖解析を行い、有意なLOD値を得た。2)家系中でのハプロタイプ解析を行い、遺伝子の存在する領域を推定した。3)領域中に存在する遺伝子についてヒト胎児内耳cDNAライブラリーに対してPCRを行い、少なくとも胎児期での内耳における発現の有無を検討した。

C. 結果と考察

当初の連鎖解析の結果では、第2番染色体に連鎖が認められることが証明されたが、その後、本家系の構成員をさらに増やして検討したところ、D2S2380-D2S124-D2S2345-D2S335でのmultipoint linkage analysisではD2S2345で最大

のLODスコア4.08 ($=0$)が得られた。ハプロタイプ解析ではD2S2380からD2S335の間、10 cMの領域に遺伝子が存在することが推定された。

この領域は細胞学的には2q24に相当する部位であることが推定されているが、同じ領域にはすでに多数のイオンチャンネルがマップされており(2)、こうしたイオンチャンネルの一つが候補遺伝子である可能性が考えられる。また、ほぼ同じ領域に有毛細胞のチップリンクを形成するMYO1bが存在することが推定されており(2)、マウスMYO1bに類似性を示すESTが、やはりDFNBA16領域近傍にあることが報告されている(3)。また、マウスで類似性のある染色体領域にはfidet (fi)と呼ばれる常染色体劣性遺伝性難聴を示すマウスがマップされており、こうしたマウスがDFNA16のモデル動物である可能性が示唆された(4)。

現在、我々はこの領域の物理地図を作製しているが、すでにいくつかの既知のイオンチャンネルは候補領域外に有ることが推定されている。これらの中ではナトリウムイオンチャンネルのサブユニットであるSCN2A1およびSCN2A2と、カリウムイオンチャンネルのサブユニットの一つに高い類似性を示すESTであるSHGC-30444は、少なくともこの領域に含まれる可能性が示されている。また、ヒト胎児内耳から得られたcDNAを用いたPCRでは、これらの候補遺伝子・候補ESTは少なくとも胎児期のヒト内耳では発現されている可能性が示されている。現在、これらの遺伝子についての異常の有無を患者サンプルから得られたcDNAを基に検討中である。

難聴の遺伝子解析は近年劇的に進歩し、新たな知見が集積されつつある。最近までにクローニング

された難聴の遺伝子はCx26, MYOVIa, POU3F4, DIAPH1, POU4F3, PDS, TECTA, MYO15, COCHなどの遺伝子が報告され、ごく最近には新たにDFNA5およびKCNQ4が発見された(5)。このDFNA16の遺伝子研究が新しい局面を迎えるためには、最終的な遺伝子とその遺伝子異常の同定が必要である。今後はこの領域に存在する候補遺伝子の解析によって原因遺伝子の究明を目標としたい。

D. 結論

我々が検討対象とした遺伝性難聴家系においては第2番染色体2q24に遺伝子が存在しているものと推定された。この領域にはいくつかのイオンチャネルがマップされているが、それらの中ではSCN2Aが候補領域中に存在し、かつ内耳にて発現されていることが示された。

E. 参考文献

1. Königsmark BW, Gorlin RJ (1976) Genetic and metabolic deafness. 1st ed. Philadelphia, Pa: Saunders
2. GDB (Genome data base)(1997) Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University, Baltimore <http://gdbwww.gdb.org/>
3. The human gene map, National center for biotechnological information (NCBI), National Institutes of Health, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/SCIENCE96/chr?2> (March)
4. MGI (Mouse Genome Informatics) (1998) The Jackson Laboratory, Maine. <http://www.informatics.jax.org/> (March)
5. HHH (Hereditary Hearing Loss Homepage) (1997) The university of Antwerp, Antwerp and the University of Iowa, Iowa, <http://dnalab-www.uia.ac.be/dnalab/hhh/> (December)

F. 研究発表

- 1) Fukushima K, Ueki Y, Smith RJH: DFNB5, 6, 7 -Homozygosity mapping to localize genes causing autosomal recessive non-syndromic hearing loss-. Advances in Oto-Rhino-laryngology in printing
- 2) Nishizaki K, Fukushima K, Oda Y, Masuda A, Hayashi S, Nagayasu R, Masuda Y: Cochlear implantation for symptomatic hereditary deafness. Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl. in printing
- 3) 福島邦博: 感音性難聴と遺伝子異常 専門医通信 56:16-17, 1998.

- 4) Smith RJH, Ramesh A, Srisailapathy CRS, Fukushima K, Wayne S, Chen A, Van Laer L, Ashley J, Zbar RIS, Lovett M, van Camp G: Homozygosity mapping applied to hereditary hearing impairment - localizing recessive deafness genes (Chpt. 13). Developments in Genetic Hearing Impairment., ed.by Stephens D, Read A, Martini A. Whurr Publishers: pp77-90.1998.