

(ii) マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖不平衡マッピングにおける新規統計検定法の開発

本研究では、新規統計検定法の提案にとどまらなかったが、今後は本研究の成果であるマイクロサテライトマーカーのコンピュータシミュレーションを利用し、実際に当該検定法による連鎖不平衡マッピングの検出力を検討する必要がある。また、case 群と control 群とのアリル頻度の差を検定する通常のカイ 2 乗検定の検出力と比較する必要もあろう。並べ替え検定に基づく検定は、組合せ総数が少ないと、多重検定に対する P 値の調整を行った際に有意水準を下回ることが無いという不利な点がある。そこで、ゲノムワイドに行われる連鎖不平衡マッピングでは、十分に小さな P 値を得るためにも、サンプル数はある程度大きい必要がある。詳しくは述べないが、このサンプル数は補正後の有意水準から逆算することが可能である。

(2) 連鎖不平衡ブロックの生成に高頻度組換え点を与える影響の理論的検討

図 5 では結果を示さなかったが、 $4Nr_h = 4$ を仮定した（高頻度組換え点で 10 倍の組換え率を仮定した）場合では、領域 1 と領域 2 との間で観察される r_2 の平均値が、領域 2 と領域 3 との間で観察される値よりも大きい場合もあった。このことから、高頻度組換え点が高頻度連鎖不平衡ブロックの境界を常に生成する条件として、今回のパラメタ設定では、周囲の組換え率よりも 100 倍近く高い必要があることが理解できた。領域 1、2、3 の中では強い連鎖不平衡が生成されていた（領域 1、2、3 が連鎖不平衡ブロックとなっていた）ことから、異なる集団間で、同一のゲノム領域に明瞭な連鎖不平衡ブロックの境界が観察された場合には、そこには高頻度組換え点が存在する可能性は極めて高いと予想される。

E. 結論

(1) マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖不平衡マッピングにおける新規統計解析手法の開発

(i) マイクロサテライトマーカーでの突然変異モデルの検討と 2 染色体間で期待されるリピート数の差

マイクロサテライトマーカーでの突然変異を考察するための K 対立遺伝子単一ステップ突然変異モデルを構築することが出来た。

(ii) マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖不平衡マッピングにおける新規統計検定法の開発

マイクロサテライトマーカーの特性に基づき、連鎖不平衡マッピングで使用するための統計検定法を提案することができた。今回提案した手法の検出力が高いことがコンピュータシミュレーションにより立証されれば、ゲノムワイドに行われる連鎖不平衡マッピングの効率が著しく増加するであろう。

(2) 連鎖不平衡ブロックの生成に高頻度組換え点を与える影響の理論的検討

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。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、連鎖不平衡ブロックおよびその境界領域の生成メカニズムについては現段階ではよく理解されておらず、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。本成果は、連鎖不平衡生成メカニズムの機構解明に役立つのみならず、連鎖不平衡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も助けると期待される。また今後は、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、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ていきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sato-Takeda M, Ihn H, Ohashi J, Tsuchiya N, Ishikawa Y, Satake M, Arita H, Tamaki K, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T. The human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) haplotype is associated with the onset of postherpetic neuralgia after herpes zoster. Pain (in press)
- (2) Araki J, Ohashi J, Muramatsu M. Application of discordant sib-pair linkage analysis for mapping minor histocompatibility antigen loci in a novel graft-versus-host-disease model. Tissue Antigens (in press)
- (3) Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Brittenham G, Looreesuwan S, Clark AG, Tokunaga K. Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection. American Journal of Human Genetics (in press)
- (4) Tochigi M, Zhang X, Umekage T, Ohashi J, Kato C, Marui T, Otowa T, Hibino H, Otani T, Kohda K, Liu S, Kato N, Tokunaga K, Sasaki T (2004) Association of six polymorphisms of the NOTCH4 gene with schizophrenia in the Japanese population. Am J Med Genet (in press)
- (5) Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K (2004) Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. Tissue Antigens 63: 21-27.
- (6) Choi YL, Makishima H, Ohashi J, Yamashita Y, Ohmine K, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Ota J, Isobe Y, Ishida F, Ymauchi K, Oshimi K, Mano H (2004) DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3-CD56+ fractions. Leukemia 18: 556-565.
- (7) Ohashi J, Naka I, Ohtsuka R, Inaoka T, Ataka Y, Nakazawa M, Tokunaga K, Matsumura Y (2004) Molecular polymorphism of ABO blood group gene in Austronesian and Non-Austronesian populations in Oceania. Tissue Antigens 63: 355-361.
- (8) Ochi M, Osawa H, Onuma H, Murakami A, Nishimiya T, Shimada F, Kato K, Shimizu I, Shishino K, Murase M, Fujii Y, Ohashi J, Makino H (2003) The absence of evidence for major effects of the frequent SNP +299G>A in the resistin gene on susceptibility to insulin resistance syndrome associated with Japanese type 2 diabetes. Diabetes Research and Clinical Practice 61: 191-198.
- (9) Ohashi J, Maruya E, Tokunaga K, Saji H (2003) Power of association test for detection minor histocompatibility gene causing graft-versus-host disease following bone marrow transplantation. Journal of Human Genetics 48: 502-507.
- (10) Ohashi J, Tokunaga K (2003) The power of genome-wide linkage disequilibrium (LD) testing using microsatellite markers. Journal of Human Genetics 48: 487-491.
- (11) Hohjoh H, Ohashi J, Takasu M, Nishioka T, Ishida T, Tokunaga K (2003) Recent divergence of the HLA-DRB1*04 allelic lineage from the DRB1*0701 lineage after the separation of the human and chimpanzee species. Immunogenetics 54: 856-861.
- (12) Tarasenko O, Ohashi J, Ataka Y, Inaoka T, Ohtsuka R, Tokunaga K (2003) HLA-DRB1 polymorphism of Balopa islanders in Papua New

