

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

慢性腎不全の原因疾患として最も多い 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した。データベースの作製とともに、IgA 腎症の予後に関与する高血圧、蛋白尿または半月体形成に関与すると考えられる候補遺伝子の多型を検討したが、有意な結果は得られなかった。家系解析ができる集団も少なく、Sib pair study や association study は困難であった。今後、他の糸球体腎炎にまで対象を広げ、候補遺伝子とともにその遺伝子発現を修飾する感受性遺伝子の解析が必要と考えられた。

A. 研究目的

慢性腎不全の原因疾患として最も多い 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、糸球体障害に関与すると考えられる増殖因子やサイトカインの遺伝子多型を調査した。また、その他の糸球体腎炎や多発性嚢胞腎にまで対象を広げ、候補遺伝子や疾患感受性遺伝子についても検討した。

B. 研究方法

IgA 腎症の発症時期と腎生検までの期間、高血圧の有無、腎生検時の腎機能と蛋白尿および血清 IgA 値、予後などをまとめたデータベースを作製する。また、DNA サンプルの採取を行い、候補遺伝子に関する国内外の論文を参考にして、SNP を施行し ASO hybridization あるいは PCR-RFLP で確認し、chi-square test で検討する。候補遺伝子としては、サイトカインあるいはケモカイン (IL-1, IL-2, IL4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-13, TNF, CCR, RANTES など) を中心に遺伝子多型の有無を検討する。

一方家族集積性の認められる lipoprotein glomerulopathy の遺伝子変異、左右非対称とともに嚢胞腎を併発するマウスの責任遺伝子、CD28 ノックアウトマウスでの糸球体腎炎の発症などについても検討する。

C. 研究結果

IgA 腎症 192 例、糖尿病性腎症 134 例、ループス腎炎 67 例、その他の腎炎 182 例のデータベースを作製した。この中で、IgA 腎

症を中心に検討を進めているが、健常人と比較して有意な関連性を示す結果は得られていない。現在、IgA 腎症において高血圧の有無、腎生検時の腎機能、蛋白尿または血清 IgA 値および予後との関連性を検討中である。IgA 腎症、糖尿病性腎症、ループス腎炎それぞれにおいて、その発症と関連のありそうな候補遺伝子が一つずつみつまっているが、全国の施設からサンプル供与を受け、症例数を増やして再検討している。

一方、lipoprotein glomerulopathy は高率に糸球体硬化をきたし、ネフローゼ症候群に至る家族集積性を認める疾患である。Apolipoprotein (Apo) genotype を検討したところ、Apo E 遺伝子 exon 4 に 54 bp の deletion を認めた (論文発表 1)。この結果、18 個のアミノ酸が欠失 (Gln 156-Gly 173→0) をきたしており、新規性のある結果であった。また、Mochizuki らは、左右非対称をきたすマウスに高率に嚢胞腎を併発することに注目し、このモデルの発症責任遺伝子である Ank/Swi6 モチーフの繰り返しをもつ inv 遺伝子をクローニングすることに成功した (論文発表 2)。この遺伝子は、第四染色体に位置し、実際に変異を起こすと嚢胞腎が発症してくることをトランスジェニックマウスを用いて証明した。さらに、糸球体腎炎の発症における補助シグナルの役割を検討するため、CD28 ノックアウトマウスに抗糸球体基底膜抗体を用いた糸球体腎炎を惹起しようと試みたが、腎炎はまったく発症しなかった (学会発表 1)。よって、CD28 補助シグナルは糸球体腎炎の発症に深く関わっていると考えられ、CD28, CTLA4, CD40 およ

び CD40L などの遺伝子レベルで変異が起こっていないか検討中である。

D. 考察

IgA 腎症は、明らかに遺伝的背景があるにもかかわらず、その発症あるいは予後を規定している責任遺伝子が明らかにならなかった。候補遺伝子のスクリーニングの過程で、ACE 遺伝子多型の関与など、すでに報告されている遺伝子の多型を次々に調べていったが、結果はネガティブであった。IgA 腎症の発症には、いくつかの遺伝子が関与し、その遺伝子の発現を促進したり、抑制したりする遺伝子の関与により、その発症が規定されているという複雑なシステムを考慮しなければならない。この疾患の本質は、IgA という免疫グロブリンが過剰に産生され、糸球体のメサンギウム細胞に沈着するという現象である。よって、多くの抗原に対して autoreactive に活性化される T 細胞とそれからシグナルを受け取る B 細胞のレベルで活躍する分子に焦点を絞る必要がある。次いで、産生された免疫グロブリンがメサンギウム細胞に沈着するプロセスで関与する分子をもう一度洗い直す必要があると考えられた。

IgA 腎症の候補遺伝子が、なかなか同定できなかったため、その他の腎炎の DNA サンプルを集めスクリーニングしていった結果、糖尿病性腎症やループス腎炎では、IgA 腎症の場合とは違った遺伝子の関与が浮上してきた。現在の臨床では、糸球体に炎症が起こり、糸球体硬化へ進行していく過程では、同じようなメカニズムが考えられているが、引き金となる遺伝子の異常や変異は違っている可能性がある。また、ACE 遺伝子多型の報告にみられるように、少数のサンプルで統計をとって有意な関連性があると指摘しても、サンプルが増加するに従って有意差がなくなることが多い。もう一度、その疾患の発症および進展のメカニズムをみつめることにより、ターゲットにすべき遺伝子の選定について考え直す必要がある。一方、疾患モデルマウスの検討から、新たな候補遺伝子を見つけ出す作業も大切である。IgA 腎症は ddY マウスを、ループス腎炎は NZB マウスを、糖尿病性腎症は NOD マウスをそれぞれ選別して、候補遺伝子および感受性遺伝子の解析を進めていく予定である。

E. 結論

慢性腎不全の原因疾患のほぼ 30~40% を占める IgA 腎症の発症に関与する遺伝子の解析を施行したが、現時点では有意な結果が得られていない。いくつかの候補遺伝子およ

び感受性遺伝子が関与する疾患と考えられ、サンプルを増やすとともに解析する遺伝子を絞る必要があると考えられた。また、疾患モデルマウスの遺伝子解析の結果を反映させる予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Toshio Mochizuki, Ken Tsuchiya, Hiroshi Nihei et al: Cloning of *inv*, a gene that controls left/right asymmetry and kidney development. *Nature* 395: 177-181, 1998

2) Minoru Ando, Hiroshi Nihei et al: A novel 18-amino acid deletion in apolipoprotein E associated with lipoprotein glomerulopathy. *Kidney Int.* 56: 1317-1323, 1999

2. 学会発表

1) Kosaku Nitta, Hiroshi Nihei et al: Resistance of CD28-deficient mice to anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 556A, 1999

2) Ken Tsuchiya, Toshio Mochizuki, Hiroshi Nihei et al: Expression of the inversion of embryonic turning (*inv*) gene in the mouse kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 443A, 1999

G. 知的所有権の取得状況

特に無し

ヒトゲノム解析研究における細胞バンクの意義

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

ヒトゲノム解析に有用と思われる新たな約200例の細胞株を樹立・保存し、保有する細胞株は約1200例となった。これらの細胞株は適宜、連鎖解析および遺伝子クローニングのために役立てられている。今年度は特に、疾患に関連した染色体均衡型構造異常症例の細胞株の重要性に注目し、我国における症例収集のためのシステムの構築を提案するとともに、いくつかの疾患において構造異常の切断点の解析を行った。

