

厚生労働科学研究研究費補助金

感覚器障害研究事業

正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定
および迅速遺伝子診断キットの開発に
関する研究に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 水木信久

平成19（2007）年 4月

目次

I. 総括報告

| | |
|--|---|
| 正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定および迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究 水木 信久 | 3 |
|--|---|

II. 分担研究報告

| | |
|--|----|
| 1. マイクロサテライトを用いた疾患感受性遺伝子同定法の確立に関する研究 猪子 英俊 | 10 |
| 2. ゲノムワイドなマイクロサテライトによる相関解析を用いた正常眼圧緑内障の感受性遺伝子の 検索に関する研究 伊藤 典彦 | 20 |
| 3. DNAチップによる正常眼圧緑内障感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析 西出 忠之 | 26 |
| 4. NTGクライテリアの確立と迅速かつ品質を維持した検体収集ネットワークの構築 遠藤 要子 | 36 |

| | |
|---------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 52 |
|---------------------|----|

| | |
|--------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物 | 別冊 |
|--------------|----|

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
総括研究報告書

正常眼圧緑内障の疾患感受性遺伝子の同定および
迅速遺伝子診断キットの開発に関する研究

主任研究者 水木信久 横浜市立大学医学部眼科学 教授

研究要旨 緑内障は視神経に傷害をきたす進行性の難治性疾患であり、本邦の失明原因の第2位を占める。その有病率は加齢とともに上昇し、40歳以上では5.8%（推定250万人）と高値を示す。緑内障は複数の危険因子（疾患感受性遺伝子）の関与のもとに発症する多因子性遺伝疾患であると考えられており、これらの遺伝情報は疾患罹患率の予測や予防法の確立、疾患感受性遺伝子をターゲットとした新薬の開発を可能にすると考えられる。本研究の目的は本邦に最も多い正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）の疾患感受性遺伝子を網羅的に同定し、NTGの迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬の開発を行うことであり、初年度は検体収集ネットワークの構築および網羅的な疾患感受性遺伝子スクリーニング系の確立を行った。現在、遺伝マーカーとしてマイクロサテライトおよびSNPを用いて全ゲノム網羅的（ゲノムワイド）なNTGの疾患感受性遺伝子スクリーニングを行っている。

分担研究者

猪子英俊（東海大学医学部基礎医学系
分子生命科学 教授）

伊藤典彦（横浜市立大学医学部眼科学 助手）

遠藤要子（横浜市立大学医学部眼科学 助手）

西出忠之（横浜市立大学医学部眼科学 助手）

A. 研究目的

緑内障は視神経に傷害をきたす進行性の難治性疾患である。放置すると視野狭窄が進行し、失明に至ることのある疾患で、本邦の失明原因の第2位を占めている。緑内障の有病率は加齢とともに上昇し、40歳以上では緑内障全体で5.8%と高値を示し、患者数は250万人以上ともいわれる。緑内障では一度失った

視野(死んだ細胞)は回復することはないため、その治療の基本は進行予防、進行抑制であり、早期発見、早期治療が非常に重要である。緑内障は正常視機能を維持できる健常眼圧以上の眼圧上昇のために、視神経が圧迫され、視野狭窄が生じると考えられており、眼圧の上昇が緑内障診断の重要な基準となっている。しかしながら、眼圧が正常範囲にあるにも関わらず、視野狭窄を来す正常眼圧緑内障（normal tension glaucoma: NTG）というタイプが存在し、本邦ではそのNTGが最も高頻度に存在することが明らかになっている（2002年多治見スタディ）。NTGは眼圧が正常範囲にあるため、健康診断や

通常の眼科の診察では見落とされることも少なくない。また、NTGは本人の自覚症状も少なく、本人が気付かないうちに視神経傷害（視野障害）が進行していることが多いため、NTGの早期発見、早期治療が大切とされている。NTGは危険因子（疾患感受性遺伝子）が多数重なることにより発症する多因子疾患であると考えられており、NTGの疾患感受性遺伝子を網羅的に同定し、それらの情報をもとに迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬（分子標的薬）を開発することは、NTGの早期発見・早期治療、しいては患者個人の特性に応じた診断・治療といったテーラーメイド医療へとつながり、医学的価値は大変に高いといえる。

