

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）

「微量化学物質によるシックハウス症候群の病態解明、診断、治療対策に関する研究」

総合研究報告書（平成 15-17 年度）

シックハウス症候群に関する遺伝要因に関する研究

分担研究者	東海大学医学部基礎医学系	木村 穰
研究協力者	東海大学医学部基礎医学系	松坂 恭成
研究協力者	東海大学医学部基礎医学系	猪子 英俊
研究協力者	東海大学医学部基礎医学系	津田 道雄
研究協力者	東海大学教育・研究支援センター	大久保朋一
研究協力者	北里研究所病院臨床環境医学センター	石川 哲
研究協力者	北里大学薬学部	坂部 貢
研究協力者	青山内科小児科病院	青山 美子
研究協力者	かくたこども&アレルギークリニック	角田 和彦

研究要旨

（平成 15 年度）

シックハウス症候群の遺伝要因を追求するために *NTE (Neuropathy Target Esterase)* 遺伝子を候補遺伝子として、その遺伝的多型箇所の検索および遺伝マーカーとしての有用性の検討を行い、このようにして設定された遺伝マーカーの一部を用いて遺伝学的相関解析を行った。検討した多型箇所は合計で 27 箇所であり、これらの多型箇所に関して解析方法を確立し、20 箇所について多型性を確認した。さらに、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の多型箇所を 11 箇所見出した。このようにして見出された多型箇所のうち 5 遺伝子座について、シックハウス症候群患者集団および健常者集団を用いて有意差検定を行ったが、患者集団において統計的有意差を示す対立遺伝子や遺伝子型は見出されなかった。

（平成 16 年度）

引き続き、*NTE* 遺伝子の遺伝的多型箇所の検索および遺伝マーカーとしての有用性の検討を行い、このようにして設定された遺伝マーカーの一部を用いて遺伝学的相関解析を行った。検討した多型箇所は合計で 81 箇所であり、これらの多型箇所に関して解析方法を確立し、66 箇所について多型性を確認した。さらに、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の多型箇所を 55 箇所見出した。

このようにして見出された多型箇所のうち 45 遺伝子座について、シックハウス症候群患者集団および健常者集団を用いて有意差検定を行ったが、患者集団において統計的有意差を示す対立遺伝子や遺伝子型は見出されなかった。

また、NTE 遺伝子 3'flanking 領域に存在するマイクロサテライトマーカーのタイピングを行った結果、8 個の対立遺伝子を見出した。これらの対立遺伝子の頻度について、シックハウス症候群患者集団および健常者集団における遺伝学的相関解析を行った。その結果、1 つの対立遺伝子について統計学的有意差が得られた。

また、シックハウス症候群の他の候補遺伝子として、CYP1A1 遺伝子および GSTP1 遺伝子を選定した。それぞれの遺伝子について、3 個および 2 個の遺伝的多型部位において対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度についての相関解析を行った。その結果、対立遺伝子頻度については、統計学的有意差を示す対立遺伝子は見出されなかったが、遺伝子型頻度については、GSTP1 遺伝子のエクソン 7 における多型部位において、ヘテロ接合体の個体が患者集団において有意に増加していることを見出した ($P=0.034$)。

(平成 17 年度)

平成 16 年度までに、NTE 遺伝子領域において見出された Minor allele frequency が 0.2 以上の多型箇所 55 箇所のうち 53 遺伝子座について、シックハウス症候群患者集団および健常者集団を用いて有意差検定を行った。その結果、エクソン 2 における非翻訳領域に存在する遺伝マーカー rs604959 において、統計学的有意差を示す対立遺伝子が見出された。さらに、この遺伝子座含む領域においてハプロタイプ解析を行った結果、相関の得られた対立遺伝子とその上流に存在する 2 つの遺伝的多型部位を含むハプロタイプ TCC の頻度が健常者集団に比べてシックハウス症候群集団において統計学的に有意に増加していた。さらに、リンパ球における NTE 酵素活性を測定した結果、健常者集団に比べてシックハウス症候群集団における NTE 酵素活性が有意に増加していた。また、シックハウス症候群のもう 1 つの候補遺伝子として PON1 遺伝子を選択し、この PON1 タンパク質の酵素活性の測定系を確立し、シックハウス症候群患者集団および健常者集団における PON1 活性を測定し有意差を行ったが、両群間に統計学的有意差は見られなかった。

A. 研究目的

シックハウス症候群は、ホルムアルデヒドや有機リン系の殺虫剤等の様々な揮発性有機化合物がその発症に関与していることは疑いが無いが、この疾患のかか

りやすさ（感受性）に個人差があることも事実である。このような疾患感受性は、現在では遺伝子型の違いによって説明することができる。

一般にヒト疾患は遺伝要因と環境要因の組み合わせによって規定されると考えられるが、現在までに進められてきたヒト疾患の遺伝要因の解析は、連鎖解析 (Linkage analysis) による単純なメンデル遺伝を示す単一遺伝性疾患に限定されていた。しかしながら、複数の遺伝的要因が関与する複合性遺伝疾患あるいは、人類集団中において高頻度で見出される通常疾患の感受性遺伝子についても、高密度な遺伝的多型マーカーを用いた遺伝的相関解析 (Association study) を行うことによって、その疾患感受性遺伝子を同定できる可能性が示された。

シックハウス症候群についても、種々の揮発性化合物に対する症状が調べられており、複数の遺伝的効果が複雑に作用している複合性遺伝疾患であると考えられる。このような疾患については、高度に多型性を示す遺伝的マーカーをヒトゲノム上に高密度に配置し、これらの遺伝マーカーを用いた相関解析によってその遺伝的要因を明らかにすることができる可能性がある。現在までに、使用されている遺伝的多型マーカーは、一塩基多型 (SNP) およびマイクロサテライト多型の大きく2つに分けられる。SNP は、ヒトゲノム上に平均 1kb に1個の割合で高密度に存在しており、対立遺伝子の数が通常 2 個で染色体上において維持される連鎖不平衡の距離は約 3kb である。一方、マイクロサテライトは、ヒトゲノム上に

