

厚生労働科学研究

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

びまん性汎細気管支炎等遺伝要因を有する
慢性呼吸器疾患の疾患感受性遺伝子の研究

平成 14 年度 研究報告書

主任研究者 慶長直人

平成 15 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

- びまん性汎細気管支炎等，遺伝素因を有する慢性呼吸器疾患の疾患感受性遺伝子の研究 3
慶長 直人

II. 分担研究報告

1. びまん性汎細気管支炎における疾患感受性候補領域と候補遺伝子 7
慶長 直人 他
2. 非定型抗酸菌症の疾患感受性遺伝子同定へ向けて
ーマイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド相関解析 11
田宮 元 他
3. 疾患感受性変異同定のための統計学的手法の開発と多型間連鎖不平衡の理論研究 14
大橋 順
4. マイクロサテライト多型との連鎖不平衡を利用したサルコイドーシス感受性遺伝子の探索 19
田中 剛 他
5. びまん性汎細気管支炎におけるムチン遺伝子群のプロモーター多型の検討 24
神尾孝一郎 他

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 31

IV. 研究成果の刊行物・別刷

1. Genetic Variants of Human β -Defensin - 1 and Chronic Obstructive Pulmonary Disease 39
I. Matsushita 他
2. Genetic Isolates in East Asia: A Study of Linkage Disequilibrium 45
T. Katoh 他
3. Corneodesmosin DNA polymorphisms in MHC haplotypes and Japanese patients with psoriasis 51
J. Hui 他
4. Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region
of the class I human MHC 58 /
Y. Matsuzaka 他
5. The expected power of genome-wide linkage disequilibrium testing using
single nucleotide polymorphism markers for detecting a low-frequency disease variant 67
J. Ohashi 他
6. CD36 Polymorphism Is Associated with Protection from Cerebral Malaria 77
K. Omi 他
7. びまん性汎細気管支炎 ー発症要因と臨床ー 88
慶長 直人
8. 慢性閉塞性肺疾患の発症にかかわる遺伝因子 92
田中 剛 他

9. COPD 発症につながる危険因子	97
松下 育美 他	
10. びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子	102
慶長 直人 他	
11. 呼吸器疾患と HLA -bare lymphocyte syndrome と慢性気道感染症	108
慶長 直人 他	

I . 總括研究報告書

びまん性汎細気管支炎等、遺伝素因を有する慢性呼吸器疾患の 疾患感受性遺伝子の研究

主任研究者 慶長直人 国立国際医療センター 研究所・呼吸器疾患研究部

研究要旨 遺伝素因を有する慢性呼吸器疾患の疾患感受性遺伝子研究として、びまん性汎細気管支炎を中心として研究を継続している。平成 13 年度に候補領域内に同定された 100 あまりの一塩基多型 (SNPs) の連鎖不平衡構造を明らかにし、関連解析を行い、さらに疾患と関連する強い連鎖不平衡の領域内に、昨年度と異なる新規遺伝子を見だし、そのクローニングを行った。すなわち、200 kb の領域内には、疾患と関連する 80 kb に渡る、強い連鎖不平衡の島状構造が存在し、その領域内に膜型ムチン様遺伝子がクローニングされた。この遺伝子変異の少なくともひとつは疾患と関連することを明らかにした。一方、既知のムチン遺伝子との関連性も検討した結果、MUC5B の複数のプロモーター多型との関連が認められたため、この領域のハプロタイプ解析を行った。サルコイドーシスについては、Th1 免疫に関する遺伝子群に関するマイクロサテライトマーカーをスクリーニングに利用した候補遺伝子アプローチの方法論をさらに深く検討し、サルコイドーシスと関連性を示す SNP を見いだした。非定型抗酸菌症のマイクロサテライトマーカーを利用したゲノムワイド関連解析のための多施設研究を開始している。また、多因子疾患の関連解析にとって問題となる、階層化の問題を補正する方法と連鎖不平衡構造に応じたマーカーの立て方についての理論的検討を行った。

A. 研究目的

びまん性汎細気管支炎は、厚生労働省特定疾患のひとつであり、一連の研究により、ヒト白血球抗原 (HLA) と疾患と強い関連が見られることが報告されている。我々は未知の DPB 感受性遺伝子が HLA-A 座と B (C) 座との間に位置し、DPB に感受性を示す遺伝子の変異が HLA B54-Cw1-A11 を保有する祖先染色体に生じたという仮説の下に、HLA 関連感受性遺伝子座の候補領域を分子遺伝学的に推定した。そこで、本研究では、さらに推定された候補領域内のエクソンと予測される部位を中心に詳細な検討を行い、最終的に疾患感受性遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

厚生省班診断基準に基づき、診断された症例を選択した。びまん性汎細気管支炎の感受性遺伝子の候補領域となる 200 kb の領域について、昨年来、コンピュータ予測されるエクソン部を中心に PCR 増幅し、直接シーケンス法により SNP を同定したが、本年度は、合わせて 100 個以上の SNPs の全タイピングを行った。

また、新規遺伝子のクローニングには、遺伝子予測プログラムで推測されるエクソン位置に基づき、

RACE 法を利用した。

さらにムチン遺伝子群のプロモーター領域の多型について、SSCP 法を利用したハプロタイプの直接決定法を開発した。

サルコイドーシスでは、遺伝子座周辺の連鎖不平衡を利用したマイクロサテライトマーカーと疾患との関連解析によって、Th1 免疫に関わる候補遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、STAT4 遺伝子の SNP を同定し、さらに関連解析を行った。

新たな多施設共同研究として、非定型抗酸菌症のマイクロサテライトマーカーを利用したゲノムワイド関連解析のための試料集積が進行している。

多因子疾患の関連解析にとって問題となる、階層化の問題を補正する方法と連鎖不平衡構造に応じたマーカーの立て方についての理論的検討を行った。

(倫理面への配慮) 本研究における遺伝子解析に関しては、いずれも三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当センターの遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究成果

1. 候補領域における SNPs の同定とタイピング、

関連解析

予測されたエクソン部位を中心にプライマーをデザインし、PCR 増幅し、塩基配列を決定し、昨年同定したものと合わせて、100 以上の SNPs を同定したため、引き続きタイピングを施行した。関連解析の結果、200 kb の候補領域のうち、前半の 80 kb の複数の SNPs が疾患と関連性を示した。

2. 候補領域における SNPs の連鎖不平衡構造

200 kb の候補領域のうち、関連解析で疾患と関連性を示す SNP が多かった前半の 80 kb は強い連鎖不平衡の島状構造を呈していた。

3. 候補領域における新規遺伝子の同定

80 kb の強い連鎖不平衡の島状構造の中に、遺伝子予測プログラムによって、エクソンと予測される部位に新規遺伝子がクローニングされた。気管支上皮細胞に発現しており、構造上、新規の膜型ムチン様遺伝子と推測された。

4. 既知のムチン遺伝子のプロモーターハプロタイプの直接決定法の開発と関連解析

SSCP を利用した方法により、1 kb 以上のプロモーター領域にある 5 個程度の SNPs からなるハプロタイプを直接決定した。その特定のハプロタイプとびまん性汎細気管支炎との関連が推測された。

5. 候補遺伝子周辺のマイクロサテライトマーカーを用いた候補遺伝子のスクリーニング法

昨年、サルコイドーシスの疾患感受性遺伝子検索のため、Th1 免疫関連遺伝子座より、100 kb 以内の領域にあるマイクロサテライトマーカーを同定し、疾患との関連性を検討したところ、STAT4 のマーカーとサルコイドーシスとの関連を示した。そこで、本年は、さらに連鎖不平衡の及ぶ範囲について検討を加えることにより、STAT4 遺伝子内に存在する、疾患関連 SNP を同定した。