Guinea. *Anthropological Science* 111: 157-164.

(13) Ataka Y, Ohtsuka R, Inaoka T, Kawabata M, Ohashi J, Matsushita M, Tokunaga K, Kano S, Suzuki M (2003) Variation in malaria endemicity in relation to microenvironmental conditions in the Admiralty Islands, Papua New Guinea. *Asia-Pacific Journal of Public Health* 13: 85-90.

(14) 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 (2003) 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. *Molecular Genetics and Metabolism* 79: 43-51.

(15) Ohashi J, Naka I, 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* 4: 528-531.

(16) 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* 34: 29-31.

(17) 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.

(18) 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* 52: 562-567.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権

なし

びまん性汎細気管支炎（DPB）におけるムチン遺伝子群

プロモーター多型の解析

	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、田中 剛	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
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
	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	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 びまん性汎細気管支炎（DPB）においては、これまで HLA class I 領域との関連が強く示唆されており、DPB の疾患感受性遺伝子の存在する可能性のある候補領域が HLA-A 遺伝子座と HLA-B 遺伝子座の間の約 80 kb の領域にまで絞り込まれている。この領域にはこれまで既知の遺伝子はなく、新たに本研究事業で、ムチン様の遺伝子がクローニングされた。DPB では気道の過分泌は特徴的な病態として捉えられており、気道粘液の主たる成分であるムチン遺伝子の分泌制御が注目される。これらの背景をもとに、我々は気道で分泌されているムチン遺伝子に関して検討した。

正常気道で分泌が認められる MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7 のプロモーター多型を解析した結果、MUC5B の複数の変異で疾患との関連が認められた。このうち CA の insertion/deletion polymorphism (I/D 多型) は疾患群で有意に低下しており、疾患と最も強い関連が認められた ($p < 0.0001$)。さらに関連が認められた変異を含む 6 個の変異は強い連鎖不平衡の状態にあることが確認されたが、これらの変異から成るハプロタイプ構造を解析するために、我々は SSCP 法を応用した方法を用いてハプロタイプの直接決定を試みた。この結果、代表的な 3 つのハプロタイプが認められ、I/D 多型を含むハプロタイプが疾患と最も強い関連を示した ($p = 0.0002$)。

この 3 つのハプロタイプごとの転写活性の相違を検討するためにルシフェラーゼアッセイを行ったが、I/D 多型を含むハプロタイプは最も低い転写活性を示した。このハプロタイプは疾患群で有意に低下しており疾患抵抗性を有するものと考えられるものであるが、ルシフェラーゼアッセイの結果から MUC5B の分泌に関して抑制的に働くものであることが考えられる。

DPB における MUC5B の発現を検討した報告はなく、MUC5B の発現を低下させ、疾患抵抗性を示唆する変異の

存在が明らかになったことは注目される。

A. 研究目的

びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis, 以下 DPB と略す) は特徴的な臨床症状、画像所見、病理所見を呈する疾患であるが、それまで分類されていた慢性閉塞性肺疾患とは別の新しい疾患として、1960 年代後半にその概念が確立された 1)。晩期には呼吸不全を来す致死的な疾患であったが、エリスロマイシンの少量長期投与によりその予後は改善し、治癒しうる疾患となった 2)。しかしながら DPB の病因は今だ明らかになっておらず、細胞レベル、分子レベルで様々な検討が行われている。その様な中で、DPB の報告が主として日本・韓国・中国など東アジアからが中心であり、少数の欧米からの報告も多くはアジア系の移民であり、その発症に人種差が見られることから、何らかの遺伝的な背景の存在が示唆されてきた。

