

(STAT1, STAT4) を選択し、その配列は、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) に登録されているものを利用した。

3. 一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) のタイピング

SNP タイピングは、ABI PRISM 3100 DNA Sequencer を使用し、直接シーケンス法で行った。登録されている SNP のタイピングには、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターと科学技術振興事業団による JSNP データベース(<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index.html>) で頻度 5%以上と報告のあるものを中心に選択し、PCR、シーケンスのためのプライマーはデータベース上に記されているものを使用した。

4. STAT4 領域の未知の SNP 探索

Genbank より取り込んだ STAT4 遺伝子周辺の配列 (NT_022197) 及び mRNA 配列 (NM_003151.2) をもとにプライマーを作成し、プロモーター領域 (-3,000 bp まで)、5'および 3'UTR 領域については 16 検体の genomic DNA を用いてシーケンスし、未知の SNP を探索した。コーディング領域については、cDNA を利用した。まず、RNA を末梢血リンパ球から TRIZOL Reagent (GIBCO BRL) を使用して抽出し、reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により、cDNA 合成した。これを用い、LA-PCR で増幅した後にシーケンスし、コーディング領域の SNP を探索した。

5. 統計解析

(1) ハプロタイプ推定と連鎖不平衡解析

タイピングを行った対照群 88 検体の結果を使用し、MS, SNP とも頻度が 5%以上の対立遺伝子について、連鎖不平衡を解析した。また、対立遺伝子頻度が一致し完全な連鎖不平衡 ($r^2 = 1$) にある複数の SNP については、そのうちの一つのみを代表として解析した。

対立遺伝子が、2重ヘテロ接合体の場合、相を特定できないため、expectation-maximization algorithm (EM algorithm) を用いた ARLEQUIN program (<http://lgb.unige.ch/arlequin>) で推定した。

ハプロタイプ推定の結果をもとに、連鎖不平衡の尺度として、 D' , r^2 を計算した。組換えの頻度について評価する場合には D' を、関連解析のマーカ

としての検出力を評価する場合には r^2 を用いた。

連鎖不平衡の検定には尤度比検定を行った。

(2) Hardy-Weinberg 平衡の検定

対照群の遺伝子型データの正当性の評価には、Hardy-Weinberg 平衡の検定を行った。検定には、ARLEQUIN program を利用した。

(3) 関連解析

タイピング後の疾患との関連解析には、 χ^2 検定を行った。期待値 5 以下となる対立遺伝子については、Fisher's exact 検定を行った。 p 値 0.05 以下を有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子解析は、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省において共同で作成された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した遺伝子解析に係わる倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

1. マイクロサテライト (MS) マーカーと一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) 間の連鎖不平衡の解析

MS マーカーと SNP 間の連鎖不平衡の指標として対立遺伝子毎に計算した D' および r^2 を、IFN- γ R1 を参考として示す (図 1)。STAT 領域以外では D' 値は 0.6-1.0 程度であり、また r^2 もいずれかの対立遺伝子で少なくとも 0.1-0.3 を示し、MS マーカーの対立遺伝子と SNP 間で強い連鎖不平衡を認めた。クラスターを形成する STAT1 および STAT4 遺伝子の領域では、連鎖不平衡の程度は他の候補遺伝子領域と比較し強いものではなかったが、候補領域内の SNP の多くは、尤度比検定でマーカーの対立遺伝子と連鎖不平衡にあることが明らかになった。

2. MS-SNP 間の距離と連鎖不平衡の関係

候補領域の MS マーカーのすべての対立遺伝子と SNP との間の r^2 を計算し、距離との関係を解析した。それぞれの MS と SNP との組み合わせのうち、最も高くなる対立遺伝子についての r^2 値と距離の関係を図 2 に示した。MS と SNP 間の距離が 50kb 程度までであれば、 r^2 値は 0.1 以上の値を示していた。

図1 IFN γ -R1 におけるマイクロサテライトの対立遺伝子と SNP 間の連鎖不平衡- D' , r^2
 マイクロサテライトの各対立遺伝子と候補遺伝子の 5'もしくは 3'付近の SNP との連鎖不平衡を D' と r^2 で計算した。連鎖不平衡の検定で有意であった SNP については、ハプロタイプを組む対立遺伝子を記載した。rs- は dbSNP 登録 ID。() 内は対立遺伝子頻度。