多因子疾患の疾患感受性遺伝子の探索法は「連鎖解析」と「相関解析」に大別される。連鎖解析は形質マッピングのきわめて有効な手段であるが、解像度と検出感度が低いため、遺伝的寄与の低い疾患感受性遺伝子を見落とす危険性がある。実際、数理モデルによるシミュレーション（Risch 2000）では、連鎖解析により数100家系を解析したとしても、相対危険率4以上の強い疾患感受性遺伝子をようやく検出できる程度の感度しかない。一方、相関解析では、数100人ずつの患者および健常者試料が得られれば、相対危険率が1.5程度の遺伝的寄与の弱い疾患感受性遺伝子まで検出することが可能である。したがって、遺伝的寄与の決して高くはない疾患感受性遺伝子が複数存在することにより疾患発症のリスクが高まる多因子疾患では、個々の疾患感受性遺伝子の探索法として相関解析が有効であると推察されている。相関解析では、候補遺伝子を絞って解析する候補遺伝子解析（candidate gene approach）が広く用いられてきたが、多くの要因が関与して発症する多因子

疾患では疾患感受性候補領域を特定することは困難である。そこで、多因子疾患と相関する遺伝子および遺伝子変異を同定する方法としては、全ゲノムを網羅的（ゲノムワイド）に相関解析を行うのが最も有効であると考えられてきている。

本研究課題では、遺伝マーカーとしてマイクロサテライトおよびSNPの両者を用いて、ゲノムワイドな相関解析による疾患感受性遺伝子スクリーニング系の構築を行っている。そして、これらを用いて、全ゲノム網羅的な相関解析により、NTGの疾患感受性遺伝子および疾患特異的変異の同定を目指している。その後、得られた遺伝情報をもとにNTGの迅速遺伝子診断キットおよびゲノム創薬の開発を行いたいと考えている。

B. 研究方法

1) マイクロサテライトを用いた疾患感受性遺伝子同定法の確立

全ゲノムを網羅する3万個（1個/100kbの密度）のマイクロサテライトを収集し、多型に富んだ遺伝マーカーの設定を行う。さらに本研究では、遺伝子スクリーニングのより効率化を図るため、多型マイクロサテライトマーカーのプレートセット化および複数人のゲノムDNAを混合して用いるPooled DNA法の確立を行い、マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな高速タイピング系を構築する。

2) NTG クライテリアの確立と迅速かつ品質を維持した検体収集ネットワークの構築

NTGは多因子疾患と考えられており、その発症にはさまざまな要因（遺伝要因

および環境要因) が関与していることが示唆される。本研究の目的は、遺伝要因が強く関与しているNTGのみを抽出してその疾患感受性遺伝子を同定することであり、通常のNTGの診断基準(クライテリア)よりも厳しいクライテリアを課して、より純粋な遺伝子疾患としてのNTGを選択する必要がある。本課題では、日本緑内障学会・データ解析委員会の協力を得て、より厳格なNTGのクライテリアを作成する。また、ゲノム解析の精度向上を図るため、解析に用いるゲノムDNAの高品質を確保するシステムの検討を行う。

3) ゲノムワイドなマイクロサテライト相関解析による NTG 感受性遺伝領域スクリーニング

全ゲノムを網羅する多型性豊富なマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムワイドに全染色体をスクリーニングすることにより、NTGの疾患感受性遺伝子の同定を行う。本スクリーニングでは、偽陽性を防ぐために3段階(1次~3次pooled DNA)の解析(pooled DNAスクリーニング)を行い、独立した3集団のすべてにおいて、患者群と健常群の比較で有意差を認められたマイクロサテライトマーカーのみを本病と相関する陽性マイクロサテライトマーカーとする。得られた陽性マイクロサテライトマーカーについて、pooled DNAスクリーニングに使用した全検体を用いた個別タイピング(individual DNAタイピング)による陽性の確認を行い、真の陽性マイクロサテライトマーカーを決定し、疾患感受性領域を絞り込む。