この遺伝的な背景については、特に HLA class I 領域との関連が強く示唆されており、DPB の疾患感受性遺伝子の存在する候補領域が、HLA-A 遺伝子座と HLA-B 遺伝子座の間の約 200 kb の領域にまで絞り込まれている 3)。この領域にはこれまで既知の遺伝子は報告されていなかったが、現在新たにムチン様の遺伝子のクローニングが進行中である。

このムチンは気道粘液の水分以外の約 5% の部分を占める糖蛋白であるが、コア蛋白の周りに糖鎖がついた構造をしている。

気道粘膜においてムチンは主に杯細胞や粘膜下腺より分泌され、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。

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るが、その主要な成分であるムチン遺伝子の転写活性に変化が見られることが推測される。先述の様に DPB 感受性遺伝子の存在が推定される HLA class I の約 200kb の領域にムチン様の遺伝子の存在が考えられることとも併せ、この病態においてムチンが持ちうる役割は注目される。

ムチン遺伝子ではアミノ酸の繰り返し配列をコードする VNTR (variable number of tandem repeat) 多型が特徴的であり、この多型は糖鎖の形成に影響を及ぼすなどムチンの質的な変化に影響することが考えられる。一方、転写調節領域の変異はムチン遺伝子の発現に影響することが予想される。これらより、気道分泌が亢進している慢性気道炎症性疾患の遺伝的背景解明のため、気道に主に発現しているムチン遺伝子に関し、転写調節領域の変異が転写活性に及ぼす影響の検討を開始した。

B. 研究方法

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 MUC1, MUC2, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC7 を解析の対象とした 4)。これらのムチン遺伝子群のプロモータ

一活性を検討した各報告に基づき (図1参照)、それぞれの転写調節領域 1~2 kb をカバーするようにプライマーセットを作成し、多型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変異に関して、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、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、128 例を対照群とした。

MUC5B プロモーター領域のハプロタイプ解析

上述の関連解析から疾患との関連が予想された MUC5B プロモーター領域の変異に関して、変異間の連鎖不平衡の尺度として、expectation-maximization (EM) algorithm (11) で推定したハプロタイプ頻度をもとに、対照群 128 例につき Lewontin's $|D'|$ (12) を計算した。強い連鎖不平衡にある転写開始点に近い 6 個の変異に関しては、ハプロタイプ頻度を EM algorithm を用いた最大尤度法で推定した。実際の計算には Arlequin program を用いた (13)。

6 個の変異からなるハプロタイプと疾患との関連を見るために、実際のハプロタイプを確定することを試みた。今回われわれは single-strand conformation

polymorphism (SSCP) 法を応用した方法を用いた。すなわち SSCP は通常 300 塩基程度の DNA に含まれる 1~2 個の変異を、一本鎖 DNA が形成する 3 次構造の違いに基づくアクリルアミドゲル上の移動度の差として検出するものであるが、今回の検討では約 1.1 kb の DNA に含まれる 6 個の変異を対象とした。アクリルアミドゲルは通常よりも薄い 6% とし、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。この際、銀染色時におけるゲルの破損を防ぐため、ゲル版の片方の面に Bind-Silane (Pharmacia Biotech, Upssala, Sweden) を塗布しゲルを固定した。PCR product は熱変性で一本鎖にし、水温の実測値約 13 度で 4 時間泳動した。泳動後、銀染色はゲルを片方のゲル板に固定した状態で行った。得られたバンドは一本の chromosome に相当するものであるが、これを切り出し粉砕後に 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。

ルシフェラーゼアッセイを用いた機能解析

上述のハプロタイプ解析の結果認められた代表的なハプロタイプに関して、転写活性の相違を検討する目的で、ルシフェラーゼアッセイを行った。6 個の変異を含む 1090 塩基の領域を、制限酵素 Bgl II サイト及び Hind III サイトを付加したプライマー

セットで増幅し、これらの制限酵素で処理した後、pGL3-Basic Vector (Promega, Madison, WI, USA) にクローニングした。この plasmid を大腸菌に導入・増幅し、抽出後に pulmonary mucoepidermoid carcinoma 由来のヒト気管支上皮細胞株 NCI-H292 細胞に transfection し、24 時間培養後に Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) にて活性を測定した

統計学的処理

疾患とマーカーの関連解析では 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。Hardy-Weinberg 平衡の検定には Arlequin program を用いた。