IFNGR1

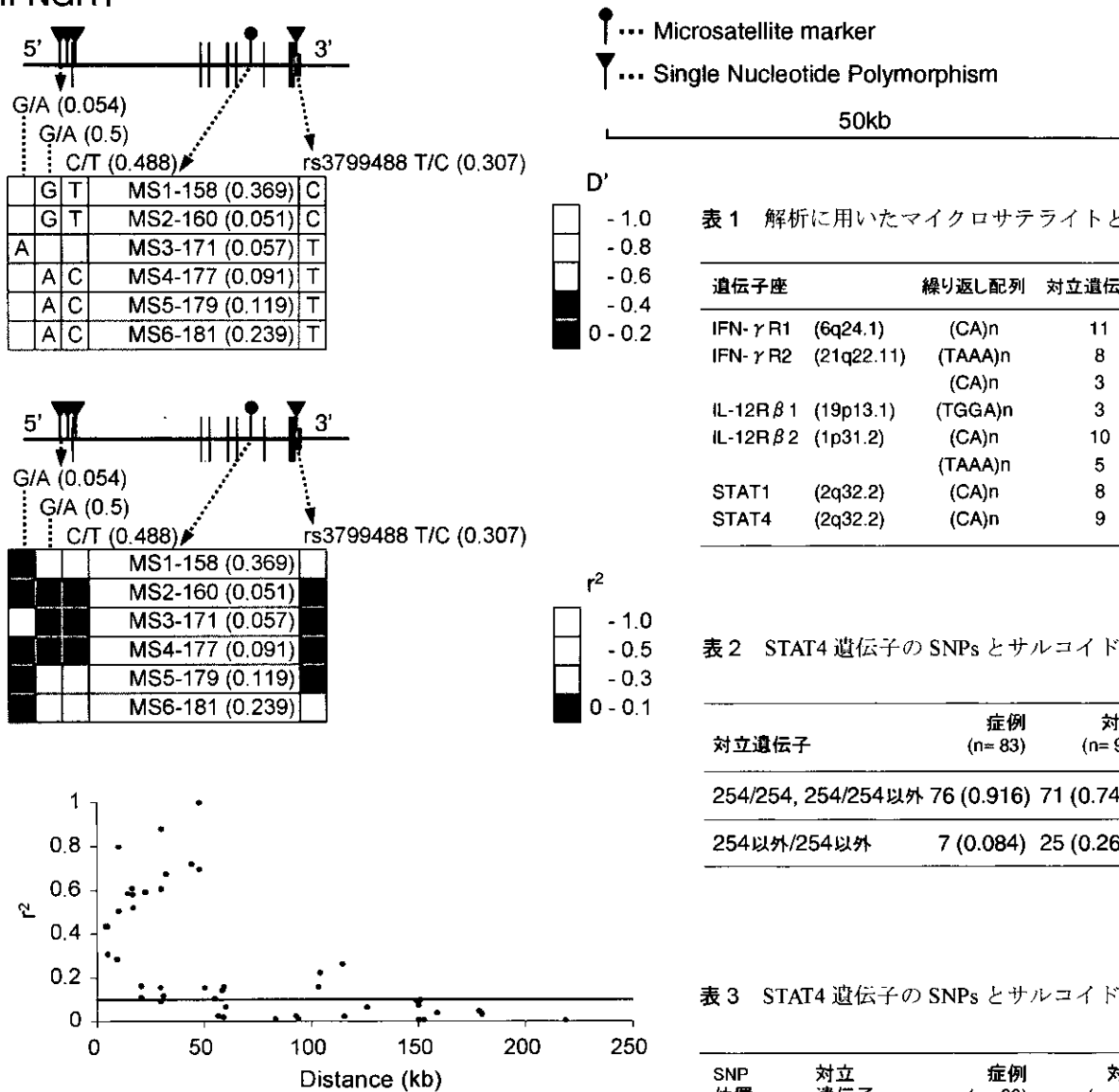


表1 解析に用いたマイクロサテライトと多型性

遺伝子座	繰り返し配列	対立遺伝子数	ヘテロ接合度
IFN- γ R1 (6q24.1)	(CA) n	11	0.78
IFN- γ R2 (21q22.11)	(TAAA) n	8	0.73
	(CA) n	3	0.53
IL-12R β 1 (19p13.1)	(TGGA) n	3	0.67
IL-12R β 2 (1p31.2)	(CA) n	10	0.66
	(TAAA) n	5	0.50
STAT1 (2q32.2)	(CA) n	8	0.66
STAT4 (2q32.2)	(CA) n	9	0.67

表2 STAT4 遺伝子の SNPs とサルコイドーシスの関連解析

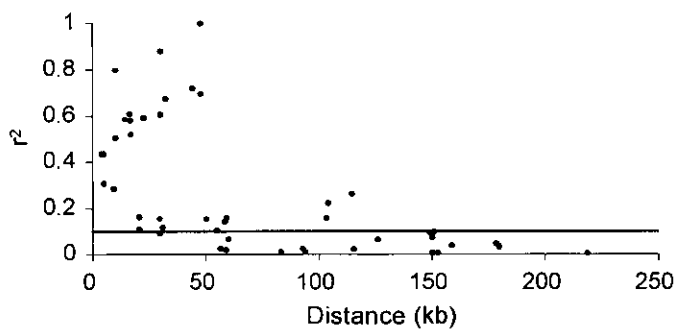
対立遺伝子	症例 (n= 83)	対照 (n= 96)	χ^2 値	P値
254/254, 254/254以外	76 (0.916)	71 (0.740)	9.40	0.0022
254以外/254以外	7 (0.084)	25 (0.260)		

表3 STAT4 遺伝子の SNPs とサルコイドーシスの関連解析

SNP 位置	対立遺伝子	症例 (n= 83)	対照 (n= 96)	χ^2 値	P値
+19664	A/A, A/G	83 (1.000)	89 (0.927)	-	0.016*
	G/G	0 (0)	7 (0.073)		

()内は対立遺伝子頻度. * Fisher's exact検定で解析

図2 候補領域におけるマイクロサテライト-SNP 間の距離と連鎖不平衡 (r^2) の関係
 SNP1 遺伝子座につき、 r^2 値を最大とする MS の対立遺伝子の結果のみを提示した。



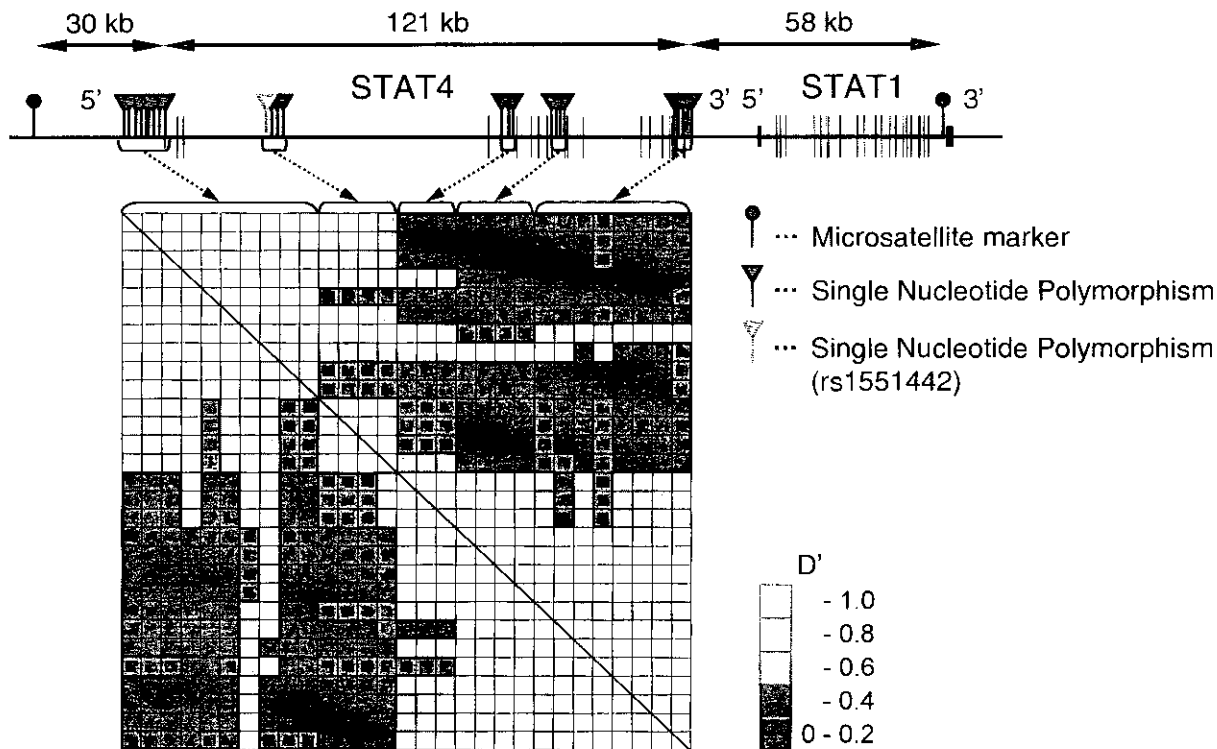


図3 STAT4領域の連鎖不平衡マッピング
STAT4領域内でタイピングしたSNP間のD'を計算した。INT3を境として大きく2つの連鎖不平衡の強い領域に区分けされている。

3. STAT4領域におけるサルコイドーシス感受性変異の探索

STAT4遺伝子のコーディング領域にはSNPを認めなかった。また、NCBIのデータベースdbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)上に登録されている日本人以外のパネルでみられた2カ所の非同義置換(rs3024839, rs3024933)について、症例群83検体でタイピングを行ったが、こちらでもSNPを認めなかった。プロモーター領域(転写開始領域から5'側上流約3,000bp)では、3個(A-1277G, T-977C, A-954G)、新規SNPを同定した。