4) DNA チップによる NTG 感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

本研究では、Affymetrix社のGeneChip® map ping 500kアレイを用いて、50万以上のSNPを

ハイスループットに解析することで、全ゲノムを網羅的にスクリーニングする。実験方法はAffymetrix社のプロトコールを準拠して行い、得られた結果からSNPごとに患者群と健常群の対立遺伝子分布を統計学的に解析し、疾患と相関する遺伝子変異の決定を行う。統計解析に用いるデータベースは従来のデータベースを大規模SNPタイピングに対応するように改変し、データ登録・管理・統計解析・検索・抽出が可能な新しいSNP解析用のデータベースを構築・導入する。

(倫理面への配慮)

すべての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報(連結匿名化)の上、本研究に関与しない個人情報管理者により厳重に管理されている。

C. 研究結果

1) マイクロサテライトを用いた疾患感受性遺伝子同定法の確立

本研究では、目標以上の 34,269 個の多型マイクロサテライトマーカーの設定を完了した。その平均解像度は 83.2kb/1 マーカー(平均 83.2kb に 1 マーカーが存在)であった。また、平均ヘテロ接合率は 0.69、平均アレル数は 7.0 個と計算され、遺伝的相関解析を行うに足る、多型性に富んだマイクロサテライトマーカーをゲノム全体にわたって高密度に収集するこ

とに成功した。さらに、それら多型マイクロサテライトマーカのプレートセットの作製および Pooled DNA 法の検証・確立を行い、ゲノムワイドな遺伝的相関解析のハイスループットな高速タイピング系を構築した。

2) NTG クライテリアの確立と迅速かつ品質を維持した検体収集ネットワークの構築

当初の案を下地に、下記NTG診断基準 I～III を定めた。

I 眼圧が常に21mmHg以下で、正常外観の隅角所見を有し、少なくとも1眼に緑内障性視神経乳頭変化とそれに対応する視野変化をもつ。

II 視野評価判定はHumphrey静的視野測定にて、Anderson & Patellaの基準に準じP<5%の感度低下を示す検査点が、最周辺以外の3つ以上の隣接する検査点に存在し、かつ、うち1点がP<1%の感度低下を示す。

III 診断時50才まではいかなるstageの視野変化でもよいが、50才以上55才未満であればmean deviationが-10dBより不良なもの。

IV 除外基準:(i)緑内障様視神経乳頭変化を惹起し得る局所的・全身的な疾患を有するもの、(ii)エントリー時20歳未満ないし診断時60才以上、(iii)屈折異常が等価球面で-8Dを超えるもの。

また今回高品質なゲノムDNAを確保するシステムを確立した。条件検討の結果、ゲノムDNAの断片化がDNA抽出前の血液の保存状態、特に温度および日数に対する依存が大きいことが判明したため、各医療機関で採血した検体は、4℃の保存状態で横浜市大眼科学教室に輸送され、遅くとも1週間以内にゲノムDNAの抽出を行う検体収集システムを構築

した。この検体収集システムにより、DNAの断片化はほとんど起こらず、質の高いDNAをゲノム解析に使用することが可能になった。

3) ゲノムワイドなマイクロサテライト相関解析による NTG 感受性遺伝領域スクリーニング

患者、健常者ともに138検体を用い、22本の常染色体およびX、Yの性染色体に設定したすべてのマイクロサテライトマーカについて1次pooled DNAスクリーニングを行った。その結果、NTG患者群と健常群の相関解析で約13.5%のマイクロサテライトマーカがP値0.05未満の陽性を示した。

4) DNAチップによる NTG 感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

NTG患者146検体についてAffymetrix社GeneChip® mapping 500kアレイを用いたSNP解析を終了した。GeneChipのデータをDirect Modelアルゴリズムによって解析したところ、SNPのcall rate(解析が適切に行われたSNPの割合)はNsp Iのアレイ(24万SNP解析)で平均94.00%、Sty Iのアレイ(26万SNP解析)で平均96.13%であり、各アレイにおいてSNP call rateが94%以上、両アレイ平均で95%以上の良好な精度を示した。また、実験精度やサンプルのコンタミネーションを評価するMPAMアルゴリズムによる解析数値(MCR、MDR)も良好な値を示した。