6. 多因子疾患の関連解析における階層化の問題を補正する方法と連鎖不平衡構造に応じたマーカーの立て方に関する理論的検討

多因子疾患の関連解析における疾患感受性変異同定の妨げとなる階層化の問題を補正する方法と、連鎖不平衡領域におけるマーカー設定の選択基準に関する検討を行った。

7. 非定型抗酸菌症の疾患感受性遺伝子同定のための多施設研究の進行

マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド相関解析を行うための、多施設共同研究組織を立ち上げ、すでに 100 例以上の症例サンプルを蓄積した。

D. 考案

慢性、難治性呼吸器疾患の多くは、多因子疾患であるが、主要疾患感受性遺伝子が限られ、相対危険度も高いのではないかと推測される。たとえば、本研究の主要テーマのひとつであるびまん性汎細気管支炎は、欧米人に同様の疾患が見られず、欧米においてはアジア系の移民が罹患することが多いという事実から、人類創世後、アジア系集団の形成時に生じた遺伝子変異の一つが、疾患感受性を規定する有力な因子ではないかと考えられる。本年度は、その有力な候補遺伝子として、新たな膜型ムチン様遺伝子をクローニングした。この遺伝子は気道上皮の分化に伴い、alternatively spliced form が出現する（未発表データ）ことから、気道の傷害、修復に密接な関連を持つ分子である可能性が示唆される。さらに既知のムチン遺伝子群と疾患との関連についても検討した結果、MUC5B のプロモーター多型と有意な関連を認めた。これらの関連性の確からしさを最終年度で明らかにする予定である。

本研究では、このようにこれまで取り残されていた、呼吸器病の臨床に直結した疾患感受性遺伝子検索というテーマを掲げ、初年度、呼吸器病学の研究者と第一線のゲノム研究者が共同戦線をひき、次年度は、各疾患について、データを蓄積し、ここに有意な結果を報告することができた。

E. 結論

びまん性汎細気管支炎の HLA 関連疾患感受性遺伝子候補領域 200 kb 内に、100 個以上の SNP が同定され、連鎖不平衡構造が明らかにされた。疾患と関連する強い連鎖不平衡の島状構造の中に、膜型ムチン様候補遺伝子が同定された。さらにサルコイドーシスの疾患感受性候補遺伝子についても、症例対照研究の形をとりながら、新しい視点で検討を進め、成果を上げた。症例対照研究を進めていく上での、統計学的に多因子疾患の関連解析における階層化の問題を補正する方法と連鎖不平衡構造に応じたマーカーの立て方に関する理論的検討は、五大疾患など、さらに頻度の高い多因子疾患の候補遺伝子のマッピングにも重要な示唆を与えるものと予想される。

II . 分担研究報告

びまん性汎細気管支炎における疾患感受性候補領域と候補遺伝子

主任研究者	慶長 直人	国立国際医療センター	研究所・呼吸器疾患研究部
	土方美奈子	国立国際医療センター	研究所・呼吸器疾患研究部
	松下 育美	国立国際医療センター	研究所・呼吸器疾患研究部
分担研究者	中田 光	国立国際医療センター	研究所・呼吸器疾患研究部
分担研究者	徳永 勝士	東京大学大学院医学系研究科	人類遺伝学教室
	吾妻安良太	日本医科大学	第四内科
分担研究者	工藤 翔二	日本医科大学	第四内科

研究要旨 びまん性汎細気管支炎の疾患感受性候補遺伝領域として、HLA-A, B 遺伝子間の 200 kb の領域が推定されている。昨年より、その領域を遺伝子予測プログラムによって解析し、予測されるエクソン部を中心に、一塩基多型 (SNPs) を探索した結果、100 個以上の SNPs が同定された。その 200 kb の候補領域の中には、特に連鎖不平衡の強い 80 kb の領域が存在した。連鎖不平衡の島状構造の中にある複数の SNP は疾患と有意な関連を示したが、周辺の SNP に比べ、極端に強い関連を示すものは見いだされていない。一方、その候補領域の中に新たな遺伝子がクローニングされ、構造上、膜型ムチンと推測された。この遺伝子変異の少なくともひとつは疾患と関連することを明らかにした。

A. 研究目的

びまん性汎細気管支炎の病因を考える上で、アジア人特有の遺伝要因が本疾患の発症に関与している可能性が強く示唆されている 1)。日本においては、HLA-B54 (B*5401) と本疾患の関連性は再確認されたが 2)、韓国においては、HLA-B54 とは明らかな関連を示さず、代わって HLA-A11 が本疾患と強い関連性 (補正 p 値 < 0.0005, オッズ比 = 5.4) を示した 3)。すなわち、びまん性汎細気管支炎は HLA class I 関連疾患であるが、密接に関連する HLA class I 対立遺伝子型は韓国人と日本人の患者でそれぞれ異なるという結果であり、びまん性汎細気管支炎では、特定の HLA 分子そのものではなく、HLA-A, B 遺伝子座間に真の疾患感受性遺伝子が存在するものと推定された。本疾患の主要感受性遺伝座は、我々の検討により、HLA-B 座より 300 kb ほどテロメアより (HLA-A 座側) の約 200 kb の領域と推定され 4)、ヒト遺伝子および遺伝要因を有する疾患のデータベースである Mendelian Inheritance in Man に、MIM 604809 として登録されている。昨年からのこの 200 kb の候補領域内のスクリーニングを開始して、同定し得た一塩基置換 (SNP) の分布について、本年度、詳細な検討を加えた。

B. 研究方法

1995 年厚生省班の診断基準に基づき診断された症例 92 例、対照者 100 例を対象に解析を行った。主要感受性遺伝子候補領域である 200 kb の塩基配列について、GenScan コンピュータプログラムを用いて推定される予測遺伝子のエクソン部を中心に、およそ 500 bp ずつ PCR 増幅し、ABI PRISM 3100 DNA シーケンサー (Applied Biosystems) を用いた直接シーケンス法により、塩基配列を決定し、配列を比較することにより、SNP を同定した。それらの結果を基に、症例、対照集団の各サンプルについて、同様なタイピングを実施した。

候補遺伝子内の新規遺伝子のクローニングに関しては、Pulmonary mucoepidermoid carcinoma 由来のヒト気管支上皮細胞株 NCI-H292 細胞から total RNA を抽出し、初めに 5' RACE および 3' RACE 法、遺伝子の 5' 末端側の断片と 3' 末端側の断片を得た。両断片をつなぐ目的で、total RNA から Oligo-dT プライマーにより合成された cDNA をテンプレートにして、long PCR による全長クローニングを行った。

(倫理面への配慮) 本研究における遺伝子解析に関しては、三省合同の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当センターの遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究成果

1. 候補領域における連鎖不平衡の島状構造

遺伝子予測プログラムである GenScan により予測されたエクソン部位を中心に PCR 増幅し、配列を比較検討し、SNP を同定した。その後、症例、対照のタイピングを行い、連鎖不平衡の指標として D' を用いて解析したところ、200 kb の候補領域の中には、特に連鎖不平衡の強い 80 kb の領域が存在していた (図 1)。80 kb の連鎖不平衡のブロック構造の中にある複数 SNP は疾患と有意な関連を示したが、その中で極端に強い関連を示すものは見いだされていない (図 2)。

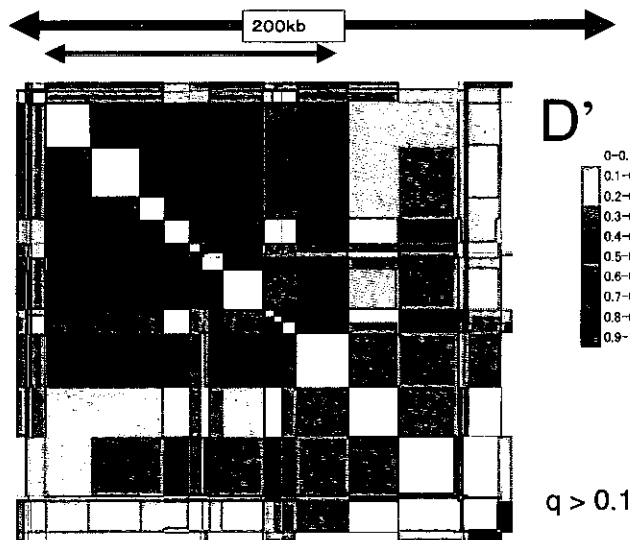


図 1 候補領域内に存在する SNP 間の連鎖不平衡値から推定されるゲノム構造
200 kb の候補領域のうち、連鎖不平衡の指標である D' 0.9 以上の強い連鎖不平衡を示す領域、約 80 kb が黒い四角で示されている。