平均 30kb に1個の割合で存在しており、その対立遺伝子数は通常数個以上存在し (図1)、SNP に比べてその数が比較的多い。維持される連鎖不平衡の距離も約 100kb と長いため、疾患との関連を調べるには、第一にマイクロサテライトを用いた遺伝学的相関解析を行い、第二に相関の得られた領域において SNP を用いた相関解析を行うことによって、効率的に疾患感受性遺伝子を同定できると予想される (図2)。

遺伝的相関解析には、全ゲノム領域を対象として位置的情報のみを手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法と、現在までにその遺伝子の機能が解明されており疾患との関連性を考慮して候補遺伝子を選定する、すなわち機能的情報を手がかりに遺伝的要因を明らかにする方法があるが、本研究では後者の方法によってシックハウス症候群の遺伝的要因に関する情報を蓄積することを目指した。

シックハウス症候群の候補遺伝子として、NTE (Nueropathy target esterase) 遺伝子を選定した。ヒトにおいて、有機リンや化学物質の暴露によって生ずる神経性の疾患が、湾岸戦争後の兵士や慢性的に化学物質に暴露されたヒトにおいて報告されているが、これは有機リンがNTEと反応することによって引き起こされると考えられている (図3. 文献1)。

Nte 遺伝子欠損マウスは、ホモ型欠損マウスにおいては胎児期に死亡してしま

う。一方、*Nte*+/-マウスでは野生型マウスに比べて多動であることが報告されている。また、野生型マウスに *Nte* の阻害物質である EOPF (ethyl octylphosphonofluoridate) を少量加えた場合もまた同様に、多動性が著しく高くなることも報告された。このようなことから、*Nte* 活性の阻害が遺伝的にも化学的にも神経毒性的効果に影響を与えていることが示唆された (文献 2)。

そこで、シックハウス症候群患者集団および健常者集団において、*NTE* 遺伝子領域に存在する遺伝的多型の対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度を解析することによって、*NTE* 遺伝子とシックハウス症候群との関連を明らかにすることを目的とした。

本疾患は、その原因因子としての、環境要因を特定すること、およびその基準値を設定することが必要であるが、本疾患の感受性の違いを明らかにすることは、本疾患の発症および病態を解明し、治療法を開発するための手がかりとなると思われる。したがって、本疾患に関連性が高いと予想される遺伝子を科学的根拠に基づいて選定し、その遺伝子と本疾患との関連を詳細に解析することは、本疾患の病因および発症における重要な事実を蓄積することができると期待した。

第一段階として、*NTE* 遺伝子領域に存在するマイクロサテライトマーカーを検索して、見出されたマイクロサテライト

マーカーの対立遺伝子頻度について相関解析を行った。さらに第二段階として、*NTE* 遺伝子領域において、遺伝的多型の連鎖不平衡によって網羅的に解析するために高密度な遺伝マーカーの設定を行い、シックハウス症候群集団および健常者集団を用いた相関解析によって各遺伝的多型マーカーの対立遺伝子および遺伝子型頻度について有意差検定を行い、疾患との関連性を解析した。さらに、それぞれの遺伝的多型間の連鎖不平衡値の算出により、ハプロタイプの推定を行い、シックハウス症候群集団および健常者集団におけるハプロタイプ頻度についての有意差検定を行った。

また、*NTE* タンパク質の機能解析として、ヒトリンパ球における *NTE* タンパク質の酵素活性の測定系を確立し、シックハウス症候群集団および健常者集団における *NTE* タンパク質の酵素活性についての有意差検定を行った。

また、シックハウス症候群の環境要因として、有機リンのほかにホルムアルデヒドやトルエンなどの揮発性有機化合物の関与が指摘されている。そこで、このような有害物質を生体内で無毒化する薬物代謝経路の構成分子についてもシックハウス症候群の候補遺伝子として、本疾患との遺伝的関連を調べた。本研究では、薬物代謝酵素遺伝子として、*CYP1A1* 遺伝子および *GSTP1* 遺伝子を選定した。

B. 研究方法

1) DNA の抽出

北里研究所・北里研究所病院の協力により、インフォームドコンセントの得られたボランティアより末梢血の採取を行った。採血管はヘパリンがその後の酵素反応に影響を与えるためクエン酸主体のものを使用し、10ml を採血した。このうち 0.4ml を用いて、カートリッジ（キアゲン社）による DNA の抽出を行った。得られたゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動によりゲノム DNA の定性的判定を行った。さらに、吸光度を測定して DNA 濃度を算出した。各試料はコード化をはかり、特定の個人情報とは簡単に連結できないように配慮した。個人情報管理は東海大学医学部個人情報管理部で管理されている。

2) DNA 配列情報およびマイクロサテライト繰り返し配列および一塩基置換 (SNP) の検索

NTE 遺伝子のゲノム領域内においてマイクロサテライト繰り返し配列および SNPs の検出を行うためには、この遺伝子領域を含むゲノム DNA の配列情報が必要となる。ヒトゲノム配列は、GenBank DNA database (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) より入手した。得られたゲノム配列について、NTE 遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター領域を明らかにした。SNP のなかには、調節領域に存在す

る rSNP(regulatory SNP)やコーディング領域に存在する cSNP(coding SNP), イントロン領域に存在する iSNP(intron SNP), 遺伝子間の介在領域に存在する gSNP(genomic SNP)がある。これらのうち、直接的に表現型に影響を与える SNPs は、rSNP、cSNP、iSNP であり、予めこれらの情報を整理しておくことは、疾患感受性遺伝子のマッピングするうえで大変重要である。

現在までにヒトゲノム上で見い出された SNP についてはデータベースに登録されており、NTE 遺伝子領域に存在する SNP についてもこのデータベースを検索することによって SNP の位置を明らかにした (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)。