A. 研究目的

ヒトゲノム解析研究において種々の遺伝疾患患者の細胞株を樹立・保存する細胞バンクの意義は広く認められている。我々はすでに精度の高い細胞株の樹立・保存・再培養・輸送方法を確立し、適切なインフォームドコンセントに基づいた細胞バンクを構築することにより、数多くのゲノム解析研究に関与してきた。今年度は細胞バンクを有効に機能させるとともに、ゲノム解析研究に極めて重要な情報となることが予想される染色体均衡型構造異常を伴う遺伝疾患患者を対象とした細胞バンクのシステム化をはかり、いくつかの症例についてその切断点からの遺伝子クローニングを試みた。

B. 方法および C. 結果

I. 細胞バンク活動

1999.4.1～2000.1.31の期間に新たに以下に記載する約200例の細胞株が樹立・保存され、我々の保有する細胞株は計約1200例となった（括弧内は症例数）。凍結保存された細胞株は適宜、解凍・再培養され、ヒトゲノム解析研究に役立てられている。

川崎病（63）、Exostosis（28）、CMT・HMSN（7）、HNPCC（6）、Engelmann syndrome（6）、MEN1・家族性副甲状腺機能亢進症（6）、Autism（5）、PWS（5）、家族性癱性脊髄麻痺・家族性癱性対麻痺（4）、DM（3）、FSHD（3）、重症筋無力症（3）、PKC（3）、モヤモヤ病（3）、難治性てんかん（3）、Fra(X）（3）、染色体異常（3）、SCID（2）、Antley-Bixler syndrome（2）、Projeria（2）、Lesch-Nyhan syndrome（2）、ICF syndrome（2）、以下 各1例：Werner syndrome、X-anuploidy、大理石病、Shprintzen-Goldberg syndrome、pure gonadal dysgenesis、Borjeson-

Fossman-Lehmann syndrome、メチルマロン酸血症、FG syndrome、epilepsy、下垂体腫瘍、コラーゲン異常症、特発性側彎症、Cohen syndrome、Angelman syndrome、頭蓋骨早期癒合症、先天性側彎症、内軟骨腫症、microcephaly、MCA、8p-mosaic syndrome、CMD、多動、Lowe syndrome、異食癖、Retinoblastoma、Coffin-Siris syndrome、先天性ミオパチー、Cockayne synd.、Rubinstein-Taybi syndrome、Opitz-trigonocephaly-like syndrome、高乳酸血症等。

今年度の細胞株樹立率は1月末現在、88.5%（169/191）であった。

II. Japan Mendelian Cytogenetic Network (JMCN)の構築

染色体均衡型構造異常のほとんどは表現型に影響しないが、稀に均衡型構造異常を伴う単一遺伝疾患の患者の切断点の情報が疾患責任遺伝子の単離につながる場合がある。疾患に関連した染色体均衡型構造異常 (disease-associated balanced chromosome rearrangements: DBCRs) の情報はヒトゲノムの塩基配列がすべて決定したあとも、ヒトの genotype-phenotype の関連を明らかにし、その情報を疾患の予防・治療に役立てていくうえで極めて重要である。

Tommerupらの研究グループはDBCRsの情報をヒトゲノム解析研究を役立てるべく Mendelian Cytogenetics Network (MCN) の構築を呼びかけている。その内容は以下の通りである。

1. DBCRsのデータを、過去にさかのぼって、そしてこれからもできる限り数多く収集する。
2. 切断点および臨床所見の情報を含んだ、インターネットでアクセス可能なデータベース (MCNdb : <<http://mcndb.imbg.ku.dk>>) を構築し、これらのデータの普及を促進する。

3. 臨床症状の再検討および材料（樹立細胞株 FISHマッピングのための染色体浮遊液, DNA）の運用を効果的に行うため、疾患に関連している可能性の高いDBCRsを同定する。
4. DBCRsの分子レベルでの切断点同定のための標準化したFISH用プローブを供給する。
5. 特定の疾患について共同研究を開始する。
6. 希望する研究室に、cell lineの作成、DBCRsのFISHマッピングおよび遺伝子単離のためのコンタクトをとり、便宜を提供する。

我々はMCNの国際プロジェクトに参加するためにJapan Mendelian Cytogenetic Network (JMCN)の構築の準備を進めた。まず、MCNの活動のうち、DBCRs症例の情報収集については、いくつかの染色体検査を行っている施設に協力を依頼し、承諾を得た。今後の方針として、DBCRs症例の情報が得られた場合は、主治医に連絡をとり、患者・家族のインフォームドコンセントを得たのち、検体を送付していただき、細胞株を樹立・保存する。さらにDBCRsの情報をMCNに登録するとともに、MCNより切断点近傍のFISHプローブの供与を受け、YACレベルの切断点の解析を行うこととした。

D. 考案

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、今までにヒトゲノム解析に有用な約1200例の細胞株を樹立・保存した。これらの細胞株は、必要に応じて適宜、解凍・再培養され、数多くのヒトゲノム解析研究に役立てられている。3年前、本研究が開始した頃に樹立できた細胞株を用いた研究成果が F. 研究発表のリストに掲載されているように、ようやく実を結びつつある。研究開始から成果があげられるまでには時間がかかるのである。細胞バンクに保存されている細胞を用いた研究の範囲は今後ますます増大することが予想され、細胞バンクを維持・管理・発展させるための継続的な経済的支援が望まれる。

我々は以前より疾患責任遺伝子の単離に役立つ可能性があると考えられたDBCRs症例の細胞の樹立・保存を行っていたが、今回、同様の目的で立ち上がった国際プロジェクトであるMendelian Cytogenetic Network (MCN)に参加できるよう我国における共同研究のシステム化をはかった。

我国においては、染色体検査の必要性は日常の医療で十分理解され、必要に応じて診療の一貫として

検査が行われている。しかし医学部においても遺伝医学教育が確立していないため、DBCRsの情報の重要性をふくめて、染色体構造異常が判明した場合にその情報が患者のQOLに役立てられること、さらに医学研究にも役立てられることなどについて認識していない一般の臨床医も決して少なくない。また、染色体検査の大部分は商業ベースの染色体検査センターが担っているのが現状で、指導する遺伝医学の専門医も十分ではない。個人情報を含むこれらの情報提供を我々が検査センターから直接得ることは、検査センターと契約関係にある施設との間の守秘義務の問題で困難である。一方、我国の染色体検査の精度および普及の程度は極めて高く、DBCRsの潜在的症例数は計り知れない。我国の優れた染色体解析技術により蓄積されたDBCRs症例を本研究の継続により発掘することは、我国におけるポジショナルクローニングを飛躍的に推進させる可能性があると考ええる。

E. 結論

今年度は約200症例の種々の疾患患者の細胞株樹立・保存を行い、数多くのゲノム解析に役立てた。その中でゲノム解析研究に直結する、疾患に関連した染色体均衡型構造異常症例を収集し、YACレベルで切断点を解析する我国における共同研究プロジェクトとしてJapan Mendelian Cytogenetics Networkの構築を提案した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ghadami M, Makita Y, Yoshida K, Nishimura G, Fukushima Y, Wakui K, Ikegawa S, Yamada K, Kondo S, Niikawa N, Tomita H: Genetic Mapping of the Camurati-Engelmann Disease Locus to Chromosome 19q13.1-q13.3. *Am J Hum Genet* 66(1):143-147, 2000

Wakui K, Tanemura M, Suzumori K, Hidaka E, Ishikawa M, Kubota T, Fukushima Y: Clinical applications of two-color telomeric FISH for prenatal diagnosis: identification of chromosomal translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 44:85-90, 1999

De Baere E, Van Roy N, Speleman F, Fukushima Y, De Paepe A, Messiaen L: Molecular and physical characterization of the 3q23 breakpoint of a de novo reciprocal translocation t(3;4)(q23;p15.2) in a patient with BPES. *Genomics* 57:70-78, 1999

Kubota T, Nonoyama S, Tonoki H, Masuno M, Imaizumi K, Kojima M, Wakui K, Shimadzu M, Fukushima Y: A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation based on methylation-specific PCR. *Hum Genet* 104:49-55, 1999