これらの新規SNP及びJSNPデータベース上から選択したSTAT4領域のSNPを中心に、対照88検体についてタイピングし、連鎖不平衡の解析を行った。その結果、イントロン3を境に、D'が比較的高い値を示す2つのブロックの存在がみられた(図3)。

以上のSTAT4領域に存在するSNPのうち、STAT4マーカーと連鎖不平衡にあるSNPを中心に関連解析を行った結果、A19664G(rs1551442)で、マーカーと同様に保有者の頻度で有意差を認めた(表3)。また、A19664Gとrs1020658, rs1551441, rs1551440(全てイントロン3に存在)は、ほぼ完全な連鎖不平衡

($r^2 \approx 1$)を認めた。

D. 考案

本年度は、昨年度に設定したMSマーカーの連鎖不平衡の及ぶ範囲が候補遺伝子領域内をカバーしているかを確認するため、候補遺伝子の5'もしくは3'末端付近のSNPのタイピングを行った。その結果、クラスターを成すSTAT1, STAT4遺伝子以外のマーカーでは、それぞれの対立遺伝子とSNP間の連鎖不平衡のパラメーターD'は高値を示し、MSとSNPの間にほとんど組換えが起こっておらず、相互に強い連鎖不平衡にあると考えられた。 r^2 もMSのいずれかの対立遺伝子がマーカーとして有用とされる0.1以上の値²⁾³⁾を示し、十分にマーカーとして使用できると考えられた。一方、STAT4遺伝子では、検定で連鎖不平衡は認めるものの、D', r^2 とも他の領域と比較し低値を示し、STAT4領域のマーカーとしては、感度が低いものと考えられた。これは、STAT遺伝子が他の遺伝子と比較して、ゲノム上で占める領域が121 kbと大きい上、マーカーを5'側上流30 kbと離れた位置に設定したことによるものと考えられた。さらに、STAT4領域のSNP解析により、STAT4遺伝子領

域は、イントロン3付近を境に2つの連鎖不平衡の強い領域に区分けされることが示され、遺伝子内に組換えの起こり易いと考えられる領域が存在することが明らかになった。STAT4の3'側は、一部、STAT1のマーカーでカバーされていた。以上の結果から、設定したマーカーを利用した候補遺伝子のスクリーニングは有効であると考えられた。

昨年度に行った解析で、STAT4のマーカーの一つの対立遺伝子で有意差を認め、この対立遺伝子が疾患感受性変異と連鎖不平衡にある可能性が示唆されていた。そこで、今回、STAT4領域のSNP探索、解析を行った。STAT4のマーカーと連鎖不平衡にあるSNPを中心に関連解析を行った結果、イントロン領域にあるSNP(A19664G)で疾患との関連を認めた。また、これらとほぼ完全な連鎖不平衡($r^2 \approx 1$)にあるイントロン領域のSNPでも関連が示唆された。これらは、マーカーとの連鎖不平衡が比較的弱いSNPであり、また、疾患との関連も有意差は認めるものの、それほど強いものではなかった。

STAT4領域に疾患感受性変異が存在する場合、STAT4の機能や発現量などに変化を与えTh1系免疫の賦活化や持続に影響を与える、あるいは細胞内殺菌能に影響を及ぼしサルコイドーシスの発症に関わるなどの可能性が考えられる。しかし、今回、有意差を認めたSNPは、マーカーとの連鎖不平衡が比較的弱いSNPであり、また、疾患との関連も有意差は認めるものの、それほど強いものではなかった。そのため、これらのSNPを真の感受性変異と考えるほかに、マーカーと同様にSTAT4遺伝子内もしくは近傍の別の遺伝子内の未知の感受性変異と連鎖不平衡にあるために有意差がでている可能性も考えられる。

いずれにせよ、この領域で、マーカーの対立遺伝子、SNPの頻度とも症例と対照で有意な差を認めており、このようなスクリーニングで得られた結果を確定的なものとするためには、別の症例・対照群で解析結果の再現性を確認して偽陽性の可能性を排除する必要がある。そして、さらにマーカーと連鎖不平衡にある領域の詳細なマッピングを行い、その後、機能解析で、変異の病態に関わる意義について検討する必要があると考えられた。

参考文献

- 1) Risch N, and Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996;273 (5281):1516-1517.
- 2) Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage dis-

equilibrium mapping of common disease genes. *Nature Genetics* 1999;22 (2):139-44.

- 3) Pritchard JK, and Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *American Journal of Human Genetics* 2001; 69 (1):1-14.

F. 健康危険情報 (略)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) 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.*
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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)

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

神尾孝一郎 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
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
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
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
主任研究者 慶長 直人

研究要旨 びまん性汎細気管支炎など慢性気道炎症性疾患においては気道粘液分泌の亢進がみられ、病態の一部に遺伝素因による修飾が疑われる。われわれは気道粘液の主要構成成分であるムチンの発現調節に注目し、ヒトムチン遺伝子群のプロモーター領域の遺伝子変異と病態との関連を明らかにすることを目的に検討を行った。

これまでの報告に基づき、主に気道に発現がみられるムチン遺伝子群、すなわち、MUC1, 2, 4, 5AC, 5B, 7, 8 の合計 7 つの遺伝子について、転写制御領域約 1~2 kb の範囲に、PCR プライマーセットを設定し、直接シーケンス法により日本人に見られる遺伝子変異の同定を行った。特に MUC5B では、変異が高頻度に認められたため、SSCP 法を応用して、1~1.5 kb の PCR 断片を一度に電気泳動したのち、分離した各一本鎖 DNA をゲルから抽出、PCR 再増幅し、このシーケンスを行うことにより、各ハプロタイプ型を決定した。これらの検討の結果、MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7 のプロモーター領域には新たな変異が同定され、特に MUC5B では複数の変異により構成されるプロモーターハプロタイプの構造が明らかになった。さらにびまん性汎細気管支炎との関連解析の結果、MUC5B の特定のハプロタイプとの関連が示唆された。

A. 研究目的

ハプロタイプ構造が決定されればこれを 1 つのアリルとして扱うことが可能となり、多因子疾患の疾患感受性遺伝子の同定に際し、ハプロタイプを用いた関連解析を行うことができるようになる。一方、従来の解析では、個々の変異について疾患との関連をみることが一般である。しかしながら、解析結果が陽性の変異であっても真の原因となる変異と単に連鎖不平衡にあるだけのこともあり、また個々の変異が陰性の結果であっても近隣の変異との組み合わせ、すなわちハプロタイプ単位での解析は行えないことになり、あるハプロタイプが疾患の発症に関与する場合には真に疾患と関連のある変異が見落とされてしまうことになる。これらのことから、近年ではハプロタイプを単位とした解析が行われつつある。例えば Drysdale らは、 β_2 アドレナリン受容体のプロモーター領域にある個々の変異およびそれらから

なるハプロタイプでの解析で、個々の変異ではなく特定のハプロタイプ構造が β_2 受容体刺激薬への反応性と関連を示したと報告しており、ハプロタイプを用いた解析の重要性を強調している¹⁾。