(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. ムチン遺伝子群プロモーター領域のスクリーニング

PCR-SSCP 法と direct sequence 法によるスクリーニングの結果、MUC1 を除くムチン遺伝子で、解析した領域に複数の変異を認めた。この中には、SNP のデータベースである dbSNP や JSNP 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 (図 1)。

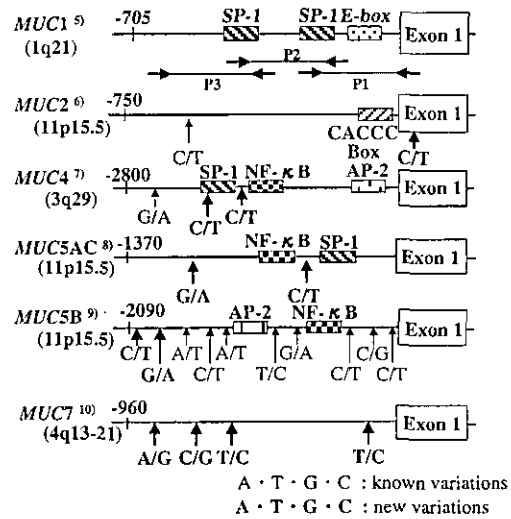


図 1 各ムチン遺伝子について、今回解析したプロモーター領域の範囲ならびに変異の位置を图示してある。転写開始点を +1 とし、それより上流側の位置を - で示してある。例えば MUC1 では P1, P2, P3 のようにプロモーター領域をカバーできるように 3 つのプライマーセットを作成し解析した。↑ は変異の位置を示しており、細字はデータベースで確認できるもの、太字は今回見出された新規のものを示してある。SP-1、NF- κ B などは文献に記載のあった転写因子が結合するコンセンサス配列の位置を示している。各遺伝子の右側に、参考文献を示してある。

2. 各変異についての疾患群と対照群の間の関連解析

それぞれのムチン遺伝子にみられた各変異について疾患群と対照群の間で関連解析を行った。この結果、MUC5B の複数の変異で疾患との関連が予想されたが、他のムチン遺伝子では関連は認められなかった (表 1)。

3. MUC5B プロモーター領域の変異間の連鎖不平衡構造の解析およびハプロタイプ解析

遺伝子	Position*	Polymorphism	Number of alleles (%)	
			DPB (2n=184)	control (2n=256)
MUC 5B (AF107890)	2107	T allele	70 (38.0)	104 (40.3)
		C allele	114 (62.0)	154 (59.7)
	2179	G allele	69 (37.5)	81 (31.4)
		T allele	115 (62.5)	177 (68.6)
	2389	C allele	45 (24.5)	60 (23.3)
		A allele	139 (75.5)	198 (76.7)
	2571	T allele	63 (34.2)	112 (43.8)
		C allele	121 (65.8)	144 (56.3)
	2691	A allele	83 (45.1)	130 (50.8)
		T allele	101 (54.9)	126 (49.2)
	3259	A allele	40 (21.7)	51 (19.9)
		G allele	144 (78.3)	205 (80.1)
	3272*	A allele	41 (22.3)	85 (33.2)
		G allele	143 (77.7)	171 (66.8)
	3518-19†	Insertion†	165 (89.7)	191 (74.6)
		Deletion	19 (10.3)	65 (25.4)
	3941	A allele	86 (46.7)	97 (37.9)
		C allele	98 (53.3)	159 (62.1)
	3961*	G allele	88 (47.8)	98 (38.3)
		C allele	96 (52.2)	158 (61.7)
	4100*	T allele	70 (38.0)	124 (48.4)
		C allele	114 (62.0)	132 (51.6)

表1. MUC 5B のプロモーター領域に認められた各変異についての関連解析。
変異の位置は今回の検討で用いたMUC 5Bのデータベース (GenBank accession number AF107890) 中の位置で示してある。太字は今回の検討で新たに認められた変異である。右肩のフリップは疾患群と対照群の間で有意な差を認めた変異である。
*OR = 0.56; 95% CI 0.37-0.87; $\chi^2 = 6.83$, and $P = 0.0090$
†OR = 2.96; 95% CI 1.70-5.13; $\chi^2 = 15.73$, and $P < 0.0001$
*OR = 1.47; 95% CI 1.00-2.16; $\chi^2 = 3.93$, and $P = 0.0474$
*OR = 0.65; 95% CI 0.44-0.96; $\chi^2 = 4.72$, and $P = 0.0299$
†Insertion と DeletionはそれぞれCAの挿入と欠失を意味している。

