

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学研究事業

特定疾患遺伝子ヘテロ保因者に着目した老化性疾患の抑制
に関する地域長寿保健システムの構築に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 小泉 昭夫

平成13年(2001)年3月

目次

I. 総括研究報告	
特定疾患遺伝子ヘテロ保因者に着目した老化性疾患の抑制に関する 地域長寿保健システムの構築に関する研究	1
小泉 昭夫	
II. 分担研究報告	
1. 多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常の遺伝疫学と保健予防活動 に関する研究	9
小泉 昭夫	
2. 西日本における脊髄小脳変性疾患の遺伝疫学に関する研究	20
阿部 康二	
3. 代謝異常疾患における加齢による病態の修飾に関する研究	22
大浦 敏博	
4. 健康指標への影響の検討：岩手県東北部の健康マクロ指標 に関する研究	25
中屋重直	
5. 糖尿病候補遺伝子の検索に関する研究	28
山田 祐一郎	
6. 原発性全身性カルニチン欠損症ヘテロ保因者の加齢性心肥大 の動物モデル(JVS マウス)に関する研究	31
和田 安彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	34
IV. 研究成果の刊行物・別刷	39

厚生科学研究費助成（長寿科学研究事業）
総括研究報告書

特定疾患遺伝子ヘテロ保因者に着目した老化性疾患の抑制
に関する地域長寿保健システムの構築に関する研究

主任研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻
環境衛生学分野・教授

研究趣旨：一般住民において、多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常を有する頻度は、数十名に一名から数万人に1名と幅広い分布を示す。今回対象とした疾患は、早期の介入により老後のQOLの改善が可能である。このような遺伝子異常の多様な変異と老化過程での健康リスクに対して加齢過程でリスクを増加させる個人の同定が可能であり、これら遺伝子異常に対し公衆衛生的対策が望まれる。我々の研究結果は、遺伝子異常のあるものでは創始者変異が存在し地域に著しい偏りを有する一方、もう一つの例として創始者変異は存在せず、家系ごとに変異がことなり家系が全国に散らばる場合のあることが判明した。前者の場合には技術的に診断は容易であるが後者の場合には診断は困難である。また、ヘテロ保因者における健康障害は加齢とともに phenotype が変化することも判明した。さらに動物疾患モデルを用いた検討は関与する遺伝子の同定に役立つ可能性がしめされた。以上の研究成果は、ポストゲノム時代における中高年における保健活動のあり方を考える上で有用であると考えられる。

小泉 昭夫（京都大学大学院医学研究
科・社会健康医学系・健康要因学講座・環
境衛生学分野・教授（主任研究者）

阿部 康二（岡山大学医学部神経内科教
授）（分担研究者）

大浦 敏博（東北大学大学院医学研究
科・小児医学講座・小児病態学分野助教
授）（分担研究者）

中屋重直（岩手医科大学衛生学公衆衛生
学講座助教授）（分担研究者）

山田祐一郎（京都大学大学院医学研究
科・病態代謝栄養学助教授）（分担研究者）

和田安彦（秋田大学医学部衛生学助教授）
（分担研究者）

A. 研究目的

我々人類は多くの DNA の変異を有しており、これらの極少数のものは優性あるいは劣性遺伝形式で若年で疾病を発症する。しかしその他多く変異は生物学的要因である加齢や、社会的要因であるライフスタイルの修飾を受け原因が現在まで明らかでない老化性疾患の原因となる可能性が存在する。我々はこの様な仮説に立ち、老化性疾患の保健システムの構築を試みる。

具体的には以下の4点を検討する。

1) 変異遺伝子の出現頻度の偏り：わが国のように江戸期において遺伝的隔離を経験した国では変異遺伝子の地域的偏りが存

在すると考えられる。その場合には地域に特異的な Founder mutations として捕らえることができる。もう一つの偏りの可能性は、遺伝子の変異に由来する変異のしやすさである。この場合には家系毎に変異がことなり地域的な共通性はなくなるが変異という現象は全国で共通することになり、家系に特異的ながら国レベルでの課題となる。この様な観点から、変異遺伝子の出現頻度の偏りを、代謝性疾患であるリジン尿性蛋白不耐症、Hereditary hemorrhagic telangiectasia, Polycystic kidney, 家族性甲状腺腫、Hartnup disease (小泉)、および脊髄小脳変性症(阿部)の遺伝疫学をおこなった。

2) 遺伝子変異と加齢要因による相互作用：同一遺伝子異常に起因する疾患でも加齢より病像が大きく変化する可能性が存在する。さらに、高齢期で見出される原因不明の疾患の原因が特定疾患のヘテロ保因者に好発する場合が考えられる。我々は成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) (大浦) および全身性カルニチン血症ヘテロ保因者についてこの可能性を検証する(和田)。

3) マクロ指標での検出：地域的に偏りのある遺伝子変異で機能から健康リスクが予想される場合、地域健康マクロ指標から障害の発生頻度への影響が検出されるかどうか検討した(中屋)。

4) 動物モデルからのアプローチ：ヒトにおける遺伝子多型の影響を検出するためには候補遺伝子によるアプローチが有効である。我々は糖尿病(山田)をモデルとしラットモデルを用いヒト糖尿病に与える影響を検討した。

B. 研究方法

1) 多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常の遺伝疫学と保健予防活動：一般住民において、多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常を有する頻度は、数十名に一名から数万人に1名と幅広い分布を示す。これら遺伝子異常の内、あるものは早期介入により高齢期のQOLの改善が確実に期待できるため、高齢期の予後を左右する実行可能な保健政策として重要である。遺伝子異常の多様な変異と老化過程での健康リスクに対して加齢過程でリスクを増加させる個人の同定が可能であり、これら遺伝子異常に対し公衆衛生学的対策が望まれる。我々はポストゲノム時代の高齢者のQOLの低下に対する予防対策のあり方を視野に、①遺伝子異常の一般人口にける頻度の推定および②ハザードの大きさ、③早期診断の効果の程度、④早期発見の技術的可能性と倫理的妥当性など今後の予防対策のあり方の4点について検討した。

2) 西日本における脊髄小脳変性疾患の遺伝疫学：脊髄小脳変性症は加齢により重篤化する疾患の典型的疾患である。岡山市を中心とする山陽地域で、遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝疫学を展開した。

3) 代謝異常疾患における加齢による病態の修飾：先天性代謝疾患のあるものでは加齢による病態の修飾が想定される。成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) は、SLC25A13 の以上により発症する疾患である。本疾患を例として小児期から成人期における症状の変化を検討し、加齢と遺伝的要因の相互作用を検討した。

4) 健康指標への影響の検討：リジン尿性蛋白不耐症のヘテロ保因者は、岩手県東

北部に高頻度に見られる。加齢過程において SLC7A7 遺伝子の異常が加齢に腎疾患のリスク要因であるとの仮定のもとに疾病有病ならびに死亡の状況について疫学的に解析することを目的とした。