この様にハプロタイプでの解析は重要性を増しているが、現在普通に行われるシーケンシングなどの genotyping 法では遺伝子座ごとの個々のアリルの組み合わせ、すなわち相を決定することができず、従ってハプロタイプに関する情報を得ることができない。このような問題を解決する一つの手段として、統計的にハプロタイプを推測する方法がいくつか考案されている。これらには Clark による最大節約法や²⁾、expectation-maximization (EM) アルゴリズムを用いて最大尤度法で推定する方法などがある^{3,4,5)}。またベイズ推定に基づいた PHASE アルゴリズムも使用できるようになっており、これでは全体のハプロタイプ頻度だけではなく、case 毎のハプロタイプ

の組み合わせを推定することが可能となっており、またこの確からしさも同時に推定される⁶⁾。しかしながら統計的に推定されたハプロタイプはあくまで推定量でありそれ自体が幅を持つものであるため、この推定値を用いて χ^2 検定を行うことは問題がある。またこれらの推定を行うに当たっては、Hardy-Weinberg 平衡が成立していることが前提となるが、疾患群では必ずしもこの平衡が成立しているとは限らない。一方、仮に家系データが利用できるのであればハプロタイプの構築は比較的容易になるが、多因子疾患の多くは late onset であり、症例の両親を含めた家系データの入手は極めて困難である。

これらとは別に、一本の染色体上の変異の組み合わせを実験的に直接決定する方法も考案されており、allele specific primer を用いる方法やクローニング、また somatic cell hybrid を利用した方法などが行われている。いずれもコスト面や簡便さには長所、短所があり、必ずしも一般化しているとは言い難い。

この様な問題を解決するため、今回われわれは通常行われる single strand conformation polymorphism (SSCP) 法を応用し、ハプロタイプを決定する方法を考案した。通常の SSCP 法は 300 bp 程度の一本鎖 DNA に含まれる 1~2 個の変異を同定する簡便で安価な方法であるが、これを modify し 1~1.5kb 程度の比較的長い PCR 産物に應用することにより、この中に含まれる複数の変異の組み合わせ、すなわちハプロタイプを決定する事が可能となった。この方法を開発するに当たり使用した遺伝子はムチン遺伝子群のうち MUC5B であるが、ムチン遺伝子群のプロモーター領域の変異解析の中で MUC5B で比較的多数の変異が同定され、これらがびまん性汎細気管支炎 (DPB) と関連することが推定されている。

ムチン遺伝子群の解析を開始した背景には、DPB を始めとした慢性気道炎症性疾患においてムチンの関与が想定されることがある。ムチンは気道粘液の水分以外の主要な構成成分であり、気道粘膜の潤滑化や外来異物や微生物からの粘膜保護の役割を果たしていると考えられているものであるが、DPB を始めとした慢性気道炎症性疾患においては気道粘液分泌の亢進がみられ、その主要な成分であるムチン遺伝子の転写活性が亢進していることが推測される。また特に DPB では MHC class I の約 200kb の領域に疾患感受性遺伝子の存在が推定されており⁷⁾、この領域において現在ムチン様の遺伝子のクローニングが進行している。このことから、この病態においてムチンが持ちうる役割は注目される。そのため

われわれはムチン遺伝子群の発現調節という観点から、気道に主に発現が見られるムチン遺伝子群について各プロモーター領域の変異解析を開始した。この結果、MUC5B の複数の変異が DPB と関連を示し、連鎖不平衡構造の解析ならびに統計的な解析からこれらの変異を含む特定のハプロタイプと疾患との関連が予想されたため、上述の方法を考案し解析を試みた。この解析から得られたハプロタイプは統計的な推定量とは異なる実在するデータとなるが、双方の解析結果を検討することによりそれぞれの利点や問題点についての考察も行った。

B. 研究方法

1. 対象

ヒトの正常気道における発現が報告されているムチン遺伝子のうち⁸⁾、MUC5B を解析の対象とした。MUC5B のプロモーター活性を検討した報告に基づき^{9,10,11)}、転写調節領域約 2 kb をカバーするようにプライマーセットを作成し、一塩基多型すなわち SNP (single nucleotide polymorphism) のスクリーニングを行った。スクリーニングは健常者 16 名で PCR-SSCP 法と direct sequence 法を用いて行った。Direct sequence には ABI PRISM 3100 DNA sequencer を使用した。これらのスクリーニングで検出された SNPs に関して、頻度が 5% 以上の対立遺伝子について疾患群と対照群で関連解析を行った。この解析では、1997 年および 1998 年に各施設より提供を受け、1995 年厚生省班診断基準に基づき DPB と確認された 92 例を疾患群、129 例を対照群とした。

2. MUC5B プロモーター領域のハプロタイプ解析 (SSCP 法の応用)

MUC5B のプロモーター領域に認められた 10 個の SNPs からなるハプロタイプを実験的に確定するために、SSCP 法を応用した方法を開発した。MUC5B のプロモーター領域を、7 個の変異を含む上流側と 5 個の変異を含む下流側の 2 カ所にわけて PCR 増幅した (図 2 A)。PCR 産物は熱変性後、約 1.3 kb の上流側は 5% アクリルアミドゲルで泳動し、約 1.1 kb の下流側は 6% アクリルアミドゲルで泳動したが、こちらには変性剤として 5% の濃度になるようにフォルムアミドを添加した。ゲルの作成時には、ゲル版の片方の面に Bind-Silane (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) を塗布しゲルを固定した。泳動時の温度は水温の実測で、上流側は 27°C、下流側は 13°C とし、両方とも 300V で 4 時間泳動した。泳動終了後

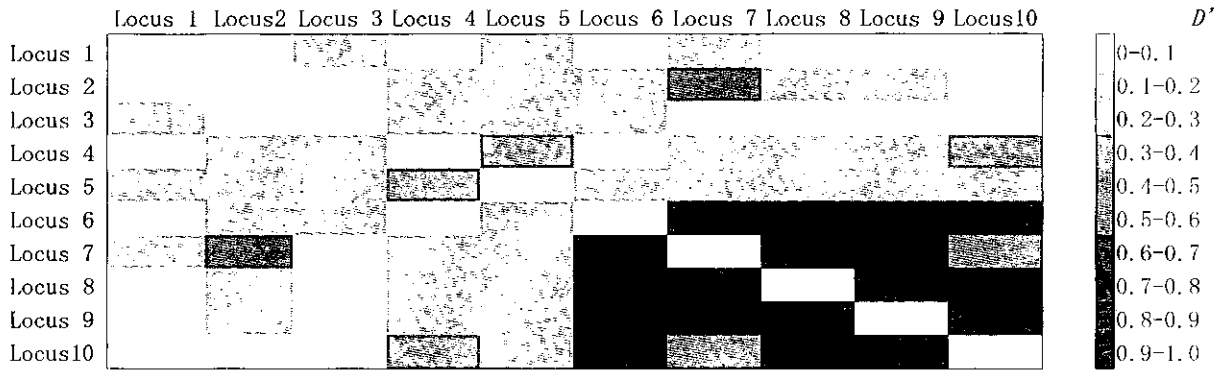


図1 MUC5B プロモーター領域の SNPs 間の pairwise D' (対象群 129 例)