3) プライマーの設計

PCR プライマーの設計は、PCR に適した条件を考慮するソフトウェアである「Primer Express」を用いて、SNP を挟み込むようにフォワードプライマーとリバースプライマーの2種類のプライマーを各 SNP ごとに設計した。このソフトウェアは PCR の適した条件の必要事項である Tm 値、GC 含量、プライマー配列の2次構造等を考慮してプライマー配列を選定できるが、反復領域やゲノム上に類似した配列がある場合あるいはプライマー配列内に多型がある場合には PCR 増幅が阻害されるため、できる限り配列情報の検索を行っておくことが重要であり、この点にも留意した (表 1)。

4) PCR 増幅

ゲノム DNA 10ng を鋳型としてサーマルサイクラー-9700 (ABI 社) を用いて PCR 反応を行い、SNP を含むゲノム領域の増幅を行った。増幅断片を 2.0%アガロースゲル電気泳動等によって確認した。このとき、予想されるサイズの DNA 断片が検出されなかったり、非特異的 DNA 断片が検出された場合は、PCR 増幅サイクルのうち、アニーリング温度あるいは伸長反応の時間を検討することによって特異的な DNA 増幅の検出を確認した。SNP 検出は、最終段階の塩基配列の決定において偽陽性あるいは偽陰性が検出される場合があるため、PCR 増幅条件を十分に検討した。

5) 塩基配列の決定

増幅 DNA 断片を Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって精製後、PCR 増幅に用いたプライマーを用いてサイクルシーケンシングを行う。反応後、シーケンシング産物を精製して ABI3100 シーケンサーによって塩基配列の決定を行った。明確な波形データが得られない場合は、入れ子 (nested) プライマーを用いて再度サイクルシーケンシングを行った。

6) ハプロタイプ解析

連鎖不平衡値の算出およびハプロタイプの推定は、Haploview (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/>) によって行った (文献 3)。

7) NTE 酵素活性の測定

ヒト末梢血 10ml より室温で 8 時間以内にリンパ球を分画した (図 4)。NTE 活性は、0.8mM Paraoxon の存在下および 0.8mM Paraoxon、0.2mM mipafox の存在下における 5.3mM Phenyl valerate の加水分解の割合によって算出された。

ヒト血漿中の Paraoxonase 活性の測定は、

Paraoxon (o,o-diethyl-o-p-nitrophenylphosphate) を基質として、4-nitrophenol の生成量を吸光度 412 nm として求めることによって出された。

8) 統計解析

上記の解析で得られた多型データについて、患者集団および健常者集団における対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度、ハプロタイプ頻度、NTE 酵素活性を算出し、両集団間の各頻度についての有意差検定は χ^2 検定およびフィッシャーの Probability 検定により解析を行った。

なお、本研究は遺伝子解析を含むため、3 省庁の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、北里研究所・北里研究所病院および東海大学医学部の医の倫理委員会での承認を得ると共に、試料提供者には十分な説明を行い、試料提供の同意書を得るように十分配慮した。

一方、この研究について、東海大学医学部では情報管理、遺伝カウンセリングの体

制も十分備えて万全を期している。

C. 研究成果

1. 遺伝的多型箇所の検索

シックハウス症候群の候補遺伝子である NTE 遺伝子について、遺伝的多型箇所をデータベース検索によって調べた。この遺伝子は 27.6Kb のゲノム領域にわたり、現在までのところ、106 個の SNP と 7 個のマイクロサテライトが存在する (表 2)。SNP に関しては、その対立遺伝子頻度の情報が全ての SNP について明らかにされていないため、遺伝的多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency の高い遺伝マーカーを実験的に調べる必要がある。そこで、上記の検索によって検出された SNP についてランダムにいくつかの SNP について対立遺伝子頻度を求めることとした。

2. PCR プライマーおよび PCR 条件の設定

遺伝的多型の解析方法を確立するために、a)DNA 抽出方法、b)PCR プライマーの設定と PCR 条件の決定、c)PCR 産物の抽出方法、d)Sequencing 方法の決定を行った。DNA の抽出方法については、0.4ml の末梢血試料をカートリッジ (キアゲン社) を使用して DNA の調製を行った。このようにして抽出されたゲノム DNA は、次ぎの PCR 反応条件に適当な DNA 濃度および品質を保っていた。PCR

プライマーは、SNP 箇所を挟み込む形で設定してその増幅 DNA 断片が 1.5kb 以下になるように設計した。PCR 反応条件は、94°C 30sec、56~60°C 30sec、72°C 2min のサイクルを 30 回繰り返すことで標的 DNA 断片の増幅を確認できた。また、近接する SNP 箇所については 1 つの PCR 断片の中に複数の SNP が含まれるように PCR プライマーを設定し、多型解析の効率化を図った。PCR 増幅断片を含む PCR 産物には、PCR プライマーおよび dNTPs (デオキシリボヌクレオチド三リン酸) が含まれているため、これらを Exonuclease I および Shrimp Alkaline Phosphatase によって除去し、1/100 量を Sequencing 反応に使用した。

3. マイクロサテライトマーカー解析

NTE 遺伝子の 3'flanking 領域に存在するマイクロサテライト繰り返し配列のタイピングを行った。このマイクロサテライトは、塩基配列 (ATT) の繰り返し配列であり、日本人対象者集団 151 人とシックハウス症候群患者 59 人におけるタイピングの結果、7 個の対立遺伝子が存在していた。このうち 2 個の対立遺伝子 (allele 3 および 4) において患者集団において数を増やしている正の統計学的な有意差を示した (表 3)。これら 2 個の対立遺伝子頻度に関する有意差検定の結果を Bonferroni の補正によって補正した結果、一方の対立遺伝子が統計学的有意

差を示した (表 3、 $P_c=0.040$)。

4. DNA 多型解析

DNA 多型の解析方法が確立された SNP について、その対立遺伝子頻度を求め遺伝的多型マーカーとしての有用性を検討した。患者群 10 名、対照群 10 名について、*NTE* 遺伝子内に検出された遺伝的多型箇所のうちランダムにいくつかの SNP を選択して、塩基配列の決定を行った。その結果、SNP81 箇所中 66 箇所において多型性が確認された。さらに、多型が確認されたこれらの SNP について Minor allele frequency を算出したところ、多型マーカーとして有用であると予想される Minor allele frequency が 0.2 以上の SNP を 55 箇所を確認した。