5) 糖尿病候補遺伝子の検索：豚ラ氏島で発現が増強する転写因子 TSC-22 の遺伝子変異を糖尿病患者と対照群で検索した。

6) 全身性カルニチン欠損症ヘテロ保因者の加齢による心筋症のメカニズムの解明：原発性全身性カルニチン欠乏症のモデルマウスのヘテロ個体を用い、加齢に伴うヘテロ保因者の心肥大のリスクを動物実験で確認し、発生機序を探るため、長期にわたる飼育実験を施行した。

以上の研究を通じて、ヘテロ保因者の健康影響についての保健システムの形成基盤、ヘテロ保因者の病態の加齢現象による修飾、ヘテロ保因者の健康リスクの地域健康マクロ指標での検出の可能性、有効な動物モデルの活用について明らかにすることを目的としている。

C 研究結果

1) 多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常の遺伝疫学と保健予防活動：

(1) 岩手県東北部における LPI の保因者の頻度は約 100 名に一名であり、極めて高い。費用は 1 名あたり 80 円であった。LPI の検出のための費用は、郵便代を除外すればほぼ一人あたり 80 円程度である。この地域で 1 名の患者発見のために要する費用は、最も頻度の高い宮古地区では、 $43000 \text{人} \times 80 \text{円} = 3440000 \text{円}$ であり、投資期間はこの地域の人口が約 10 万人であり年間出生が約 1500 名である

ことから、現状では、344 万円を 29 年に投資すればよいことになる。

一方、LPI の発症者は新生児期に発見することにより高アンモニア血症を予防でき著しく QOL を改善できる。

(2) Osler-Rendu-Weber 病：秋田県中央部の約 17 万の診療圏において 7 家系 18 名の HHT 患者を見出した。従ってこの地域における頻度は少なくとも 1 万人に 1 名以上の頻度と考えられる。

次にこれら 7 家系における臨床的形質について検討した。その結果高頻度に重篤な合併症である肺動静脈ろうが認められた。

以上から HHT については創始者変異は認められず多様な変異にも関わらず共通の臨床形質を示すこと事が明らかになった。

(3) Polycystic kidney

阪神間に在住する 8 家系約 15 名の参加を得た。

これら 8 家系は、家族歴で何れも Polycystic kidney の重篤な合併症である腎不全および脳動脈瘤の家族集積を認めた。特に中高年の突然死を 3 家系で証明した。

遺伝子座の同定は、家系が大きく連鎖解析が行なえる 1 家系を用い行なった。16 番染色体および 4 番染色体について連鎖解析を行い 16 番染色体に連鎖を認めた。その結果、PKD1 に分類された。創始者変異を想定し polycystin の変異を検索したが創始者変異は認められなかった。

(4) 地域特異的甲状腺腫の遺伝子検索
1990 年以降年度の秋田県における新生児甲状腺機能低下のマスクリーニングは、年間 12000 名を数え、そのうち約 1000 名に一名の頻度で高 TSH 血症が見出された。そのうち約 2/3 は恒常的に高 TSH

血症が見出され、残りの 1/3 は一過性の高 TSH 血症であった。この 10 年の間に、持続的に高 TSH 血症を示す発端者にたいし家族歴を調査したところ 2 家系で 3 世代に渡り甲状腺腫が見出された。

また 2 家系において IBD (Identical by descent) は証明されず、それぞれ同一遺伝子における異なる変異の存在が示唆され、変異の多様性が想定された。

(5) Hartnup disease (HD)

わが国における Hartnup 病の家系を用い連鎖解析を行なった。この 2 家系とも近親紐が認められたため Homozygosity mapping を行なった。

その結果 Fig. 6 に示すように 5 番染色体 15.3 に連鎖が証明された。

本 2 家系においてはヘテロ保因者と考えられるものに小児期の腎症、高齢者の蛋白尿および腎症が認められた。

2) 西日本における脊髄小脳変性疾患の遺伝疫学：岡山市を中心とする山陽地域で、遺伝性脊髄小脳変性症の遺伝疫学を展開したところ新たな中国・四国地域に新たな脊髄小脳変性症が広く分布することが示唆された。

3) 遺伝子変異と加齢要因による相互作用：

(1) 成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) 我々は肝内胆汁うっ滞を主訴とした 3 症例に SLC25A13 の変異があるかどうか検討した。3 症例とも小児期に高度の胆汁うっ滞があり、スレオニン、シトルリン、メチオニン、チロシン、リジン、アルギニンの上昇を認めした。症状は、成人発症 II 型シトルリン血症とことなり一時的に肝機能障害を示した以外その他症状なく発達も正常であった。特異なアミノ酸パター

ンより CTLN2 を疑い、既知の 5 種類の変異に対する遺伝子診断を行なったところ AH、TH は IVS11+1G>A 変異のホモ接合体、ME は IVS11+1G>A 変異と 851del4 変異の複合ヘテロ接合体であった。

(2) 全身性カルニチン血症ヘテロ保因者の心筋症の確認：原発性全身性カルニチン欠乏症のモデルマウスのヘテロ個体を用い、加齢に伴うヘテロ保因者の心肥大のリスクを動物実験で確認し、発生機序を探るため、長期にわたる飼育実験を施行した。その結果、電子顕微鏡的には 1 歳時のヘテロでもホモ個体同様の心筋細胞の変化を認め、加齢に伴い将来的に心肥大発症リスクが高まる可能性が示唆された。これは人の家系調査によって得られた高齢者の心肥大のリスクの結果を支持するものである。

4) マクロ指標での検出：慢性腎不全の有症率を人口透析受療患者統計から把握したところ、市町村間格差が大きく見られたが、保健医療圏にまとめた上で、LPI ヘテロ保因者の頻度の高い岩手県北部への偏重は明らかでなかった。

5) 動物モデルからのアプローチ：

糖尿病モデル動物を用いヒトにおける糖尿病の役割を検討した。

①GK ラットおよび Wistar ラットの隣ラ氏島より得られた mRNA を蛍光 differential display 法で検索したところ、Wistar ではほとんど発現しないが、GK ラットで発現の認められるクローン TSC-22 を同定した。
②TSC-22 の遺伝子構造を決定し、蛋白翻訳領域は 3 つのエクソンから構成されていることを明らかにした。

③PCR-SSCP 法によって、蛋白翻訳領域に 2 つの遺伝子変異を認めた。1 つは 23 番目

のイソロイシンがバリンに置換(ATT→GTT)、もう1つは38番目のアルギニンのサイレント変異(AGA→CGA)であり、それぞれ2型糖尿病患者に各1症例認めた。また、プロモータ領域にはA/GのSNPを認めた。アレル頻度は、2型糖尿病患者ではAが0.864、Gが0.136であり、正常耐糖能者ではAが0.836、Gが0.136であり、有意な差異を認めなかった