SNP は 5' 側から Locus 1 とし、転写開始点に最も近い SNP を Locus 10 としてある。 D' は 0 から 1 までの範囲で、1 に近い程連鎖不平衡の程度は強くなる。この例では転写開始点に近い 5 個の SNPs が強い連鎖不平衡にあることが考えられる。

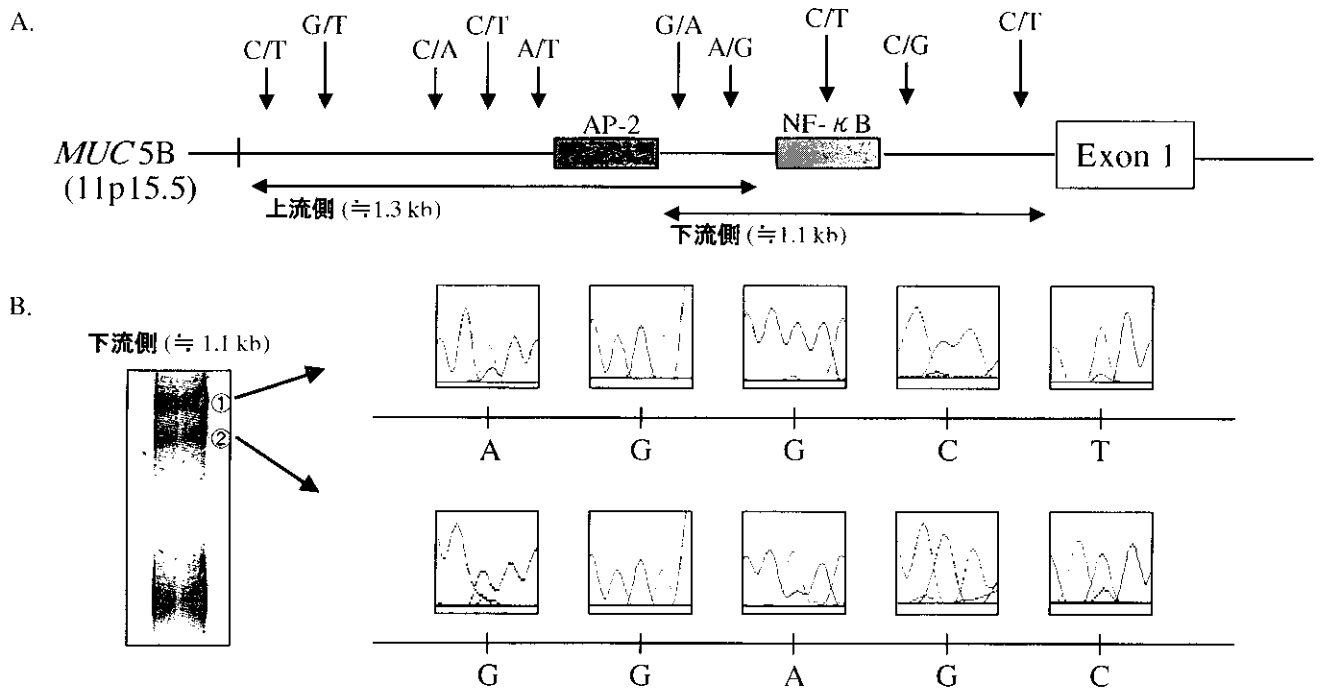


図2 SSCP によるハプロタイプ決定の例

- A. MUC5B のプロモーター領域を上流側と下流側の 2 カ所に分け、PCR 増幅後に SSCP を行った。AP-2、NF- κ B などは参照文献に記載のあった、転写因子が結合するコンセンサス配列の位置を示している。各変異の位置は最上段に ↓ で示している。
- B. 5 個の変異を含む約 1.1 kb の下流側で SSCP を行った一例を示している。バンド①、②を切り出し、DNA を抽出後に PCR で再増幅しシーケンスを行った。バンド①は AGGCT、バンド②は GGAGC という変異の組み合わせを含むことがわかりこれによりハプロタイプが決定できる。

は銀染色を行ったが、ゲルは片方のゲル板に固定した状態で施行した。得られたバンドは一本の chromosome に相当するものであるが、これを切り出し tube の中で粉碎後に 95°C で 30 分間加熱し DNA を抽出した。これを再度 PCR で増幅し、この塩基配列を direct sequence 法で決定しハプロタイプを確定した。今回は対照群 50 例について解析した。

3. 統計学的解析および処理

疾患と変異の関連解析では χ^2 検定を行い、 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意と判定した。対照群の各変異については Hardy-Weinberg 平衡の検定を行った。

MUC5B のプロモーター領域に認めた 10 個の変異については、変異間の連鎖不平衡の尺度として、expectation-maximization (EM) algorithm³⁾で推定した

ハプロタイプ頻度をもとに、対照群 129 例につき Lewontin's D' ¹²⁾を計算した。 D' とハプロタイプ頻度は minor-allele frequency が 5%以上の変異について解析した。さらにこの 10 個の変異は、連鎖不平衡の弱い上流側の 5 個と連鎖不平衡の強い下流側の 5 個に分け、それぞれのハプロタイプ頻度を EM algorithm に基づいた最大尤度法で推定した。実際の計算には Arlequin program(versoin 2.000) を用いた¹³⁾。同様に PHASE algorithm を用いてそれぞれのハプロタイプ頻度を計算した⁶⁾。EM algorithm および PHASE algorithm により推定したそれぞれのハプロタイプ頻度は、SSCP を用いて実際に確定したハプロタイプとの確からしさを比較したが、この際の尺度としては Stephens らによる Discrepancy を用いた⁶⁾。また PHASE algorithm では解析した個人ごとに推定したハプロタイプが割り振られるが、phase unknown の個体に関して SSCP で確定した実際のハプロタイプと PHASE algorithm での推定値との一致度を error rate を用いて検討した⁶⁾。

(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. 研究結果

1. MUC5B プロモーター領域の各 SNPs における疾患群と対象群の関連解析 (表 1)

PCR-SSCP 法と direct sequence 法によるスクリーニングの結果、MUC5B のプロモーター領域に 10 個の変異を認めた。この中には、SNP のデータベースである dbSNP に報告されているもの以外に、今回の解析で新規に認めたものも含まれている。JSNP には報告は見られなかった。これらの SNPs について疾患群と対照群の間で関連解析を行った結果、MUC5B の 3 個の SNPs で疾患との関連が認められた。

2. MUC5B プロモーター領域の SNPs 間の連鎖不平衡構造の解析

SNPs 間の連鎖不平衡の強さの程度の指標として、対照群 129 例について計算した pairwise の D' の結果を図 1 に示す。転写開始点に近い 5 個の SNPs の間では Locus 7 と Locus 10 の間を除いて全て D' が 0.8、1.0 の間で強い連鎖不平衡にあることがわかる。