統計学的解析に用いるデータベースは現在稼働中のデータベース管理システムに準じ、(i)Gene Chip 250k および 500k の

SNP タイピング出力ファイルをデータベース入力用ファイルとしてデータ入力できること、(ii)GTYPE で使用されている SNP ID と rs 番号・位置情報・近傍の遺伝子情報・人種別既知アレル情報 (Hapmap) との対応が管理できること、(iii)Haploview 他、各種解析ソフトの入力用テキストフォーマットを任意に指定して出力ファイルとして得られることなど、新しい機能を付加し、登録データや解析結果の検索・ソート・抽出表示が可能なデータベースファイルとしてデータ入力できること、(ii)GTYPE で使用されている SNP ID と rs 番号・位置情報・近傍の遺伝子情報・人種別既知アレル情報 (Hapmap) との対応が管理できること、(iii)Haploview 他、各種解析ソフトの入力用テキストフォーマットを任意に指定して出力ファイルとして得られることなど、新しい機能を付加し、登録データや解析結果の検索・ソート・抽出表示が可能なデータベースを現在作成中である。

D. 考察

1) マイクロサテライトを用いた疾患感受性遺伝子同定法の確立

本研究では多因子疾患のゲノムワイドな遺伝的相関解析を想定し、約3万個を目標に多型マイクロサテライトマーカーの収集・設定を行った。その結果、全染色体にわたって83 kbに1個の密度で、34,269個の多型マイクロサテライトマーカーの設定を完了し、収集した多型マイクロサテライトマーカーのプレートセット化を行った。いずれのマーカーも多型性に富んだマーカーであり、疾患の遺伝的解析のみならず、ヒトの進化研究を進める際に、有益な参考情報を与えるものと期待される。また、本研究で確立されたPooled DNA法を利用することで、より簡便かつハイスループ

ットな全ゲノム相関解析が可能となった。本研究により確立されたこの高速タイピング系を用いて、効率的に疾患感受性候補領域を100 kb以内に絞り込んだのち、その絞り込まれた領域内についてSNP解析を行うことで、迅速に疾患感受性遺伝子および疾患特異的な変異の同定を行うことができるかと期待される。

2) NTGクライテリアの確立と迅速かつ品質を維持した検体収集ネットワークの構築

NTGは多因子疾患と考えられており、その発症にはさまざまな要因が関与していることが示唆される。本研究では、遺伝的要因が強く関与しているNTGのみを抽出してその疾患感受性遺伝子を同定することを目的としており、通常のNTGの診断基準よりも数段厳しいクライテリアを課して、NTGをより純粋な単一疾患に絞り込んだ。すなわち、老化による影響を除いた早期発症、早期重症型の遺伝的要因の強いNTGのみを本研究の対象にした。本年度までに、このクライテリアを満たすNTG検体を全国から204検体収集できた。今後、診断基準を緩めることなく、検体収集ネットワークに参画されている各大学を中心に、サテライトの収集施設の増加を検討して、さらに検体数を増やしていきたい。

また、今回、全国規模で行われている検体収集の保存、輸送の条件が設定され、質の高い検体収集ネットワークが構築された。このことで高品質なDNAを解析に使用することが可能になったことに加え、各施設で抽出するために生じる労力と予算を削減することが可能となった。

3) ゲノムワイドなマイクロサテライト相関解析によるNTG感受性遺伝領域スクリーニング

全染色体を網羅するすべてのマイクロサテライトマーカーについて、NTG感受性遺伝子の1次pooled DNAスクリーニングを終了した。その結果、 P 値0.05で判定して約13.5%の陽性マイクロサテライトマーカーが得られた。この中には偽陽性のマーカーが多く含まれていると考えられる。今後、偽陽性のマーカーを除外するため、1次スクリーニングと異なる別の集団（2次、3次pooled DNA）を用い、1次スクリーニングで陽性を示したマイクロサテライトマーカーに対して2次、3次スクリーニングを行い、陽性マーカーを絞り込んでいく予定である。

4) DNAチップによるNTG感受性遺伝子の全ゲノム網羅的解析

NTG患者146検体についてAffymetrix社の高精度のDNAチップ、GeneChip® mapping 500kアレイを用いて、全ゲノムを網羅的に解析し、良好な結果が得られた。今後、更に検体数を増やしてタイピングを行っていく予定である。また、データベースが完成次第、対照群と患者群の相関解析を行い、多因子疾患と考えられるNTGの有力な疾患感受性遺伝子を同定していきたい。

