

平成11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* を利用し、骨化過程で遺伝子発現が大きく変化する5種類の遺伝子を同定した。NOAマウスを利用した連鎖解析から、マウス皮膚炎発症に関与する主要遺伝子を突き止めた。クローン病の感受性遺伝子の存在を特定した。M1S1遺伝子が膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子であることを解明した。血管炎、腎炎、関節炎、唾液腺炎など、複雑な病像を発症する膠原病のモデルマウス MRL/lpr のゲノム解析を通じて、膠原病感受性遺伝子座の特性を明らかにした。自己免疫性甲状腺疾患感受性遺伝子座の一つが5q31領域に存在することを明らかにした。

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）
福嶋 義光（信州大学医学部衛生学・教授）
山本 一彦（東京大学医学部アレルギー・
リウマチ内科・教授）
天野 殖（京都大学医療技術短期大学部・教授）
名川 弘一（東京大学医学部腫瘍外科・教授）
白澤 専二（九州大学生体防御医学研・助手）

A. 研究目的

本研究の目的は遺伝子レベルでの疾患の原因あるいは素因を明らかにして、疾患の予防や新しい治療法の開発を目指すものである。偶発的な事故による外傷を除いて、すべての疾患の発生には、それぞれの比重には差のあるものの遺伝的な要因と後天的な外的要因とが複雑に関与している。ゲノム解析の進展に伴って遺伝子あるいはDNAマーカーが多数単離され、両親由来の染色体を区別することができるようになったことによりポジショナルクローニング法が確立された。この成果によって、1980年代前半には全く手がかりさえつかめなかった原因不明の遺伝性疾患（主に、単一遺伝子の異常による遺伝性疾患）の原因が次々と単離され、その数はすでに100以上にのぼっている。さらに解析に必要な材料・道具や解析プログラムの改良・開発がなされ、現在では複数の遺伝子が関与するような多因子遺伝子疾患、あるいは、環境要因などの外的な要因と遺伝的な要因が複雑に関与するような疾患における遺伝的背景をつきとめることも可能となっている。これらの研究は、新しい治療法・治療薬の開発や遺伝子診断による

疾患の予防や発症を遅らせる方法の開発にむけて世界的に取り組まれているものであり、疾患の予防・治療の観点から最も重要な研究である。

B. 研究方法

平成9年度にスタートした本研究において、すでに、膠様滴状角膜変性症・潰瘍性大腸炎・後縦靭帯骨化症の原因遺伝子の発見がされ、また、血管炎・腎炎・関節炎・唾液腺炎・Graves病などの自己免疫疾患、てんかんなどに対応する遺伝子座の決定が行われた。従って、これらの進捗状況に応じて研究計画が変更された。以下は平成11年の計画を示す。

(1) 後縦靭帯骨化症については *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が確認された。この *ttw* マウスにリン酸を高濃度に含む食餌を与えたところ、3-4週間の間に急速に全身の靭帯・軟骨などの骨化の生ずることが明らかとなった。この骨化プロセスに関与する遺伝子をスクリーニングして骨化に関与する遺伝子群の単離と病態との関連の解明を目指す（中村）。

(2) 潰瘍性大腸炎・クローン病の候補遺伝子は患者とコントロール群においてMUC3タンパクのアミノ酸の繰り返しの数が違い、それによって蛋白の構造に変化を来すことが発症と関連すると推測されている。この遺伝子構造の違いについて詳細に検討を加える。また、複数の遺伝子が関与していると推測されるため、連鎖解析により他の遺伝子の局在を明らかにする（中村、名川）。

(3) 正常集団での多型性情報データベースの充実を図る（中村）。

(4) 膠様滴状角膜変性症についても原因遺伝子が明らかとなったため、今後はモデルマウスの

樹立と病態解明を行い、モデルが樹立されれば点眼薬を用いた遺伝子治療などの可能性について検討する(田野)。

(5) 天野(京大医療短大)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限局化しており、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う。

(6) 白澤(九大医)はGraves病、新川(長崎大医)は常染色体優性の白内障、発作性運動誘発性コレオアテトーシスの原因遺伝子の限局化を目指す。

(7) 二瓶(東京女子医)はIgA腎症の症例について多型性マーカーによるアソシエーション解析をすすめ、原因遺伝子の染色体局在を明らかにする。

(倫理面への配慮)

ヒトの患者サンプルを利用している研究グループについては、事前に患者あるいは親(患者が未成年の場合)に対する書面によるインフォームドコンセントを得たうえで材料を採取している。長崎大・東大・阪大・信州大では施設内倫理委員会があり、これらの大学の研究グループは倫理委員会での審査を経ている。プライバシーの保護のために、患者に関する資料については厳重に管理保管している。

C. 研究結果と考察

(1) 中村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。本年度は、この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利用し、骨化過程で遺伝子発現が大きく変化する5種類の遺伝子を同定した。また、NOAマウスを利用した連鎖解析から、マウス皮膚炎発症に関与する主要遺伝子が第14染色体上に存在することを明らかにした。さらに、この部位に存在している遺伝子情報をもとに、候補遺伝子アプローチを試み、細胞死に関与する遺伝子の一つのエクソンがジーンコンバージョンによって他の遺伝子のエクソンに置き換えられていることが原因となっていることを突き止めた。おそらく、この遺伝子変異によってマウスマスト細胞の寿命が延長することが、異常なアレルギー反応の

原因となっていると考察された。

(2) 名川は、42組のクローン病同胞発症例解析を行い、第7・8・10・12染色体上の領域において感受性遺伝子との連鎖を示す結果を得た。これらのうち第8染色体上の領域との連鎖は白人におけるクローン病解析研究では確認されておらず、日本人においてのみ重要な役割を果たす感受性遺伝子が存在する可能性が示唆された。第7、10、12染色体上の領域は現在までの欧米での報告と一致し、人種を越えて、これらの染色体に感受性遺伝子の存在することが確定的となった。

(3) 田野らは、日本人近親婚家系における膠様滴状角膜変性症患者を対象としてホモ接合性マッピングを行い、この疾患の原因遺伝子座を第1番染色体短腕に限定し、また、認められた連鎖不平衡の解析によりさらにごく狭い領域に限局化することに成功した。続いて、この領域のゲノムコンテイングを作成し、その全塩基配列を決定し、その情報をもとに幾つかの候補遺伝子を単離した。そのうちの一つ、消化管腫瘍関連抗原をコードするM1S1遺伝子において患者に特有な3つのナンセンス変異及び1つのフレームシフト変異を同定した。日本人患者すべてがこれらの変異のホモ接合体もしくは複合ヘテロ接合体であった。また、正常日本人対象100人においてはこれらの変異を認めなかった。この結果より我々はM1S1が膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子であるとの結論に達した。

(4) 新川は、連鎖解析およびFISH法によって5種の未知遺伝病座の染色体局在を決定した。発作性運動誘発性コレオアテトーシス(PKC)座は16p11.2-q12.1、先天性後極性白内障座は20p12-q12、Engelmann病(ED)座は19q13.1-q13.3、先天盲座を10q21、Sotos症候群座を5q35にマップした。