D. 考察

1) 多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常の遺伝疫学と保健予防活動：我々が対象とした疾患(LPI, HD, HHT, PKD, 甲状腺疾患)および昨年度対象とした疾患(SCD:全身性カルニチン欠損症)は、何れも治療および合併症の重篤化に対する手段が現在の医療水準で提供される。従って主として本研究で考察すべき事は医療そのものではなく、公衆衛生学的対策である。

(1) 遺伝子異常の頻度および偏り、ハザード、早期診断の効果、技術的可能性と倫理的問題

LPIについては創始者変異が存在し、その存在によりこの地域におけるLPIの集団でのマススクリーニングを用いた早期診断の導入が技術的にも、経済性からも妥当と考えられる。費用-効果比も良好で早期診断の意義は大きい。

この一方、HHT, PKDおよび甲状腺疾患では事情は異なる。これらの疾患では遺伝子変異は家系特異的でありマススクリーニングは原理的に不可能であり、連鎖解析、配列決定などで家系の参加が必須となる。しかし、一方、HHTのPAVMsやPKDの高血圧および脳動脈瘤などについては、早期介入による適切な医療的介入により重

篤な合併症を未然に防ぐことができる。

これら優性疾患は遺伝的変異の多様性から、どの変異も新しく地域的偏りがなく日本全国においてほぼ同等の頻度で存在することが考えられる。従って、疾患の多さから全国的なレベルでの対策が必要となる。

PKDの頻度は、凡そ800名に1名と考えられておりわが国では15万人存在すると推定される。60歳頃まで腎症が進展し人工透析に入ることが多いが高血圧の管理により人工透析への導入を遅らせることができる。

HHTの頻度は従来からアジア人種には稀であるとされてきたが今回の検討で凡そ1万人に1名であり全国で約12000人存在し、約そのうちの1/3が重篤なPAVMsの異常を有しすることがしめされた。

脊髄小脳変性症は、従来から地域により異なるタイプが存在することが考えられてきたがどの程度の範囲で存在するのか不明であった。今回家系を中心とした検討で中国四国地域に地域特異的な新たな脊髄小脳変性症が存在する可能性が示された。

(2) 遺伝子診断に関連する倫理的問題について次に考察する。地域特異的な変異では、遺伝子情報そのものが明らかになるのではなく創始者変異の有無のみであるため遺伝子情報の漏洩などの危険性は少ない。しかし、リスクを有する可能性が示されることから保険の加入などで差別を受ける可能性が存在する。

一方、優性疾患の場合、診断が行なわれる場合には家族単位で行なうことになり先に述べたごとく遺伝子異常を有するものは健康管理上有益な情報を得る。しかし、遺伝子情報の漏洩は保険加入時に差別の対象とな

る可能性も有している。

今後これらの点への配慮が必要であろう。

2) 遺伝子変異と加齢要因による相互作用：今回我々は成人発症 II 型シトルリン血症 (CTLN2) の研究のより同一疾患であっても phenotype が年齢依存性であることを証明した。さらに全身性カルニチン欠損症ヘテロ保因者では、疫学調査で高頻度に心筋肥大および不整脈を見出したが、今回動物モデルでも加齢により心筋変性の生じることを証明した。

以上から、遺伝子異常による phenotype は、加齢要因で修飾をうけることが示された。

3) マクロ指標での検出：LPI ヘテロ保因者の頻度の非常に高い岩手県北部において、人工透析の頻度は高くなくこのことは SLC7A7 のヘテロ保因者では加齢によっても腎症の危険が増加しないことを示すか、あるいは腎症が SLC7A7 のヘテロ保因者で生じていても人工透析という指標で捕らえきれないかどうかを意味している。この様に常に不確定因子が存在するため、マクロ健康指標での地域における遺伝子異常の肩よりは困難であると考えられる。

4) 動物モデルからのアプローチ：

今回糖尿病では明確に TSC-22 のヒト糖尿病での関与は否定された。動物疾患モデルからヒト疾患へ外挿することは、有用なアプローチである。

E. 結論 疾患自体はまれでもヘテロ保因者まで考慮に入れると遺伝子異常を有するものの割合は非常に高い。本研究によって、遺伝子異常による phenotype は、加齢によ

り大きく修飾を受けることが明らかになった。国民全体で遺伝子異常に起因すると思われる疾患は未知のものまで考えるとかなりの高頻度に登る (1 : 100 以上)。従って遺伝子を利用した健康リスク管理は、有益であるとともに、疾患遺伝子の種類により、遺伝子異常を共有する人口集団の規模や変異の検出の難易度、効果、方法などが大きく異なることがしめされた。さらにこれら多様性に対応し、異なる次元の倫理的問題も存在することも示された。遺伝子レベルの情報を用いた公衆衛生的施策を行なうためには、今後こうした問題を解決すべきであろう。

F.健康危険情報

それぞれの章に記載した。

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubota T, Hara M, Nozaki J, Manabe M, Koizumi A (2000) Probable involvement of a germ-line mutation of an unknown mismatch repair gene in a Japanese Muir-Torre syndrome phenotype. *J Dermatol Sci* 23:117-125
- 2) Kayo T, Fujita H, Nozaki J, Xiaofei E, Koizumi A (2000) Identification of two chromosome loci determining glucose intolerance in a C57BL/6 mouse strain. *Comparative Med* 50:296-302.
- 3) Habuchi T, Suzuki T, Sasaki R, Satoh S, Akao T, Tuchiya N, Shimada N, Wasa Y, Koizumi A, Chihara J, Ogawa O, Kato T (2000) Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with prostata cancer and benign prostatic hyperplasia in