変異間の連鎖不平衡の程度の指標として、対照群 128 例について pairwise の $|D'|$ を計算したところ、転写開始点に近い 6 個の変異の間では $|D'|$ が 0.8~1.0 の強い連鎖不平衡にあった。これらの強い連鎖不平衡

Haplotype name	Haplotype frequency				p value*
	Estimated		Determined*		
	control	DPB	control	DPB	
H 1 G G I A G C	0.378	0.473	0.379 (97)	0.467 (86)	
H 2 G A D G C T	0.237	0.103	0.238 (61)	0.098 (18)	0.0002
H 3 A G I G C T	0.187	0.217	0.191 (49)	0.212 (39)	
H 4 G A I G C C	0.095	0.093	0.094 (24)	0.098 (18)	
H 5 G G I G C C	0.034	0.037	0.035 (9)	0.038 (7)	
H 6 G G I G C T	0.027	0.049	0.023 (6)	0.054 (10)	
H 7 G G D G C T	0.017	0.006	0.016 (4)	0.005 (1)	
H 8 A G I G C C	0.008	0.000	0.008 (2)	0.000 (0)	
H 9 G A I G C T	0.008	0.016	0.008 (2)	0.016 (3)	
H 10 G G I G C C	0.004	0.000	0.004 (1)	0.000 (0)	
H 11 G G I A G T	0.004	0.000	0.004 (1)	0.000 (0)	
H 12 A A I G C C	0.000	0.006	0.000 (0)	0.005 (1)	
H 13 A G I A G C	0.000	0.000	0.000 (0)	0.005 (1)	

表2 対照群128名と疾患群92名で統計的に推測したハプロタイプと実験的に決定したハプロタイプを示す。H2は疾患群で有意に低下していた。
*括弧内には実験的に決定したハプロタイプの数を示している。
*有意差の認められたp値を示す。

にある 6 個の変異に関して、Arlequin program を用いて疾患群と対照群のそれぞ

れでハプロタイプ頻度を推定した (表 2 Estimated)。この結果、代表的なハプロタイプで両群に頻度の差が存在するものが予想された。

SSCP により、実験的に決定したハプロタイプを示す (表 2 Determined)。この決定したハプロタイプを用いて関連解析を行った所、H2 で有意な関連が認められたが、この H2 は CA の deletion を含むハプロタイプである。

4. ルシフェラーゼアッセイ

代表的な 3 つのハプロタイプを用いて行ったルシフェラーゼアッセイの結果を図 2 に示す。疾患群で有意に低下していた H2 では 3 つのハプロタイプのうちで最も転写活性が低かった。このハプロタイプは CA の

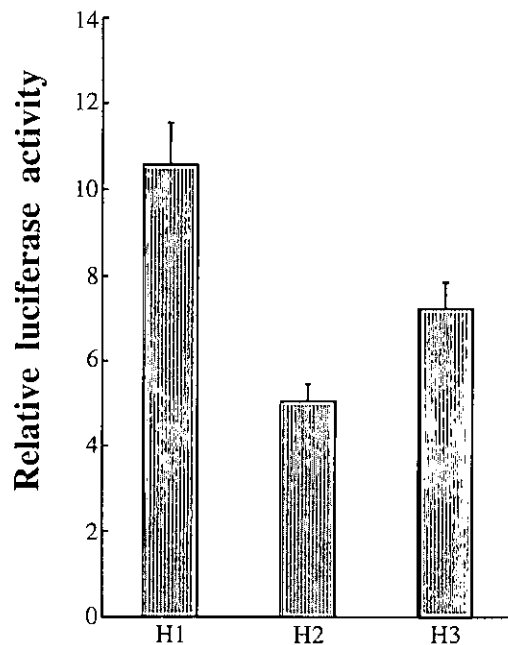


図2 MUC5Bのプロモーター領域に見られる代表的な3つのハプロタイプを用いて行ったルシフェラーゼアッセイの結果を示す。疾患抵抗性と考えられたH2で転写活性は最も低下していた。

deletion を含むものである。

D. 考案

今回のムチン遺伝子群の解析では、MUC5B の転写調節領域の複数の変異で疾患との関連が認められた。このうち最も強い関連を示した変異は 2 塩基 CA の insertion/deletion polymorphism であり、CA の欠失が DPB 群で有意に低下しており ($p < 0.0001$)、この CA の欠失は疾患抵抗性に関与していることが予想された。