- Ohnishi A, Yamamoto T, Yamamori K, Sudo K, Fukushima Y, Ikeda M: Myelinated fibers in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B with arg98his mutation of Po protein. *J Neurological Sciences* 171:97-109, 1999
- Kubota T, Oga S, Ohashi H, Iwamoto Y, Fukushima Y: Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome in a woman with skewed X-chromosome inactivation. *Am J Med Genet* 87:258-261, 1999
- Sato T, Oyake M, Nakamura K, Nakao K, Fukushima Y, Onodera O, Igarashi S, Takano H, Kikugawa K, Ishida Y, Shimohata T, Koide R, Ikeuchi T, Tanaka H, Futamura N, Matsumura R, Takayanagi T, Tanaka F, Sobue G, Komure O, Takahashi M, Sano A, Ichikawa Y, Goto J, Kanazawa I, Katsuki M, Tsuji S: Transgenic mice harboring a full-length human mutant DRPLA gene exhibit age-dependent intergenerational and somatic instabilities of CAG repeats comparable with those in DRPLA patients. *Hum Mol Genet* 8:99-106, 1999
- Matsuo M, Muroya K, Kosaki K, Ishii T, Fukushima Y, Anzo M, Ogata T: Random X-inactivation in a girl with duplication Xp11.21-p21.3: Report of a patient and review of the literature. *Am J Med Genet* 86:44-50, 1999
- Nakajima K, Sakurai A, Kubota T, Katai M, Mori J, Aizawa T, Fukushima Y, Hashizume K: Multiple endocrine neoplasia type 1 concomitant with Prader-Willi syndrome: Case report and genetic diagnosis. *Am J Med Sci* 317:346-349, 1999
- Kondo K, Kaga K, Ogawa Y, Fukushima Y: Temporal bone histopathologic findings in a case of interstitial deletion of the long arm of chromosome 2 [del(2)(q31q33)]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 48:31-37, 1999
- Tomita H, Nagamitsu S, Wakui K, Fukushima Y, Yamada K, Sadamatsu M, Masui A, Konishi T, Matsuishi T, Aihara M, Shimizu K, Hashimoto K, Mineta M, Matsushima M, Tsujita T, Saito M, Tanaka H, Tsuji S, Takagi T, Nakamura Y, Nanko S, Kato N, Nakane Y, Niiikawa N: Paroxysmal kinesigenic choreoathetosis locus maps to chromosome 16p11.2-q12.1. *Am J Hum Genet* 65:1688-97, 1999
- 福嶋義光: 遺伝子診断 (特集: 遺伝子医療の発展). *最新医学*55 (1):66-70, 2000
- 福嶋義光: 遺伝カウンセリングとそのあり方 (特集: 出生前診断). *産婦人科治療*80 (1):72-75, 2000
- 福嶋義光, 中根貴弥: 遺伝子診断: 遺伝子診療外来の実際 (特集: ゲノム医学の現在と未来 基礎と臨床). *現代医療*32 (1):279-284, 2000
- 福嶋義光, 上野一郎: 臨床検査における遺伝子診断の現状と今後の展望. 広範囲 血液・尿化学検査, 免疫学的検査 (4) —その数値をどう読むか—. *日本臨床*57: 615-618, 1999
- 涌井敬子, 福嶋義光: 染色体検査の適応となる病態・疾患および試料の採取法. 広範囲 血液・尿化学検査, 免疫学的検査 (4) —その数値をどう読むか—. *日本臨床*57: 624-627, 1999
- 福嶋義光: 遺伝医学と生命倫理. *日本皮膚科学会雑誌* 109:1729-1733, 1999
- 福嶋義光: 遺伝子診療外来の現状. 第25回日本医学会総会誌 12-S-5-1
- 櫻井晃洋, 福嶋義光, 橋爪潔志: MEN 1型の遺伝カウンセリングとフォローアップ. 特集: MEN 1型: 基礎から臨床まで—最新のトピックスから. *内分泌外科*16:111-116, 1999
- 櫻井晃洋, 橋爪潔志, 福嶋義光: 多発性内分泌腺腫症患者の遺伝子診療の現状と将来. *肝胆膵* 38:1035-1040, 1999
- 福嶋義光: 遺伝子診療としての家族性腫瘍への取り組み. *現代医療*31:143-147, 1999
- 福嶋義光: 糖尿病の遺伝カウンセリング (特集: 糖尿病と遺伝子診療). *Pharma Medica* 17(9):79-84, 1999
- 福嶋義光: 遺伝子診療システムの構築に向けて. *臨床医*25 (6):1254-1257, 1999
- 福嶋義光, 玉井真理子: 遺伝医療における患者支援. *臨床医*25 (6):1247-1249, 1999
- 福嶋義光: 遺伝子診療の現状と将来. *Mebio* 16 (6):98-102, 1999
- 福嶋義光: 遺伝カウンセリングの基礎と応用. *小児科診療*62 (7):971-976, 1999
- 福嶋義光, 玉井真理子: 遺伝医療におけるサポートグループとの連携. *小児科診療*62 (7):994-997, 1999
- 福嶋義光: 遺伝子解析の進歩と遺伝子診療. *総合臨床*48: 29-36, 1999
- 福嶋義光: 第1節 遺伝子・染色体異常. 第4章 精神遅滞の出生前要因・分類・疫学「発達障害の基礎 (有馬正高監修)」, 日本文化科学社, 1999, pp.151-172
- 福嶋義光: 遺伝疾患の遺伝子診断. 「分子予防医学 (松島綱治編)」, 医学書院, 1999, pp.286-294

2. 学会発表

- 福嶋義光: [シンポジウム] 出生前診断とその問題点 2) 遺伝医学の視点から. 第102回日本小児科学会学術集会 (東京), 1999.4.23-25
- 新川詔夫, 富田博秋, 松本正, 山田浩喜, 近藤新二, Gadhani Mohsen, 中村祐輔, 池川志郎, 福嶋義光, 涌井敬子, 松尾雅文, 蒔田芳男: 遺伝子病家系における連鎖解析. 第9回Medical Genetics研究会 (東京), 1999.6.19-20
- 櫻井晃洋, 一ノ瀬良樹, 涌井敬子, 橋爪潔志, 福嶋義光: Anticipationを認める海綿状血管腫の1家系. 第9回Medical Genetics研究会 (東京), 1999.6.19-20
- 涌井敬子, 日高恵以子, 石川雅世, 勝山努, 福嶋義光: 染色体の構造異常解析におけるSKY法の有用性と限界. 第9回Medical Genetics研究会 (東京), 1999.6.19-20
- 関博, 久保田健夫, 涌井敬子, 高岡邦夫, 福嶋義光: 多発性外骨腫の遺伝子変異解析. 第9回Medical Genetics研究会 (東京), 1999.6.19-20
- 久保田健夫, 関博, 安達瓦, 涌井敬子, 那須民江, 福嶋義光: 腫瘍組織における遺伝子のメチル化異常. 第9回Medical Genetics研究会 (東京), 1999.6.19-20
- 福嶋義光, 上野一郎, 久保田健夫, 涌井敬子, 関博,