- Japanese population. *Cancer Res* 60:305-308
- 4) Noguchi A, Shoji Y, Koizumi A, Takahashi T, Shoji Y, Matsumori M, Kayo T, Oohata T, Wada Y, Yoshimura I, Maisawa S, Konishi M, Takasago Y, Takada G (2000) SLC7A7 genomic structure and novel variants in three Japanese lysinuric protein intolerance families. *Human Mut* 15:367-372
- 5) Koizumi A, Shouji Y, Nozaki J, Noguchi A, Xiaofei E, Dakeishi M, Ohura H, Kayo T, Wada Y, Manabe M, Takasago Y, Takada G. Mass screening group (2000) Excessive clustering of lysinuric protein intolerance (LPI) patients in a northern part of Japan due to a founder effect. *Human Mut.* 16:270-271
- 6) Shioya T, Hashimoto M, Koizumi A, Kawamura M, Miura M (2000) Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) in Akita, Japan *Internal Med* 39:675-676
- 7) . Nozaki J, Dakeishi M, Ohura T, Inoue K, Manabe M, Wada Y, Koizumi A (2000) Homozygosity mapping to chromosome 5p15 of a gene responsible for Hartnup disease in two Japanese pedigrees. *Human genetics*. Submitted
- 8) Takahashi M, Nozaki J, Komatsu M, Wada Y, Utunomiya M, Inoue K, Takada G, Koizumi A (2000) A new locus for a dominant form of multinodular goiter on 3q26.1-q26.3. *J Clin Endocrinol Metab* submitted.
- 9) Fujita H, Haseyama T, Kayo T, Nozaki J, Wada Y, Ito S, Koizumi A. An Increased Expression of Glutathione S-Transferases in the Renal Proximal Tubuli in the Early Stage of Diabetes: a Study in a Mouse Model of Type 2 Diabetes, Akita Mouse. *Exp Nephrol*. In press
- 10) Y. Manabe, Y. Shiro, K. Takahashi, K. Kashiwara, and K. Abe A case of spinocerebellar ataxia accompanied by severe involvement of the motor neuron system. *Neurol. Res.* 22 (2000) 567-570
- 11) K. Abe. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells J. *Cereb. Blood against ischemic brain injury. Flow Metabol.* 20 (2000)1393-1408
- 12) Y. Onodera, M. Aoki, T. Tsuda, H. Kato, T. Nagata, T. Kameya, K. Abe, and Y. Itoyama. High prevalence of spinocerebellar ataxia type 1 (SCA1) in an isolated region of Japan. *J. Neurol. Sci.* 178 (2000) 153-158
- 13) Toshihiro Ohura, Keiko Kobayashi, Yusaku Tazawa, Ikumi Nishi, Daiki Abukawa, Osamu Sakamoto, Kazuie Iinuma, and Takeyori Saheki. Neonatal presentation of adult-onset type II citrullinemia. *Human Genetics* 108 (in press)
- 14) F Sugawara, Y Yamada et al., Human TSC-22 gene: no association with type 2 diabetes. (submitted)
- 15) Y Ihara, Y Yamada, et al. Antioxidant α -tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes.

FEBS lett 473(1): 24-26 (2000)

16) K Miyawaki, Y Yamada, et al. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: A study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 96(26): 14843-14847 (1999)

2. 学会発表

1) 小泉昭夫 環境汚染物質への遺伝的感受性：ヒト健康影響のリスク評価への影響
第71回 日本衛生学会 福島 2001年

2) 鄂 暁飛、嶽石美和子、平澤富士子、和田安彦、小泉昭夫：全身性カルニチン欠損症原因遺伝子キャリアーにおける加齢性心肥大の動物モデル JVS マウスでの検討

3) 嶽石美和子、野崎潤一、井上純子、和田安彦、小泉昭夫：遺伝性出血性末梢血管拡張症の家系における Endoglin 遺伝子の変異

4) 大浦敏博、田澤雄作、西育美、小林圭子、虹川大樹、飯沼一字、佐伯武頼：
特異なアミノ酸異常、脂肪肝を伴った新生児肝炎例における SLC25A13 遺伝子異常-成人発症 II 型シトルリン血症の小児期の病態。日本先天代謝異常学会雑誌 16 巻 2 号 96、2000 年

5) 小野寺好明、青木正志、津田丈秀、加藤宏之、糸山泰人、阿部康二東北地方の SCA1 患者出身地の集積第 41 回日本神経学会総会、松本市、2000. 5.24

6) 山田祐一郎他、第 97 回日本内科学会講演会

7) 山田祐一郎他、第 23 回日本分子生物学会年会

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

む)

1) 許取得 なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

厚生科学研究費助成（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常の

遺伝疫学と保健予防活動に関する研究

分担研究者 小泉 昭夫 京都大学大学院医学研究科社会健康医学系専攻
環境衛生学分野・教授

研究趣旨：一般住民において、多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常を有する頻度は、数十名に一名から数万人に1名と幅広い分布を示す。これらの遺伝子異常の内、我々が今回対象として PKD1, Endoglin の異常は明らかな健康リスクを加齢との相互作用で有し、また Systemic carnitine deficiency の原因遺伝子である OCTN2 の異常は、従来知られていない健康障害へのリスクを加齢との相互作用で有している。これらの遺伝子異常の内あるものの頻度は(LPI, OCTN2)地域的偏りが著しく、その他のもの(PKD1, Endoglin),では家系ごとに異なる多様性を有する。我々が今回対象とした疾患すべてが早期の介入によりその後の QOL の改善が可能である。このような遺伝子異常の多様な変異と老化過程での健康リスクに対して加齢過程でリスクを増加させる個人の同定が可能であり、これら遺伝子異常に対し公衆衛生学的対策が望まれる。我々はポストゲノム時代の高齢者の QOL の低下に対する予防対策のあり方を視野に、1) 遺伝子異常の一般人口にける頻度の推定、2) 今後の予防対策のあり方の2点について検討した。我々の成果は、ポストゲノム時代における中高年における保健活動のあり方を考える上で有用であると考えられる。

A. 研究目的

一般住民において、多様な遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常を有する頻度は、数十名に一名から数万人に1名と幅広い分布を示す。これら遺伝子異常の内、あるものは早期介入により高齢期の QOL の改善が確実に期待できるため、高齢期の予後を左右する実行可能な保健政策として重要である。しかし、地域における政策決定の過程で他の健康政策との競合が生じ、医療経済的効率および機会の均等性・公平性などを評価する必要が生じる。これらの基礎となる情報として、1) 健康ハザードの大きさ、2) 効果の程度、3) 早期発見の可能性、

4) 倫理的妥当性などがある。

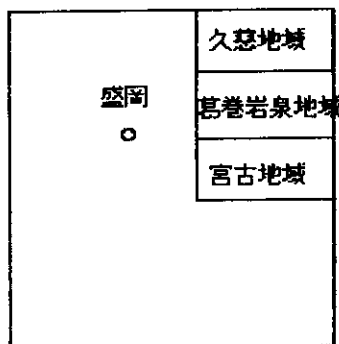
平成12年度には我々は、LPI (Lysinuric protein intolerance), Osler-Rendu-Weber 病、Polycystic kidney (PKD1), 男鹿甲状腺腫、Hartnup 病の5疾患を対象として検討してきた。我々が今回対象として PKD1, Endoglin の異常は明らかな健康リスクを加齢との相互作用で有し、また昨年報告したように Systemic carnitine deficiency の原因遺伝子である OCTN2 の異常は、従来知られていない健康障害へのリスクを加齢との相互作用で有している。これらの遺伝子異常の内あるものの頻度は(LPI, OCTN2)地域的偏りが著しく、その他のもの