(5) 能勢は、血管炎、腎炎、関節炎、唾液腺炎など、複雑な病像を発症する膠原病のモデルマウスMRL/lprのゲノム解析を通じて、以下の膠原病感受性遺伝子座の特性を明らかにした。(あ)相加性・階層性・臓器特異性：各病像の感受性遺伝子座は、それぞれ互いに異なる複数の遺伝子座群に支配された。(い)候補遺伝子の多型とその機能的差異：腎炎の候補遺伝子のひとつとしてオステオポンティン(OPN/Eta-1)を、腎炎および血管炎が共有する候補遺伝子としてCD72を得た。これらは機能的差異を生じ得る遺伝子多型を有し、合成したOPN蛋白多型間で、培養系でのB細胞の分化活性化能に顕著な差を認めた。

(6) 山本は、慢性関節リウマチの関連・原因候補遺伝子50種類について、SNPのスクリーニングを行い、約600塩基に一つの割合でSNPが存在することを示した。分布頻度はcoding領域1に対し、non-coding領域2程度であった。これらのSNPを利用してアソシエーション解析を行った結果、サイトカイン遺伝子のひとつのSNPが強い相関を示し、この遺伝子が慢性関節リウマチの発症に關与する可能性を示した。

(7) 天野は、遺伝性てんかんラット(IER)にみられる白内障、てんかん発作、海馬微小神経形成異常の責任遺伝子座の染色体マッピングを行った。白内障遺伝子は第8番染色体並びに第15番染色体上に、微小形成異常遺伝子は第8番染色体上にマッピングされた。

(8) 白澤は、自己免疫性甲状腺疾患(Auto-immune Thyroid Disease: AITD)感受性遺伝子座を同定するために、Graves病(GD)、橋本病(HT)の罹患同胞対(ASP)102家系102組(GD-GD、68組; GD-HT、19組; HT-HT、15組)を収集し、約400個のDNAマーカーを用いた全ゲノムスキャンを行った。サイトカイン等の免疫関連遺伝子が多数存在する5q31領域のD5436でMultipoint Lod Score (MLS)が3.04を示した。これ以外では、染色体1、5、8、9、10、12、14、15、22番の合計12個の領域でMLSが1以上を示した。さらに、8番染色体では、HTのASP15組においてMLSが2.25-2.40を示した。これらの結果により、AITDに複数の共通の遺伝子が存在すること、およびGD、HTそれぞれに特異的な遺伝子が關与することが示唆された。

(9) 二瓶は、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子的要因を検索するため、メサングウム細胞の増殖性と関連のありそうなp27Kip1遺伝子多型との関連性を検討したが、有意な結果は見い出せなかった。

(10) 福嶋は、ヒトゲノム解析研究における細胞バンクの設立に向け、細胞株樹立率を向上させるための技術開発、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を行い、この方法にしたがって、ヒトゲノム解析に有用な約1000例の細胞株を樹立・保存した。特に疾患に関連した染色体均衡型構造異常症例の細胞株は重要であり、いくつかの疾患において構造異常の切断点の情報からポジショナルクローニングが行われた。

D. 結論

ttwマウスに対するリン酸負荷により急速におこる異所性骨化と長管骨の骨粗鬆症様の変化の病態解析を通して、5つの新規遺伝子を同定したことにより、異所性骨化のみならず、骨粗鬆症の発症に關与する仕組みが明らかとなり、後縦韌帯骨化症などの異所性骨化の症状進行を抑制する薬剤・食餌などを検討することが可能となる。膠様滴状角膜変性症については、動物モデルの作製により、それらを利用した病態解析や点眼薬による(遺伝子治療等も含めた)治療法の開発を進めることができるものと期待される。アレルギー性皮膚炎や自己免疫性甲状腺疾患については発症の手がかりとなる要因が明らかとなったため、発症の仕組みの解明が進むものと期待される。

E. 研究発表

論文発表

1. Tomita H-A, Nagamitsu S, Wakui K, Fukushima Y, Yamada K, Sadamatsu M, Masui A, Konishi T, Tsujita T, Matsuishi T, Tsuji S, Nanko S-I, Kato N, Namane Y, Niikawa N: Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis maps to chromosome 16p11.2 - q12.1. *Am J Hum Genet* 65: 1688-1697, 1999
2. Nakamura I, Ikegawa S, Okawa A, Okuda S, Koshizuka Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Koyama T, Goto S, Toguchida J, Matsushita M, Ochi T, Takaoka K, Nakamura Y: Association of the human *NPPS* gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). *Human Genet.*, 104:492-497, 1999
3. Kyo K, Parkes M, Takei Y, Nishimori H, Nagawa H, Baba S, Muto T, Lathrop GM, Nakamura Y: Association of ulcerative colitis with rare VNTR alleles of the human intestinal mucin gene, *MUC3*. *Human Molecular Genetics* 8:307-311, 1999
4. Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka K, Nishida K, Simomura Y, Tano Y, Nakamura Y: Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nature Genet* 21:420-423, 1999
5. Natori K, Tamari M, Watanabe O, Onouchi Y, Shiimoto Y, Kubo S, Nakamura Y:

Mapping of a gene responsible for dermatitis of NOA (Naruto Research Institute Otsuka Atrichia) mice, an animal model of allergic dermatitis. *J Human Genetics*, in press

6. Yamada R, Tanaka T, Ohnishi Y, Suematsu K, Minami M, Seki T, Tohma S, Yamamoto K, Nakamura Y: Identification of 142 single nucleotide polymorphisms in 41 candidate genes for rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Human Genetics*, in press

ヒトゲノム解析法にもとづく後縦靭帯骨化症・膠様滴状角膜変性症・
アトピー性皮膚炎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* を利用し、異所性骨化過程で遺伝子発現が大きく変化する5種類の遺伝子を同定した。皮膚炎モデルNOAマウスを利用した連鎖解析から、マウス皮膚炎発症に関与する主要遺伝子が第14染色体上に存在することを明らかにし、さらに、細胞死に関与する遺伝子の一つがその原因となっていることを突き止めた。日本人近親婚家系における膠様滴状角膜変性症患者を対象としてポジショナルクローニングを行い、M1S1 遺伝子が膠様滴状角膜変性症の原因遺伝子であることを解明した。

A. 研究目的

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については、昨年度、モデルマウスである *ttw* を用い、ポジショナルクローニング法によって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。本年度は、分子病態解析を行うため、リン酸を負荷した食餌を投与してこのマウスに生ずる異常を観察する。また、ヒトNPPS遺伝子ヒトOPLL発症との関係についても検討する。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。さらに、本年度より、新たにヒトアトピー性皮膚炎モデルであるNOAマウスを用いて、この皮膚炎発症に関わる遺伝子のポジショナルクローニングを目指す。このマウスは、潰瘍性皮膚病変、ひっかき行動、血清IgE値の上昇を特徴とし、病理組織学的には、病変部、及びその周辺に著明なマスト細胞の集積および好中球、好酸球、リンパ球の浸潤を認める、きわめてヒトのアトピー性皮膚炎に近い病態を示すマウスである。

B. 研究方法

後縦靭帯骨化症については *ttw* マウス原因遺

伝子に相当するヒト遺伝子を単離し、この遺伝子の遺伝的多型、特にSNP（single nucleotide polymorphism）を用いてヒト後縦靭帯骨化症との関連の有無を検討する。また、この *ttw* マウスにリン酸を高濃度に含む食餌を与えて、異所性骨化のプロセスにどのように影響が及ぶかを観察する。さらに、異所性骨化が生ずる場合に関与する遺伝子をディフェレンシャルディスプレイ法を利用してスクリーニングし、異所性骨化に関与する遺伝子群の単離と病態との関連の解明を目指す。