5. 相関解析

上記において遺伝マーカーとしての有用性を検定された 53 個の SNP およびエクソン 9 における SNP について、シックハウス症候群患者集団において特異的な対立遺伝子を解析するために、シックハウス症候群集団 60 名および健常者集団 152 名を用いた相関解析を行った。その結果、エクソン 2 における非翻訳領域に存在する遺伝マーカー rs604959 において、統計学的有意差を示す対立遺伝子が見出された (表 4 図 5、 $P=0.037$)。同様に、遺伝子型頻度についても有意差検定を行った結果、上記の対立遺伝子頻

度において有意差を示した遺伝マーカーに加えて、プロモーター領域内 rs560849、イントロン 1 領域内 rs540516 において統計学的有意差を示す遺伝子型が見出された (表 5)。これら 3 個の遺伝マーカーの遺伝子型頻度に関する有意差検定の結果を Bonferroni の補正によって補正した結果、エクソン 2 における遺伝マーカー rs604959 のみが統計学的有意差を検出した (表 5、 $P=0.019$)。

また、*CYP1A1* 遺伝子および *GSTP1* 遺伝子についても遺伝的多型マーカーを用いた遺伝学的相関解析を行った。*CYP1A1* 遺伝子については、イントロン 1、エクソン 7、3'flanking 領域に存在する 3 個の多型部位を遺伝マーカーとし、*GSTP1* 遺伝子については、エクソン 5 および 7 に存在する 2 個の多型部位を遺伝マーカーとした (表 6)。これらの遺伝マーカーについて、シックハウス症候群集団 60 名および健常者集団 131 名における対立遺伝子頻度および遺伝子型頻度についての有意差検定を行った (表 7)。その結果、対立遺伝子頻度については、5 個の遺伝マーカーについて統計学的有意差を示すような対立遺伝子見出されなかった。しかし、遺伝子型頻度については、*GSTP1* 遺伝子のエクソン 7 における多型部位において、ヘテロ接合体の個体が患者集団において有意に増加していた (表 8、 $P=0.034$ 、投稿準備中)。

6. ハプロタイプ解析

上記の遺伝学的相関解析に使用した 53 個の遺伝マーカー間の連鎖不平衡値 D' を解析ソフトウェア「Haploview」によって算出し、 $D' > 0.94$ を満たすハプロタイプを推定した。その結果、53 個の遺伝マーカーは 9 個のハプロタイプブロックに分けられた (図 6)。9 個のハプロタイプブロックそれぞれについて、ハプロタイプ頻度を推定し、有意差検定を行った。その結果、ハプロタイプブロック 1 および 3 が、統計学な有意差を示した (図 5、表 9)。ハプロタイプブロック 1 においては、遺伝子型頻度についての有意差検定において相関の得られたイントロン 1 の rs540516 およびエクソン 2 の rs604959 が含まれているが、さらにプロモーター領域の rs560849 遺伝マーカーを加えた 3 個の遺伝マーカーについて TCA, CTC, CCA, TCC の 4 個のハプロタイプが推定された (表 10)。これらのハプロタイプのうち、ハプロタイプ TCC の頻度については、シックハウス症候群患者集団において有意に増加していた ($P=0.000004$)。さらに、プロモーター領域の rs560849 およびイントロン 1 の rs540516 における 2 個の遺伝マーカーについてハプロタイプの推定を行った結果、3 個のハプロタイプ TC, CT, CC が推定されたが、その頻度については患者群および健常者群において統計学的有意差はなかった (表 10)。また、イントロン 1 内の rs540516 およびエクソン

2 内の rs604959 における 2 個の遺伝マーカーについてハプロタイプの推定を行った結果、3 個のハプロタイプ TA, TC, CC が推定された。これらのハプロタイプ頻度について患者群および健常者群において有意差検定を行った結果、ハプロタイプ CC において統計学的有意差が見られた ($P=0.000003$ 、表 10)。

7. NTE および PON1 酵素活性

シックハウス症候群患者 9 名および健常者 10 名を用いて、末梢血から分画したリンパ球における NTE 酵素活性を測定した。両群間の酵素活性について有意差検定を行った結果、患者集団において統計学的に有意に酵素活性が上昇していた ($P=0.0005$ 、図 7)。

また、シックハウス症候群患者 5 名および健常者 6 名を用いて、ヒト血漿中における PON1 活性を測定した。両群間の酵素活性について有意差検定を行った結果統計学的有意差は見られなかった (図 8)。

D. 考察

シックハウス症候群の感受性候補遺伝子として NTE 遺伝子を選定し、遺伝的多型マーカーを用いた遺伝学的相関解析を行った。用いた遺伝マーカーは、マイクロサテライトマーカーおよび SNP マーカーを用いたが、それぞれの遺伝マーカーの特性より、第一段階では少数のマイクロサテライトマーカーを用いた相関解析、

第二段階では、相関の得られた領域における高密度の SNP マーカーを用いた相関解析、第三段階として、相関の得られた遺伝子の酵素活性の比較といった戦略で、シックハウス症候群の感受性遺伝子の同定を行ったが、非常に効率的に感受性領域を絞り込むことができた。

この遺伝子はマウスにおいて、その酵素活性の阻害を通して有機リンによる神経毒性効果を及ぼすことが初めて示されたもので、シックハウス症候群を含む神経性疾患に遺伝的要因が関与することを示唆したものである。このことより、*NTE* 遺伝子の遺伝子多型がシックハウス症候群に影響を及ぼすかということに、我々はいち早く解析した。

ヒト *NTE* 遺伝子領域において合計 53 個の遺伝マーカーに関して、シックハウス症候群患者集団および健常者集団における対立遺伝子頻度、遺伝子型頻度さらにハプロタイプ頻度に関する有意差検定を行った。その結果、対立遺伝子頻度に関しては、エクソン 2 の非翻訳領域に存在する遺伝マーカー rs604959 においてシックハウス症候群との相関が見られた。また、この遺伝マーカーに加えて、これより上流に存在する 2 つの遺伝マーカー rs560849、rs540516 の 3 個の遺伝マーカーともに遺伝子型頻度についてシックハウス症候群と相関が見られた。さらに、この 3 個の遺伝マーカーを含むハプロタイプ解析の結果、ハプロタイプ TCC が