E. 結論

今年度はNTG検体収集ネットワークの構築、ゲノムワイドな疾患感受性遺伝子スクリーニング系およびそのデータベースの構築を行い、多因子疾患と考えられるNTGの感受性遺伝子同定の基盤が整った。また、既に遺伝マーカーとしてマイクロサテライトおよびSNPを用いたゲノムワイドな相関解析を開始しており、それぞれ良好なデータが得られ

てきている。今後、NTG検体の収集を精力的に行うとともに、引き続き全ゲノム網羅的な解析を進め、遺伝要因が多数重なることにより発症すると考えられるNTGの疾患感受性遺伝子および疾患特異的遺伝変異を明らかにしていきたい。さらに、高齢化社会の到来とともに懸念されるNTG患者数の増加を踏まえ、本研究により得られる遺伝情報をもとにNTGの迅速遺伝子診断キットを作成しNTGの早期発見、早期治療に活用していきたい。また、最終的にはそれらの遺伝情報をもとに、NTGの分子遺伝学的発症機序を解明し、ゲノム創薬へと繋げることで、NTGの根治治療への道を開いていきたい。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1) Itoh Y, Inoko H, Kulski JK, Sasaki S, Meguro A, Takiyama N, Nishida T, Yuasa T, Ohno S, **Mizuki N**: Four-digit allele genotyping of the HLA-A and HLA-B genes in Japanese patients with Behcet's disease by a PCR-SSOP-Luminex method.

Tissue Antigens 67(5): 390-394, 2006

2) Chen X, Katoh Y, Nakamura K, Oyama N, Kaneko F, Endo Y, Fujita T, Nishida T, **Mizuki N**: Single nucleotide polymorphisms of Ficolin 2 gene in Behcet's disease. J Dermatol Sci 43(3): 201-205, 2006.

3) Yanagihori H, Oyama N, Nakamura K, **Mizuki N**, Oguma K, Kaneko F: Role of IL-12B promoter polymorphism in Adamantiades-Behcet's disease susceptibility: An involvement of Th1 immunoreactivity

against Streptococcus Sanguinis antigen. J Invest Dermatol 126(7):1534-1540, 2006. .

4) Hasumi Y, Inoko H, Ota M, Kulski JK, Nishizaki R, Mok J, Oka A, Okada E, Kumagai N, Nishida T, Ohno S, **Mizuki N**: Single nucleotide polymorphisms of transforming growth factor-induced factor gene indicates to have no association with high myopia in Japanese. Immunogenetics 58(12):947-53, 2006.

5) Matsui K, Saha S, Saitoh M, **Mizuki N**, Itoh N, Okada E, Yoshida A, Xin KQ, Nishio O, Okuda K: Isolation and identification of adenovirus from conjunctival scrapings over a two-year period (between 2001 and 2003) in Yokohama, Japan. J Med Virol 79(2): 200-205, 2006.

6) Horie Y, Takemoto Y, Miyazaki A, Namba K, Kase S, Yoshida K, **Mizuki N**, Ohno S: Tyrosinase gene family and Vogt-Koyanagi-Harada disease in Japanese patients. Mol Vis 20(12): 1601-1605, 2006.

7) Matusda A, Ebihara N, Kumagai N, Fukuda K, Ebe K, Hirano K, Sotozono C, Tei M, Hasegawa K, Shimizu M, Tamari M, Ohno S, **Mizuki N**, Ikezawa Z, Shirakawa T, Hamuro J, Kinoshita S: Functional SPNs in the promoter of the IFNGR1 gene are associated with ocular complications of atopic dermatitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 48(2): 583-589, 2007.

8) Hayashi T, Inoko H, Nishizaki R, Ohno S, **Mizuki N**. Exclusion of Transforming Growth Factor- β 1 as a Candidate Gene for Myopia I n the Japanese. Jpn J Ophthalmol. 2007 51: 96-9.

9) Teshigawara T, Hata S, Hitoi K, Watanabe Y, Ito Y, **Mizuki N**: Penetration of gatifloxacin eye drop into the aqueous humor in humans. Ocular Immunol Inflamm, in press.

11) Yatsu K, **Mizuki N**, Hirawa N, Oka A, Ito N, Yamane T, Ogawa M, Shiwa T, Tabara Y, Ohno S, Soma M, Hata A, Nakano K, Ueshima H, Ogihara T, Tomoike H, Miki T, Kimura A, Mano S, Kulski JK, Umemura S, Inoko H: High-resolution mapping for essential hypertension using microsatellite markers. Hypertension 49(3): 446-452, 2007.