の(PKD1, Endoglin),では家系ごとに異なる多様性を有する。我々が今回対象とした疾患すべてが早期の介入によりその後のQOLの改善が可能である。このような遺伝子異常の多様な変異と老化過程での健康リスクに対して加齢過程でリスクを増加させる個人の同定が可能であり、これら遺伝子異常に対し公衆衛生学的対策が望まれる。我々はポストゲノム時代の高齢者のQOLの低下に対する予防対策のあり方を視野に、1) 遺伝子異常の一般人口にける頻度の推定および2) 健康ハザードの大きさ、3) 効果の程度、4) 早期発見の技術的可能性と倫理的妥当性など今後の予防対策のあり方の4点について検討した。我々の成果は、ポストゲノム時代における中高年における保健活動のあり方を考える上で有用であると考え。

B. 研究方法

- 1) LPI(Lysinuric protein intolerance) : 昨年に引き続き岩手県東北部の3地域(Fig 1)において新生児のLPIマスキングを行なった。

Figure 1. 岩手県東北部における新生児マスキング地域



上記3地域にある産院の協力を得て平成12年度に出生した新生児を対象に、代謝異常のマスキングの際に同時に

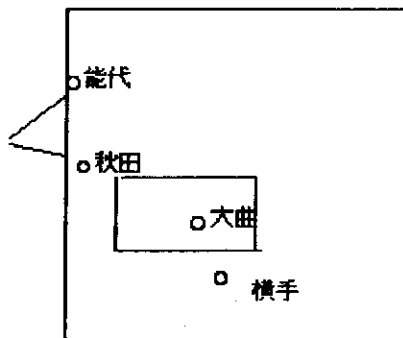
LPIマスキングも行なった。新生児より約20μlの血液を足より採血し、LPI用の濾紙にとり風乾後に京都大に郵送した。その後、濾紙からDNAを採取し、岩手県東北部に創始者効果の存在が確認されこの地域で過剰のLPIの発生の原因となっているSLC7A7のR410X変異の検出を行なった。検査結果は、受領より2週以内に書面でなされ1ヶ月検診時には親に通知された。

- 2) Osler-Rendu-Weber病(Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia: HHT):本年度から秋田県中央部の人口約17万の診療圏を中心にHHTの遺伝疫学を行なった(Fig 2)。HHTの欧米における頻度は、1/1万人~2/4万人と報告されている。既にこの地域で数名のHHT発症者の存在が確認されており、これらの患者ではPulmonary Arteriovenous malformation(PAVMs)が高頻度に認められ、早期発見による重篤な合併症の予防が可能であるためこの地域の医療機関と共同で検討を行なった。地域の基幹病院で現在治療を継続している7家系の参加を得ることができた。

(1) 連鎖解析:参加家系の内、大家系である2家系について9番および12番染色体への連鎖の有無の検討を行なった。HHTは現在まで3タイプ知られており、そのうち多くが9番染色体に連鎖するタイプ1と、12番染色体に連鎖するタイプ2である。前者の責任遺伝子として既にEndoglin,また後者の責任遺伝子と

して ALK1 が知られている。9 番染色体のマーカーとして D9S1690, D9S1677、D9S1776, D9S1682, D9S290, D9S164, D9S1826 および D9S158 を用いた。また後者の連鎖マーカーとして D12S310, D12S1617, D12S345, D12S85, D12S368, D12S83, D12S326 および D12S351 を用いた。

Figure 2 秋田県中央部におけるHHTの遺伝疫学



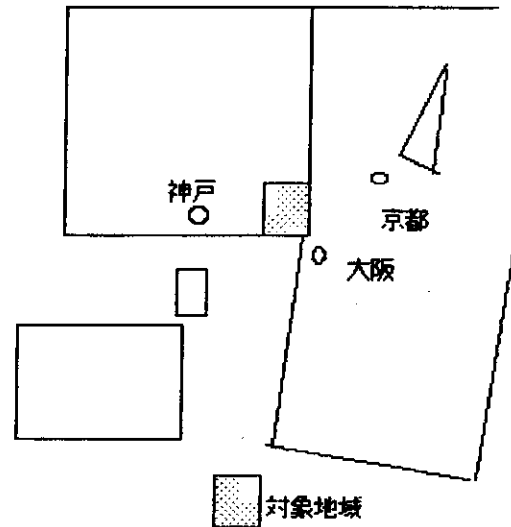
(2) 変異の検索：臨床症状および連鎖解析の結果からタイプ1のHHTが疑われたため既に報告されている Endoglin の5'Prmoter 領域および Exon 1-14 の決定(HENDUGLN1)を行なった。また、Splicing 異常の認められた場合には mRNA を抽出 Reverse transcriptase で cDNA に変換後 cDNA の配列決定 (g3392889) を行なった。

3) Polycystic kidney (PKD):

この腎臓症(Polycystic kidney)は最も頻度の高い常染色体優性疾患であり頻度は400人に一名から1000人に一名と報告されている。我々は、兵庫県南部における限られた地域において地域の医療機関および患者の協力を得て遺伝疫

学的検討を行なった。

Figure 3. 兵庫県南部におけるPolycystic kidney



Polycystic kidney は現在まで3型知られているが、16番染色体に連鎖する PKD1 と4番染色体に連鎖する PKD2 がほぼ大部分をしめ前者が全症例の85%以上をしめると報告されている(文献)。

今回我々は阪神地域に在住する8家系の協力を得て検討を行なった。

(1) 連鎖解析：PKD1, PKD2 のどちらかを明らかにする目的で十分大きな家系について連鎖解析を行なった。16番染色体のマーカーとして、D16S3075, D16S3103, および D16S3046 を用いた。また4番染色体のマーカーとして D4S2964, D4S1534, D4S414, D4S1572 および D4S406 のマーカーを用いて検討した。

(2) Polycystin 遺伝子の変異の検索：PKD1 遺伝子は、約50kbにわたり存在し46exonsよりなる。Polycystin 近傍には95%以上のホモロジーを示す遺伝子が存在し変異の検出を困難にしている。我々はこれらの問題点を解決するために近年開発された PKD1 に特異的な配列を Primer に

用い特異的領域を増幅する LA-PCR 法を用いて変異の検索を行なった。

4) 地域特異的甲状腺腫の遺伝子検索：新生児の甲状腺機能低下症のマススクリーニングにおいて TSH が異常高値を示す症例がごく少数存在する。これら症例のうち常に TSH 高値を示す症例で、家族性甲状腺腫の家族歴を有し、加齢により腺腫が増大する症例が存在する。これら家族性の甲状腺腫では、多くが腫瘍性増殖を伴い Multiple endocrine adenomatosis の一型と考えられている。我々はこの様な 2 家系について連鎖解析および候補遺伝子の変異の検索を行なった。