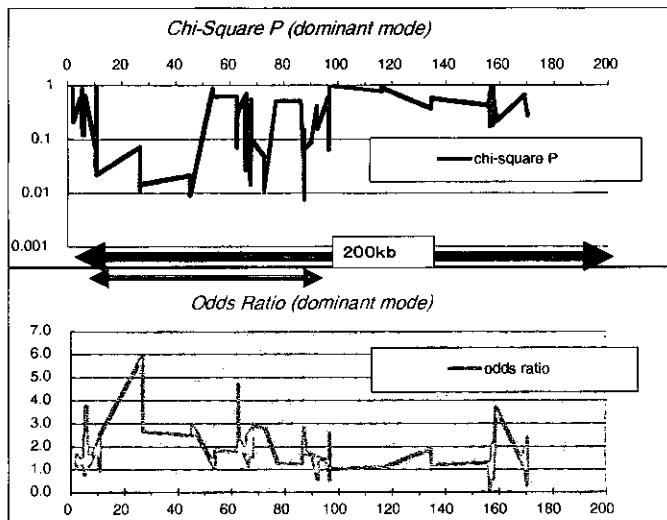


図 2 候補領域内に存在する SNP 頻度の症例対照関連解析に

おけるカイ 2 乗 p 値 (上段) とオッズ比 (下段)
カイ 2 乗 p 値は、左側の 80 kb の領域で低く、有意差を示す SNP が多く、右側の領域では、有意差を示す SNP がみられない。オッズ比は、頻度の低い SNP では正確な値が得られていない。

2. 新規遺伝子のクローニング

得られた遺伝子は 4 つのエクソンから成り、1,773 アミノ酸の蛋白をコードしていた。エクソン 2 から 4 は GENESCAN の予測と一致していたが、エクソン 1 は異なっていた。蛋白の N 末端側には 27 アミノ酸から成るシグナルペプチドが予測され、C 端側には 23 アミノ酸長の膜貫通部位が予測された。2 番目のエクソンにコードされる領域には、セリン・スレオニンを含む約 10 アミノ酸 (代表的には TTTASTEGSE のパターンを持つ) が約 150 回繰り返されていた。以上の特徴からこの遺伝子がコードする蛋白は細胞膜貫通型のムチンと予測された (図 3)。この mRNA 発現は手術材料から得られたヒト気管支粘膜においても確認された。16 種類のヒト組織由来の cDNA panel を用いた結果では肺・胎盤・膵臓に陽性であった。

エクソン 2 の繰り返し配列の解析では、約 7 kb の PCR 産物の長さは電気泳動上で 5 種類に別れた。制限酵素で PCR 産物を 2 kb 以下に断片化した場合もやはり 5 種類のパターンが得られた。長さが予想と異なる 4 種類の PCR 産物を断片化してシーケンスした結果、データベースに登録されている 53L9 (GenBank accession no. AB023048) ではエクソン 2 の長さは 4,599 塩基であるのに対し、表 1 に示すように欠失あるいは挿入が認められた。また症例と対照で、最も欠失の大きいアレルの頻度には偏りが認められた。

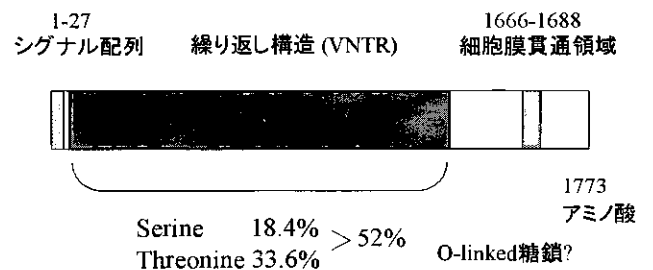


図 3 候補領域内に同定された新規遺伝子
アミノ酸配列上、膜型ムチン様構造を取っており、シグナル配列および膜貫通領域が推測される。

Allele name	Size of exon2 (nt)	deletion	insertion	Cases 184 alleles	Controls 200 alleles
L	4599	0	0	163 (88.6)	166 (83.0)
MI	3575	-1074	+210	12 (6.5)	13 (6.5)
Ms	3548	-1051	0	1 (0.5)	0 (0)
SI	3006	-1593	0	2 (1.1)	4 (2.0)
Ss	2739	-1860	0	6 (3.3)	17 (8.5)

表1 エクソン2の長さの違いとその頻度

繰り返し配列の欠失・挿入により、5つのアリルに分けられた。特に最も短いアリルの症例、対照集団における出現頻度に偏りが認められた (p=0.03)。

D. 考案

DPB 感受性遺伝子となる HLA クラス I の候補領域は、もともと既知の遺伝子が知られていない空白の領域であったこともあり、遺伝子座 (予測も含む) を中心に SNP を検索していくわが国の JSNP プロジェクトでは、取り残された領域であった5)。

日本と韓国の DPB と HLA class I 遺伝子型との関連分析の結果から推測される仮説である、HLA-A, B 間に DPB 発症に関連する遺伝子が存在し、HLA-B*54, A*11 を保有する東アジア人の祖先染色体上にその遺伝子の変異が生じた可能性について検討した結果、HLA-B 座より 300 kb ほどテロメアよりの約 200 kb の領域に DPB 感受性遺伝子が存在する確率が高いことが明らかになり、領域内新規遺伝子の同定と、遺伝マーカー、特に SNPs によるさらなる候補領域の絞り込みにより、疾患感受性遺伝子を分子遺伝学的に同定することが求められた。その結果、200 kb の領域の中には予想以上に多くの SNPs が高密度かつ高頻度に存在した。症例対照のタイピング結果から、強い連鎖不平衡にある 80 kb の領域が見いだされたが、その中で特に疾患と関連の強い特定の SNP を見いだすまでには至っていない。真の感受性遺伝子変異は、この連鎖不平衡のブロック構造の中にある未同定の変異である可能性が考えられる。一方、その候補領域の中に新たな遺伝子がクローニングされた。膜型ムチン様遺伝子で、ヒト気管支上皮細胞に発現することが確認され、疾患との関連を示す遺伝子変異も見いだされたが、連鎖不平衡の結果である可能性が否定できないため、今後、さらに周辺部の検討を行う予定である。

E. 結論

びまん性汎細気管支炎の HLA 関連疾患感受性遺

伝子候補領域 200 kb 内に、100 個以上の SNP が同定され、その連鎖不平衡に関わる島状構造が明らかにされた。またその候補領域の中に新たな遺伝子がクローニングされた。

「謝 辞」

虎の門病院、天理よろづ相談所病院、日本医科大学第4内科の諸先生のご協力をいただきましたことに感謝いたします。

参考文献

- 1) Keicho, N., Kudoh, S.: Diffuse panbronchiolitis: role of macrolides in therapy. *Am J Respir Med*, 1(2):119-131, 2002.
- 2) Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Bannai M, Emi M, Ohishi N, Yazaki Y, Kudoh S. Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 158: 846-850, 1998
- 3) Park MH, Kim YW, Yoon HI, Yoo C-G, Han SK, Shim Y-S, Kim WD. Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 526-529, 1999
- 4) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park MH, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S. Fine localization of a major disease susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet* 66: 501-507, 2000
- 5) Haga H, Yamada R, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tanaka T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 193,037 genetic variations in the human genome. *J Hum Genet* 47: 605-610, 2002