- 櫻井晃洋, 玉井真理子, 藤森実: 遺伝子診療の Pitfall. 第9回 Medical Genetics 研究会 (東京), 1999.6.19-20
- 福嶋義光: [シンポジウム] 胎児医療と生命倫理 (2) 遺伝診療部の立場から. 第39回日本先天異常学会学術集会 (鹿児島), 1999.7.14-16
- 新川詔夫, 中村祐輔, 福嶋義光: 遺伝子病家系における連鎖解析. 第6回日本遺伝子診療学会大会 (名古屋), 1999.7.30-31
- 福嶋義光: [シンポジウム] 遺伝子診療の現状と方向 (2) 遺伝子診療部について. 第6回日本遺伝子診療学会大会 (名古屋), 1999.7.30-31
- T. Kubota, H. Seki, K. Wakui, W. Adachi, T. Nasu, Y. Fukushima: Aberrant DNA methylation occurs in multiple genes in esophageal cancer tissues. 49th Annual Meeting of the American Society of Human genetics, 1999.10.19-23. San Francisco, USA
- E. De Baere, E. Roman, Y. Fykushima, K. Verhoeven, G. Van Camp, A. De Paepe, L. Messiaen: Exclusion of the β '-COP gene and identification of a novel candidate gene for the blepharophimosis syndrome (BPES). 49th Annual Meeting of the American Society of Human genetics, 1999.10.19-23. San Francisco, USA
- K. Wakui, T. Kubota, E. Hidaka, M. Ishikawa, T. Katsuyama, Y. Fukushima: Afamilial interstitial deletion of 21q. It is possible for a recessive gene responsible for mental retardation to exist within 21q11-21. 49th Annual Meeting of the American Society of Human genetics, 1999.10.19-23. San Francisco, USA
- H. Tomita, K. Yamada, N. Niikawa, Y. Nakane, S. Nagamitsu, T. Matsuishi, K. Wakui, Y. Fukushima, N. Kato: A Gene Responsible for Paroxymal Kinesigenic Choreoathetosis Mapped to Chromosome 16p11.2-q12.1. 49th Annual Meeting of the American Society of Human genetics, 1999.10.19-23. San Francisco, USA
- T. Wada, T. Kubota, Y. Fukushima, S. Saito: Clinical and Genetic characterization of 9 Japanese patients with X-linked α -thalassemia/ mental retardation (ATR-X) syndrome. 49th Annual Meeting of the American Society of Human genetics, 1999.10.19-23. San Francisco, USA
- 福嶋義光: [シンポジウム] 出生前診断と倫理 5) 遺伝カウンセリング. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 中根貴弥, 関博, 久保田健夫, 涌井敬子, 池田修一, 吉田邦広, 櫻井晃洋, 小池健一, 松本和彦, 藤森実, 二階堂敏雄, 金井誠, 中山淳, 玉井真理子, 福嶋義光, 村瀬澄夫, 山上浩志: 遺伝情報ネットワーク. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 和田敬仁, 久保田健夫, 福嶋義光, 齊藤伸治: X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-X) の ATRX 遺伝子解析. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 関博, 久保田健夫, 涌井敬子, 高岡邦夫, 福嶋義光: 多発性外骨腫の遺伝子変異解析. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 山田浩喜, 富田博秋, 吉浦孝一郎, 近藤新二, 新川詔夫, 雨宮次生, 涌井敬子, 福嶋義光, 池川志郎, 中村祐輔, 石田貴文, 松尾雅文, 松本正, 孫田信一: 遺伝性後極白内障原因遺伝子の20番染色体への局在同定. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 久保田健夫, 関博, 涌井敬子, 那須民江, 福嶋義光: 食道癌におけるDNAメチル化異常: p16, p15, E-cad, H-cad, SNERPN 遺伝子の解析. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 富田博秋, 山田浩喜, 近藤新二, 新川詔夫, 中根充文, 涌井敬子, 福嶋義光, 永光信一郎, 松石豊次郎, 小西徹, 南光信一郎, 加藤進昌, 高木利久, 中村祐輔: 発作性運動性コレオアテトーシスの連鎖解析. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- モーセン・ガダミ, 山田浩喜, 近藤新二, 新川詔夫, 富田博秋, 蒔田芳男, 吉田邦広, 涌井敬子, 福嶋義光: エンゲルマン病の連鎖解析. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 涌井敬子, 福嶋義光: 疾患に関連する染色体均衡型構造異常症例のデータベース化と株化細胞保存の重要性. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 石川雅世, 日高恵以子, 涌井敬子, 福嶋義光, 勝山努: SKY法と各染色体腕特異的テロメアプローブを用いたFISH法による染色体構造異常の解析. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 三井規雅, 當間隆也, 松嶋一成, 西田俊朗, 大橋博文, 福嶋義光, 新川詔夫: 染色体顕微切断彩色法による由来不明構造異常染色体の診断. 日本人類遺伝学会第44回大会, 1999.11.17-19, 仙台
- 五石圭司, 中村友彦, 田村正徳, 江木晋三, 小木曾嘉文, 福嶋義光: 副腎機能不全症状と高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22回小児遺伝医学会学術集会, 1999.11.4-5, 東京
- 永井敏郎, 外木秀文, 大橋博文, 長谷川知子, 福嶋義光, 黒木良和, 松尾宣武, 新川詔夫: 日本人 Prader-Willi 症候群の縦断的成長曲線の完成. 第22回小児遺伝医学会学術集会, 1999.11.4-5, 東京
- 五石圭司, 中村友彦, 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22回小児遺伝医学会学術集会, 1999.11.4-5, 東京
- G. 知的所有権の取得状況
なし

分担研究報告書

慢性関節リウマチ関連遺伝子の検出に関する研究
分担研究者 山本 一彦 東京大学医学部アレルギー・リウマチ内科教授

研究要旨

多因子遺伝疾患である慢性関節リウマチの関連遺伝子を単塩基多型の高密度遺伝子地図を用いて検出する研究の初期段階として、慢性関節リウマチ関連遺伝子につき SNP の体系的検出を行った。また、SNP の遺伝子型分けによる関連遺伝子の検出を大規模に進めるための基礎的検討を行った。

A. 研究目的

慢性関節リウマチ (RA) は、日本を含む全世界にわたり約 1%の罹患率を持つ比較的頻度の高い疾患のひとつである。その病態は、その名の通り慢性の経過をたどり、多関節を侵し関節・骨の破壊・強直を引き起こすとともに、多様な関節外病変を呈する。疾患の進行と共に少なからぬ患者が重大な身体機能障害をこうむり、その個人的・社会的不利益は看過しがたいものがある。

RA は歴史的に少なくとも中世よりその存在が確認され、治療努力・病因解明の努力が営々と続けられてきたにも関わらず、治療は内科的・整形外科的・リハビリテーション科的な対症的な方策に留まり、その成果も十分と言うにはほど遠いのが実状である。

一方病因に関しては、以前より環境要因と遺伝要因の両者が複雑に絡み合った結果、発病及び病態の決定がなされると考えられてきている。その環境要因は確定したものが未だない。他方、RA は多因子遺伝疾患に分類され、以下に示すように相当量の研究が蓄積されている。

複数の双生児研究・同胞研究により、一卵性双生児相対危険率 12^{62} 、同胞相対危険率 2^{17} とされている。またヒト組織適合抗原(HLA)クラス II DRB の抗原認識部位に存在するあるタイプの多型との関連(Shared Epitope 仮説)が複数の人種・民族において繰り返し検出されている。しかしながら、罹患同胞対を用いた連鎖解析研究は、RA の遺伝要素の

少なからぬ部分が非 HLA 領域に存在する遺伝子に由来することを示唆している。これらの研究の結果を総合しそれに遺伝学的検討を加えると、RA 関連遺伝子は非 HLA 領域に複数存在し、それら各々の遺伝子型相対危険率(Genotypic Risk Ratio ; GRR) は高々 2 程度と予想される。

このような状況の中、RA 関連遺伝子を同定することは同病の原因究明及び治療法の開発・確立への適切な方途であると考えられる。

B. 研究方法

RA をはじめとする罹患率が高い多因子遺伝疾患への最適なアプローチ法は確立していない。しかしながら高密度の遺伝子多型マーカーを用いた関連解析及び連鎖不平衡解析がシミュレーション研究から有力視されている。我々もこの手法を採用し、1) 使用する多型マーカーの検出・選定、2) ケースコントロール スタディ形式での遺伝子型の同定、3) その統計的解析の3段階で研究を進めることとした。