（2）MUC3蛋白のアミノ酸の繰り返しの数は潰瘍性大腸炎・クローン病患者群とコントロール群では有意に違い、繰り返しの数によってMUC3蛋白の構造に変化を来すことが発症と関連すると推測されているため、この遺伝子構造の違いについて詳細に検討を加える。

（3）膠様滴状角膜変性症については、限局化された領域からの遺伝子の同定を行い、それらの遺伝子内の変異の有無を検索する。

（4）NOAマウスについては、ケモカイン・サイトカインがアトピー性皮膚炎の病態形成に深く関与している可能性を考え、NOAマウス及びコントロールマウス（C57BL/6、BALB/c、C3H/HeJ、DBA/2J、IQI）の8週令、30週令の脾臓及び皮膚（NOAマウスでは正常部と病変部）よりRNAを抽出し、これらの遺伝子の発現量の比較を行う。また、アトピー性皮膚炎の原因遺伝子をポジショナルクローニングを行う目的で、NOAマウスと5種類のマウス（C57BL/6、BALB/c、C3H/HeJ、DBA/2J、IQI）の戻し交配（backcross）を行う。得られた交雑種559匹を用いて、マウスの全常染色体に関し、約10cMおきに設定した243個のマイクロサテライトマーカーを用い全ゲノムにわたる解析を行う。

C. 結果・考察

(1) 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。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。リン酸負荷後、急速に異所性骨化が生ずる耳介軟骨を経日的に摘出し、それらからmRNAを抽出してディフェレンシャル・ディスプレイ法にて、発現の変化する遺伝子を探索し、5種類の新規遺伝子の単離に成功した。

(2) 潰瘍性大腸炎については、ムチン3遺伝子(MUC3)の構造を詳細に検討した結果、MUC3には2種類の遺伝子が存在していることや非常に遺伝子多型に富んでいる(約100塩基に1カ所)ことが明らかになった。

(3) 第1番染色体短腕に同定した原因遺伝子座領域の塩基配列を決定し、コンピュータ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、MIS1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。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、正常産物は細胞質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。

(4) Northern法またはRT-PCR法により発現量の検討を行った結果、PF4, eotaxin, RANTESの全てが、NOAマウスの脾臓組織において8週よりも30週の方が発現が強くなっていた。それに対してコントロールでは、いずれも8週よりも30週の方が発現量が少ないか、ほぼ同程度であった。NOAマウスでは早いものでは、生後10週頃より発症しはじめ、20週においては約90%のマウスで発症を認めることから、これらのケモカインの発現の増加が発症に関与している可能性が考えられた。また、NOAマウスの皮膚病変部においてeotaxinのレセプターであるCCR3の発現が著明に増加していた。eotaxinは好酸球の病変部への集積に深く関与しており、この発現が病変部に特異的に高いことから、CCR3は皮膚炎の局所治療薬のターゲットとして非常に有用と考えられた。現

在までに調べた他のケモカインやサイトカインについては大きな変化は認めていない。連鎖解析のため、NOAマウスと5種類のマウス(C57BL/6、BALB/c、C3H/HeJ、DBA/2J、IQR)の戻し交配(backcross)を行った。得られた交雑種559匹を用いて、マウスの全常染色体に関し、約10cMおきに設定した243個のマイクロサテライトマーカーを用い全ゲノムにわたる解析を行った結果、第14番染色体上(遺伝マーカーのD14Mit113とD14Mit225の間、約15cM)に皮膚病変と有意に連鎖を認める領域を見出した。さらに、解析をすすめ、細胞死に関係のある遺伝子に類似性を示す遺伝子に遺伝子変換の起こっていることが明らかとなり、この遺伝子が原因遺伝子であるとの結論を得た。

D. 結論

ttwマウスに対するリン酸負荷により急速におこる異所性骨化と長管骨の骨粗鬆症様の変化の病態解析を通して、5つの新規遺伝子を同定したことにより、異所性骨化のみならず、骨粗鬆症の発症に関与する仕組みが明らかとなり、後縦靭帯骨化症などの異所性骨化の症状進行を抑制する薬剤・食餌などを検討することが可能となる。膠様滴状角膜変性症については、動物モデルの作製により、それらを利用した病態解析や点眼薬による(遺伝子治療等も含めた)治療法の開発を進めることができるものと期待される。アレルギー性皮膚炎については発症の手がかりとなる要因が明らかとなったため、発症の仕組みの解明が進むものと期待される。

(研究協力者)

池川志郎・中村功・腰塚裕・姜建宇・田中敏博・玉利真由美・渡辺乙・名取恭子・古田幸代・尾内善弘

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
塩本泰弘

大塚製薬工場

E. 研究発表

1. 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
2. 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
 3. M. Tamari, Y. Daigo, and Y. Nakamura: Isolation and characterization of a novel serine threonine kinase gene on 3p22-21.3. *J. Human Genetics* 44:116-120, 1999
 4. G. Nawa, Y. Miyoshi, H. Yoshikawa, T. Ochi, and Y. Nakamura: Frequent loss of expression or aberrant alternative splicing of P2XM, a p53-inducible ATP-gated channel gene, in human soft tissue tumors. *British J Cancer*. 80:1185-1189, 1999
 5. 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 and Y. Nakamura, P. N. Goodfellow, G. M. Lathrop, A. Tanigami, and M. R. James: A radiation hybrid map of the rat genome containing 5,255 microsatellite markers. *Nature Genetics* 22:27-36, 1999
 6. I. Nakamura, A. Okawa, S. Ikegawa, K. Takaoka and Y. Nakamura: Genomic organization, mapping, and polymorphisms of the gene encoding human cartilage intermediate layer protein (CILP). *J. Human Genetics*, 44:203-205, 1999
 7. O. Watanabe, K. Natori, M. Tamari, Y. Shiomoto, 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* 45:173-176, 1999
 8. 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*, 21:420-423, 1999
 9. 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.* 55:466-472, 1999
 10. 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.*, 104:492-497, 1999
 11. S. Ikegawa, M. Isomura, Y. Koshizuka, and Y. Nakamura: Cloning and characterization of a novel gene (C8orf2), a human representative of a novel gene family with homology to *C. elegans* C42.C1.9. *Cytogenet. Cell Genet.* 85:227-231, 1999
 12. Y. Onouchi, H. Kurahashi, H. Tajiri, S. Ida, S. Okada, and Y. Nakamura: Genetic alterations in the *JAG1* gene in Japanese patients with Alagille syndrome. *J. Human Genetics* 44:235-239, 1999
 13. T. Nakajima, T. Furukawa, Y. Hirano, T. Tanaka, H. Sakurada, T. Takahashi, R. Nagai, T. Itoh, Y. Katayama, Y. Nakamura, and M. Hiraoka: Voltage-shift of the current activation in *HERG S4* mutation (R534V) in *LQT2*. *Cardiovascular Research* 44:283-293, 1999
 14. E. Kondo-Iida, K. Kobayashi, M. Watanabe, J. Sasaki, T. Kumagai, H. Koide, K. Saito, M. Ozawa, Y. Nakamura, and T. Toda: Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 8:2303-2310, 1999
 15. K. Natori, M. Tamari, O. Watanabe, Y. Onouchi, Y. Shiomoto, S. Kubo and Y. Nakamura: Mapping of a gene responsible for dermatitis of NOA (Naruto Research Institute Otsuka Atrichia) mice, an animal model of allergic dermatitis. *J. Human Genetics* 44:372-376, 1999
 16. M. Nishihara, M. Terada, J. Kamogawa, Y. Ohashi, S. Mori, S. Nakatsuru, Y. Nakamura, and M. Nose: Genetic basis of autoimmune sialadenitis in *MRL/lpr* lupus-prone mice. *Arthritis & Rheumatism* 42:2616-2623, 1999
 17. S. Nakatsuru, M. Terada, M. Nishihara, J. Kamogawa, T. Miyazaki, W.-M. Qu, K. Morimoto, C. Yazawa, H. Ogasawara, Y. Abe, K. Fukui, G. Ichien, M. Ito, S. Mori, Y. Nakamura, and M. Nose: Genetics dissection of the complex pathological manifestations of collagen disease in *MRL/lpr* mice. *Pathology International*