この insertion/deletion polymorphism 及び疾患と関連を示した SNPs を含む転写開始点に近い 6 個の変異は、|D'| を用いた連鎖不平衡構造の解析の結果強い連鎖不平衡の状態にあることが明らかになった。この領域でハプロタイプ解析を行ったが、ハプロタイプの直接決定には SSCP 法を応用した方法を用いた。この結果、代表的なハプロタイプが 3 つ認められ、これらで全ハプロタイプの約 80% を占めた。このうち $p=0.0002$ で最も強い関連を示した H2 は、insertion/deletion polymorphism を含むハプロタイプであったが、この変異単独に比べると関連は弱くなる。

これらのハプロタイプごとに転写活性に相違があるかを確認する目的で、ルシフェラーゼアッセイを行った。これは各ハプロタイプを含む塩基配列をプラスミドに挿入し、その下流のルシフェラーゼの発現量を見るものである。今回はベースラインでの

転写活性を見たものだが、疾患群で有意に低下していた H2 の活性が最も低い結果となった。この H2 は統計的に疾患抵抗性に関与すると考えられるハプロタイプであるが、ルシフェラーゼアッセイの結果から MUC5B の分泌を抑制するように働く可能性があるハプロタイプであり、DPB の病態の一つである多量の気道粘液の分泌を抑制しうるものであることが推測され、この点からも疾患抵抗性という意味合いは増すと考えられる。

これまでの所、DPB でこの MUC5B の発現を検討した報告は見られていない。MUC5AC に関しては、DPB 患者の BAL 液中で増加が見られるとの報告が最近なされている (14)。DPB の病態の一つに過剰な気道粘液の分泌があることから、ムチンの分泌制御の検討を開始したが、このうち疾患と関連が認められた MUC5B の発現を検討することは重要と考えられる。今後は免疫染色などを用いて、発現の状態を MUC5AC とともに確認していく予定である。ちなみに MUC5B は通常粘膜下腺より分泌されるムチンであるが、DPB の病変の主座である呼吸細気管支領域は一般に気管支腺に乏しいとされており、MUC5B で見られる variation が DPB の病態にどの様に関与しうるのかは今後詳細な検討を加えなければならない。しかし MUC5B の発現のパターンは病的な状態では変化するとの報告もあり、Chen らは肺気腫や特発性間質性肺炎では MUC5B の発現が杯細胞でも認められるようになると報告している

9)。この中で、通常杯細胞から分泌される MUC5AC の発現パターンに関しては病的状態でも変化はなかったと報告されている。

E. 結論

DPB との関連が報告されてきた HLA class I の約 200kb の領域で、新規のムチン様の遺伝子のクローニングが進行していることから、ムチンが DPB の病態形成に果たす役割は注目される。

「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) 山中 晃ほか：慢性気管支閉塞性疾患の問題点—とくにびまん性汎細気管支炎について—内科 23 : 422, 1969
2) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M et al: Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1829-32, 1998
3) 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.

4) Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Marquette CH, Wurtz A, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int. J. Cancer.* 86: 162-168, 2000.

5) Kovarik A, Lu PJ, Peat N, Morris J, Taylor-Papadimitriou J. Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. *J Biol Chem.* 271:18140-18147, 1996.

6) Gum JR, Hicks JW, Kim YS. Identification and characterization of the MUC2 (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region: promoter activity in cultured cells. *Biochem. J.* 325: 259-267, 1997.

7) Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, Van Seuning I. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 276: 30923-30933, 2001.

8) Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J. Biol. Chem.*

273: 6812-6820, 1998.

9) Chen Y, Zhao YH, Di YP, Wu R. 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.* 25: 542-553, 2001.

10) Bobek LA, Liu J, Sait SN, Shows TB, Bobek YA, Levine MJ. Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7. *Genomics* 31: 277-82, 1996.

11) Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 12: 921-927, 1995.

12) Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* 120: 849-852, 1964.

13) Schneider S, Roessli D, Excoffier. Arlequin, version 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva, 2000.

14) Yukihiro Kaneko et al. Overproduction of MUC5AC core protein in patients with diffuse panbronchiolitis. *Respiration.* 2003; 70: 475-478.

F. 健康危険情報 (略)

G. 研究発表

1. 論文発表

Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Hijikata M, Nakata K, Tokunaga K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Direct determination of MUC5B promoter haplotypes based on the method of single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation. *Genomics*, in press.

2. 学会発表

Keicho N, Hijikata M, Matsushita I, et al. Contribution of an HLA-related gene to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. In: the 8th Congress of Asian Pacific Society of Respiratory, Dec 1-4, Kuala Lumpur, Malaysia, 2003.

Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Nakata K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. A SNP haplotype in the promoter region of MUC5B gene may affect susceptibility to diffuse panbronchiolitis. May 16-21, Seattle, USA, 2003.