1) 使用する多型マーカーの検出・選定

ヒトゲノム上で最も高密度に存在する多型は単塩基多型(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)である。この多型を疾患関連遺伝子解析に用いることの利点は、その密度の他に遺伝子型同定の容易さと解析の簡便性が挙げられる。SNP はその大部分が 2 つの対立遺伝子型(Biallele)を持つ。このことが、遺伝子型同定を容易にするとともに、解析をも簡単

にする。この Biallele であるという性質は多型解析上の情報量が他の多型 (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism、VNTR; Variable Number of Tandem Repeat、マイクロサテライトマーカー) に比べ少ないことをも意味するが、上記の利点はその欠点を補って余りあると判断され、我々の RA 関連遺伝子検出に用いることとした。

用いた SNP の検出方法は以下の通りである。計 48 人分のゲノム DNA を 3 人ずつ 16 組に分けた。その DNA をテンプレートとして RA に関連すると想定される遺伝子の Exon 領域と 5'-flanking 領域を中心にその周辺領域に対し PCR を行いその産物を用いて Sequence 反応を経て多型を検出した。

2) ケース-コントロール スタディ形式での遺伝子型の同定

RA 関連遺伝子の GRR は低いので、その関連検出のためには、千の単位の検体が必要であることが遺伝学的シミュレーション研究から判明していた。従って高密度マーカーを用いた我々の研究においては、各マーカーを比較的少数の検体の遺伝子型を同定 (Screening Genotyping) し、その結果から検体規模を大きくして解析するに足るマーカーか否かの判定を下し、しかる後に大規模遺伝子型同定作業へと移行することとした。Screening Genotyping には Allele Specific Oligonucleotide-hybridization Assay を用いた。(今回の報告の時点では、Screening Genotyping のみを実施し、大規模 Genotyping を行うか否かの判定基準を設定するためのデータとして活用した。)

3) その統計的解析

この研究の流れの中で、この解析作業は不可欠である。しかしながら、大規模な多点関連解析が最適か、連鎖不平衡 Mapping を用いる方が良いかは、遺伝統計学の分野で検討が進められている分野であり、解析法の進展に合わせて対応して行くべき問題である。また現時点では大規模 Genotyping の段階へと進んでおらず、このセクションの方法は未決である。

C. 研究結果

1) 使用する多型マーカーの検出・選定

RA の 41 候補遺伝子において多型を検出し、以下のような結果が得られた。

104kb (Coding Region 30kb、Non-coding Region 74kb) をスクリーニングし、163 Polymorphism を検出した。そのうち 142 は SNP であり、残りは Insertion または Deletion であった。平均 638 塩基に 1 つの Polymorphism が検出された。Coding Region では平均 963 塩基に 1 つ、Non-Coding Region では 562 塩基に 1 つ検出された。Coding Region の SNP は 31 検出され、そのうち 16 がアミノ酸変化を伴った。SNP の Minor Allele Frequency の分布は 15%以上が 71% を占め、5-15%が 17%、5%以下が 12%であった。

2) ケース-コントロール スタディ形式での遺伝子型の同定

36 遺伝子 41 SNP にかついで患者 96 人、コントロール 96 人の Screening Genotyping を行った。そのうち 2 遺伝子 2 SNP において患者-コントロール間で χ^2 値 (自由度 1) で 4~7 (p value < 0.05) の統計学的有意差を見いだしたが、これらに関して患者数・コントロール数を 2 倍にしたところどちらも有意差は消失した。

D. 考察

我々の SNP に関するデータはその密度やアミノ酸配列に及ぼす影響に関して、異なるタイプの遺伝子を用いて行われた他の SNP に関する報告と大きく異なるものではなかった。この SNP Screening の結果及び、その研究の過程で蓄積された方法上の知見は今後の SNP 研究に大きく貢献することとなった。

Genotyping の結果はそれ自体では RA 関連遺伝子の同定には到らなかったが、今後の大規模解析への予備的資料として以下のように活用された。GRR 1^{-2} の仮想遺伝子に対して、大規模 Genotyping を行ったと仮定したシミュレーションを行い、その結果をこれら 41 SNP の Screening Genotyping の結果と照合することにより、大規模 Genotyping に進むべきマーカーは 96 対 96 の Screening Genotyping にて χ^2 値 (自由度 1) として 1~1.5 を Cut-off 値とするのが適当であるようであった。

E. 結論

RA 関連遺伝子を SNP 高密度遺伝子地図を用いた方法で検出する研究は多段階を必要とするものであるが、ヒトゲノム解析に関する研究班の分担研究として、その初期段階を終了し今後のさらなる研究の礎となるものであった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada R et al : Identification of 142 Single Nucleotide Polymorphisms in 41 Candidate Genes for Rheumatoid Arthritis in the Japanese population, 2000 (In press)

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

特になし

Ihara epileptic rat (IER)のpentylentetrazole誘発痙攣に関与する遺伝子の

quantitative trait loci (QTL)解析による遺伝子座の特定に関する研究

分担研究者 天野 殖 京都大学医療技術短期大学部 教授

研究要旨 IERのてんかん原因遺伝子のクローニングを最終目標として、pentylene-tetrazole誘発痙攣を量的形質と捉え、戻し交雑仔を用いたDNAプール法により、IERの全染色体についてquantitative trait loci (QTL)解析を行った。その結果、pentylene-tetrazole誘発痙攣に関与する主働遺伝子の一つが、ラット第1染色体テロメア近傍に存在することが明らかとなった。

A. 研究目的

イハラてんかんラット (Ihara epileptic rat : 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。てんかん原因遺伝子のクローニングを最終目的として、我々は現在までに、その第1段階として自然発症てんかんを表現型として、連鎖解析法で染色体マッピングを試みてきた。てんかん発作を自動てんかんモニター装置を使用して観察したが、IERで出現する典型的な強直・間代痙攣発作は、戻し交雑仔個体ではほとんど認められず、自然発症のてんかん発作を質的形質と捉えて連鎖解析することは不可能であった。このことより、IERのてんかん発作に関与する遺伝子は複数存在し、それらの相互作用で決定されていると考えられた。自然発症てんかんを表現型として連鎖解析することが不可能であったので、一般的な痙攣誘発物質であるpentylentetrazoleを投与することにより誘発される痙攣の、発作型と潜時を量的形質として捉え、IERのてんかん発作形質の量的形質遺伝子座 (quantitative trait loci : QTLs) を、戻し交雑仔にpentylentetrazoleを投与し、DNA pool法を用いてQTL解析を行った。

B. 研究方法

pentylentetrazole誘発実験がQTL解析に有効かどうかの判定のために、以下の予備実験を行った。

IER (雌雄、8週齢) と非てんかん対照WKY/Izm (雌雄、8週齢) の各々にpentylentetrazoleを投与し痙攣誘発を観察した。IERに比してWKY/Izm

では痙攣誘発閾値が明らかに高く、それらの形質はF1ではWKY/Izmとほぼ同様の痙攣誘発閾値を示すのに対し、F2では痙攣誘発閾値は広範に分布した。雌雄間ではほとんど同様の結果を示した。従って、pentylentetrazole誘発痙攣の閾値は、複数の常染色体上の遺伝子によって支配されていると考えられた。

両親系統としてIER (雄) とWKY/Izm (雌) を用いてF1雑種を生産し、この雌をIER (雄) に戻し交配して得られたbackcross世代56匹 (雌雄) を作成し、本実験に使用した。8週齢の各動物にpentylentetrazoleを腹腔内投与 (60mg/kg) し、誘発される痙攣型を以下のように評価し、同時に潜時も観察した。(stage 0 : 痙攣なし、stage 1 : 全身のピクツキや上肢の異常運動、stage 2 : 全身の強直発作を示すが卒倒はしないもの、stage 3 : 全身の強直間代発作を生じ卒倒する、ないしは死亡するもの)。