健常者集団において 0.3%のみであるのに対してシックハウス症候群患者集団では 8.3%と有意にその頻度が増加していた。

このことから、*NTE* 遺伝子の 5' 上流領域に存在するハプロタイプ TCC がシックハウス症候群の感受性ハプロタイプであると考えられる。本結果は、現在までに全く報告がなく、シックハウス症候群の遺伝的関与を明らかにした最初の研究と考えている（投稿準備中）。

また、シックハウス症候群患者集団および健常者集団も用いたヒトリンパ球における *NTE* 酵素の活性解析についても、*NTE* 酵素はシックハウス症候群患者集団において有意にその活性が上昇していた。上記ハプロタイプ解析により同定されたシックハウス症候群感受性ハプロタイプが *NTE* 遺伝子のプロモーター領域に位置していることから、この *NTE* 酵素活性の上昇は *NTE* 遺伝子の遺伝的多型に基づく可能性が考えられる。

一般に *NTE* タンパク質は、生体内において有機リンと結合し、エステルを生成する。このエステルは有毒であるが、炭化水素基を解離しエステラーゼ活性を有する「Aged Esterase」に変化し、次なるエステル化反応を行うと考えられている。シックハウス症候群患者においては、*NTE* 活性が上昇していることから、この有機リン代謝経路の中間生成物である有毒なエステルの生成量が健常者に比べて増加し、慢性的な神経毒性が表われる可

能性があることが考えられる。

E. 結論

3年間の主な成果は下記の通りである。

1. NTE 遺伝子について、患者群 10 名、対照群 10 名を用いた DNA 多型解析の結果、Minor allele frequency が 0.2 以上の多型性を示す多型箇所 55 箇所うち 53 箇所について、相関解析を行った結果、患者集団において統計学的に有意な遺伝マーカーをエクソン 2 領域に見い出した。また、この遺伝マーカーに加えて、上流に存在する 2 個の遺伝マーカーの合計 3 個の遺伝マーカーについては、遺伝子型頻度についても統計学的に有意差を検出した。さらに、この 3 個の遺伝マーカーを含むハプロタイプ解析の結果、ハプロタイプ TCC がシックハウス症候群患者集団において、統計学的に有意にその頻度が上昇していた。
2. ヒトリンパ球を用いた NTE 活性の測定系を確立した。さらに、一般健常者集団に比べて、シックハウス症候群患者集団における NTE 活性が有意に上昇していた。

参考文献

1. Glynn P. NTE: one target protein for different toxic syndromes with distinct mechanisms? Bioessays 25(8):742-745, 2003.
2. Winrow CJ et al. Loss of neuropathy target esterase in mice links organophosphate exposure to hyperactivity. Nature genetics 33: 477-485, 2003.
3. Barrett JC et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. Bioinformatics 21:263-265, 2005.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

ア) 発表論文

本研究とは直接関連がないが本年度の発表論文を挙げておく。

1. Sato M., Nagashima A., Watanabe T., and Kimura M. Comparison of intrabursal transfer of spermatozoa (ITS), a new method for artificial insemination in mice, with intraoviductal transfer of spermatozoa. J. Assist. Reprod. Genet. 19(11), 523-530. (2003)
2. Sato, M, Tanigawa, N., Kikuti, N., Nakamura, S., and Kimura, M. Efficient gene delivery into murine ovarian cells by intraovarian injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation. Genesis 35, 167-174 (2003)

3. Kurihara, Y., Tokuriki, M., Myojin, R., Hori T., Kuroiwa A., Matsuda Y., Sakurai, T., Kimura M., Hecht N.B. and Uesugi S. CPEB2, A Novel Putative Translational Regulator in Mouse Haploid Germ Cells. *Biology of Reproduction* 69, 261-268 (2003)
4. Nomura, E., Sato, M., Suemizu, H., Watanabe, T., Kimura, T., Yabuki, K., Goto, K., Ito, N., Mizuki, N., Ohno, S. and Kimura M. Hyperkeratosis and leukocytosis in transgenic mice carrying *MHC class I-related gene B(MICB)*. *Tissue Antigen* 61, 1-8 (2003)
5. Taniguchi Y., Moriuchi T., Inoko H. and Kimura M. HOXD3 mediates the switchover of cadherin 4 to $\beta 3$ integrin gene expression in human erythroleukemia HEL cells. *Biomedical Research* 24(3), 133-140 (2003)
6. Ohtsuka, M., Kikuchi N., Ozato K., Inoko H and Kimura M. Comparative analysis of a 229 kb medaka genomic region, containing the *zic1* and *zic4* genes, to *Fugu*, human and mouse. *Genomics in press* (2003)
7. Tamaki, T., Akatsuka, A., Okada, Y., Matsuzaki Y., Okano, H. and Kimura, M. Growth and differentiation potential of main- and side- population cells derived from murine skeletal muscle. *Exp. Cell Res.* 291, 83-90 (2003)
8. Nakamura, S., Terashima, M., Kikuchi, N., Kimura, M., Saito, A. and Sato, M. A new mouse model for renal lesions produced by intravenous injection of diphtheria toxin A-chain expression plasmid. *BMC Nephrology* (submitted)
9. Ohtsuka, M., Kikuchi N., Kinoshita, M., Wittbrodt, J., Takeda, H., Wakamatsu, Y., Ozato K., Inoko H and Kimura M. Possible roles of *zic1* and *zic4*, identified within the medaka *Double anal fin(Da)* locus, in dorsoventral patterning of the trunk-tail region (related to the phenotypes of the *Da* mutant). *Genomics submitted*
10. Kimura M., Kimura, T., Sato, M., Watanabe, T., Ohno, S., Inoko, H. and Nomura, E. An Attempt To Create A Behcet's Disease Model In Mice. In *Immunology of Behcet's Disease* Ed. By Zierhut M. and Ohno, S. Swets & Zeitlinger 87-101 (2003)
11. Sato M., Nagashima A., Watanabe T., and Kimura M. Comparison of intrabursal transfer