- 49:974-982, 1999
18. T. Kinjo, M. Isomura, T. Iwamasa, and Y. Nakamura: Molecular cloning and characterization of two novel genes on chromosome 8p21.3. *J. Human Genetics* 45:12-17, 2000
 19. H. Tomita, S. Nagamitsu, K. Wakui, Y. Fukushoma, K. Yamada, M. Sadamatsu, A. Masui, T. Konishi, T. Matsuishi, M. Aihara, K. Shimizu, K. Hashimoto, H. Mineta, M. Matsushima, T. Tsujita, M. Saito, H. Tanaka, S. Tsuji, T. Takagi, Y. Nakamura, S. Nanko, N. Kato, Y. Nakane, and N. Niikawa: Paroximal kinesigenic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1. *Am J Human Genetics*, in press
 20. S. Kunishima, T. Kojima, T. Tanaka, T. Kamiya, K. Ozawa, Y. Nakamura, and H. Saito: mapping of a gene for May-Hegglin anomaly to chromosome 22q. *Human Genetics* 105:379-383, 1999
 21. H. Akashi, H.-J. Han, M. Iizaka, Y. Nakajima, Y. Furukawa, S. Sugano, K. Imai and Y. Nakamura: Isolation and characterization of a novel gene encoding a putative seven-span transmembrane protein, STMP201. *Cytogenet. Cell Genet.* In press
 22. R. Yamada, T. Tanaka, Y. Ohnishi, K. Suematsu, M. Minami, T. Seki, S. Tohma, K. Yamamoto, Y. Nakamura: Identification of 142 single nucleotide polymorphisms in 41 candidate genes for rheumatoid arthritis in the Japanese population. *Human Genetics*, in press
 23. Y. Ohnishi, T. Tanaka, R. Yamada, K. Suematsu, M. Minami, K. Fujii, N. Hoki, K. Kodama, S. Nagata, T. Hayashi, N. Kinoshita, H. Sato, H. Sato, T. Kuzuya, H. Takeda, M. Hori, and Y. Nakamura: Identification of 187 single nucleotide polymorphisms (SNPs) among 41 candidate genes for ischemic heart disease in the Japanese population. *Human Genetics*, in press
 24. H. Iwasa, T. Itoh, R. Nagai, Y. Nakamura, and T. Tanaka: 20 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and their allelic frequencies of four genes responsible for familial long QT syndrome in Japanese population. *J. Human Genetics* in press
 25. M. Unoki, S. Furuta, Y. Onouchi, O. Watanabe, S. Doi, H. Fujiwara, A. Miyatake, K. Fujita, M. Tamari and Y. Nakamura: Association studies of 33 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 29 candidate genes for bronchial asthma: Positive association of a T924C polymorphism in the thromboxane A2 receptor gene
 26. S. Okuno, T.K. Watanabe, T. Ono, Y. Yamasaki, Y. Goto, H. Miyao, T. Asai, N. Kanemoto, K. Ogawa, A. Mizoguchi-Miyatake, T. Takagi, E. Takahashi, Y. Nakamura, and A. Tanigami: Genetic determinants of plasma triglyceride levels in (OLETF X BN) X OLETF backcross rats. *Genomics* 62:356-368, 2000

モデルマウスのゲノム解析による膠原病の病像多様性・類似性の起源の解明

分担研究者 能勢真人 愛媛大学医学部 教授

研究要旨

膠原病の病像の多様性と類似性の起源をゲノムに求め、MRL/lpr モデルマウスにおいてその遺伝様式、感受性遺伝子を解析した。その結果、膠原病をポリジーン系疾患として把握し得ること、その病像多様性、類似性が、ポリジーンの種々の組み合わせに規定されること、さらにこの組み合わせを生ぜしむるゲノム交雑が新たな病像をも生み出すポテンシャルを有すること、また、位置的候補遺伝子探索により膠原病のポリジーンの少なくともいくつかは遺伝子多型そのものであることを示した。

A. 研究目的

膠原病はフィブリノイド変性を呈する疾患群に対して名づけられた病理形態学的概念で (Klemperer ら、1942)、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、全身性硬化症、多発性筋炎・皮膚筋炎、結節性多発動脈炎、リウマチ熱の 6 疾患が挙げられた。現在、結合組織疾患、リウマチ性疾患、自己免疫疾患の 3 つのカテゴリーを満足する疾患とされ、6 疾患に加え、Sjogren 症候群、Wegener 肉芽腫症、高安動脈炎など多岐にわたる。これらの多くは症候群としての診断基準に従っており、個々の疾患を重複、移行して発症する重複症候群の概念 (Silver ら、1962) もある。

我々はこの多様性と類似性の起源をゲノムに求めた。膠原病の遺伝要因は、従来、糖尿病、癌などと同様、ポリジーン遺伝の概念 (Mather, 1949) の中で論じられてきた。この概念は、複数の遺伝子が補足し合って始めて量的形質あるいは閾値効果に規定されて質的形質につながるもので、環境因子の影響を受けやすいとされる。とすれば、また家族構成が縮小化しつつある現状では、ヒトの連鎖解析のみでこの遺伝様式、遺伝子の実体を明

らかにするのは困難で、モデルマウスの連鎖解析とゲノムデータベースでの位置的候補遺伝子探索に期待が持たれる。

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、昨年度に引き続き、これらの病変発症の遺伝様式、疾患感受性遺伝子座の詳細なマッピングを行い、いくつかの候補遺伝子を同定し、その構造多型解析、機能解析を行った。さらに、野生由来マウスゲノムとの交雑により新たな膠原病病変が発症すること、また、環境因子がこれらの膠原病の病像多様性を規定する事実を見出した。

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、繁殖した。また、野生由来マウス MSM/*Msf* マウスは、国立遺伝学研究所城石俊彦教授より供与されたものを用いた。これらから、上記ならびに愛媛大学医学部動物実験施設、カワシマ商事動物実験施設にて作出した (MRL/*lpr* x C3H/*lpr*) F1 (67 匹)、MRL/*lpr* x (MRL/*lpr* x C3H/*lpr*) F1 (N2) (179 匹)、(MRL/*lpr* x C3H/*lpr*) F2 (266 匹) マウス、また、(MRL/*lpr* x MSM/*Msf*) F1 (60 匹)、MRL/*lpr* x (MRL/*lpr* x MSM/*Msf*) F1 (N2) (507 匹) マウスを対象に以下の実験を行った。