F. 健康危険情報 (略)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, Yasuda K, Tokunaga K, Keicho N. Genetic Variants of Human beta Defensin-1 and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Biochem Biophys Res Commun* 291 (1): 17-22, 2002.
- 2) Matsuzaka Y, Tounai K, Denda A, Tomizawa M, Makino S, Okamoto K, Keicho N, Oka A, Kulski J, Tamiya G, Inoko H. Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region of the class I

- human MHC. *Immunogenetics* 54 (5): 301-309, 2002.
- 3) 慶長直人. びまん性汎細気管支炎. 発症要因と臨床. *Current Concepts in Infectious Diseases* (今日の感染症) 21 (4): 6-9, 2002.
 - 4) 慶長直人. 閉塞性肺疾患. 高齢者のQOL向上をめざして. *Medical Practice* 19 (4): 539, 2002.
 - 5) 慶長直人, 神尾孝一郎, 中田 光. 呼吸器疾患とHLA-bare lymphocyte syndrome と慢性気道感染症. *Molecular Medicine* 39 (12): 1422-1427, 2002.
 - 6) 慶長直人, 中田 光. 14 員環マクロライドの新作用 3. リンパ球、マクロファージとマクロライド. *臨床医* 28: 598-600, 2002.
 - 7) 慶長直人, 土屋朋子, 神尾孝一郎, 中田 光. びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子. *呼吸器科* 1: 54-59, 2002.
 - 8) 松下育美, 中田 光, 慶長直人. COPD 発症につながる危険因子. *Medical Practice* 19 (4): 621-625, 2002.
 - 9) 神尾孝一郎, 慶長直人, 吾妻安良太. 気道感染症と少量マクロライド療法. *小児科臨床* 55 (4): 559, 2002.
 - 10) 田中 剛, 慶長直人. 慢性閉塞性肺疾患の発症にかかわる遺伝因子. *医学のあゆみ* 202 (10): 850-854, 2002.
- ## 2. 学会発表
- 1) Keicho N. Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. In: *China-Japan Medical Conference 2002*, Nov 3-6, Beijing, China, 2002.
 - 2) Keicho N. Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. In: *the 7th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology*, Oct 25-28, Taipei, Taiwan, 2002.
 - 3) Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, Yasuda K, Tokunaga K, Keicho N. Genetic variants of human beta defensin-1 and chronic obstructive pulmonary disease. In: *American Thoracic Society, 2002 International Conference*, May 17-22, Atlanta, USA, 2002.
 - 4) Tanaka G, Matsushita I, Nakata K, Oritsu M, Tokunaga K, Keicho N. Polymorphisms of genes participating in the Th1 immune response in sarcoidosis. In: *American Thoracic Society, 2002 International Conference*, May 17-22, Atlanta, USA, 2002.
 - 5) 神尾孝一郎, 松下育美, 田中 剛, 中田 光, 吾妻安良太, 工藤翔二, 慶長直人. 慢性気道炎症性疾患におけるムチン遺伝子群のプロモーター多型の検討. 第42回日本呼吸器学会総会, 4月4-6日, 仙台, 2002.
 - 6) 神尾孝一郎, 松下育美, 田中 剛, 中田 光, 吾妻安良太, 工藤翔二, 慶長直人. 慢性気道炎症性疾患におけるムチン遺伝子群のプロモーター多型の検討. 第22回気道分泌研究会, 6月1日, 熊本, 2002.
 - 7) 田中 剛, 松下育美, 中田 光, 徳永勝士, 永井英明, 倉島篤行, 豊田恵美子, 小林信之, 永田泰自, 山本一彦, 工藤宏一郎, 慶長直人. 非定型抗酸菌症の発症に関わる遺伝因子の探索. 第42回日本呼吸器学会総会, 4月4-6日, 仙台, 2002.
 - 8) 田中 剛, 松下育美, 中田 光, 徳永勝士, 折津愈, 永田泰自, 山本一彦, 慶長直人. サルコイドーシスとTh1系免疫に関わる遺伝子の多型. 第42回日本呼吸器学会総会, 4月4-6日, 仙台, 2002.
 - 9) 田中 剛, 中田 光, 小林信之, 豊田恵美子, 永井英明, 倉島篤行, 工藤宏一郎, 慶長直人. 非定型抗酸菌症の発症に関わる遺伝因子の探索. 第77回日本結核病学会総会, 4月16-17日, 東京, 2002.
- ## H. 知的財産権の出願 (略)

非定型抗酸菌症の疾患感受性遺伝子同定へ向けて —マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド相関解析

分担研究者 田宮 元 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学
主任研究者 慶長 直人 国立国際医療センター 研究所・呼吸器疾患研究部
岡 晃 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

研究要旨 100kb に 1 個の間隔で計 3 万個のマイクロサテライトマーカーを設定・配置することにより、ゲノムワイドな連鎖不平衡マッピングを行うことが可能となると考えられる。理論的・技術的根拠に基づき、ヒトゲノムドラフト配列より、2~6 塩基繰り返しの新規マイクロサテライト配列を抽出し、プライマー設計を行い、日本人一般健常者集団 100~200 人を対象として多型検索を行い、約 3 万マーカーの設定を終了している。さらに 100~200 人程度のゲノム DNA を混合 (Pool) した DNA を用いたマイクロサテライトタイピング法 (Pooled DNA 法) を利用し、効率的にタイピングを行うことが可能となった。この方法を用いて、本研究の主題である、呼吸器疾患の疾患感受性遺伝子、特に非定型抗酸菌症の疾患感受性遺伝子の同定が迅速に可能となるものと期待される。

A. 研究目的

ヒトゲノムの全塩基配列がほぼ決定した現在、集団の遺伝子多型情報を収集し、個々人の表現形質を規定する遺伝的素因を解明しようとするヒトゲノム多様性解析が世界的なレベルで精力的に進められている。その流れを受け、これまで有効なアプローチの無かった多因子性の遺伝性疾患についても、感受性遺伝子の検索が本格的に始められようとしている。これまでの多因子性疾患の感受性遺伝子検索は、ヒトゲノム上の限られた領域や遺伝子のみを対象とすることしかできず、また、全染色体を対象とする場合にも解像度の低い方法しか用いることができなかった。そのために感受性遺伝子の同定に至りつけないか、至りついたとしても他の遺伝子が関与する可能性を排除できない場合が多かった。これに対し、ヒトゲノムの全 DNA 配列を利用したヒトゲノム多様性解析は、解読された DNA 配列全体に多型性情報を蓄積し、遺伝的マーカーとして利用することによって、ゲノム全体にわたって高解像度でかつ排他的に感受性遺伝子同定を行えるアプローチとして注目されている¹⁾。

このような状況の中、われわれは、上述した利点を有するマイクロサテライトマーカーに着目した。マイクロサテライトは、通常 10 個以上の対立遺伝子を有し、少なくとも 100kb 以上にわたって連鎖不平衡を維持できることが知られている²⁾。実際、我々が

行ってきた HLA 領域における尋常性乾癬の解析においても、マイクロサテライトマーカーが連鎖不平衡を示す範囲は約 200kb であった。

このことより、30 億塩基対からなるヒトゲノムの全染色体領域にわたり、100kb に 1 個の間隔で計 3 万個のマイクロサテライトマーカーを設定・配置すれば、ゲノムワイドに連鎖不平衡マッピングを行うことが可能となると試算された。また、マイクロサテライトは、多型を生じるメカニズムがその繰り返し数に依存して単純であることから、多型マーカーを見出すことが比較的容易である。