- of spermatozoa (ITS), a new method for artificial insemination in mice, with intraoviductal transfer of spermatozoa.
J. Assist. Reprod. Genet. 19(11), 523-530. (2003)
12. Sato, M, Tanigawa, N., Kikuti, N., Nakamura, S., and Kimura, M.
 Efficient gene delivery into murine ovarian cells by intraovarian injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation.
Genesis 35, 167-174 (2003)
13. Kurihara, Y., Tokuriki, M., Myojin, R., Hori T., Kuroiwa A., Matsuda Y., Sakurai, T., Kimura M., Hecht N.B. and Uesugi S.
 CPEB2, A Novel Putative Translational Regulator in Mouse Haploid Germ Cells.
Biology of Reproduction 69, 261-268 (2003)
14. Nomura, E., Sato, M., Suemizu, H., Watanabe, T., Kimura, T., Yabuki, K., Goto, K., Ito, N., Mizuki, N., Ohno, S. and Kimura M.
 Hyperkeratosis and leukocytosis in transgenic mice carrying *MHC class I-related gene B(MICB)*.
Tissue Antigen 61, 1-8 (2003)
15. Taniguchi Y., Moriuchi T., Inoko H. and Kimura M.
 HOXD3 mediates the switchover of cadherin 4 to β 3 integrin gene expression in human erythroleukemia HEL cells.
Biomedical Research 24(3), 133-140 (2003)
16. Ohtsuka, M., Kikuchi N., Ozato K., Inoko H and Kimura M.
 Comparative analysis of a 229 kb medaka genomic region, containing the *zic1* and *zic4* genes, to *Fugu*, human and mouse.
Genomics 83(6), 1063-1071 (2003)
17. Tamaki, T., Akatsuka, A., Okada, Y., Matsuzaki Y., Okano, H. and Kimura, M.
 Growth and differentiation potential of main- and side- population cells derived from murine skeletal muscle.
Exp. Cell Res. 291, 83-90 (2003)
18. Nakamura, S., Terashima, M., Kikuchi, N., Kimura, M., Saito, A. and Sato, M.
 A new mouse model for renal

- lesions produced by intravenous injection of diphtheria toxin A-chain expression plasmid.
 BMC Nephrology 5:4, Open Access
<http://www.biomedcentral.com/1471-2369/5/4> (2004)
19. Ohtsuka, M., Kikuchi N., Yokoi, H., Kinoshita, M., Wakamatsu, Y., Ozato K., Takeda, H., Inoko H and Kimura M.
 Possible roles of *zic1* and *zic4*, identified within the medaka *Double anal fin(Da)* locus, in dorsoventral patterning of the trunk-tail region(related to the phenotypes of the *Da* mutant).
 Mechanism of Development 121, 873-882 (2004)
20. Sunaga, K., Sugaya, E., Kajiwar, K., Tsuda, T., Sugaya, A. and Kimura, M.
 Moleccular Mechanism of Preventative Effect of Peony Root Extract on Neuron Damage.
 J. Herbal Pharmacol. 4(1), 9-20 (2004)
21. Ohtsuka, M., Horiuchi, S., Kulski, J. K., Kimura M. and Inoko, H.
 CHOP: visualization of 'wobbling' and isolation of highly conserved regions from aligned DNA sequences.
 Nucleic Acid Research, 32, W55-W58 (2004)
22. Myojin, R., Kuwahara S., Yasaki T., Kuroiwa, A., Matsunaga T., Sakurai T., Kimura M., Uesugi S and Kurihara Y.
 Expression and Functional Significance of Mouse Paraspeckle Protein 1 on Spermatogenesis.
 Biology of Reproduction 71, 926-932 (2004)
23. Konishi S, Naora H, Kimura M, Sato M, Nagasaki M, Yokoyama M, Otani H, Moritake K, Katsuki M.
 Expression of SV40 T antigen gene in the oligodendroglia induced primitive neuroectodermal tumor-like tumors in the mouse brain.
 Congenit Anom (Kyoto). 2004 Dec;44(4):215-24.
24. Sakurai, T., Sato M and Kimura M.
 A Novel Method for Constructing Murine cDNA Library Enriched with Maternal mRNAs Exhibiting *De Novo* Independent Post-Fertilization Polyadenylation.
 Biochem. Biophys. Res. Comm. ;

327 : 688-699 (2005)

25. Sakurai, T., Kimura M and Sato M.

Temporary developmental arrest after storage of fertilized eggs at 4 °C : Effects on embryonic development, maternal mRNA processing and cell cycle.

Molecular Human Reproduction. 11(5) 325-333 (2005) Apr.

26. Sakurai, T., Sato M and Kimura M.

Diverse patterns of poly(A) tail elongation and shortning of murine maternal mRNAs from fully grown oocyte to 2-cell embryo stages.

Biochem. Biophys. Res. Comm. ; 336 : 1181-1189 (2005)

27. Tamiya G, Shinya M, Imanishi T,

Ikuta T, Makino S, Okamoto K, Furugaki K, Matsumoto T, Mano S, Ando S, Nozaki Y, Yukawa W, Nakashige R, Yamaguchi D, Ishibashi H, Yonekura M, Nakami Y, Takayama S, Endo T, Saruwatari T, Yagura M, Yoshikawa Y, Fujimoto K, Oka A, Chiku S, Linsen SE, Giphart MJ, Kulski JK, Fukazawa T, Hashimoto H, Kimura M, Hoshina Y, Suzuki Y, Hotta T, Mochida J, Minezaki T, Komai K, Shiozawa S, Taniguchi A, Yamanaka H, Kamatani N, Gojobori T,

Bahram S, Inoko H.

Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27,039 microsatellites.

Hum Mol Genet. 2005 Aug 15;14(16):2305-21. Epub 2005 Jul 6.