12) Katsuyama Y, Ota M, **Mizuki N**, Ito A, Okada E, Ohno S, Matsunaga T, Ohmori S: MDR1 polymorphisms effect cyclosporine AUC0-4 in Behcet's disease patients. Clinical Ophthalmol in press.

13) Sasaki S, Inoko H, Ota M, Katsuyama Y, Okada E, Hasumi Y, Hayashi T¹, Inamori Y, Nishizaki R, Mok J, Oka A, Kimura T, Kulski JK, Ohno S, **Mizuki N**: A Single Nucleotide Polymorphism analysis in the LAMA1 gene in the Japanese patients with high myopia. Clinical Ophthalmol in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

マイクロサテライトを用いた疾患感受性遺伝子同定法の確立に関する研究

分担研究者 猪子英俊 東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 教授

研究要旨 ヒトゲノム塩基配列がほぼ決定されたいま、ゲノム解析の焦点は、生活習慣病をはじめとする多因子疾患の感受性遺伝子同定を中心とするゲノム多様性解析にある。患者と健常者間でのゲノム塩基配列の違い、すなわち多型を全ゲノムに渡って網羅的に調べあげれば、疾患発症に関わる遺伝子変異あるいは多型を単離できるはずである。そこで本研究では、疾患感受性遺伝子同定を効率的に推進するため、SNP（single nucleotide polymorphism: 一塩基多型）に比べ多型性に富み、連鎖不平衡を示す物理的距離が遥かに長いマイクロサテライトに注目し、ヒトゲノム全体を網羅するようにマイクロサテライトマーカーの収集・設定を行った。さらに、これらマイクロサテライトを用いた全ゲノム網羅的（ゲノムワイド）な相関解析をより効率化するために、Pooled DNA法の確立を行い、高速なタイピング系を構築した。

A. 研究目的

ヒトゲノムの全塩基配列がほぼ決定された現在では、どのようにして遺伝子の多型を検出し、疾患の感受性遺伝子や薬剤感受性関連遺伝子を同定していくかということが全世界的に注目されている。これには、約3.1Gb (3.1×10^9 bp)、すなわち約31億個の塩基対もの膨大な情報を持つ全ゲノムを対象とした遺伝的多型の検索を、系統的かつ短期間で効率良く行うシステムの構築が必要不可欠となっている。遺伝子多型の検索、すなわち遺伝性疾患の感受性遺伝子同定のための戦略としては、現段階では、欧米を中心としたSNPと我々が中心となって進めているマイクロサテライトの2手法に大別される。マイクロサテライトは連鎖不平衡を示す距離が約100kbとSNPの約3-10kbに比べて遥かに長い

ため、より効率的に疾患感受性遺伝子をスクリーニングすることが可能である。また、マイクロサテライトはSNPより遥かに多型性が豊富であり、スクリーニング効率に優れている。SNPでは多型性が少ないため、感受性遺伝子に近接していても感受性遺伝子と相関せずに見落としてしまうものもあるため、同一領域で複数のSNP設定を行う必要がある。したがって、全ゲノムをカバーするために必要なSNP数は約200-300万個 ($3.1\text{Gb} \div 3\text{Kb} \times 2-3$ 個=200-300万個)と試算されている。これに対し、マイクロサテライトでは連鎖不平衡の距離が100kbと長いため、その100分の1である、約3万個 ($3.1\text{Gb} \div 100\text{Kb} = 3.1$ 万個)について相関解析を遂行することにより、100kb前後に疾患関連領域が絞り込まれると予想される。その後、絞り込まれた100kbの候補領域についてSNP解析を高密度に行えば、迅速な疾

患感受性遺伝子の同定が可能であり、治療が困難であった多因子疾患発症の分子機構が解明されることが期待される。

そこで我々は全ゲノムを網羅する3万個（1個/100kbの密度）を目標に多型マイクロサテライトを収集し、世界に先駆けて、多型に富んだ遺伝マーカーの設定を行った。さらに本研究では、遺伝子スクリーニングのより効率化を図るため、100~200人程度のゲノムDNAを混合して用いるPooled DNA法の確立も行った。