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43回 日本呼吸器学会総会, 3月13-15日, 福岡, 2003.

H. 知的財産権の出願

慢性気道炎症性疾患であるびまん性汎細気管支炎と関連し、機能的意味を持つムチン遺伝

子 MUC5B プロモーター領域の遺伝子変異の
同定 (予定)

Ⅲ. 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
Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Hijikata M, Nakata K, Tokunaga K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N.	Direct determination of MUC5B promoter haplotypes based on the method of single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation.	Genomics			(in press)
Kudoh S, Keicho N.	Diffuse panbronchiolitis.	Semin Respir Crit Care Med	24 (5)	607-617	2003
Fujii T, Hogg J, Keicho N, 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
Seymour JF, Doyle IR, Nakata K, Presneil IJ, Dunn AR.	Relationship of anti-GM-CSF antibody concentration, surfactant protein A and B levels, and LDH to pulmonary parameters and response to GM-CSF therapy in patients with idiopathic alveolar proteinosis.	Thorax	57	252-257	2003
Ohnishi T, Yamada G, Shijubo, N, Takagi Y, Itoh T, Nakata K, Abe S.	Secondary alveolar proteinosis associated with myelodysplastic syndrome.	Internal Medicine	42(2)	187-190	2003
Khanjari F, Watier H, Domenech J, Asquier E, Diot P, Nakata K.	Successful recombinant GM-CSF treatment of pulmonary alveolar proteinosis (PAP) in a patient without anti-GM-CSF antibodies.	Thorax	58	645	2003
Trapnell B, Whitsett J, Nakata K.	Pulmonary Alveolar Proteinosis; Mechanism of Disease.	New England Journal of Medicine	349	2528-40	2003
Matsuyama N, Mishiro S, Sugimoto M, Furuichi Y, Hashimoto M, Hijikata M, Ohta Y,	The dinucleotide microsatellite polymorphism of the IFNAR1 gene promoter correlates with responsiveness of hepatitis C patients to interferon.	Hepatology Research	25	221-225	2003

Miyashita R, Tsuchiya N, Hikami K, Kuroki K, Fukazawa T, Bijl M, Kallenberg CG, Hashimoto H, Yabe T, Tokunaga K.	Molecular genetic analyses of human NKG2C (KLRC2) gene deletion.	Int Immunol.	16(1)	163-8	2004
Siriboonrit U, Tsuchiya N, Sirikong M, Kyogoku C, Bejrachandra S, Suthipinittharm P, Luangtrakool K, Srinak D, Thongpradit R, Fujiwara K, Chandanayingyong D, Tokunaga K.	Association of Fcγ receptor IIb and IIb polymorphisms with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Thais.	Tissue Antigens.	61(5)	374-83	2003
Hohjoh H, Takasu M, Shishikura K, Takahashi Y, Honda Y, Tokunaga K.	Significant association of the arylalkylamine N- acetyltransferase (AA-NAT) gene with delayed sleep phase syndrome.	Neurogenetics.	4(3)	151-3	2003
Hikami K, Tsuchiya N, Yabe T, Tokunaga K.	Variations of human killer cell lectin-like receptors: common occurrence of NKG2-C deletion in the general population.	Genes Immun.	4(2)	160-7	2003
Okamoto K, Matsuzaka Y, Yoshikawa Y, Takaki A, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H.	Identification of NAD ⁺ - dependent isocitrate dehydrogenase 3 gamma-like (IDH3GL) gene and its genetic polymorphisms.	Gene	323	141-8	2003
Romphruk AV, Oka A, Romphruk A, Tomizawa M, Choonhakarn C, Naruse TK, Puapairoj C, Tamiya G, Leelayuwat C, Inoko H.	Corneodesmosin gene: no evidence for PSORS 1 gene in North-eastern Thai psoriasis patients.	Tissue Antigens.	62(3)	217-24	2003

Oka A, Hayashi H, Tomizawa M, Okamoto K, Suyun L, Hui J, Kulski JK, Beilby J, Tamiya G, 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)	203-10	2003
Tsuji H, Okamoto K, Matsuzaka Y, Iizuka H, Tamiya G, Inoko H.	SLURP-2, a novel member of the human Ly-6 superfamily that is up-regulated in psoriasis vulgaris.	Genomics.	81(1)	26-33	2003
Okamoto K, Makino S, Yoshikawa Y, Takaki A, Nagatsuka Y, Ota M, Tamiya G, 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
Hui J, Oka A, Tamiya G, 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, Tamiya G, 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
Hiramatsu K, Azuma A, Kudoh S, Desaki M, Takizawa H, Sugawara I.	Inhalation of diesel exhaust for three months affects major cytokine expression and induces bronchus-associated lymphoid tissue formation in murine lungs.	Exp Lung Res.	29(8)	607-22	2003
Nakamura S, Hashimoto Y, Mikami M, Yamanaka E, Soma T, Hino M, Azuma A, Kudoh	Effect of the proteolytic enzyme serrapeptase in patients with chronic airway disease.	Respirology.	8(3)	316-20	2003