イ) 学会発表

1. 松坂恭成 シックハウス症候群と疾患感受性遺伝子 —Neuropathy Target Esterase (NTE) 遺伝子における SNPs およびマイクロサテライト多型とシックハウス症候群— 第 14 回日本臨床環境医学会総会 2005 年 7 月 1-2 日
2. 松坂恭成 シックハウス症候群と疾患感受性遺伝子 —Neuropathy Target Esterase (NTE) 遺伝子多型解析とシックハウス症候群— 第 13 回日本臨床環境医学会総会 2004 年 7 月 2-3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

特になし

表 1. PCR oligonucleotide primers used for sequencing analysis of the human NTE gene

Location	Forward sequences (5' to 3')	Reverse sequences (5' to 3')	Sequencing primers (5' to 3')	PCR product (bp)	annealing temperature (°C)
promoter - intron 1	TCTCTGCTGCTGCGGAAGGTTTCGAGTC	CCGGTGTGGAACAACACTGCCGAGACGGTG		758	56
exon 1 - intron 2	CGGCCTCAGTCGGCCCTTCCAAGCATGG	CTACCAGACGCCCGCCTGTCCAAC	GTATTGTAATCCTCAGAATCTCAGTAAC	1186	58
intron 6	TCCTTCCACTGGAGTATCTGAGC	GACTGCCATTGCAGGACTATTG		547	58
exon 9	GAGATGCCCTGCTCGTTGGAAG	CATCGGCAGCATAACGGATGAACC		337	56
intron 12	TCAGCACCTCAGCTACAGACG	GACCTGGATTCAAACCTGGAAG		525	58
intron 14	GGCGTTGATTAGTCATGCTGC	GGCCGACTCATCCTCACAG		572	57
intron 19	AGTGGCAAGAAGGAGCTGGTG	GTGTAGGGAAGCAAGCCTCG		298	58
intron 21	CGCTTCCCAGGTCTCACTG	CGGCCCTGCCATCATTC		506	58
intron 21	TCTACATTGTGGTGGCCAGA	ACTTTGACCCAGCTGTTGCT		902	59
intron 21	ACTGAGGAGGAAAGCGATCA	GGTTGGTGAGTCCGAGTGTTGG		921	59
intron 23 - exon 24	CTACTCCTTAACAGTGACATCATC	CACAAATGAGGATGCAGTCGGCCTG		474	56
exon 24 - intron 25	ACACCGTATCGTACTCTACCAGAC	GCCAAAGCGGAGAAAGTCGCTGTG		711	58
intron 27 - exon 30	ACCTCCTGTCTACTGACCCCTAACC	GGCAGGTAGCCCCGACAGCCGTCATGC		1232	58
intron 29 - intron 30	CGTTAACAAACGTOCCAGGTC	CTGTGCACATGTGCCTGTGTGTACACGGT	AGGCTGGAGTGCAGTAGCAT	949	63
exon 31 - intron 31	AACGGTCAATGCCATTGACGTTGG	TGCTGGGATTAATGCAATGA		1016	58

表 2. NTE 遺伝子におけるSNPs

REGION	SNPs
Promoter	2
Exon	4
Intron	96
3' Flanking	4
	106

表3 Allele frequencies of ATT repeat polymorphism of the NTE gene in patients with Sick house syndrome and controls

Allele	PCR product length	PATIENTS		CONTROLS		OR (90% CI)	χ^2	P-value	Pc
		Repeat	(2n=118)	Repeat	(2n=302)				
Allele 1	286	10	0.17	0.18	0.18	0.94 (0.53 - 1.65)	0.05	0.822	1.000
Allele 2	292	12	0.07	0.06	0.06	1.22 (0.51 - 2.90)	0.20	0.654	1.000
Allele 3	295	13	0.13	0.06	0.06	2.44 (1.20 - 4.97)	6.05	0.014	0.084
Allele 4	298	14	0.14	0.06	0.06	2.63 (1.31 - 5.28)	7.37	0.007	0.040
Allele 5	301	15	0.34	0.42	0.42	0.70 (0.45 - 1.09)	2.55	0.111	0.664
Allele 6	304	16	0.16	0.17	0.17	0.92 (0.52 - 1.64)	0.08	0.784	1.000
Allele 7	307	17	0.00	0.06	0.06	-	-	-	-

表 4. Allelic association between SNPs in the *NTE* gene and Sick house syndrome.