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、あるいはエラストイカ・マッソン染色、PAS 染色し、光学顕微鏡下に、血管炎、関節炎（軟骨増殖性関節病変、後述）、糸球体腎炎、唾液腺炎の有無を昨年度の方法に準じて判定した。加えて、OTL 解析のために、血管炎に対しては、0—2 段階、糸球体腎炎、関節炎、唾液腺炎に対しては、0—3 段階の組織病理学的スコアを各病像に付した。糸球体腎炎に対しては、一部の解析で、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：N2、F2 世代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) とした。さらに、これらの遺伝子座について、新た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、N2 世代に対しては $P < 0.0034$ 、F2 世代に対しては $p < 0.0016$ 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。significant linkage は、N2 世代に対しては $P < 0.0001$ 、F2 世代に対しては $p < 0.000052$ とした。昨年度は、組織病理学的形質は準連続変異 (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) に相当するとの判断から OTL 解析を削除したが、今回、検索対象個体数を増すことにより、一部の病変に対しては可能であることが判明し、病変のスコア値を対象に OTL 解析を行った。OTL 解析には MAPMAKER-QTL パッケージを用いた。

C. 研究結果・考察

1. 膠原病の感受性遺伝子座群のマップピング：腎臓の血管炎では、N2 世代の解析で第 4 染色体上に 2 個の劣性感受性遺伝子座、第 3 染色体上に 1 個の抵抗性遺伝子座を認めしたが、さらに F2 世代の解析にて、これらはほぼ同様の位置にそれぞれマップされ、第 3 染色体の抵抗性遺伝子座は不完全優性遺伝形式を呈することが明らかとなった。これら 3 座は OTL 解析にても同様の領域に位置した。最終的にこれらを、*Arvm1* (Autoimmune renal vasculitis in MRL mice 1)、*Arvm2*、*Arvm3* とした。(表 1 参照) *Arvm1*、*Arvm2* はともに significant linkage を示し、位置的候補遺伝子探索の対象とした。

糸球体腎炎に関しては、最終的に、N2 世代を対象とする糸球体腎炎 Index に基づく QTL 解析により第 4 染色体上に 2 個の劣性

感受性遺伝子座 (significant linkage)を得、最終的に *Gnm1* (*Glomerulonephritis in MRL mice 1*)、*Gnm2* とした。F2 マウスの解析により得た第5染色体上の劣性感感受性遺伝子座は *Gnm3* とした。

関節炎に関しては、N2 世代系の解析で第15、7、2、1染色体上に、全部で6個の関節炎関連遺伝子座を同定していたが、最終的に、この関節炎の形質に滑膜組織の肉芽性炎症病像を陽性とプロットしているところから、それぞれ *Paam1* (*Progression of autoimmune arthritis in MRL mice 1*)、*Paam2*、*Paam3*、*Paam4*、*Paam5*、*Paam6* とした。うち *Paam1-3* は significant linkage を呈し、おそらく互いに近接しており、おそらく同一の遺伝子座であると推定された。*Paam4* のみが遺伝子型 MRL/MRL ホモで抵抗性を示し、他の5座は劣性感感受性遺伝子座であった。

唾液腺炎は、N2 世代系の解析に基づき、第10、18、4、1染色体上に4座、いずれも劣性感感受性遺伝子座としてマップされ、*Asm1*、*Asm2*、*Asm3*、*Asm4* とした。*Asm1*、*Asm2* は significant linkage を示した。

2. 膠原病感受性遺伝子座のゲノム由来：
MRL 系マウスがこのような多数の疾患感受性遺伝子を備えている理由は、このマウスが元来 C57BL/6J、C3H/Di、AKR/J、LG/J の近交系マウスゲノムのモザイクであるためと考えられた。即ち、各病像の感受性遺伝子座群は、いずれも2系統 (LG/J と AKR) のマウスゲノムに由来するものであった。しかも第4染色体上のほぼ同一領域に感受性遺伝子座としてマップされた *Arvm2*、*Gnm2*、*Asm2* は、その対立遺伝子がいずれも AKR/J マウスに由来するもので、これらは血管炎、糸球体腎炎、唾液腺炎の common locus である可能性が示唆された。

3. 疾患感受性遺伝子座の相加性と階層性：昨年度報告したように、関節炎感受

性遺伝子座の少なくとも *Paam1*、*Paam4*、*Paam5*、ならびに唾液腺炎感受性遺伝子座の *Asm1*、*Asm2*、*Asm3* には、相加性と階層性が認められたが、加えて血管炎の感受性遺伝子座 *Arvm1*、*Arvm2*、*Arvm3* にも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が血管炎感受性遺伝子型である MRL/MRL、MRL/MRL、MRL/C3H の場合、それぞれ単独では、血管炎の発症率が48-60%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血管炎発症率は90%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 *Arvm1* > *Arvm2* > *Arvm3* であった。

これらの結果から、血管炎も、関節炎、唾液腺炎と同様、その発症の遺伝様式が、それぞれが同義的に補足し合っ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、N2、F2 マウスで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、これら一連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. 位置的候補遺伝子の解析：これらの感受性遺伝子座における位置的候補遺伝子探索から、腎炎 *Gnm3* の候補遺伝子のひとつとしてオステオポンチン (*OPN/Eta-1*) を、腎炎 *Gnm1* および血管炎 *Arvm1* が共有する候補遺伝子として *CD72* を得た。これらの cDNA の塩基配列の解析に基づき、MRL 系と C3H 系マウス間に機能的差異を生じ得る遺伝子多型を有していることが判明した。

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、接着分子であると同時に B 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。愛媛大学工学部遠藤弥重太教授との共同研究により、cell free system にて合成した OPN の蛋白

多型間において、細胞培養系での少なくとも B 細胞の分化活性化能に顕著な差を認めた。

また、関節炎感受性遺伝子座 *Aaam1* は、慢性関節リウマチ患者の sib-pair から得られた第 8 染色体上の遺伝子座 *D8S556* (塩澤ら、1999) の領域とほぼ一致し、候補遺伝子として *SDC2* が示唆された。

5. 野生由来マウスゲノムとの交雑による新たな関節病変の発症: MRL 系マウスと MSM/Msf 野生由来マウスとの交配系 MRL/lpr x (MRL/lpr x MSM/Msf)F1 (N2) マウス群に、両親系統にはない新たな関節病変を発症する個体が存在することを見出した。この病変は足、膝関節の線維軟骨の増生を特徴とするもので、本症は *lpr* 遺伝子、*MHC* とは共に非拘束性であった。この感受性遺伝子座を両親系統間の多型マイクロサテライトマーカーを用いてマッピングした結果、上記のいずれの遺伝子座とも異なるものであった。この事実は、ゲノム交雑が新たな病像をも生み出すポテンシャルを有することを意味する。