非定型抗酸菌症は呼吸器疾患の中でも、慢性、難治性の非定型抗酸菌感染により生じる疾患であり、特別な免疫力の低下徴候のない、中年以降の女性に発症することが多く、近年、わが国で増加傾向にあることが報告されている。本症は、緩徐に進行することが多く、有効な治療法が乏しく、新たな特效薬の開発が急がれる。このような疾患の宿主側の感受性遺伝子をゲノムワイド相関解析により、スクリーニングすることは、ゲノム創薬上も、意義深いものと思われる。

B. 研究方法

1. 対象

非定型抗酸菌症については、対象を MAC 症に限定し、ATS1997 基準 (Am J Respir Crit Care Med Vol. 156.

pp. S1-S25, 1997) に基づいて診断された症例(治療中、治療後を問わない)で、HIV 症例、血液疾患症例(白血病、悪性リンパ腫など)、免疫抑制剤(ステロイドを含む)使用例は対象から除く。既存の肺病変の有無は問わない。説明と同意の可能な症例を対象とする。国立療養所近畿中央病院を中心に、当センター、国立療養所東京病院の協力を得、さらに試料提供施設を追加していくことにより、最終的に 300 例を集積する。

2. ゲノムワイドな新規マイクロサテライトマーカーの設定

ヒトゲノムドラフト配列より、2~6 塩基繰り返しの新規マイクロサテライト配列を抽出しプライマー設計を行い、日本人一般健常者集団 100~200 人を対象として多型検索を行っている。そして、さらに最近では、100~200 人程度のゲノム DNA を混合(Pool)した DNA を用いたマイクロサテライトタイピング法(Pooled DNA 法)を利用する。

3. マイクロサテライトマーカーを用いたゲノムワイド相関解析

ゲノムワイドな遺伝的相関解析の進め方として、理想的には、対象集団を以下の 3 段階のフェーズに分けて解析を行う。すなわち、①非血縁患者集団と非血縁健常者集団を用いた検出力の高い相関解析を補正無しで行うことにより、有意な相関を示すマーカーの一次スクリーニングを行い、②相関を示したマーカーに関して別の集団を用いて補正有りで二次スクリーニングを行い、③最終的には患者の両親を内部コントロールにする TDT (transmission disequilibrium test) 法を採用して相関を追試する。

C. 研究結果

すでに抗酸菌症の発症に関わる遺伝的要因を探求する目的で、遺伝子解析に関する説明と同意が得られた 100 例以上の既提供試料が存在する。多施設共同研究により、平成 15 年度上半期までに、目標の 300 例までに到達することができるものと思われる。

ゲノムワイドに新規マイクロサテライト配列を抽出して、多型性の認められたマーカーについて、対立遺伝子数やヘテロ接合率を加味した上で、順次カタログ化を行っている。また、既に公共データベース上で公開されているマイクロサテライトマーカー約 1 万個についても、日本人集団における多型性を検索し、カタログ化している。既に、約 3 万マーカーの

設定をほぼ終了しており、まもなく、その情報を広く一般に公開する予定である。

D. 考案

以上のように、対照集団を 3 段階のフェーズに分けて解析を行うことにより、サンプル構造に依存した偽陽性を示すマーカーを、無理な補正無しに大幅に減少させることができ、候補領域がそれぞれ約 100kb に絞り込まれると期待される。また、Pooled DNA 法は、効率的にタイピング・多型検索を行う方法として注目されている³⁻⁵⁾。すなわち、この方法の大きな利点は、多数の DNA サンプルからなる Pooled DNA を鋳型として PCR を行うことで、Individual タイピングに比べて時間とコストの大幅な軽減が期待できる点にある。例えば、3 万個のマイクロサテライトマーカーについて、200 人を対象にタイピングを行うことを想定した場合、Individual タイピングでは 600 万回の PCR を行わなければならない。一方、200 人分のゲノム DNA からなる Pooled DNA を鋳型としてタイピングを行った場合には、PCR はその 200 分の 1 の 3 万回で済む。本法では、増幅した PCR 産物の電気泳動上の波形パターンをもとにして推定対立遺伝子頻度を求める。すなわち、波形パターンから全てのピークの高さの総和を求め、その値に対してそれぞれのピークの高さの割合を求めることで推定上の頻度を算出する。

このように、マイクロサテライトマーカーを用いた複数フェーズのゲノムワイド相関解析により感受性候補領域を 100kb 程度まで絞り込んだ後には、各感受性候補領域内に存在する SNP マーカーを用いて相関解析・ハプロタイプ解析を行う。このような手順で解析を進めることにより、ゲノム中に存在する全ての疾患感受性遺伝子および疾患感受性遺伝子座を、高い検出感度を維持したまま“排他的”に同定できると考えている。

E. 結論

われわれは、これまで遺伝学的解析に広く利用されてきたマイクロサテライトマーカーの有用性に着目し、約 3 万遺伝子座という前例のない規模で遺伝的相関解析を行っている。本解析により、未だ確実な方法論のない疾患感受性候補領域の絞り込みから感受性遺伝子の同定に至る戦略を確立し、それをシステム化することで、今後迅速に非定型抗酸菌症の疾患感受性遺伝子の同定が可能となると期待される。

参考文献

- 1) Risch N, Merikangas K : The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273 : 1516-1517, 1996
- 2) Koch HG, McClay J, Loh EW et al : Allele association studies with SSR and SNP markers at known physical distances within a 1 Mb region embracing the ALDH2 locus in the Japanese, demonstrates linkage disequilibrium extending up to 400 kb. *Hum Mol Genet* 9 : 2993-2999, 2000
- 3) Barcellos LF, Klitz W, Field LL et al : Association mapping of disease loci, by use of a pooled DNA genomic screen. *Am J Hum Genet* 61 : 734-747, 1997
- 4) Daniels J, Holmans P, Williams N et al : A simple method for analyzing microsatellite allele image patterns generated from DNA pools and its application to allelic association studies. *Am J Hum Genet* 62: 1189-1197, 1998
- 5) Collins HE, Li H, Inda SE et al : A simple and accurate method for determination of microsatellite total allele content differences between DNA pools. *Hum Genet* 106 : 218-226, 2000

疾患感受性変異同定のための統計学的手法の開発と多型間連鎖不平衡の理論研究

大橋 順 東京大学医学部人類遺伝学教室

研究要旨 本研究では、びまん性汎細気管支炎などの多因子疾患の「(1) 疾患感受性変異を同定するための統計学的手法の開発」と、疾患感受性変異探索研究の基礎情報として利用できる、「(2) 多型間連鎖不平衡のコンピュータシミュレーション用アルゴリズムの開発」を行った。これらの研究内容の要旨は以下の通りである。

(1) 疾患感受性変異を同定するための統計学的手法の開発

多因子疾患の感受性変異の同定を目的とする case-control 関連検定の問題点は、population stratification によって case 群と control 群との間に遺伝的差異（偽陽性）が生じる点である。研究対象集団中には、population stratification は多少なりとも存在すると予想されるが、それを検出することは一般には困難である。そこで、本研究では、たとえ population stratification が存在していたとしても、候補領域中の SNP マーカーの情報を利用することで偽陽性を調整する統計開発手法を開発した。本成果により、ある候補領域中の多数の SNP マーカーが調べられた場合は、population stratification の存在を気にすることなく、case-control 関連検定を行うことができるようになると思われる。

(2) 多型間連鎖不平衡のコンピュータシミュレーション用アルゴリズムの開発

疾患感受性変異の同定を目的とするゲノムワイド連鎖不平衡検定においては、多数のマーカーを効率よくヒトゲノム中に配置することが望まれるが、そのようなマーカーの選択基準は確立していない。選択基準を確立するためには、ヒト集団中で観察される多型間連鎖不平衡データが必須ではあるが、実在集団から得られたデータは質的にも量的にも不十分なため、選択基準の評価に利用するには限界がある。また、ヒト集団中の連鎖不平衡の生成メカニズムについてもよくは理解されておらず、連鎖不平衡ブロックの生成を理論的に研究できるツールの開発が強く望まれている。そこで、本研究では、多型間連鎖不平衡データを簡便かつ迅速に供給するためのコンピュータシミュレーション用アルゴリズムの開発を行った。本成果は、LD ブロック内の代表マーカーを選択するアルゴリズム開発を助け、さらに連鎖不平衡生成メカニズムの機構解明に役立つと期待される。