B. 研究方法

マイクロサテライトとはゲノム上に散在する数塩基単位の反復配列のことで、その反復回数に多型性（個人差）が存在することが知られている。すなわち、患者群と対照群で各マイクロサテライトマーカーにおける対立遺伝子分布を比較することにより、疾患感受性遺伝子の存在する位置を正確にマッピングすることが可能である。マイクロサテライトは100kbにわたって連鎖不平衡を維持することが知られているため、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る。

1. マイクロサテライト抽出プログラムの構築

公共データベース（DDBJ/EMBL/GenBank 国際塩基配列データベース）よりヒトゲノムドラフト配列情報を収集し、染色体ごとに整理した。次にこの情報をデータベース化して管理および更新を自動的に行うシステムを作成した。これはヒトゲノムドラフ

ト配列の整列化データを基幹とするデータベースであり、このデータベースを利用してマイクロサテライトマーカーの抽出作業などを進めた。

登録したヒトゲノムドラフト配列情報から、マイクロサテライト配列を抽出した。抽出を行ったマイクロサテライト配列の定義として、2、3、4、5 塩基からなる短い配列を一単位とした繰り返し配列で、2 塩基については 10 回以上の繰り返し数を有するもの、3、4、5 塩基については 5 回以上の繰り返し数を有するものとした。この定義に該当するマイクロサテライト配列を選択した後、その繰り返し配列の塩基組成等に関する種々の検索が可能なデータベースを構築した。

抽出された各々のマイクロサテライトについて、PCR 増幅するためのプライマーを自動的に設計するプログラムを開発し、このデータベースに統合した。このプログラムは、設計対象とする染色体の番号やマイクロサテライトの繰り返し単位、プライマーTm 値などの、プライマー設計時の条件を指定することが可能であり、インターネットを通じたアクセスによって効率的に PCR プライマーの設計を行うことができる。プライマー設計の際、マイクロサテライトマーカーとして確実な PCR アンプリコン（amplicon）が得られるように、ヒト染色体のおよそ 40%を占める繰り返し配列を避ける必要があり、繰り返し配列を集めたデータベース「RepBase (<ftp://ncbi.nlm.nih.gov/repository/repbase/>)」を参照した。

2. マイクロサテライト多型検索

設計したプライマーセットについて、フ

フォワードプライマーは 5'末端部分を 6-FAM または HEX で蛍光標識したものを、リバープライマーは未標識のものを PCR に用いた。PCR 反応液の総量 20 μ l 中に 48ng の pooled DNA (以下参照) を使用し、酵素には AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems) を用いた。PCR 後の産物は自動シーケンサー ABI3700 にて泳動し、GeneScan ソフトウェア (Applied Biosystems) によって得られた波形パターンから多型マイクロサテライトを選別した。

多型性を検索し、疾患解析マーカーとしての有用性が考えられるマーカーの染色体上の分布を明らかにし、染色体上において多型マーカーが等間隔に配置されるようにするため、以下の 2 つの方法を用いて染色体上の物理的位置を推測した。一つ目の方法として、ヒトゲノムドラフト配列上に既知の STS マーカーを検索し、STS マーカーがもつマッピング情報を元にしてドラフト配列を染色体上に整列化した。染色体全長に対する各ドラフト配列の相対位置を算出することにより、それぞれ設計したプライマーの位置を推測した。二つ目に、設計したプライマー配列を直接、整列化ゲノム配列上に検索することによって位置の推測を行った。

3. Pooled DNA 法

本研究では全ゲノム網羅的 (ゲノムワイド) な遺伝的相関解析を想定して約 3 万個の多型マイクロサテライトマーカーの設定を行うことが目標である。しかしながら、3 万個のマーカーについて患者 100 検体、健常者 100 検体を通常通りタイピングしたと仮定すると、実に 600 万反応 (200 検体 \times 3 万マーカー) を処理しなければならない。

これはコストおよび作業効率を考慮すると全く現実的ではない。そこで我々は Pooled DNA 法を採用し、効率的にマイクロサテライトの対立遺伝子タイピングを行うための方法および条件を確立した。Pooled DNA 法は大規模な数のサンプルとマーカーに対して効率的な解析を行うための有用な手段であり、大規模な DNA サンプル数から構成される 2 つの pooled DNA 間における総対立遺伝子の相違を測定して、相関解析を行う。Pooled DNA 法では患者 100 検体と健常者 100 検体の 3 万マーカーについての解析が 6 万反応 (2 pooled DNA \times 3 万マーカー) で可能となり、タイピング効率が大幅に上昇することが見込まれる。