Gene	Polymorphism *	No. (%)	
		DPB(2n=184)	control(2n=258)
MUC5B Locus 1	T allele	70(38.0)	104(40.3)
	C allele	114(62.0)	154(59.7)
Locus 2	G allele	69(37.5)	81(31.4)
	T allele	115(62.5)	177(68.6)
Locus 3	C allele	45(24.5)	60(23.3)
	A allele	139(75.5)	198(76.7)
Locus 4	T allele	63(34.2)	112(43.4)
	C allele	121(65.8)	146(56.6)
Locus 5	A allele	83(45.1)	131(50.8)
	T allele	101(54.9)	127(49.2)
Locus 6	A allele	40(21.7)	53(20.5)
	G allele	144(78.3)	205(79.5)
Locus 7 ^b	A allele	41(22.3)	87(33.7)
	G allele	143(77.7)	171(66.3)
Locus 8	A allele	86(46.7)	97(37.6)
	G allele	98(53.3)	161(62.4)
Locus 9 ^c	G allele	88(47.8)	99(38.4)
	C allele	96(52.2)	159(61.6)
Locus 10 ^d	T allele	70(38.0)	125(48.4)
	C allele	114(62.0)	133(51.6)

表 1 MUC5B のプロモーター領域に見られた変異の関連解析

^a プロモーター領域の変異は 5' 側より記載してある。

^b OR = 0.56; 95% CI 0.37-0.87; $\chi^2 = 6.83$, and P = 0.0090

^c OR = 1.47; 95% CI 1.00-2.16; $\chi^2 = 3.93$, and P = 0.0474

^d OR = 0.65; 95% CI 0.44-0.96; $\chi^2 = 4.72$, and P = 0.0299

3. SSCP を応用した MUC5B プロモーター領域の SNPs からなるハプロタイプの確定

Locus 6~10 の 5 個の SNPs を含む PCR product を泳動後にバンドを切り出し、DNA を抽出後、再度 PCR を行い direct sequence でハプロタイプを決定した結果を図 2B に示す。この例ではそれぞれのバンドから GGAGC と AGGCT という変異の組み合わせが確定され、この 2 つのハプロタイプが存在することが決定できる。対照群 50 例で行った今回の検討では、この領域に 7 種類のハプロタイプが実験的に確認された (表 2)。この領域は図 1 の連鎖不平衡の強い領域に相当する。

一方、図 1 で連鎖不平衡の弱い 5 つの SNPs を含む上流側の PCR product を泳動しハプロタイプを決定した結果では、39 種類のハプロタイプが認められた。このうち頻度が 5%未満のものが 56%を占めた。

上流側 (Locus1~7) 頻度(%)		下流側 (Locus 6~10) 頻度(%)		
HU1	CTATTGA	11	HL1 GGAGC	37
HU2	CGACTGG	8	HL2 GAGCT	24
HU3	TGACTGG	7	HL3 AGGCT	21
HU4	CTACAGA	7	HL4 GAGCC	10
HU5	TTATAGG	6	HL5 GGGCC	3
HU6	CTACTGA	5	HL6 GGGCT	3
HU7	TTACTGG	4	HL7 AGGCC	2
HU8	CTACTGG	4		
HU9	TTACAAG	4		
HU10	TTACTAG	3		
HU11	CGATAAG	3		
HU12	CTATAAG	3		
HU13	CTATAGG	3		
HU14	TTCTAGG	3		
HU15	TTCTAGA	2		
HU16	CGCCTGG	2		
HU17	TTATAGA	2		
HU18	CTACAAG	2		
HU19	TTCTAAG	1		
HU20	CGCTTAG	1		
HU21	CTCTAAG	1		
HU22	TGATTGA	1		
HU23	CGATAGG	1		
HU24	TTACTGA	1		
HU25	CGCTAGG	1		
HU26	TGACAGA	1		
HU27	CTACAGG	1		
HU28	TTCTTAG	1		
HU29	CGACTGA	1		
HU30	TTCCAGA	1		
HU31	TTCTTGG	1		
HU32	CTCTAGG	1		
HU33	TGCTAGA	1		
HU34	CTACTAG	1		
HU35	CGACTAG	1		
HU36	TGATAAG	1		
HU37	TTATTAG	1		
HU38	TTACAGA	1		
HU39	TGACAGG	1		

表2 SSCPからの切り出しにより確定したMUC5Bプロモーター領域の上流側と下流側のハプロタイプ頻度(対照群50例、100アレル)

連鎖不平衡の強い下流側では7種類のハプロタイプが認められたが、連鎖不平衡の弱い5個のSNPsを含む上流側ではハプロタイプの種類は39となった。

HU: 上流側のハプロタイプ、HL: 下流側のハプロタイプ

4. EM algorithm および PHASE algorithm によるハプロタイプ頻度の推定ならびに実験的に確定したハプロタイプとの比較

MUC5B のプロモーター領域の10個のSNPsをLocus 1~5 と Locus 6~10 の2つに分けて、Arlequin program と PHASE program を実行した。SSCPを用いて実験的に確定したハプロタイプもこの2つの領域に分けて解析し直した。対象は対照群50例、100ア

レルである。結果を(表3)に示す。ハプロタイプのばらつきの多いLocus 1~5では統計学的に推測できないハプロタイプがみられ、PHASE algorithmではその傾向が強くなることが考えられる。SSCPにより実験的に確定したハプロタイプとのDiscrepancyは、EM algorithmでは0.19、PHASE algorithmでは0.21となった。個々のハプロタイプで見ても、例えばCTACAは推定では14%で最もmajorなハプロタイプであるが、実測の10%とかなりのずれが認められた。一方、連鎖不平衡が強く実験的にもハプロタイプのばらつきが少ないLocus 6~10の解析では、Discrepancyはいずれも小さく、統計的な推定値が実測値と極めて近似することが確認された。

またPHASE algorithmでは各個人のハプロタイプの組み合わせを推定できるが、対照群50例のうちgenotypeからphaseを決定できない者、すなわち2カ所以上のlocusでヘテロになっている者に対してPHASE algorithmの推測が異なったケースの割合をerror rateとして計算した。ハプロタイプのばらつきの多いLocus 1~5ではphase unknownの者のうち、42%でハプロタイプを正しく推測することができなかった。一方ハプロタイプが少ないLocus 6~10では正しく推測できなかったのは一例のみであった。

D. 考案

はじめに触れたように、現在通常行われているシーケンシング法では個人のgenotypeの決定は可能だが、ハプロタイプ構造を決めることはできない。ハプロタイプ構造の重要性についての認識はますます高まってきており、この決定をめぐる方法論に関しては現在様々に議論されている。統計学的な推測は、genotypingにより得られたデータをもとに解析を行う簡便な手段であるが、それ自体がばらつきをもつため、これにより得られたデータをもとに χ^2 検定などさらに統計処理を行うことは問題があると考えられる。実験的にハプロタイプを決定する方法も複数考案されているが、簡便さなどの点から一般化しているとは言い難い。

SSCPは一本鎖DNAが形成する三次元構造の違いが、アクリルアミドゲル上での移動度の違いとして認められることを応用したものである。通常は1~2個の変異を含む300塩基程度のDNAに用いられる方法であるが、それ以上の変異が含まれる場合での検討は十分には行われていない。今回の検討では複数の変異が含まれる1kb以上のDNAを泳動したため、通常用いる10%のアクリルアミドゲルではバンドの