発作型が最も重篤なstage 3を生じ、かつ発作誘発までの潜時が9分までの動物をhigh sensitive group (11個体) とし各動物から等量のgenomic DNAを採取して、high sensitive poolを作成した。一方、全く痙攣が誘発されなかったstage 0の動物をnon sensitive group (11匹) とし各動物から等量のgenomic DNAを採取して、non sensitive poolを作成した。それぞれのpoolをサンプルとして、マイクロサテライトマーカーを全ての染色体で20cM間隔で設定してPCRを行ない、high sensitive poolとnon sensitive poolの間で、視覚的にバンドの形成に差があるかどうかを調べた。

動物実験は、滋賀医科大学医学部の動物実験に関するガイドラインに準じて行なわれた。

C. 研究結果

雄34個体においてはstage 0が5個体、stage 1が5個体、stage 2が11個体、stage 3が13個体であった。それぞれの潜時はstage 1が 2.4 ± 0.9 、stage 2が 5.2 ± 6.7 、stage 3が 3.8 ± 3.7 (平均 \pm 標準偏差 (分)) であった。雌24個体においてはstage 0が6個体、stage 1が2個体、stage 2が2個体、stage 3が14個体であった。それぞれの潜時はstage 1が 2.0 ± 0.0 、stage 2が 22.5 ± 2.1 、stage 3が 14.8 ± 10.1 であった。

DNA pool法を用いて、現在までラットの全染色体の約50%を検査した結果、ラット第1染色体テロメア近傍にIERに特異的なバンドの偏りを認めた。一方、ラット第3染色体およびラット第18染色体上にnon sensitive poolとIERが相関するマーカーが認められた。

D. 考察

これまでいくつかのてんかんモデル動物が開発されて来ているが、それらの遺伝子クローニングは必ずしもうまくいっていないのが現状である。その原因の一つとして交配実験により雑種世代、戻し交雑仔子世代では、痙攣発作が表現型として明瞭に確認することが出来なくなってしまうことが挙げられる。この事実はてんかん遺伝子が複数の遺伝子により支配されているであろうことも示唆している。

IERの連鎖解析による異常遺伝子の染色体マッピングプロジェクトでも同様の問題が生じた。この研究方法上の問題を解決する一つの手段として、IERにてんかん誘発剤を投与し、痙攣誘発閾値と発作出現までの潜時を量的形質としてとらえQTL解析を行った。

結果で示されたとおりラット第1染色体テロメア近傍の領域にIERに特異的なバンドの偏りを認めた。pentylentetrazole誘発性痙攣形質が、自然発症てんかん形質と完全に一致しているという保障はない。しかしながらカイニン酸を用いたIERの痙攣誘発実験では、IERでは対照非てんかんラットに比して著明に誘発閾値が低かった。従ってpentylentetrazole誘発性痙攣形質と、自然発症てんかん形質が密接に関連していると考えられる。このような痙攣誘発性実験が今後のてんかんモデル動物の連鎖解析実験に有効な手段となることが期待される。

現在までラット第1染色体テロメア近傍の領域痙攣を誘発するような機能を有する遺伝子の報告はない。従って、このQTLは新しい遺伝子の部位

を特定できた可能性がある。このQTLの他に、ラット第3染色体およびラット第18染色体上には痙攣抑制に働く遺伝子が存在する可能性がある。IERにおけるpentylentetrazole誘発痙攣は、これらの複数の遺伝子が相互に関与して生じているものと考えられた。

E. 結論

pentylentetrazole誘発痙攣に関与している遺伝子のQTLを特定し、痙攣抵抗性を示す遺伝子の存在も考えられた。今後は、全染色体を網羅した、QTL解析を完成させ、詳細な連鎖地図の作成、遺伝子の同定を行なう予定である。最終的に同定された遺伝子の機能を特定するために、遺伝子改変動物の作出する必要がある。痙攣発症に関与する遺伝子を同定することで、ヒトにおける抗痙攣治療をより有効かつ効率的なものにすることにつながるものと思われる。

F. 研究発表文献

1. 論文発表

1. 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*, 19:181-189, 1999
2. S.Amano, Is Ihara's genetically epileptic rat an adequate model for studying human temporal lobe epilepsy? Verification of suitability from the clinical and pathomorphological perspectives, *Neuropathology*, 19:209-216, 1999
3. 安田 新、天野 殖、伊原信夫、森田邦彦、石田展弥、加藤進昌、 遺伝性てんかんラット(IGER)の自然発症発作に対する抗てんかん薬の効果、*滋賀医科大学雑誌*、13:41-41, 1999
4. 横山正男、天野 殖、辻 篤史、伊原信夫、芹川忠夫、挟間章忠、 遺伝性てんかんラット(IGER)におけるてんかん原因遺伝子座の染色体マッピング、*滋賀医科大学雑誌*、13:49-52, 1999
5. 辻 篤史、天野 殖、横山正男、半田譲二、挟間章忠、 遺伝性てんかんラット(Ihara's genetically epileptic rat:IGER)の神経病

理学的異常：原因遺伝子のクローニングにむけて、滋賀医科大学雑誌，13:53-56，1999

6. Tsuji A., Amano S., Yokoyama M., Fukuoka J., Sasahara M., Ihara N., Hazama F., Handa J. Hereditary neuronal microdysgenesis and acquired lesions in the hippocampal formation of Ihara epileptic rat, *Epilepsia* (in press)
7. Amano S, Ikeda M, Uemura S, Fukuoka J, Tsuji A, Sasahara M, Hayase Y, Hazama F, Mossy fiber sprouting in the dentate gyrus in a newly developed epileptic mutant, Ihara epileptic rat, *Brain Res* 834:214-218, 1999