No.	rs No.	Location	Allele	Allele frequency		OR (90% CI)	χ^2	P-value
				Patients (2n=120)	Controls (2n=304)			
1	rs560849	Promoter	T/c	0.500	0.447	1.24 (0.81 - 1.89)	0.947	0.330
2	rs540516	intron 1	C/t	0.407	0.362	1.21 (0.78 - 1.87)	0.733	0.392
3	rs604959	exon 2	A/c	0.475	0.365	1.57 (1.03 - 2.41)	4.341	0.037
4	rs541271	intron 6	G/a	0.418	0.388	1.13 (0.74 - 1.74)	0.325	0.569
5	rs526411	intron 6	C/t	0.418	0.398	1.09 (0.71 - 1.66)	0.145	0.704
6	rs654059	intron 6	T/c	0.508	0.497	1.05 (0.69 - 1.59)	0.046	0.830
7	rs591040	exon 9	C/t	0.017	0.016	1.05 (0.20 - 5.48)	0.003	0.955
8	rs492092	intron 12	C/g	0.598	0.566	1.14 (0.75 - 1.75)	0.378	0.539
9	rs620744	intron 14	C/t	0.451	0.438	1.06 (0.69 - 1.61)	0.063	0.802
10	rs577219	intron 19	G/t	0.415	0.382	1.15 (0.75 - 1.77)	0.405	0.525
11	NEW	intron 19	DEL/a	0.415	0.395	1.09 (0.71 - 1.68)	0.149	0.699
12	rs473899	intron 21	A/g	0.393	0.385	1.04 (0.67 - 1.59)	0.027	0.870
13	rs661825	intron 21	G/c	0.631	0.625	1.03 (0.66 - 1.59)	0.014	0.906
14	rs496380	intron 21	A/g	0.639	0.625	1.06 (0.69 - 1.65)	0.077	0.782
15	rs557596	intron 21	T/c	0.648	0.628	1.09 (0.70 - 1.68)	0.139	0.709
16	rs2432110	intron 21	T/c	0.458	0.410	1.21 (0.79 - 1.86)	0.787	0.375
17	rs793864	intron 21	C/g	0.754	0.679	1.45 (0.90 - 2.35)	2.299	0.129
18	rs1645799	intron 21	G/a	0.492	0.443	1.21 (0.79 - 1.86)	0.793	0.373
19	NEW	intron 21	C/g	0.508	0.438	1.33 (0.87 - 2.03)	1.739	0.187
20	NEW	intron 21	T/a	0.508	0.438	1.33 (0.87 - 2.03)	1.739	0.187
21	NEW	intron 21	C/g	0.508	0.424	1.40 (0.92 - 2.14)	2.454	0.117
22	NEW	intron 21	G/t	0.508	0.438	1.33 (0.87 - 2.03)	1.739	0.187
23	rs688348	intron 21	A/c	0.492	0.424	1.31 (0.86 - 2.00)	1.580	0.209
24	rs480208	intron 21	A/g	0.492	0.408	1.40 (0.92 - 2.15)	2.461	0.117
25	rs581698	intron 21	G/c	0.517	0.434	1.39 (0.91 - 2.13)	2.345	0.126
26	rs582611	intron 21	A/g	0.500	0.433	1.31 (0.85 - 2.01)	1.519	0.218
27	rs534758	intron 21	G/t	0.750	0.733	1.09 (0.67 - 1.78)	0.120	0.729
28	rs583984	intron 21	T/c	0.491	0.447	1.20 (0.78 - 1.84)	0.673	0.412
29	rs50874	intron 21	A/g	0.509	0.470	1.17 (0.76 - 1.80)	0.508	0.476
30	rs534464	intron 23	G/c	0.742	0.704	1.21 (0.75 - 1.94)	0.600	0.438
31	rs563266	intron 23	T/c	0.458	0.421	1.16 (0.76 - 1.78)	0.487	0.485
32	rs597582	intron 23	C/t	0.742	0.720	1.11 (0.69 - 1.80)	0.196	0.658
33	rs598023	intron 23	A/g	0.737	0.720	1.09 (0.67 - 1.76)	0.122	0.727
34	rs598028	intron 23	C/g	0.742	0.720	1.11 (0.69 - 1.80)	0.196	0.658
35	rs599328	intron 24	C/g	0.742	0.737	1.03 (0.63 - 1.66)	0.010	0.919
36	rs599330	intron 24	C/t	0.708	0.701	1.04 (0.65 - 1.65)	0.024	0.876
37	rs524530	intron 24	A/g	0.750	0.701	1.28 (0.79 - 2.07)	1.027	0.311
38	rs539887	intron 24	A/c	0.717	0.714	1.01 (0.63 - 1.62)	0.003	0.953
39	rs563826	intron 25	A/g	0.717	0.704	1.06 (0.67 - 1.70)	0.067	0.795
40	rs2446176	intron 29	G/a	0.690	0.671	1.09 (0.69 - 1.73)	0.133	0.716
41	rs1645800	intron 30	G/a	0.456	0.418	1.17 (0.76 - 1.80)	0.499	0.480
42	rs503336	intron 30	A/g	0.442	0.418	1.10 (0.72 - 1.69)	0.201	0.654
43	rs518321	intron 30	T/c	0.442	0.418	1.10 (0.72 - 1.69)	0.201	0.654
44	rs504149	intron 30	T/G/c	0.500	0.441	1.27 (0.83 - 1.94)	1.215	0.270
45	rs504934	intron 30	C/t	0.474	0.421	1.24 (0.81 - 1.90)	0.962	0.327
46	rs7245592	intron 30	G/a	0.432	0.414	1.08 (0.70 - 1.65)	0.110	0.740
47	NEW	intron 30	T/c	0.432	0.398	1.15 (0.75 - 1.77)	0.411	0.521
48	rs506104	intron 30	C/a	0.432	0.391	1.18 (0.77 - 1.82)	0.587	0.444
49	rs538850	intron 31	C/t	0.448	0.408	1.18 (0.77 - 1.82)	0.562	0.453
50	rs538852	intron 31	G/a	0.741	0.737	1.02 (0.63 - 1.67)	0.009	0.925
51	rs577029	intron 31	T/c	0.448	0.418	1.13 (0.74 - 1.74)	0.320	0.572
52	rs577145	intron 31	T/c	0.448	0.418	1.13 (0.74 - 1.74)	0.320	0.572
53	rs541600	intron 31	C/t	0.448	0.418	1.13 (0.74 - 1.74)	0.320	0.572
54	rs89621	intron 31	C/t	0.448	0.418	1.13 (0.74 - 1.74)	0.320	0.572

表 5 . Genotype association between SNPs in the NTE gene and Sick house syndrome.

No.	rs No.	Location	Genotype	Genotype frequency		OR (90% CI)	χ^2	P -value	Pc -value
				Patients (2n=120)	Controls (2n=304)				
1	rs560849	Promoter	C/C	0.305	0.151	2.46 (1.23 - 4.94)	6.419	0.011	0.068
			C/T	0.390	0.592	0.44 (0.24 - 0.81)	6.991	0.008	0.049
			T/T	0.305	0.257	1.27 (0.66 - 2.47)	0.507	0.476	1.000
2	rs540516	intron 1	C/C	0.390	0.375	1.06 (0.57 - 1.97)	0.040	0.842	1.000
			C/T	0.407	0.526	0.62 (0.34 - 1.13)	2.430	0.119	0.714
			T/T	0.203	0.099	2.33 (1.04 - 5.25)	4.176	0.041	0.246
3	rs604959	exon 2	A/A	0.317	0.375	0.77 (0.41 - 1.46)	0.637	0.425	1.000
			A/C	0.417	0.520	0.66 (0.36 - 1.21)	1.829	0.176	1.000
			C/C	0.267	0.105	3.09 (1.46 - 6.53)	8.744	0.003	0.019