A. 研究目的

(1) 疾患感受性変異を同定するための統計学的手法の開発

びまん性汎細気管支炎のような多因子疾患の疾患感受性変異を探索する手法としては、連鎖解析より関連解析の方が検出力が高く、さらに関連解析の中では、伝達不平衡検定より case-control 関連検定の方が高いことが分かっている^{2,3)}。しかし、case-control 研究においては、case 群と control 群との間に疾患以外の理由による遺伝的差異が存在する可能性があり、それが原因で疾患と真の関連の無い遺伝子変異（またはマーカー）においても、統計学上有意差が検出される場合がある。一つの集団が複数の小集団から構成されており、小集団内は任意交配であるが小集団間では交配が起きない場合、小集団ごとに集団罹患率、対立遺伝子頻度、連

鎖不平衡の程度が異なると予想される。このことが、疾患以外の理由による、case 群と control 群との遺伝的差異（偽陽性）を生じさせる原因となっている。この問題を解決する方法として提案されているのが genomic control を用いる方法である。この方法は、疾患感受性変異と連鎖不平衡にない（連鎖していない）と予測されるマーカー（genomic control）を用いて、検定を行う際に名義的な有意水準を設定し、感受性変異（または感受性変異と連鎖不平衡にあるマーカー）を同定する方法である。例えば、疾患に全く関連がないとわかっているマーカーに比べ、候補領域にあるマーカーが圧倒的に大きな検定統計量を示した場合、そのマーカーは疾患感受性変異と連鎖不平衡にある（近傍に位置する）可能性が高いと予想される。一方で、候補領域内のマーカーが比較的大きな検定統計量を示

した場合であっても、疾患に関連がないとわかっているマーカーにおいても、それと同程度に大きな値が示された場合は、候補領域内のマーカーで観察された大きな値は、population stratification によってもたらされた可能性が高いと考えられる。この問題を解決するために、Reich and Goldstein⁴⁾は、population stratification が存在するために生じる α エラー（偽陽性）の inflate を抑える有意水準の補正法を提案した。彼らの方法では、疾患と関連がないと確認されている多数の SNP マーカーを事前にタイピングしておく必要がある。しかし、疾患と関連が無いという保証のある SNP マーカーを選定するのは実際には困難である。また、調べる変異が存在する領域とは異なるゲノム領域内の SNP マーカーの遺伝子系図は、調べる変異の遺伝子系図とは大きく異なることも予想される。さらに、ある疾患感受性候補領域内の多数（100 以上）の SNP マーカーが調べられる研究では、当該領域内の SNP マーカーを genomic control として利用できれば、研究効率の観点から考えると望ましい。そこで、本研究では、候補領域内の多数の SNP マーカーに対して χ^2 検定を行う場合に、当該領域内の SNP マーカーを用いて $\alpha\%$ 有意水準の補正を行う統計解析手法の開発を第一の目的とした。

(2) 多型間連鎖不平衡のコンピュータシミュレーション用アルゴリズムの開発

疾患感受性変異をマーカーとの間の連鎖不平衡によって同定しようとする研究（連鎖不平衡検定）においては、調べるゲノム領域の連鎖不平衡の程度（LD ブロックの有無）に応じてマーカーを設定する必要がある。もし連鎖不平衡が強い領域であれば、少数の SNP マーカーによって当該領域をカバーできる（連鎖不平衡検定における当該領域の代表マーカーになる）と考えられている。しかし、そのようなマーカーを設定する基準は確立しておらず、また実際にカバーできているかの判断を実際のタイピングによって検証するのは非常にコストがかかる。そのため、多型間連鎖不平衡の程度をコンピュータシミュレーションによって再現し、その結果をもとにマーカー選択基準を検討することは効率的であり意義深い。そこで、簡便かつ迅速に、多型間連鎖不平衡の基礎情報となるデータを供給するためのシミュレーション用アルゴリズムの開発を第二の目的とした。

B. 研究方法

(1) 疾患感受性変異を同定するための統計学的手法の開発

case-control 研究において、case 群と control 群との遺伝的異質性を調整するために、精確な χ^2 検定統計量の経験分布を推定することなく、候補領域内の比較的小数の SNP マーカーを用いて χ^2 検定統計量を次のように補正する方法を提案する。これは、Reich and Goldstein⁴⁾の方法を、SNP マーカーの選択に関して改良したものである。

(2) 多型間連鎖不平衡のコンピュータシミュレーション用アルゴリズムの開発

Visual Basic（プログラミング言語）を用いて、コンピュータシミュレーションプログラムを構築する。アルゴリズムの内容は以下の通りである。

集団中には $2N$ 本の染色体があると仮定する（集団サイズは一定）。染色体上には等間隔（遺伝距離）に連鎖して存在する n 箇所の二対立遺伝子サイトを仮定する。各サイトにおける突然変異率を u とし、多型のなサイトでは突然変異は起こらないと仮定する。この仮定により、シミュレーション中の全ての変異は単一起源であることが保証される。隣り合う多型間の組換え率を r とし、交差は 2 箇所以上で起きない（二重組換え体は生じない）と仮定する。すなわち、数 Mb 以内に連鎖して存在する多数のサイトを考慮するモデルを考える。シミュレーションは単型的な状態から開始し、十分に時間が経過した後（平衡状態）の結果を解析に利用する。

C. 研究成果

(1) 疾患感受性変異を同定するための統計学的手法の開発

いま、population stratification の非存在下での χ^2 検定統計量を χ_{nopop}^2 、population stratification の存在下での χ^2 検定統計量を χ_{pop}^2 とすると、二つの統計量の関係は $\chi_{nopop}^2 = \chi_{pop}^2 / \mu$ と表すことができる。この式の μ を推定し、検定統計量を補正することで名義的な有意水準を設定することにする。population stratification が存在しない集団で、あるマーカーが「疾患と関連がない」という帰無仮説に従うとすると、検定統計量は自由度 1 の χ^2 分布に従い、 $\mu = 1$ である。

候補領域中の n 個の SNP マーカーを調べたとする。検定を行う SNP を i とし、 i 以外の $n-1$ 個の全ての SNP の中から、 i とは連鎖不平衡にない SNP を全て選び出す。ここで、「連鎖不平衡にない」とは、ペアワイズで連鎖不平衡の強さに関して χ^2 検定した場合に、 $\chi^2 < T$

であることをいう。Tは小さい方が望ましく、0.5以下となるTを採用すべきである。さらに、選び出されたSNPの中から、互いに連鎖不平衡でないSNPを全て選び出す(この個数をmとする)。このm個のSNPをgenomic control用のSNPとする。これらについて χ^2 検定を行い、得られたm個の検定統計量の平均 $\bar{\chi}^2_m$ を μ の点推定値とみなす。真の μ は $\bar{\chi}^2_m$ よりも実際には大きい可能性もあるため、次のように、より保守的にp値を計算する。 $\bar{\chi}^2_m$ は帰無仮説の下で自由度mの χ^2 分布に従うことから、その $\alpha\%$ 信頼区間を計算することができる。 $\bar{\chi}^2_m$ の95%信頼区間の上側点 $\bar{\chi}^2_{m,0.95}$ を名義的な有意水準として採用し、iに対する χ^2 値を $\bar{\chi}^2_m \times \bar{\chi}^2_{m,0.95} / m$ で割った値

$$\frac{\chi^2 \times m}{\bar{\chi}^2_m \times \bar{\chi}^2_{m,0.95}}$$

を補正後の χ^2 値とみなす。このようにすれば、 α エラーのinflateをより保守的に抑えることができる。研究全体の有意水準を0.05とするのであれば、有意水準は $\alpha = 0.05/n$ とする。