Locus 1 2 3 4 5			Locus 6 7 8 9 10		
CTATT	(.11)	{.12} [.12]	GGAGC	(.37)	{.37} [.37]
CTACT	(.10)	{.09} [.09]	GAGCT	(.24)	{.25} [.25]
CGACT	(.10)	{.11} [.13]	AGGCT	(.21)	{.21} [.21]
CTACA	(.10)	{.14} [.14]	GAGCC	(.10)	{.09} [.09]
TTATA	(.08)	{.11} [.12]	GGGCC	(.03)	{.04} [.04]
TACT	(.08)	{.05} [.05]	GGGCT	(.03)	{.02} [.02]
Others	(.43)	{.38} [.35]	Others	(.02)	{.02} [.02]
Discrepancy		{.19} [.21]			{.017} [.02]
Error		15			1
Error rate		0.417			0.037
Phase unknown		36			27

表3 ハプロタイプ頻度の実験的決定値と推定値の比較

MUC5B プロモーター領域の SNPs を Locus 1~5 と Locus 6~10 に分けて、健康者 50 例、100 アリルについて解析した。Discrepancy は $\frac{1}{2} \sum |f_j - f_j'|$ で計算したが、ここで f_j と f_j' はそれぞれ j 番目のハプロタイプ頻度の推定値と実測値を表している。Error rate は genotype で phase を決定できない者のうち、PHASE algorithm での推測が実測によるものと異なる割合を示している。() = 実験値、{ } = EM algorithm による推定、[] = PHASE algorithm による推定

分離が不十分であり、5~6%程度の薄いゲル濃度での泳動が必要であった。この場合銀染色時の破損が問題となるため、ゲルの作成時には Bind-Silane をゲル板の一方の面に塗布することによりゲルをゲル版に固定し、ゲル板ごと染色を行った。さらに GC-rich の領域ではフォルムアミドを添加することにより、良好なバンドの分離が得られた。

この様に通常の SSCP にいくつかの操作を加えることにより 1~1.5kb 程度の長さの DNA の解析が可能となり、これにより得られるバンドを切り出し DNA を抽出し再増幅することにより、一本鎖 DNA 上の複数の変異の組み合わせ、すなわちハプロタイプの決定が可能となった。今後の課題としては、さらに長い DNA の場合どの程度までこの方法を応用する事が可能であるかなどの検討が残されている。また今回の方法は PCR ベースで全てが処理でき、PCR-SSCP 法とバンドの切り出しの自動化が達成されれば、1 から 2 キロベースの塩基配列上にあるハプロタイプの決定が容易になると考えられる。

このように SSCP を応用することにより、今回の検討では MUC5B のプロモーター領域約 2 kb に存在する 10 個の SNPs からなるハプロタイプを決定することができた。対照群 129 例についてこの領域の連鎖不平衡構造を解析した結果では、転写開始点に近い 5 個の SNPs は強い連鎖不平衡にあり、これらからなるハプロタイプは 7 種類のみであった。一方これより上流側の 5 個の SNPs の連鎖不平衡の程度は弱い、これを含むハプロタイプは 39 種類と非常にばら

つきが大きくなった。連鎖不平衡の弱い領域は組み換えの頻度が高いことも予想され、従ってハプロタイプの種類が多くなることは考えられることである。

この 10 個の変異を 5 個ずつに分けて統計的に推測したところ、連鎖不平衡の強い領域での推測値は実験値と非常に良く一致した。しかし連鎖不平衡が弱い領域では実験値からの隔たりが大きくなる傾向がみられ、PHASE algorithm で推測した個人ごとのハプロタイプが実測値に一致しない割合も、この領域では大きくなった。今回の検討から、連鎖不平衡の弱い領域で統計学的な推測を行う場合には、実測値との隔たりが存在する可能性があることが示唆される。

しかしアリル頻度の低いハプロタイプの解析を行うことがどの程度まで必要であるかは議論のあるところであり、統計的な推測もこのような領域で行うことを必ずしも前提としていない可能性が考えられる。ただし、統計的な推測の適応などを議論した報告はまだ乏しく、今回の検討はどの様な領域で推測したハプロタイプ頻度の信頼性がより高くなるかある程度示すものと考えられる。さらに呼吸器疾患は比較的稀少な疾患が多く、このようなばらつきの大きい領域の解析が必要となることも考えられるため、ハプロタイプ頻度の確定値を得られる手段は重要と考えられる。

MUC5B のプロモーター領域の変異の解析では、複数の SNP で DPB との関連が認められたが、今後はハプロタイプでの解析を行い、関連が予想される場合にはハプロタイプ単位での機能解析を予定している。

参考文献

- 1) Connie M. Drysdale et al. (2000) Complex promoter and coding region β_2 -adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict *in vivo* responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10483-10488.
- 2) Clark AG (1990) Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Mol Biol Evol* 7: 111-122
- 3) Excoffier L and Slatkin M (1995) Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 12:

921-927

- 4) Hawley M, Kidd K (1995) HAPLO: a program using the EM algorithm to estimate the frequencies of multi-site haplotypes. *J Hered* 86:409-411
- 5) Long JC, Williams RC, Urbanek M (1995) An E-M algorithm and testing strategy for multiple locus haplotypes. *Am J Hum Genet* 56:799-810
- 6) Matthew Stephens et al. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68:978-989.
- 7) Keicho N, et al. (2000) : Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet.* Feb; 66(2): 501-7.
- 8) Marie-Christine Copin et al. (2000) From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int. J. Cancer.*: 86, 162-168
- 9) Van Seuningen et al. (2000) Sequence of the 5'- flanking region and promoter activity of the human mucin gene MUC 5B in different phenotypes of colon cancer cells. *Biochem. J.* 348 675-686.
- 10) Perrais, M. et al. (2001) Aberrant expression of human mucin gene MUC5B in gastric carcinoma and colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276 (18), 15386-15386
- 11) Yin Chen et al. (2001) Characterization of human mucin 5B gene expression in airway epithelial and genomic clone of the amino-terminal and 5'-flanking region. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* Vol.25, pp. 542-553,
- 12) Lewontin RC et al. (1964) The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 120: 849-852, 1964.
- 13) Schneider S et al. (2000) Arlequin, version 2.000: a software for population genetics data analysis. *Genetics*

and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva

F. 健康危険情報（略）

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.