6. 環境因子による病像多様性の修飾: ポリジーン遺伝は環境の影響を受けやすいとされる。とすれば、感染などの外的因子は膠原病の病像を修飾することが考えられる。そこで、ウイルス感染などにより誘導されるインターフェロン転写活性化因子 *IRF-1* を MRL/lpr マウスに強制発現させることで膠原病に対する環境因子の作用をシミュレートした。即ち、ヒト *Eμ* をエンハンサーとするヒト *IRF-1* 遺伝子全長を導入した C57BL/6-h*IRF-1* (B6-h*IRF-1*) を MRL/lpr マウスに戻し交配し、FISH にて transgene の局在を明らかにした後、その部位のマイクロサテライトマーカーを用いて speed congenic 方式にて N15 世代まで戻し交配したものを用いた。その結果、MRL/lpr-h*IRF-1* マウスでは、MRL/lpr+ マウス同様、全身性のリンパ節腫脹、脾腫、間質性肺炎、慢性唾液腺炎、涙腺炎の所見を呈したが、

関節炎、および腎炎、動脈炎を発症する個体はほとんど認められなかった。血清中の IgG、IgM、IgG2a、IgG3 値、抗 dsDNA 抗体価は正常レベルで、脾細胞の FACS 解析の結果から、これらがプロ B 細胞を含めた B 細胞系列の細胞の分化抑制によると思われた。一方 CD4、CD8 陽性細胞の発現に明らかな差は認められなかった。また、MRL/lpr+ マウスでは全身性に Mac-2 抗原陽性活性化マクロファージが増加しているが、MRL/lpr-h*IRF-1* マウスでは、これらが著しく減少していることが明らかとなった。

これらの事実は、膠原病疾患群をポリジーン疾患として位置付けること、かつその病像多様性の起源に環境因子が関わりうることを明確にしている。即ち、IFN、TNF、IL-1 等のサイトカインを誘導する感染要因などにより *IRF-1* 遺伝子が活性化され、その結果、上記膠原病関連遺伝子座に位置する遺伝子を含めて、IRF 結合配列をプロモーター部位に有する遺伝子の転写活性化を介して膠原病の発症を修飾すると考えられるからである。このことは、例えば慢性関節リウマチ患者が、何故経過中に、重複してあるいは原疾患を離れて、血管炎やシェーグレン症候群、間質性肺炎を発症したりするのかを理解するに妥当な概念を呈示しているものと考えられる。

D. 結論

膠原病の病像の多様性と類似性の起源をゲノムに求め、MRL/lpr モデルマウスにおいてその遺伝様式、感受性遺伝子を解析した。

1. 血管炎、腎炎、関節炎、唾液腺炎の感受性遺伝子座をマッピングした。
2. 各病像は互いに異なる複数の遺伝子座群に支配された。この遺伝子座群間には、相加性、階層性が存在した。血管炎、腎炎、唾液腺炎のマスタージーンが存在が示唆された。
3. 腎炎の候補遺伝子のひとつとしてオステオポンティン (OPN/Eta-1) を、腎炎および血管炎の候補遺伝子として CD72 を得た。

これらは機能的差異を生じ得る遺伝子多型を有した。合成した OPN 蛋白多型間で、培養系での B 細胞の分化活性化能に顕著な差を認めた。

4. MRL/lpr マウスは 4 系統の近交系マウスゲノムのモザイクからなるが、各病像の感受性遺伝子座群は、少なくとも 2 系統のマウスゲノムに由来した。また、野生由来マウス MSM/Msf との交配により、両親系統にはない新たな関節病変（線維軟骨増殖性）が発症した。この感受性遺伝子座は上記のいずれとも異なるものであった。

5. ウイルス感染などにより誘導されるインターフェロン転写活性化因子 IRF-1 を MRL/lpr マウスに強制発現させると、唾液腺炎を増悪する一方、他病像をほぼ完全に抑制した。

以上の事実から、膠原病をポリジーン系疾患として把握し得ること、その病像多様性、類似性が、ポリジーンの種々の組み合わせに規定されること、さらにこの組み合わせを生ぜしむるゲノム交雑が新たな病像をも生み出すポテンシャルを有すること、また、位置的候補遺伝子探索により膠原病のポリジーンの少なくともいくつかは遺伝子多型そのものであることを示した。

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、山田明弘（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）、加藤秀樹（浜松医科大学動物実験施設）、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

1. 論文発表

1. Nakatsuru S, Terada M, Nishihara M, Kamogawa J, Miyazaki T, Q WM,

Morimoto K, Yazawa C, Ogasawara H, Abe Y, Fukui K, Ichien G, Ito RM, Mori S, Nakamura Y, Nose M. : Genetic dissection of the complex pathological manifestataions of collagen disease in MRL/lpr mice. *Pathol. Int.* 49 : 974-982, 1999.

2. Nishihara M, Terada M, Kamogawa J, Ohashi Y, Mori S, Nakamura S, Nakamura Y, Nose M. : Genetic basis of autoimmune sialoadenitis in MRL/lpr lupus mice: additive and hierarchical properties on polygenic inheritance. *Arthritis Rheum.* 42:2616-2623, 1999.

3. 能勢真人 : 血管炎の遺伝要因—モデルマウスのゲノム解析—治療学 33 : 152-156, 1999

4. 鴨川淳二, 寺田美穂, 西原美由紀, 水木伸一, 森士朗, 中鶴修一, 中村祐輔, 能勢真人: RA モデルマウスの疾患感受性遺伝子座, 日本臨床免疫学会会誌 22 (6) 487-490, 1999

5. 能勢真人 : 血管炎モデルマウスのゲノム解析 : , *Bio Clinica* 14 : 320-322, 1999

6. 能勢真人 : 自然発症疾患モデル動物 : 血管炎, *Morecular Medicine*, 36:32-36 1999

2. 学会発表

1. 西原美由紀, 寺田美穂, 森士朗, 能勢真人 : 膠原病疾患群モデルマウスへの IRF-1 遺伝子導入による唾液腺炎好発マウスの樹立とその病態解析. 第 88 回日本病理学会, 東京, 1999. 4. 8.

2. 宮崎龍彦, 曲衛敏, 寺田美穂, 路靈敏, 森士朗, 能勢真人 : 自己免疫性糸球体腎炎の発症・進展におけるオステオポンチン遺伝子多型の役割. 第 88 回日本病理学会, 東京, 1999. 4. 8.

3. 路靈敏, 曲衛敏, 宮崎龍彦, 鴨川淳二, 水木伸一, 西原美由紀, 寺田美穂, 能勢真人 : QTL analysis of susceptibility loci to lupus-like glomerulonephritis in MRL/lpr

mice. 第88回日本病理学会, 東京, 1999. 4.8.

4. 能勢真人, 宮崎龍彦, 寺田美穂, 西原美由紀, 鴨川淳二, 水木伸一, 曲衛敏, 路靈敏, 森士朗, 日合弘, 中鶴修一, 中村祐輔: 膠原病疾患群モデルマウスにおける血管炎感受性遺伝子の解析. 第43回日本リウマチ学会総会, 札幌, 1999. 6.3

5. 鴨川淳二, 寺田美穂, 水木伸一, 西原美由紀, 森士朗, 奥村秀雄, 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. 第43回日本リウマチ学会総会, 札幌, 1999. 6.4

6. 能勢真人: 膠原病疾患群とポリジーン 第15回奈良セミナー, 奈良, 1999. 7.10

7. 宮崎龍彦, 宮崎龍彦, 路靈敏, 寺田美穂, 能勢真人: 自己免疫性糸球体腎炎の発症・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29回日本免疫学会 京都 1999. 12.1.