(1) 甲状腺腫：新生児マススクリーニングで TSH を示し、家族歴に加齢とともに甲状腺腫が増大する 2 家系を対象に行なった。これら 2 家系は、甲状腺腫を示す症例では、TSH が高く Thyroglobulin 高値、T3、T4 は正常であり抗甲状腺抗体は証明されず、ヨウドの取り込みも正常でありヨウドの有機化の障害も証明されない共通な臨床形質を示す。

(2) 連鎖解析：2 家系約 20 名の協力を得て、抹消血を約 2 ml 採取した。採取した抹消血より DNA を抽出し 343 のマーカーを用い全ゲノムにわたる連鎖解析を行なった。連鎖の有無は two-point linkage analysis と multipoint linkage analysis の 2 つの方法により検討した。

(3) 候補遺伝子の配列決定：連鎖解析で連鎖が証明された領域に diacylglycerol kinase 3 が存在したためゲノム配列の決定を行なった。

5) Hartnup Disease: 中性アミノ酸の transporter の異常である Hartnup disease について 2 家系を用い、homozygosity mapping を行なった。昨年報告したように Hartnup disease のヘテロ保因者では加齢とともに腎症の頻度が増加しており、加齢により健康リスクが増大すると考えられた。2 家系約 10 名の協力を得て、抹消血を約 2 ml 採取した。採取した抹消血より DNA を抽出し 343 のマーカーを用い全ゲノムにわたる連鎖解析を行なった。連鎖の有無は homozygosity mapping 方法により検討した。また死亡者については家族より臍の緒の一部を寄贈していただき DNA を抽出した。

倫理的配慮：上記疾患すべてに対し、遺伝的解析を行なうに当たり研究者あるいは研究協力者が説明し、協力者から同意を得た。また、結果の報告および遺伝的カウンセリングや治療などの臨床的相談についても説明し、研究協力者があたることにした。

疾患	責任者	所属
LPI	高砂子祐平	もりおか子ども病院長
HHT	塩谷隆信	秋田大学医療短期大学部教授
Polycystic kidney	山田祐一郎 岩佐敏夫	京都大学医学部病態代謝・助教授 三上クリニック副院長

地域特异的甲状腺疾患 Hartnup Disease	高橋勉 大浦博敏	秋田大学医学部小児科学・講師 東北大学大学院医学研究科発達・助教授
-------------------------------	-------------	--------------------------------------

Table 2. 平成11年7月から平成13年1月までの結果

地域	平成11年		平成12年		合計		1000人 当たり	相対頻 度
	ヘテロ 数	サンプル 数	ヘテ 口 数	サンプル 数	ヘテロ 数	サン プ ル		
久慈地域	1	293	3	203	4	496	8.06	28.23
宮古地域	8	584	2	455	10	1039	9.62	33.19
葛巻・岩泉地域	2	485	2	134	4	619	6.46	22.28
全体	11	1362	7	792	18	2154	8.36	28.82
対照地域A	1	3500	ND	ND	1	3500	0.29	1
対照地域B	0	3500	ND	ND	0	3500	0.00	0

また、今回の研究においてLPIは秋田大学の倫理委員会での承認を得ている。

C研究結果

1) LPI マスクリーニングの結果：本年度に792名の参加を終了し現在7名のヘテロ保因者を見出している。平成11年度とあわせて合計18名のヘテロ保因者を見出した(Table 2)。この3地域においては頻度の差はなく、1000名あたり8名程度のヘテロ保因者がいるものと推定される。また平成11年に行なった隣県でのSLC7A7のR410X変異の頻度は3500名に1名以下であり、隣県においても頻度は低く岩手県東北部における過剰なLPIの発症が創始者変異であるR410Xによるものであることが了解される。

この岩手県東北部のヘテロ保因者の頻度からLPIの頻度は、約43000人に一名から96000人に一名であり、対照地域では発症頻度は、5000万人に一名

と1000倍から500倍高いことになる。さらに、岩手県東北部におけるLPIの頻度は現在国の事業として行なわれているマスキングの対象疾患よりも高い。

また、LPIの検出のための費用は、郵便代を除外すればほぼ一人あたり80円程度である。この地域で1名の患者発見のために要する費用は、最も頻度の高い宮古地区では、43000人×80円=3440000円であり、投資期間はこの地域の人口が約10万人であり年間出生が約1500名であることから、現状では、344万円を29年に投資すればよいことになる。

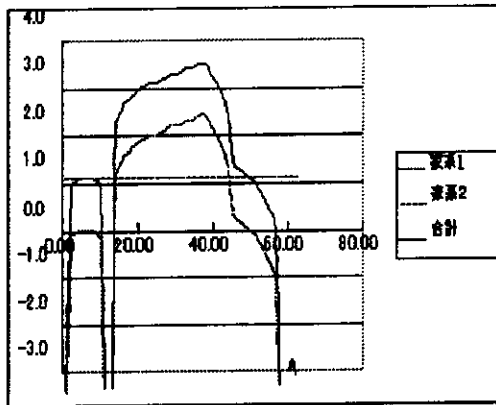
一方、LPIの発症者は新生児期に発見することにより高アンモニア血症を予防でき著しくQOLを改善できる。

2) Osler-Rendu-Weber病：秋田県中央部の約17万の診療圏において7家系18名のHHT患者を見出した。従ってこの地域における頻度は少なくとも1万人に1名以上の頻度と考えられる。

2家系を用いた連鎖解析の結果9番染色

体に連鎖を認めた(Fig 4).

昨年到我々が報告したように、地方では Figure 4 HHT の 2 家系をもち連鎖解析



地域で創始者効果を期待し 7 家系において Endoglin の変異を 5' promoter 領域から

Table 3. 7家系のEndoglinの変異の検索で見出された5つの変異と肺動静脈 (PAVMs)

変異部位	mRNA	Mutation	家系	PAVMs
Intron 3 splice donor site	Exon 3 skipping	del 74 Gly-120 Tyr	A家系	Yes
Exon 7	ND	276+56aa (ins A)	B,C家系	Yes
Exon 8	ND	373+5aa (del AAAG)	D家系	Yes
Exon 11	ND	490+9aa (insA)	E家系	Yes

塩谷らの検討によれば(文献) 今回の7家系を含むこれら秋田県中央部における家系208名の検討では51名がHHTと診断されそのうち17名が肺動静脈ろうを有していた。すなわちHHT発症者の役30%は有していることになる。

以上からHHTにおいては創始者変異は認められず多様な変異にも関わらず共通の臨床形質を示すこと事が明らかになった。

3. Polycystic kidney

江戸期の社会的隔離の結果による遺伝的隔離が存在しており、我々も調査対象3'UTR領域まで変異を検索した。その結果をTable 3に示す。

今回の7家系の検索でA, B家系においては共通の変異が見出されたが他のC, D, E家系では共通の変異は見い出されなかった。また7家系のうち2家系では変異を見つけることが出来なかった。この様に創始者変異の期待にも関わらず変異は多様であった。