例えば、19個のgenomic control用マーカーの χ^2 値の平均値が3.1であり、候補変異の χ^2 値が20であったとすると、 $20/3.1 = 6.5$ を補正後の χ^2 値とみなして χ^2 検定を行い(自由度1)、候補変異に対して $p = 0.011$ を得る。上の例で説明すると、まず自由度19の χ^2 分布の上側95%点である30.14を19で割り1.59($\bar{\chi}^2_{m,0.95} / m$)を得る(自由度mの上側95%点の値は一般的な統計数値表に記載されている)。次に、これをマーカーの平均値である3.1に掛けて4.9を得る($\bar{\chi}^2_m \times \bar{\chi}^2_{m,0.95} / m$)。最後に、候補変異の χ^2 値である20をこの値で割り、 $20/4.9 = 4.1$ を補正後の χ^2 値とみなして χ^2 検定を行うことで(自由度1)、候補変異に対して $p = 0.043$ を得る。

(2) 多型間連鎖不平衡のコンピュータシミュレーション用アルゴリズムの開発

シミュレーションでは $4Nu = 4Nr = 0.2$ とパラメタを設定した。また、シミュレーションを開始してから約4000世代経過後には平衡状態に到達することが確認されたので、この時点でシミュレーションを終了し、シミュレーション結果をもとに多型間の連鎖不平衡係数 D' と r^2 を計算した。なお、マイナーアレル頻度が20%以上であったサイトのみを計算では使用した。これらの指標を計算するアルゴリズムの一部は、平成13年度厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等

研究事業)によって開発されたものであり、平成13年度報告書内に記載してある。

図1に、シミュレーション結果の一例を示す。横軸は多型間の距離(サイト数)を示している。 r^2 に比べ、 D' の方が多型間距離が長くても大きな値を示しており、実際に遺伝子解析を行った際の観察結果とよく一致していると思われる。

図2に、図1と同じデータをGOLDプログラム⁶⁾によって視覚化した結果を示す。右側の r^2 の図から、シミュレーションによって強いLDブロックが誕生したことが理解できる。 D' のプロットからは、全体的に連鎖不平衡の程度は強いと考えられるが、 r^2 のプロットからではそのようには考えられない。その理由は、当該領域中では組換えがあまり起こらないために D' は大きくなったが、突然変異後の機会的遺伝子浮動が r^2 を大きくする方向(多型は維持しつつもハプロタイプ数を減少させる方向)に働かなかったためである。

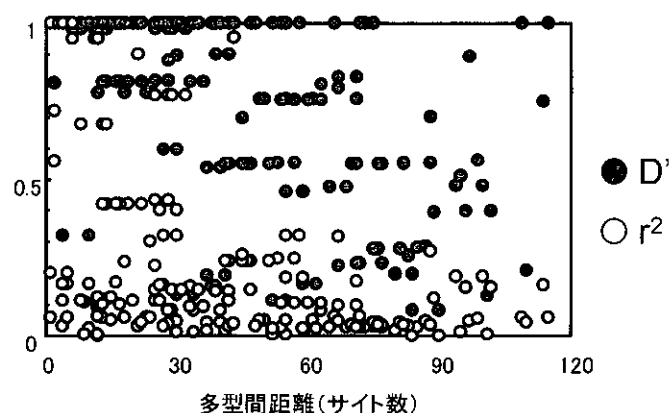


図1 多型間連鎖不平衡シミュレーションによってえられた結果に対して計算された D' と r^2 と多型間距離との関係

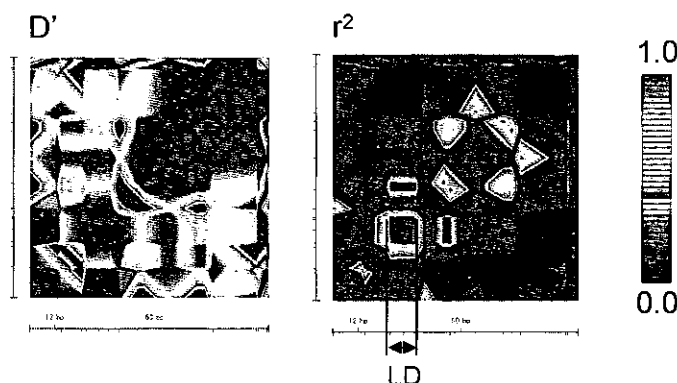


図2 多型間連鎖不平衡シミュレーションによってえられた結果に対して計算された D' と r^2 のGOLDプログラムによる視覚化

D. 考察

(1) 疾患感受性変異を同定するための統計学的手法の開発

今回開発した統計手法が有効であるか否かは、 μ をいかに正確に推定できるかに依存する。 μ の推定方法には、他にも最尤推定法に基づく方法⁵⁾などもあるが、本手法は、これら他の方法によって推定した結果とさほど変わらず、かなり正確に μ を推定することができ、かつ簡便でマーカーの数も少数でよいという利点がある。上記の手法は、 μ の値が大きい場合に、 μ は漸近的に χ^2 分布に従わないと予想されるが、よくデザインされたcase-control研究では、解析結果に大きな影響を及ぼすほどのpopulation stratificationが存在するとは考えにくいと思われる。

(2) 多型間連鎖不平衡のコンピュータシミュレーション用アルゴリズムの開発

図2において、 r^2 の値が1に近い領域は強いLDブロックになっている。このブロック内には5箇所の多型サイトが存在するが、ハプロタイプとしては2種類しか存在しなかった。すなわち、各サイトのメジャーアリルを1、マイナーアリルを0とすると、11111と00000という2種類のハプロタイプのみが存在していた。このような場合は、5箇所の中から任意の1箇所のタイピングを行うことで残りの4箇所のアリルを完全に予測できることになる。ヒトゲノム中にLDブロックが多数存在していれば、ゲノムワイドに行う連鎖不平衡検定に必要なマーカー数を大幅に減らすことが可能となる。しかし、今回の結果から理解できるように、組換えがあまり起こっていない(D'が大きい)領域であっても、必ずしも r^2 は大きくなってはいないと予想される。したがって、ほとんどのゲノム領域では多数のマーカーを調べる必要があることになる。なぜなら、疾患と真の感受性変異との関連を、感受性変異とマーカーとの連鎖不平衡によって検出するためには、感受性変異自体をcase群とcontrol群との間で比較する場合に比べ、かなり大きなサンプルサイズが必要になるからである²⁾。本研究では、組換えはゲノム上で均等に起こると仮定しており、これが実際のヒトゲノムにもあてはまるのならば、ゲノムワイド連鎖不平衡検定においては、かなり大きなサンプルサイズで研究を行うか、多数のマーカーを使用する必要があると思われる。

E. 結論

(1) 疾患感受性変異を同定するための統計学的手法の開発

一つの候補領域内の多数のSNPマーカーが調べられるcase-control研究において、たとえpopulation stratification

が存在する場合でも、 α エラーを有効に抑えることができる統計学的手法のアルゴリズムを提案した。これにより、その非存在を証明することが実際には不可能なpopulation stratificationを気にすることなく、case-control関連研究を行うことができるようになる。これまでの我々の研究成果により、びまん性汎細気管支炎の主要な感受性遺伝子座の候補領域はヒト6番染色体HLA領域の200kbに絞り込まれている。現在は当該領域の多数のSNPマーカーを利用して連鎖不平衡マッピングを行っており、今回開発した手法を用いることで、より信頼性の高い解析ができると予想している。

今後は、実データおよびシミュレーションデータを用いて、本手法の統計学的検出力の検討を行う予定である。

(2) 多型間連鎖不平衡のコンピュータシミュレーション用アルゴリズムの開発

多型間連鎖不平衡をシミュレーションにより再現するためのアルゴリズムを開発することができた。今後は、本アルゴリズムを利用して多数のシミュレーションを行い、連鎖不平衡解析において必要なマーカー選択のためのアルゴリズム開発を行う予定である。さらに、実際の観察データとシミュレーション結果との一致点および相違点を見出し、ヒト集団中で観察される連鎖不平衡の生成メカニズムを解明したい。