8. 西原美由紀, 曲衛敏, 宮崎龍彦, 寺田美穂, 森士朗, 大橋裕一, 加藤秀樹, 能勢真人: 膠原病疾患群モデルマウスのポリジーン系遺伝子の環境要因による修飾: *IRF-1* 遺伝子強制発現による選択的疾患抑制機構の解析. 第29回日本免疫学会 京都 1999. 12.1.

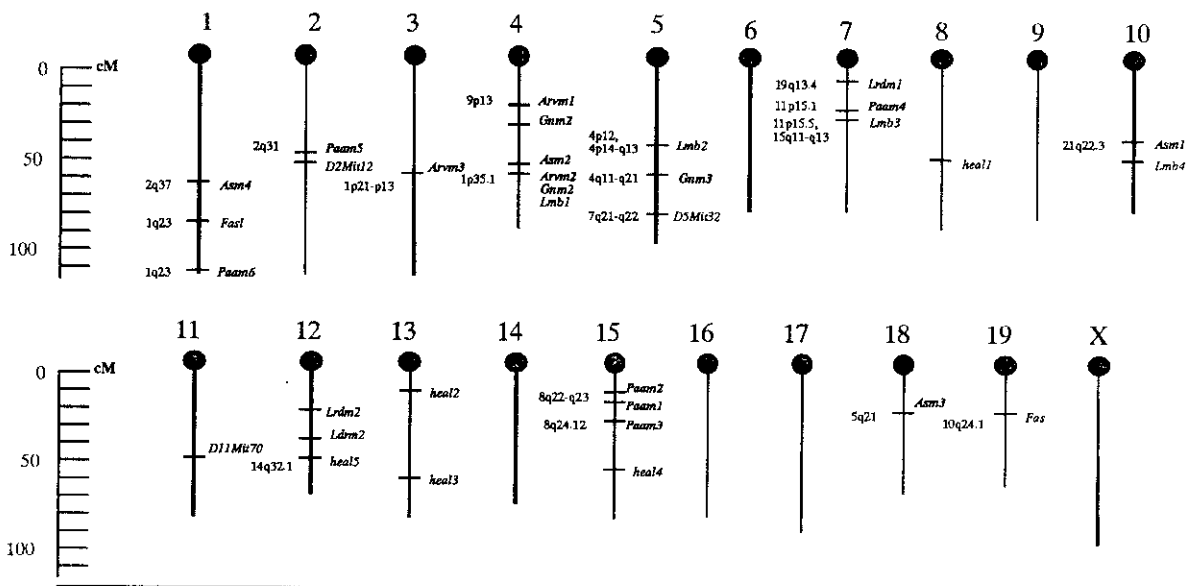
9. 大石久志, 水木伸一, 鴨川淳二, 寺田美穂, 西原美由紀, 奥村秀雄, 能勢真人: 膠原病疾患群モデルマウスの像多様性におけるTCRレパトリの役割: 滑膜炎局所におけるTCRレパトリの特異性の解析. 第29回日本免疫学会 京都 1999. 12.2.

10. 水木伸一, 鴨川淳二, 大石久志, 寺田美穂, 奥村秀雄, 能勢真人: DBA/1マウスコラーゲン誘導関節炎における疾患感受性遺伝子座の同定とMRL系マウス関節炎関連遺伝子群の役割. 第29回日本免疫学会 京都 1999. 12.3.

11. 曲衛敏, 宮崎龍彦, 路靈敏, 西原美由紀, 山田明弘, 寺田美穂, 森士朗, 中鶴修一, 中村祐輔, 能勢真人: ループモデルマウスMRL/lprにおける新たな血管炎感受性遺伝子座. 第29回日本免疫学会 京都 1999. 12.1.

13. 鴨川淳二, 寺田美穂, 水木伸一, 大石久志, 西原美由紀, 森士朗, 奥村秀雄, 中鶴修一, 中村祐輔, 能勢真人: 関節炎好発系マウスMRL/lprとMSM野生マウスとの交配による新たな関節病変の発現. 第29回日本免疫学会 京都 1999. 12.2.

Susceptibility loci to collagen diseases in MRL/lpr mice



arthritis: *Paam1*, *Paam2*, *Paam3*, **Paam4*, *Paam5*, *Paam6*

sialoadenitis: *Asm1*, *Asm2*, *Asm3*, *Asm4*

vasculitis in kidney: *Arvm1*, *Arvm2*, **Arvm3*

glomerulonephritis: *Gnm1*, *Gnm2*, *Gnm3* (*Opn*) *resistant loci

分担研究報告書

ヒトゲノム解析に関する研究

分担研究者 新川 詔夫 長崎大学医学部教授

研究要旨

連鎖解析およびFISH法によって3種の未知遺伝病座の染色体局在を決定した。発作性運動誘発性コレオアテトーシス(PKC)座は16p11.2-q12.1のD16S3081 [lod score (LS)=10.27]、先天性後極性白内障座は20p12-q12のD20S885とD20S874間 (LS=3.61)、Camurati-Engelmann病(CED)座は19q13.1-q13.3のD19S881とD19S606間 (LS=7.41) にマップした。CED座領域の候補遺伝子を調べた結果、TGF- β 1遺伝子 (TGFB1) のLAP蛋白に相当するドメイン内にC225R、R218C、R218Hの3種の変異を認め、TGFB1が責任遺伝子だと決定した。

A. 研究目的

ポジショナルクローニングまたはポジショナル候補遺伝子探索法で未知の疾患遺伝子の同定を行うことを目的とした。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。また、マップした疾患座付近の既知の遺伝子あるいはESTを候補遺伝子として、疾患遺伝子を同定するものである。

以下の3種の未知遺伝子病、発作性運動誘発性コレオアテトーシス(PKC)、先天性後極性白内障(CPP3)、およびCamurati-Engelmann病(CED) (図1) を研究対象とした。PKCは原因不明の神経疾患、CPP3は長崎県地方に多発する白内障、CEDは主として骨幹部の骨密度が痛みを伴って増加する遺伝性疾患である。PKC、CPP3、およびCEDはすべて常染色体優性遺伝病である。

B. 研究方法

ゲノム上にはほぼ均等に分布する約400種のマイクロサテライトマーカーを選択した。罹患者および家族構成員から血液を採取し、DNA源とした。一部の構成員は爪からDNAを採取した。PCR増幅後、オートシーケンサで多型を解析し、罹患者および非罹患者の遺伝子型を決定し、コンピュータプログラムを用いてロッド得点を算出した。連鎖したマーカーを含むPACクローンのFISH解析によって染色体局在を決定した。

同定した遺伝子座領域についてはマップされてい

る既知遺伝子あるいはESTを候補としてイントロン領域にプライマーを設計し、PCR産物のSSCP解析およびPCR・直接塩基配列決定法により変異の有無を検索した。

(倫理面への配慮) 罹患者およびその家族構成員に対しては疾患の説明と同時に、本研究について詳細に説明し、文書で同意(インフォームドコンセント)を得た。

C. 研究結果

連鎖解析によって3種すべての遺伝子病の染色体局在を決定した。

●PKC座はD16S3081と連鎖した(最大ロッド得点=11.51、組換え値=0.00、浸透率=0.80)。ハプロタイプ解析によって疾患座はD16S3093とD16S41間~12.4 cMに、さらにFISH解析によりPKC座は16p11.2-q12.1に局在する。同定した疾患座領域にはイオンチャネル関連遺伝子はなかった。