H. 知的財産権の出願（略）

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Fujii T, Hogg J, <u>Keicho N</u> , Vincent R, Van Eeden S, Hayashi S	Adenoviral E1A modulates inflammatory mediator expression by lung epithelial cells exposed to PM10	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	284 (2)	L290-L297	2003
Hijikata M, Hayashi S, Trinh TT, Ha LA, Ohara H, Shimizu YK, <u>Keicho N</u> , Yoshikura H	Genotyping of hepatitis E virus from Vietnam	Intervirology	45 (2)	101-104	2002
Matsuzaka Y, Tounai K, Denda A, Tomizawa M, Makino S, Okamoto K, <u>Keicho N</u> , 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
Matsushita I, Hasegawa K, Nakata K, Yasuda K, Tokunaga K, <u>Keicho N</u>	Genetic Variants of Human beta Defensin-1 and Chronic Obstructive Pulmonary Disease	Biochem Biophys Res Commun	291 (1)	17-22	2002
Oka A, Hayashi H, Tomizawa M, Okamoto K, Suyun L, Hui J, Kulski JK, Beilby J, <u>Tamiya G</u> , Inoko H	Localization of a non-melanoma skin cancer susceptibility region within the major histocompatibility complex by association analysis using microsatellite markers	Tissue Antigens	61 (3)	203-210	2003
Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takemura T, Takizawa T, Koike M, <u>Kudoh S</u> , Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma OP, Ando M	Quantitative Analysis of Mycobacterial and Propionibacterial DNA in Lymph Nodes of Japanese and European Patients with Sarcoidosis	J of Clinical Microbiology	1	198-204	2002
Oka A, Hayashi H, Tomizawa M, Okamoto K, Suyun L, Hui J, Kulski JK, Beilby J, <u>Tamiya G</u> , Inoko H	Localization of a non-melanoma skin cancer susceptibility region within the major histocompatibility complex by association analysis using microsatellite markers	Tissue Antigens	61 (3)	203-210	2003
Tsuji H, Okamoto K, Matsuzaka Y, Iizuka H, <u>Tamiya G</u> , Inoko H	SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris(small star, filled)	Genomics	81 (1)	26-33	2003
Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, <u>Tamiya G</u> , Kimura A, Bahram S, Inoko H	Identification of I kappa BL as the second major histocompatibility complex-linked susceptibility locus for rheumatoid arthritis	Am J Hum Genet	72 (2)	303-12	2003
Matsuzaka Y, Okamoto K, Tsuji H, Mabuchi T, Ozawa A, <u>Tamiya G</u> , Inoko H	Identification of the hRDH-E2 gene, a novel member of the SDR family, and its increased expression in psoriatic lesion	Biochem Biophys Res Commun	297 (5)	1171-80	2002

Hui J, Oka A, <u>Tamiya G</u> , Tomizawa M, Kulski JK, Penhale WJ, Tay GK, Iizuka M, Ozawa A, Inoko H	Corneodesmosin DNA polymorphisms in MHC haplotypes and Japanese patients with psoriasis	Tissue Antigens	60 (1)	77-83	2002
Matsuzaka Y, Makino S, Okamoto K, Oka A, Tsujimura A, Matsumiya K, Takahara S, Okuyama A, Sada M, Gotoh R, Nakatani T, Ota M, Katsuyama Y, <u>Tamiya G</u> , Inoko H	Susceptibility locus for non-obstructive azoospermia is localized within the HLA-DR/DQ subregion: primary role of DQB1*0604	Tissue Antigens	60 (1)	53-63	2002
Matsuzaka Y, Tounai K, Denda A, Tomizawa M, Makino S, Okamoto K, Keicho N, Oka A, Kulski JK, <u>Tamiya G</u> , Inoko H	Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region of the class I human MHC	Immunogenetics	54 (5)	301-9	2002
Katoh T, Mano S, Ikuta T, Munkhbat B, Tounai K, Ando H, Munkhtuvshin N, Imanishi T, Inoko H, <u>Tamiya G</u>	Genetic isolates in East Asia: a study of linkage disequilibrium in the X chromosome	Am J Hum Genet	71 (2)	395-400	2002
Omi K, <u>Ohashi J</u> , Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, <u>Tokunaga K</u>	Absence of Association between the <i>Fcg receptor IIIA-176F/V</i> Polymorphism and the Severity of Malaria in Thai	Japanese Journal of Infectious Diseases	55	167-169	2002
Omi K, <u>Ohashi J</u> , Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, <u>Tokunaga K</u>	Fcg receptor IIA and IIIB polymorphisms are associated with susceptibility to cerebral malaria	Parasitology International	51	361-366	2002
Tochigi M, <u>Ohashi J</u> , Umekage T, Koda K, Hibino H, Otowa T, Marui T, Masui K, Sugahara Y, Kanamori R, Juji T, Kato N, <u>Tokunaga K</u> , Sasaki T	HLA-A specificities and its relation with season of birth in Japanese patients with schizophrenia.	Neuroscience Letters	329	201-204	2002
<u>Ohashi J</u> , <u>Tokunaga K</u>	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	2002
<u>Ohashi J</u> , Izumi Naka, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, <u>Tokunaga K</u>	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	2002
Sato M, <u>Ohashi J</u> , Tsuchiya N, Kashiwase K, Ishikawa Y, Arita H, Hanaoka K, <u>Tokunaga K</u> , Yabe T	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	2002
Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T, Kato K, Shimizu I, Fujii Y, <u>Ohashi J</u> , Makino H	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	2002

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
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
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
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
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
松下育美、中田 光、慶長直人	COPD 発症につながる危険因子	小児科臨床	55 (4)	559	2002
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
間野修平、田宮 元	多遺伝子性疾患の遺伝的解析と多型マイクロサテライトマーカー	Molecular Medicine	40 (1)	26-35	2003
工藤翔二	Ⅲ 主要疾患の歴史 10. びまん性汎細気管支炎	日本内科学会雑誌創立 100 周年記念号	91 (6)	146-149	2002
工藤翔二	特集：びまん性肺疾患の診断と治療 びまん性肺疾患の診断の進め方	呼吸器科	1(1)	2-5	2002
安藤正幸、工藤翔二	特発性間質性肺炎をめぐる歴史と重要性	日本医師会雑誌	128 (2)	197-201	2002
工藤翔二	下気道閉塞性疾患の臨床-歴史的俯瞰	病理と臨床	20 (9)	888-892	2002

書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
工藤翔二	Ⅲ. 診断の進歩 5. 特発性間質性肺炎の診断基準をめぐる歴史的考察		Annual Review 呼吸器 2002	中外医学社		155-160	2002
工藤翔二、宮本晴子	5. 呼吸器疾患 びまん性汎細気管支炎		今日の処方改訂第3版	南江堂		189-191	2002
工藤翔二	薬剤誘起性肺炎		今日の治療指針	医学書院		205	2002
工藤翔二	びまん性汎細気管支炎		新臨床内科学第3版	医学書院		99-100	2002
工藤翔二	びまん性汎細気管支炎 (DPB) 疾患概念		呼吸器病 New Approach 8 閉塞性肺疾患	メディカルレビュー社		183-189	2002
慶長直人	慢性気道感染症.	河野 茂, 永井厚志, 大田 健, 飛田 渉	呼吸器病 New Approach 肺感染症	メジカルビュー社	東京	63-77	2002

20020418

以降 [P.37]-P.113までは雑誌/図書に掲載された論文となりますので、P.33-P.35の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

厚生労働科学研究
ヒトゲノム・再生医療等研究事業
平成 14 年度研究報告書（2003 年 3 月）

発行所 〒162 - 8655 東京都新宿区戸山 1-21-1
国立国際医療センター研究所
TEL03 - 3202 - 7181

発行人 慶 長 直 人
印刷所 (株) 欧 印 舎
〒135-0032 江東区福住 1-7-1
TEL 03-3643-2484