参考文献

- 1) Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-1517.
- 2) Ohashi J, Tokunaga K (2001) Power of genomewide association studies of complex disease genes: Statistical limitation of indirect approaches using SNP markers. *Journal of Human Genetics* 46: 478-482.
- 3) Ohashi J, Yamamoto S, Tsuchiya N, Hatta Y, Komata T, Matsushita M, Tokunaga K (2001) Comparison of statistical power between 2×2 allele frequency and allele positivity tables in case-control studies of complex disease genes. *Annals of Human Genetics* 65: 197-206.
- 4) Reich DE, Goldstein DB (2001) Detecting association in a case-control study while correcting for population stratification. *Genet Epidemiol* 20: 4-16
- 5) Devlin B, Roeder K (1999) Genomic control for association studies. *Biometrics* 55:997-1004
- 6) Abecasis GR, Cookson WO (2000) GOLD-graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics*

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ohashi J, Izumi Naka, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K (2003) A single nucleotide substitution from C to T at position -1055 in the *IL-13* promoter is associated with protection from severe malaria in Thailand. *Genes and Immunity* (in press)
- 2) Osawa H, Niiya T, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T, Ogura T, Kato K, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Yamada K, Liang SJ, Manganiello VC, Fujita-Yamaguchi Y, Makino H. Systematic search for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the 5'flanking region of the human phosphodiesterase 3B gene: absence of evidence for major effects of identified polymorphisms on susceptibility to Japanese type 2 diabetes. *Mol Genet Metab* (in press).
- 3) Naka I, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K (2003) Genetic variants of β -globin gene in Thai malaria patients. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* (in press)
- 4) Tarasenko O, Ohashi J, Ataka Y, Inaoka T, Ohtsuka R, Tokunaga K. HLA-DRB1 polymorphism of Balopa islanders in Papua New Guinea. *Anthropological Science* (in press)
- 5) Ataka Y, Ohtsuka R, Inaoka T, Kawabata M, Ohashi J, Matsushita M, Tokunaga K, Kano S, Suzuki M. Variation in malaria endemicity in relation to microenvironmental conditions in the Admiralty Islands, Papua New Guinea. *Asia-Pacific Journal of Public Health* (in press)
- 6) Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K (2003) CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria. *American Journal of Human Genetics* 72: 364-374.
- 7) Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T, Kato K, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Makino H (2003) Systematic search for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *FOXC2* gene: The Absence of evidence for the association of three frequent SNPs and four common haplotypes with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes* (in press)
- 8) Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K (2002) Absence of Association between the *Fc γ receptor IIIA-176F/V* Polymorphism and the Severity of Malaria in Thai. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 55: 167-169.
- 9) Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K (2002) *Fc γ receptor IIA and IIIB* polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria. *Parasitology International* 51: 361-366.
- 10) Tochigi M, Ohashi J, Umekage T, Koda K, Hibino H, Otowa T, Marui T, Masui K, Sugahara Y, Kanamori R, Juji T, Kato N, Tokunaga K, Sasaki T (2002) HLA-A specificities and its relation with season of birth in Japanese patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters* 329: 201-204.
- 11) Ohashi J, Tokunaga K (2002) The expected power of genome-wide linkage disequilibrium testing using single nucleotide polymorphism markers for detecting a low-frequency disease variant. *Annals of Human Genetics* 66: 297-306.
- 12) Ohashi J, Izumi Naka, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K (2002) Significant association of longer forms of CCTTT microsatellite repeat in inducible nitric oxide synthase (iNOS) promoter with severe malaria in Thailand. *Journal of Infectious Diseases* 186: 578-581.
- 13) Sato M, Ohashi J, Tsuchiya N, Kashiwase K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T (2002) Association of HLA-A*3303-B*4403-DRB1 *1302 haplotype, but not of TNF α promoter and NKp30 polymorphism, with postherpetic neuralgia (PHN) in the Japanese population. *Genes and Immunity* 3: 477-481.
- 14) Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T, Kato K, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Makino H (2002) Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene. The absence of evidence for the association of three identified single nucleotide polymorphisms with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 863-866.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権

なし

マイクロサテライト多型との連鎖不平衡を利用した サルコイドーシス感受性遺伝子の探索

	田中 剛	国立国際医療センター 研究所・呼吸器疾患研究部	東京大学呼吸器内科
	松下 育美	国立国際医療センター 研究所・呼吸器疾患研究部	
分担研究者	大橋 順	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室	
分担研究者	中田 光	国立国際医療センター 研究所・呼吸器疾患研究部	
	折津 愈	日本赤十字社医療センター呼吸器内科	
分担研究者	徳永 勝士	東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学教室	
主任研究者	慶長 直人	国立国際医療センター 研究所・呼吸器疾患研究部	

研究要旨 多因子疾患の感受性遺伝子を同定する方法として、多型マーカーとの連鎖不平衡を利用し、大規模な領域を関連解析でスクリーニングする手法が広く検討されている。本研究は、多型性に富むマイクロサテライト (MS) をマーカーとして利用し、サルコイドーシス発症と関連する一塩基多型 (SNP) を同定することを目的に解析を行った。昨年度、Th1 系免疫に関わる 6 遺伝子近傍の MS 多型をマーカーとして設定し、スクリーニングを行い、STAT4 の MS マーカーで疾患との関連を認めていた。本年度は、まず、これらの MS マーカーと候補遺伝子領域の SNP の連鎖不平衡を解析し、マーカーとしての有効性を確認した。次に、関連を認めていた STAT4 領域で感受性変異の有無を確認するため SNP 解析を行った。その結果、STAT4 の MS マーカーと連鎖不平衡にあり、疾患との関連を認める SNP が STAT4 遺伝子のイントロン領域で見出された (A19664G; p 値 0.016)。得られた結果を確定的なものとするため、別の症例・対照群での再現性の確認を行い、その後、機能解析により病態に関わる意義について検討を行う予定である。

A. 研究目的

多因子疾患の疾患感受性遺伝子を同定していく場合、関連解析の手法は、他の方法と比較して、検出力の高い、有力な方法であると考えられている¹⁾。しかし、従来行われてきた候補遺伝子アプローチのように、候補遺伝子をひとつずつ検討する方法では限界がある。そこで、最近、全ゲノム領域や候補領域について多型マーカーを利用し関連解析を行いスクリーニングする方法が検討されている。このような大規模なスクリーニング法を確立するため、一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) を中心とした多型マーカーの設定方法が検討されているが、これまでのところ決定的な方法はない。このような背景のもとで、本研究は、多型性に富むマイクロサテライト (MS) 多型を利用した候補遺伝子領域をスクリーニングを確立し、サルコイドーシスの発症に関わる遺伝子を同定することを目的とした関連解析を計画した。

昨年度、Th1 系免疫に関わる 6 遺伝子近傍の MS

多型をマーカーとして設定し、サルコイドーシスについてスクリーニングを行い、その結果、STAT4 のマーカーで疾患との関連を認めた (表 1,2)。

本年度は、まず、これらの MS マーカーと候補遺伝子領域の SNP の連鎖不平衡を解析し、このようなスクリーニング法の有効性を確認した。そして、関連を認めていた STAT4 領域で感受性変異を同定することを目的に SNP 解析を行った。

B. 研究方法

1. 対象

旧厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班の診断基準により診断されたサルコイドーシス症例 83 例と日本人一般集団 96 例を対象として解析を行った。

2. 候補遺伝子の選択

候補遺伝子には、Th1 系免疫に関わるサイトカインのレセプター (IFN- γ R1, IFN- γ R2, IL-12R β 1, IL-12R β 2) 及びそのシグナルを伝達する転写因子