Azuma A, Miyamoto H, Enomoto T, Usuki J, Kudoh S.	Familial clustering of dendriform pulmonary ossification.	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.	20(2)	152-4.	2003
Enomoto T, Usuki J, Azuma A, Nakagawa T, Kudoh S.	Diabetes mellitus may increase risk for idiopathic pulmonary fibrosis.	Chest.	123(6)	2007-11.	2003
Sato-Takeda M, Ihn H, Ohashi J, Tsuchiya N, Ishikawa Y, Satake M, Arita H, Tamaki K, Hanaoka K, Tokunaga K, Yabe T.	The human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) haplotype is associated with the onset of postherpetic neuralgia after herpes zoster.	Pain			(in press)
Araki J, Ohashi J, Muramatsu M.	Application of discordant sib-pair linkage analysis for mapping minor histocompatibility antigen loci in a novel graft-versus-host-disease model.	Tissue Antigens			(in press)
Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Brittenham G, Looareesuwan S, Clark AG, Tokunaga K	Extended linkage disequilibrium surrounding the hemoglobin E variant due to malarial selection.	American Journal of Human Genetics			(in press)
Tochigi M, Zhang X, Umekage T, Ohashi J, Kato C, Marui T, Otowa T, Hibino H, Otani T, Kohda K, Liu S, Kato N, Tokunaga K, Sasaki T	Association of six polymorphisms of the NOTCH4 gene with schizophrenia in the Japanese population.	Am J Med Genet			(in press)
Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K	Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations.	Tissue Antigens	63	21-27	2004

Choi YL, Makishima H, Ohashi J, Yamashita Y, Ohmine K, Ohki R, Wada T, Koinuma K, Ota J, Isobe Y, Ishida F, Ymauchi K, Oshimi K, Mano H	DNA microarray analysis of natural killer cell-type lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with purified CD3-CD56+ fractions.	Leukemia	18	556-565	2004
Ohashi J, Naka I, Ohtsuka R, Inaoka T, Ataka Y, Nakazawa M, Tokunaga K, Matsumura Y	Molecular polymorphism of ABO blood group gene in Austronesian and Non- Austronesian populations in Oceania.	Tissue Antigens	63	355-361	2004
Ochi M, Osawa H, Onuma H, Murakami A, Nishimiya T, Shimada F, Kato K, Shimizu I, Shishino K, Murase M, Fujii Y, Ohashi J, Makino H .	The absence of evidence for major effects of the frequent SNP +299G>A in the resistin gene on susceptibility to insulin resistance syndrome associated with Japanese type 2 diabetes.	Diabetes Research and Clinical Practice	61	191-198	2003
Ohashi J, Maruya E, Tokunaga K, Saji H	Power of association test for detection minor histocompatibility gene causing graft-versus-host disease following bone marrow transplantation.	Journal of Human Genetics	48	502-507	2003
Ohashi J, Tokunaga K	The power of genome-wide linkage disequilibrium (LD) testing using microsatellite markers.	Journal of Human Genetics	48	487-491	2003
Hohjoh H, Ohashi J, Takasu M, Nishioka T, Ishida T, Tokunaga K	Recent divergence of the HLA-DRB1*04 allelic lineage from the DRB1*0701 lineage after the separation of the human and chimpanzee species.	Immunogeneti cs	54	856-861	2003
Tarassenko O, Ohashi J, Ataka Y, Inaoka T, Ohtsuka R, Tokunaga K	HLA-DRB1 polymorphism of Balopa islanders in Papua New Guinea.	Anthropologic al Science	111	157-164	2003

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	13	85-90	2003
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.	Molecular Genetics and Metabolism	79	43-51	2003
Ohashi J, Naka I, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K	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	4	528-531	2003
Naka I, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Looareesuwan S, Tokunaga K	Genetic variants of b-globin gene in Thai malaria patients.	Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health	34	29-31	2003
Omi K, Ohashi J, Patarapotikul J, Hananantachai H, Naka I, Looareesuwan S, Tokunaga K	CD36 polymorphism is associated with protection from cerebral malaria.	American Journal of Human Genetics	72	364-374	2003
Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Mishimiya T, Kato K, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Makino H	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	52	562-567	2003

20030368

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。