●CPP3座を20p12-q12のD20S885とD20S874間に(ロッド得点=3.61、組換え値=0.00)、ハプロタイプ解析で疾患座はD20S851とD20S96間33.9 cMにマップした。同領域にあるBFSP1を候補遺伝子とした変異解析によって疾患遺伝子から除外した。

●CED座は19q13.1-q13.3のD19S881とD19S606間~15.1 cMにマップした(ロッド得点=7.41、組換え値=0.00、浸透率=1.00)。血族関係のない8名の罹患者において、本領域に存在する数種の骨組織発現を示す候補遺伝子の変異解析を行い、8名全例に

TGF- β 1遺伝子 (*TGFBI*) のエクソン4に3種のミスセンス変異を同定した(図2、表1)。*TGFBI*内のSNP(多型)によるハプロタイプ解析では各家系間に血縁関係はなかった。300名の正常対象者にはこれらの変異はみられなかった。

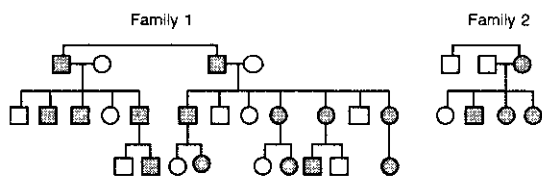


図1 連鎖に用いたCED 2家系

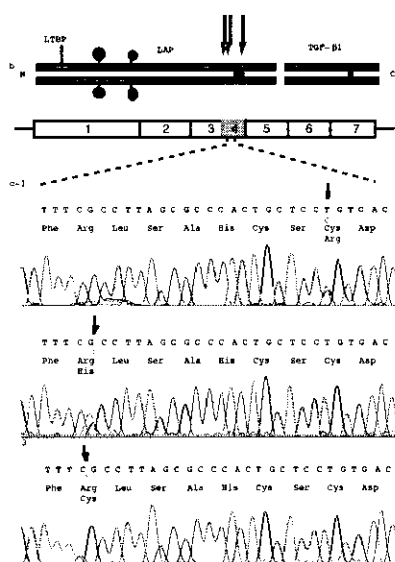


図2 CED患者に同定した3種のTGFBI変異

表1 8例の患者における3種の変異

患者	cDNA position (エクソン4)		
	655	656	676
家族例1			C225R
家族例2		R218C	
家族例3	R218H		
孤発例1	R218H		
孤発例2	R218H		
孤発例3	R218H		
孤発例4	R218H		
孤発例5		R218C	

D. 考察

3種の未知の疾患座の染色体局在を決定し、さらにより詳細なマッピングを行った。PKC座が局在する16p11.2-q12.1領域にはイオンチャンネルに関連する候補遺伝子は未だないが、最近、アポクリン線で発現する腫瘍遺伝子が本領域にマップされ、この領域

のPACコンティグや一部配列が判明しているため、その情報を入手し、解析中である。

連鎖解析によって同定したCPP3座の局在範囲は非常に大きく、候補となる遺伝子/ESTは多い。その中で、水晶体で発現するfilensin遺伝子 (*BFSP1*) を候補として解析したが、数種の新しいSNPが同定されたもののCPP3特異的変異は同定できなかった。長崎県地方にはCPP3と思われる別の家系が存在するので、その連鎖解析で範囲を狭めたい。

CED患者に同定したTGFBIミスセンス変異は疾患特異的である。本結論は、(1) 家族例3名および孤発例5例全例に3種の変異のいずれかが同定されたこと、(2) 家族例および孤発例各々1例は白人患者であり、またTGFBI内のSNP(多型)によるハプロタイプ解析によって5つの家系間の血縁関係は否定されたこと、(3) 3種の変異は300人の正常人にみられないこと、および(4) 変異はLAP蛋白のS-S結合領域に局限していることによって支持される。これらの変異はTGF- β 1蛋白の3次元構造の変化によるプロテアーゼ抵抗性をもたらし、活性型TGF- β 1が遊離せず受容体結合能を欠くため、下流のシグナルが伝達されない。これによって骨芽細胞の増生もしくは破骨細胞の機能不全をもたらすことが発症機構だと推定される。

E. 結論

3種の未知遺伝子病 (PKC、CPP3、CED) の遺伝子局在を連鎖解析で明らかにした。CEDでは候補遺伝子探索によってTGFBIが原因遺伝子だと結論した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Tomita H-A, Niikawa N, et al. Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis maps to chromosome 16p11.2-q12.1. *Am J Hum Genet* 65: 1688-1697, 1999.
- Ghadami M, Niikawa N, et al.: Genetic Mapping of the Camurati-Engelmann Disease Locus to Chromosome 19q13.2-q13.3. *Am J Hum Genet* 66, 2000.
- Yamada K, Niikawa N et al.: An autosomal dominant posterior polar cataract locus maps to human chromosome 20. *Hum Genet* (in submission)
- Kinoshita A, Niikawa N, et al.: Domain-specific mutations in the human transforming growth factor beta 1 gene (*TGFBI*) result in Camurati-Engelmann Disease. *Nature Genet* (in submission)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

CED特異的TGFBI変異、その検出用プライマーDNAおよび分子診断法について特許申請中である。

膠様滴状角膜変性症（GDLD）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GDLD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 (GDLD) 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。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。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、GDLDによるものの占める割合は少なくない。また、その病因は多くがい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、GDLD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人を対象としてこの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GDLD20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。また、病因遺伝子を単離後、患者数が35家系41人に増加したため、蛋白短縮試験、PCR-RFLP、直接塩基決定により単離された遺伝子の変異検索を行った。

C. 研究結果

Homozygosity Mappingの結果結果第1番染色体短腕のマーカーDIS220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DIS2650, 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DIS2650, からDIS2741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DIS2869とDIS2801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DIS220および、その遠位の二つのマーカーDIS2648, DIS2752において有意な連鎖不平衡を認めた(DIS220: $\chi^2=36.24$, $p<0.001$; DIS2648: $\chi^2=12.90$, $p=0.032$; DIS2752: $\chi^2=19.77$, $p=0.012$)。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Genome Contig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。GDL D20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。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、グルタミンが同じく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GDL D20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。最終的には35家系41人の患者の変異を検索したが、患者は全員上記4変異のホモ接合体、もしくは複合ヘテロ接合体であった。うち、Q118X変異は病因染色体の90.0%を占めた。

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。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、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GDL20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GDL20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90.0%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. 研究発表

1. 論文発表

Tsujikawa M, Kurahashi H, Tanaka K, Nishida K, Shimomura Y, Tano Y, Nakamura Y. Identification of the gene responsible for gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Nature Genetics*. 1999; 21: 420-423.

2. 学会発表

辻川 元一、倉橋 浩樹、田中 敏博、岡田 正

喜、山本修士、前田 直之、渡辺 仁、井上 幸次、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単離。1999年4月日本眼科学会第100回大会 (千葉)

辻川 元一、辻川 薫、井上 幸次、前田 直之、渡辺 仁、田野 保雄、真島 幸彦: Protein Truncation TestによるMIS1変異の検索。2000年2月第24回角膜カンファランス (千葉)