2. 学会発表

1. Y. Miura, H. Kitahara, S. Amano, J. Fukuoka, N. Ihara, Effects of antiepileptics on two different types of seizures in a novel epileptic mutant rat (IGER), 第87回日本薬理学会、札幌、1999, 3, 25
2. 早瀬ヨネ子、天野 殖、笹原正清、片岡秀夫、福岡順也、伊原信夫、イハラてんかんラット (IER) の脳における GABA transporter-1 (GAT-1) の発現動態、第 88 回日本病理学会総会、東京、1999, 4, 6
3. 片岡秀夫、天野 殖、福岡順也、笹原正清、早瀬ヨネ子、伊原信夫、Ihara epileptic rat (IER) の脳内におけるミクログリア動態研究、第 88 回日本病理学会総会、東京、1999, 4,
4. 辻 篤司、天野 殖、横山正男、福岡順也、片岡秀夫、笹原正清、早瀬ヨネ子、伊原信夫、芹川忠夫、松田昌之、イハラてんかんラット (Ihara epileptic rat: IER) に認められる微小神経形成異常の責任遺伝子の染色体マッピング、第 88 回日本病理学会総会、東京、1999, 4, 6
5. 福岡順也、天野 殖、笹原正清、片岡秀夫、早瀬ヨネ子、辻 篤司、伊原信夫、イハラてんかんラット (IER) 海馬に見られる微小形成異常の病理発生：BrdU を用いた神経細胞の移動の解析、第 88 回日本病理学会総会、東京、1999, 4, 6
6. 天野 殖、王 妍、今本喜久子、片岡秀夫、福岡順也、笹原正清、早瀬ヨネ子、伊原信夫、イハラてんかんラット (IER) 海馬に見られる微小神経形成異常の電顕的研究、第 88 回日本病理学会総会、東京、1999, 4, 6
7. S. Amano, A. Tsuji, M. Yokoyama, J. Fukuoka, T. Serikawa, R. Torii, N. Ihara, Chromosomal mapping of epilepsy- and neuronal microdysgenesis in a newly developed epilepsy mutant, Ihara epileptic rat. Focus on Epilepsy V, Quebec, Canada, May 18, 1999
8. 早瀬ヨネ子、笹原正清、福岡順也、片岡秀夫、天野 殖、イハラてんかんラット (IER) の脳における GABA transporter-1 (GAT-1) の発現動態、日本神経病理学会
9. H. Kataoka, S. Amano, J. Fukuoka, Y. Hayase, M. Sasahara, R. Torii, N. Ihara, Microglial activation in the brains of a novel epileptic mutant, Ihara epileptic rat (IER), 23d International Epilepsy Congress, Prague, Checo, Sep. 14, 1999,
10. S. Amano, Y. Miura, H. Kitahara, J. Fukuoka, N. Ihara, Effects of antiepileptics on two different types of seizures in a novel epileptic mutant rats (IER), 23d International Epilepsy Congress, Prague, Checo, Sep. 14, 1999
11. Tsuji, S. Amano, M. Yokoyama, J. Fukuoka, M. Sasahara, Y. Hayase, N. Ihara, M. Matsuda, Hereditary neuronal microdysgenesis and acquired lesions in the hippocampal formation of Ihara epileptic rat (IER) 23d International Epilepsy Congress, Prague, Checo, Sep. 14, 1999
12. 福岡順也、天野 殖、笹原正清、片岡秀夫、早瀬ヨネ子、辻 篤司、伊原信夫、イハラてんかんラット (IER) の海馬の微小神経形成異常の病理発生：BrdU を用いた神経細胞移動の経路並びにその時期のトレース実験、第 33 回日本てんかん学会、仙台、1999, 10, 23
13. 辻 篤司、天野 殖、横山正男、福岡順也、笹原正清、早瀬ヨネ子、伊原信夫、芹川忠夫、松田昌之、イハラてんかんラット (Ihara epileptic rat: IER) の海馬に認められる微小神経形成異常の責任遺伝子の染色体マッピング 第 33 回日本てんかん学会、仙台、1999, 10, 23
14. 早瀬ヨネ子、天野 殖、福岡順也、辻 篤司、笹原正清、伊原信夫、芹川忠夫、定量 RT-PCR

- およびin situ hybridizationによるイハラてんかんラット(IER)海馬におけるGABA合成酵素(GAD), GABA受容、GABA transporter (GAT)の各mRNA発現の解析、第33回日本てんかん学会、仙台, 1999, 10, 23
15. 辻 篤司、天野 殖、横山正男、福岡順也、笹原正清、早瀬ヨネ子、伊原信夫、芹川忠夫、松田昌之、イハラてんかんラット(Ihara epileptic rat:IER)の微小神経形成異常の責任遺伝子の染色体マッピング、第58回日本脳神経外科学会、東京, 1999, 10、
16. 辻 篤司、天野 殖、横山正男、福岡順也、笹原正清、早瀬ヨネ子、伊原信夫、芹川忠夫、松田昌之、イハラてんかんラット(Ihara epileptic rat: IER)の海馬微小神経形成異常の責任遺伝子の染色体マッピング、第16回日本疾患モデル動物学会、
17. Amano S., Ihara epileptic rat : A novel epileptic mutant with various seizure patterns. Russian Academy of Science, Moscow ,1999, 9, 10,

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

クローン病の感受性遺伝子のマッピング

分担研究者 名川 弘一 東京大学医学部腫瘍外科 教授

研究要旨

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し、全国より収集した 42 組の同胞発症例を対象として、罹患同胞対法による連鎖解析を行った。第 7、8、10、12 染色体上の領域において、同胞間の対立遺伝子の共有率は高値を示し、連鎖の可能性が示唆された。第 7、10、12 染色体上の領域には白人と共通な感受性遺伝子が、第 8 染色体上の領域には日本人において特に重要な役割を果たす感受性遺伝子が存在するものと考えられる。

A. 研究目的

クローン病は原因不明の炎症性腸疾患であり、遺伝的素因に環境要因が加わって発症に至る多因子疾患と考えられている。最近、白人を対象とした連鎖解析により感受性遺伝子座が明らかとなってきたが、人種や地域により個々の遺伝子座の重要性は異なるものと考えられている。本研究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 42 組 (84 例) のクローン病同胞発症例を収集し、ゲノム全体にわたる 343 個のマイクロサテライトマーカーを用いて、遺伝子型タイピングを行った。罹患同胞対法に基づき、患者同胞間の対立遺伝子の共有率を MAPMAKER/SIBS プログラムにより解析した。その結果、共有率が高値を示した領域と現在までに連鎖が報告されている領域について、42 個のマーカーを追加し、詳細に検討した。

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、42 組の解析を終了した。

第 7、8、10、12 染色体上に同胞間の対立遺伝子の共有率が高値を示す領域を認めた。連鎖の指標となる Multipoint maximum lod score (MLS) は 1.5 を超え、これらの領域にクローン病の感受性遺伝子座が存在する可能性が示唆された。

Chr.	Marker	Two-point MLS	Multipoint MLS	Allele sharing
7	D7S492	1.24	1.70	0.66
8	D8S1759	1.35	1.51	0.64
10	D10S548	1.24	1.72	0.67
12	D12S345	0.92	1.57	0.67

D. 考察

クローン病の感受性遺伝子座については、欧米各国で連鎖解析が行われ、第 7、10、12、16 染色体などの数ヶ所の領域が候補として挙げられている。

本研究では、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唆する結果が得られた。これらのうち第 7、10、12 染色体上の領域は現在までの報告と一致し、感受性遺伝子の存在が確定的となった。第 8 染色体上の領域は報告されていない新規のものであり、日本人において特に重要な役割を果たす感受性遺伝子が存在するものと推定される。この領域には腸管免疫に関与する defensin の遺伝子が存在し、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、8、10、12 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

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 自己免疫性甲状腺疾患である Graves 病、橋本病の罹患同胞対 102 家系 102 組に対して全ゲノムスキャンを施行し、罹患同胞対法による多点連鎖解析を行った結果、5 番染色体長腕の D5S436 で Multipoint Lod Score (MLS) が 3.04 を、又、橋本病において 8 番染色体長腕の D8S272 で MLS が 2.40 を示した。更に、MLS \geq 1 となる領域をその他に 9 個同定した。これらの結果により、自己免疫性甲状腺疾患に共通の遺伝子が D5S436 近傍に、又橋本病に特異的な遺伝子が D8S272 近傍に存在すること、および自己免疫性甲状腺疾患に複数の遺伝子が関与することが明らかになった。

A. 研究目的

免疫システムにおける自己寛容が破綻して発症する自己免疫疾患は、複数の遺伝要因と複数の環境要因の相互作用により発症する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疾患において、第 1 の遺伝要因として、ヒト主要組織適合抗原複合体 (HLA) 遺伝子との連鎖、あるいは特定のプロタイプとの正の相関が報告されている。T 細胞が HLA により提示された抗原ペプチドを T 細胞受容体により認識し、抗原特異的な免疫応答が惹起されることを考慮するならば当然の結果とも考えられる。しかしながら、HLA のみで自己免疫疾患の発症を説明することは不可能である。自己免疫疾患を広義に捉えると、その罹患率は世界的に 4% にも及び、又、中には重篤な経過をとる症例も存在することを考えるならば、自己免疫疾患の発症の分子機構を解明することは現代医療に課せられた急務であると考えられる。甲状腺特異的な自己免疫疾患 (Autoimmune Thyroid Diseases; AITD) である Graves 病 (GD)、橋本病 (HT) においては、1) 多発家系の存在、2) twin study、