次にこれら7家系における臨床的形質について検討した。その結果高頻度に重篤な合併症である肺動静脈ろうが認められた。

阪神間に在住する8家系約15名の参加を得た。

これら8家系は、家族歴で何れもPolycystic kidneyの重篤な合併症である腎不全および脳動脈瘤の家族集積を認めた。特に中高年の突然死を3家系で証明した。

遺伝子座の同定は、家系が大きく連鎖解析が行なえる1家系を用い行なった。16番染色体および4番染色体について連鎖解析を行い16番染色体に連鎖を認めた。その結果、PKD1に分類された。創始者変異

を想定し polycystin の変異を検索した。その結果現在2家系で exon 15 のおける nononsense 変異と同じく exon 15 の deletion を見出した。

4. 地域特異的甲状腺腫の遺伝子検索

1990年以降年度の秋田県における新生児甲状腺機能低下のマスクリーニングは、年間12000名を数え、そのうち約1000名に一名の頻度で高TSH血症が見出された。そのうち約2/3は恒常的に高TSH血症が見出され、残りの1/3は一過性の高TSH血症であった。この10年の間に、持続的に高TSH血症を示す発端者にたいし家族歴を調査したところ2家系で3世代に渡り甲状腺腫が見出された。これら家族20名の参加により臨床像、検査所見、連鎖解析をおこなった

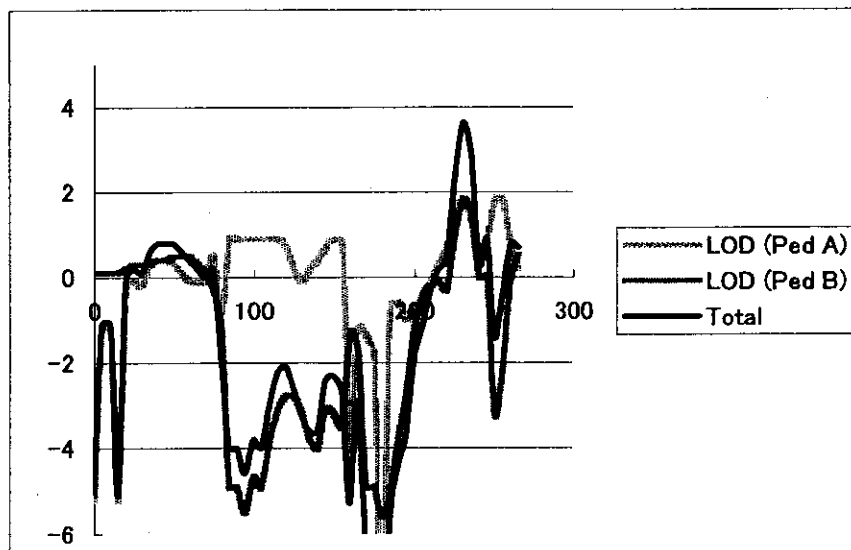
臨床像および検査所見：1家系では、甲状腺腫を示すものが4名4世代に渡り証明された。

またもう1家系では甲状腺腫を示すもの

が3名3世代に渡り証明された。これら症例は、高TSH, Thyroglobulinemia がみとめられ、T3, T4値は正常であった。さらに、123Iの取り込み、ヨウドの有機化は正常であった。また、両家系とも手術を受けたものがおり、術後の病理検索で反応性の甲状腺上皮細胞の増殖が証明されたが、悪性像は認められなかった。以上から今回の2家系は甲状腺ホルモンの合成過程の未知の異常による反応性の高TSH血症を核心とする病態生理を示すものと考えられた。

連鎖解析：両家系20名の参加者のDNAを用い全ゲノム連鎖解析を開始した。

Figure 5. 地域特異的家族性甲状腺腫の連鎖解析：3q26



家系より常染色体優性遺伝形式が示唆された。全ゲノム検索の結果3番染色体の3q26

領域にのみそれぞれの家系で有意な連鎖を認め、両家系で Multipoint Lod Score は 3.62 に達した(Fig.5)。

次いでこの領域に存在しTSHを介する Signal transduction に関与する可能性のある diacylglycerol kinase 3 の配列決定を行なったが変異は検出されなかった。