3) 協同研究者である笹月らにより報告された HLA との相関 (GD では HLA class I A*0206、HLA class II DPB1*0501、HT では HLA class I A*0207、HLA class II DRB4 *0101)、により遺伝要因の存在が強く示唆されてきた。又、Graves 病、橋本病の混在する家系、Graves 病より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、AITD 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

1. AITD の罹患同胞対の情報収集と末梢血採取

甲状腺専門病院である伊藤病院（東京）、隈病院（神戸）の協力を得て、罹患同胞対の情報収集・検体収集を行った。その際、下記に示した倫理面への配慮を十分に注意してインフォームド・コンセントを書式化し、患者に署名、捺印をして頂いた。記号化され採取された末梢血は九州大学・生体防御医学研究所・遺伝学部門

に送付され、DNA の抽出が行われ、-20℃にて保存・管理がなされた。

2. AITD-102 家系 102 罹患同胞対に対する全ゲノムスキャンニング

本年度までに、102 家系の AITD の罹患同胞対 (GD-GD pair, 68 組; GD-HT pair, 19 組; HT-HT pair, 15 組) の DNA 抽出を終了した。これらの DNA に対して ABI 社の 400 個の microsatellite marker (マーカー間の平均距離は約 10 cM) を PCR 法にて増幅させ、アガロースゲルにて PCR 産物を確認後、ABI377XL のオートシーケンサーを用いて泳動させた。Gene Scan、Genotyper ソフトを用いて各個人のマーカーのアリルの同定を行い、全ゲノムスキャンを行った。

3. 罹患同胞対法による連鎖解析

各マーカーにおける個人のアリルの情報および各マーカー間の距離を基に、MAPMAKER/SIBS のプログラムを用いて罹患同胞対法による multipoint の Lod スコアを算出した。又、各マーカーにおける single point の Lod スコアも算出した。

(倫理面への配慮)

AITD の情報収集、末梢血の採取、および DNA を用いる解析については、1) 主治医より患者に、書面および口頭によりこの研究の目的および期待される成果につき十分に説明してもらい、次回の来院までに患者に家族も含めた賛同が得られるか否かを検討して頂き、同意が得られた症例については、更にインフォームド・コンセントを書式化したものに署名捺印してもらった後に、末梢血が採取されるよう行った。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するよう努めた。九州大学生体防御医学研究所に送付された記号化により識別される末梢血より DNA を抽出し、-20℃で保存管理を行った。

C. 研究結果

102 家系 102 組の罹患同胞対に対して最大 Lod スコアを算出し、Lod スコア ≥ 1 となるマーカー、11 個を下記に示した。

マーカー名 (Multipoint の Lod スコア、Single point の Lod スコア) で表示した。

D1S498 (1.64, 2.30) 、 D1S425 (1.56, 1.70) 、
D5S407 (1.20, 1.20) 、 D5S436 (3.03, 1.75) 、
D8S272 (1.72, 1.26) 、 D10S189 (1.04, 0.82) 、
D12S336 (1.45, 1.36) 、 D12S324 (1.20, 1.29) 、
D14S258 (1.57, 3.04) 、 D15S120 (1.14, 0.95) 、
D22S423 (1.25, 1.57)

D. 考察

1. 第 5 番染色体長腕

5 番染色体長腕のマーカー D5S2115-D5S436-D5S410 は 5q31-33 領域に一致し、この領域にはサイトカイン等の免疫関連遺伝子が多数存在する。Lod スコアは D5S2115 (2.71, 2.34) -D5S436 (3.03, 1.75) -D5S410 (2.37, 1.43) であり、MLS が 3.03 であった D5S436 を挟むマーカーの single point の Lod スコアも高いことより、この領域に AITD に関与する分子が存在することが強く推定される。この領域には、未知の遺伝子が少なくとも 100 個以上あるとの報告もあり、免疫の機能に直接に関与する未知の遺伝子が AITD の疾患感受性を規定している可能性があると考えられる。

2. 第 8 番染色体長腕

8 番染色体長腕の末端側に位置する D8S514-D8S284-D8S272 の Lod スコアは AITD 全体として (1.15, 1.61) - (1.27, 0.45) - (1.72, 1.26) であったが、GD-GD 組と HT-HT 組の罹患同胞対に分類して Lod 値を算出すると 68 組解析した GD-GD の対で (0.20, 0.60) - (0.35, 0.18) - (0.50, 0.30) 、15 組のみ解析した HT-HT の対で (2.25, 1.37) - (2.35, 0.70) - (2.40, 1.85) の Lod 値を得ることができた。このことは、8

番染色体長腕に橋本病の発症に特異的な感受性遺伝子が存在することが推定される。橋本病のみの罹患同胞対の数を増やして、再検定することが急務である。この領域には、甲状腺特異的なサイログロブリン遺伝子が存在し、サイログロブリンの多型が免疫応答の制御に重要な役割を果たしている可能性もあると考えられる。

3. 全体的考察

GD-GD68 組、GD-HT19 組、HT-HT15 組の系102 組の AITD の罹患同胞対に対して、全ゲノムスキャンを行い $MLS \geq 1$ となる領域を複数個同定することができた。その中でも、免疫関連遺伝子が多数存在する 5q31-33 に位置するマーカーで MLS が 3.03 を呈示したことは、この領域に AITD 全体、即ち GD、HT に共通の疾患感受性遺伝子が存在することが強く推定される。又、8 番染色体長腕では GD-GD では $MLS \leq 0.5$ であるが、15 組の HT 対により $MLS=2.40$ を呈示した。このことは、HT に強く関与する遺伝子が 8 番染色体長腕に存在すると考えられる。その他の全てのマーカーにつき、GD-GD と HT-HT で解析を行ったが、その他の領域でも 8 番染色体長腕ほど明らかではないが、GD-GD あるいは HT-HT のみの解析で MLS が AITD 全体の結果よりも高くなる領域が存在した。しかしながら、HT-HT の組は 15 組しか存在しないので、HT-HT の pair を増やして解析する必要性がある。

罹患同胞対法の統計学的処理を異なるプログラムを用いて行うことにより、これまでの結果を確認する。また AITD は明らかに女性に多数認められる疾患であることから、男性を含む組と含まない組に分類して解析する必要性もあると考えられる。さらに、笹月らにより報告されている HLA の特定のアリルの有無により解析を行う必要性があると考えられる。

今後は、suggestive な連鎖を示した領域につき、候補遺伝子法およびそれらの領域の EST につき、多型性の有無を解析し、健常群と患者群でそれ

らの多型性との相関の検定を行い、疾患感受性遺伝子そのものを同定し、その疾患における役割を解明することが最終的な目標となると考えられる。

E. 結論

自己免疫性甲状腺疾患である Graves 病 (GD)、橋本病 (HT) の罹患同胞対 102 組 (GD-GD、68 組; GD-HT、19 組; HT-HT、15 組) に対して 400 個のマイクロサテライトマーカーを用いて全ゲノムスキャンを行い、MAPMAKER/SIBS のプログラムにより、Multipoint Lod スコアを算出した結果、D5S436 で MLS が 3.03 を、また D8S272 において橋本病の罹患同胞対の解析で MLS が 2.40 と suggestive な連鎖を示した。このことは、D5S436 近傍に自己免疫性甲状腺疾患に共通の、又 D8S272 近傍に橋本病に特異的な疾患感受性遺伝子が存在することを示唆した。

F. 研究発表

1. 学会発表

白澤専二、酒井健司、山本健、笹月健彦、石川直文、伊藤国彦、玉井一、隈寛二、赤水尚史、谷村雅子：罹患同胞対法による自己免疫性甲状腺疾患の疾患感受性遺伝子座の同定、日本人類遺伝学会第 44 回大会、仙台、1999

研究協力者

笹月健彦（九州大学生体防御医学研究所 教授）