また2家系において IBD(Identical by descent)は証明されず、それぞれ同一遺伝子

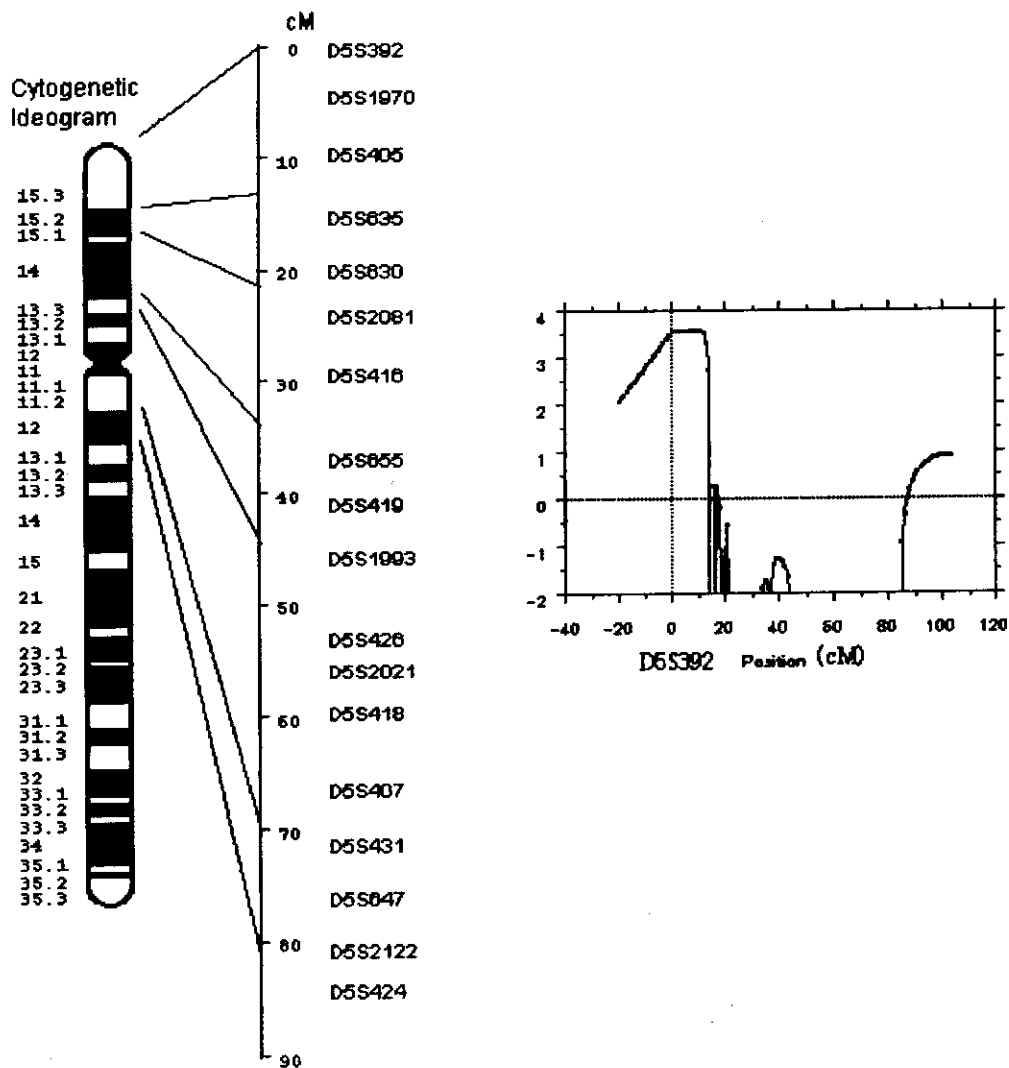
における異なる変異の存在が示唆され、変異の多様性が想定された。

5. Hartnup disease (HD)

わが国における Hartnup 病の家系を用い連鎖解析を行なった。この2家系とも近親婚が認められたため Homozygosity mapping を行なった。

その結果 Fig. 6 に示すように5番染色体 15.3 に連鎖が証明された。

Figure 6. 日本人2家系によるHomozygosity mapping の結果



本2家系においてはヘテロ保因者と考えら

れるものに小児期の腎症、高齢者の蛋白尿

および腎症が認められた。

D. 考察

本年度我々が対象とした疾患（LPI, HD, HHT, PKD, 甲状腺疾患）および昨年度対象とした疾患（SCD：全身性カルニチン欠損症）は、何れも治療および合併症の重篤化に対する手段が現在の医療水準で提供される。従って主として本研究で考察すべき事は医療そのものではなく、公衆衛生学的対策である。

本年度の研究で明らかにされた様に LPI については創始者変異が存在し、その存在によりこの地域における LPI の集団でのマススクリーニングを用いた早期診断が可能となる。この創始者変異を用いた診断は費用も 80 円/人と安価であり特異性も高い。また SCD においても昨年報告したように同様に創始者変異が存在し地域における集団でのマススクリーニングを用いた早期診断が可能となる。マススクリーニングは特に新生児にとって早期治療を可能としその後の QOL の改善に大きく寄与する。この一方、SCD では高齢者へテロ保因者は心疾患を発症する可能性が疫学的にもまた動物実験（本年度報告分担研究者和田参照）でも確認されている。この様なことから、これら疾患についてはマススクリーニングは、新生児期ではホモ保因者に、高齢期ではヘテロ保因者に有用な情報を提供する。さらに一般的には Table 4 にまとめたごとく劣性疾患では創始者効果が存在するために感度および特異度もたかく経済的効率のよいマススクリーニング法が存在しえ、ホモおよびヘテロ個体と健康管理上の利益を得るものと考えられる。

この一方、HHT, PKD および甲状腺疾患では事情は異なる。これらの疾患では遺伝子変異は家系特異的でありマススクリーニングは原理的に不可能であり、連鎖解析、配列決定などで家系の参加が必須となる。しかし、一方、HHT の PAVMs や PKD の高血圧および脳動脈瘤などについては、早期介入による適切な医療的介入により重篤な合併症を未然に防ぐことができる。

これら優性疾患は遺伝的変異の多様性から、どの変異も新しく地域的偏りがなく日本全国においてほぼ同等の頻度で存在することが考えられる。従って、疾患の多さから全国的なレベルでの対策が必要となる。PKD の頻度は、凡そ 800 名に 1 名と考えられておりわが国では 15 万人存在すると推定される。60 歳頃まで腎症が進展し人工透析に入ることが多いが高血圧の管理により人工透析への導入を遅らせることができる。

HHT の頻度は凡そ 1 万人に 1 名であり約 12000 人存在し、約そのうちの 1/3 が重篤な PAVMs の異常を有し、早期の介入により治療可能である。

遺伝子診断に関連する倫理的問題について次に考察する。地域特異的な変異では、遺伝子情報そのものが明らかになるのではなく創始者変異の有無のみであるため遺伝子情報の漏洩などの危険性は少ない。しかし、リスクを有する可能性が示されることから保険の加入などで差別を受ける可能性が存在する。

Table 4. 本研究で対象とした遺伝疾患

疾患	遺伝様式	頻度	特徴	効率のよい遺伝子を用いた 早期診断の技 術的可能性	遺伝子診断による利益
LPI	常染色体劣性	1/100~1/3500	創始者変異の存在	地域毎で可能	1)ホモ発症者の発見と早期治療の開始 2)ヘテロ保因者の高齢期におけるハザードとリスク予測
SCD	常染色体劣性	1/125~?	創始者変異の存在	地域毎で可能	1)ホモ発症者の発見と早期治療の開始 2)ヘテロ保因者の高齢期における心疾患のリスク予測
HD	常染色体劣性?	?	?	?	1)ホモ発症者の発見と早期治療の開始 2)ヘテロ保因者の高齢期における腎疾患とそのリスク予測
HHT	常染色体優性	1/10,000	変異は極めて多様	困難	早期にリスクを有するものの特定
PKD	常染色体優性	1/800	変異は極めて多様	困難	早期にリスクを有するものの特定
甲状腺腫	常染色体優性?		変異は極めて多様	困難	早期にリスクを有するものの特定

一方、優性疾患の場合、診断が行なわれる場合には家族単位で行なうことになり先に述べたごとく遺伝子異常を有するものは健康管理上有益な情報を得る。しかし、遺伝子情報の漏洩は保険加入時に差別の対象となる可能性も有している。

E. 結論 以上から遺伝子を利用した健康リスク管理は、有益であるとともに、疾患遺伝子の種類により、遺伝子異常を共有する人口集団の規模や変異の検出の難易度、効果、方法などが大きく異なることがしめされた。さらにこれら多様性に対応し、異なる次元の倫理的問題も存在することも示された。遺伝子レベルの情報をを用いた公衆衛生学的施策を行なうためには、今後こうした問題を解決すべきであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kubota T, Hara M, Nozaki J, Manabe M, Koizumi A (2000) Probable involvement of a germ-line mutation of an unknown mismatch repair gene in a Japanese Muir-Torre syndrome phenotype. *J Dermatol Sci* 23:117-125
- 2) Kayo T, Fujita H, Nozaki J, Xiaofei E, Koizumi A (2000) Identification of two chromosome loci determining glucose intolerance in a C57BL/6 mouse strain. *Comparative Med* 50:296-302.
- 3) Habuchi T, Suzuki T, Sasaki R, Satoh