Pooled DNA 法における定量性の検証は日本人健常者 100 人を対象とし、末梢から 10~20ml の採血を行った。その後、血液から DNA を抽出し、Collins ら (2000) の既報に基づいて混合 DNA (pooled DNA) を調製した。すなわち、蛍光色素 PicoGreen (PicoGreen dsDNA Quantification Reagent and Kit 200-2000 assays) を利用した DNA 定量法を用いて DNA 濃度を定量し、各個人の DNA 量が均一になるように 100 サンプルを混合して pooled DNA を調製した。任意に選択した 8 遺伝子座のマイクロサテライトマーカーについて pooled DNA を用いてタイピングを行うとともに、pooled DNA に供したものと同一の 100 検体について個別にタイピングを行い、検出された各対立遺伝子の頻度を比較した。

(倫理面への配慮)

すべての血液提供者に対して研究の目的、研究の期間と方法、予測される効果及び危険性、協力しない場合であっても不利益を

受けないこと、研究への参加に同意した場合であっても、随時これを撤回できること等を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で研究に参加して戴いた。得られた個人情報には連結匿名化の上、本研究に関わらない個人情報管理者により厳重に管理されている。

C. 研究結果

1. 多型マイクロサテライトの収集

多因子疾患についてのゲノムワイドな遺伝的相関解析を想定すると、約3万個の多型マイクロサテライトマーカーを設定する必要がある。本研究では、目標以上の34,269個の多型マイクロサテライトマーカーの設定を完了した(図1)。繰り返し単位ごとのヘテロ接合率及びアレル数の分布を調べた結果を、それぞれ図2と図3に示した。両者は類似した傾向を示しており、いずれも2塩基繰り返し単位の多型マイクロサテライトマーカーの概要が他の繰り返し単位に比べ突出した多型性を示しており、3、4、5塩基繰り返しではほぼ同等の結果となっていた。その平均解像度は83.2kb/1マーカーであった。また平均のヘテロ接合率とアレル数はそれぞれ0.69と7.0個と計算され、遺伝的相関解析を行うに足る、多型性に富んだマーカーをゲノム全体にわたって高密度に収集することに成功した。

2. 多型マイクロサテライトマーカーのプレートセット化

多型検索の結果、34,269個、すなわち83kbに1個の密度の割合で全染色体にマイクロサテライトマーカーを配置することに成功した。我々は、これら多型マーカーを染色体別に並べ直し、疾患解析に向けた多型マ

ーカープレートを作製した。

3. 連鎖不平衡の検証

我々はSNPと比較して、連鎖不平衡を示す距離が遥かに長く、多型が豊富なマイクロサテライトを遺伝子マッピングの多型マーカーとして用いることを提唱している。

我々が尋常性乾癬の感受性遺伝子であるHLA-C遺伝子について行った連鎖不平衡の解析では、SNPマーカーは検査したマーカーのうちごく少数のものしか連鎖不平衡を示さず、その範囲は5~10kbと狭いものであった。一方、マイクロサテライトマーカーでは200kb程度の連鎖不平衡を示し、ゲノムワイドに連鎖不平衡を検出するにはマイクロサテライトマーカーのような多型性の高いマーカーを用いた方が明らかに効率的であることが分かった(図4)。

4. Pooled DNA法の検証

大規模な数のサンプルを対象にしたゲノムワイドな相関解析の高速化を図るため、本研究ではPooled DNA法を採用し、本法の定量性の検討を行った。任意に選択した3遺伝子座のマイクロサテライトマーカーのタイピングの結果、すべての8遺伝子座において、pooled DNAタイピングから推測された対立遺伝子頻度とpooled DNAに供した100検体についての個別タイピングの対立遺伝子頻度に有意差は認められず($P>0.05$)、非常に近似したものであった(図5)。

D. 考察

マイクロサテライトはSNPに比べ遺伝的多型性が豊富で、連鎖不平衡を示す距離も遥かに長い為、より効率的な疾患遺伝子マッピングが可能である。本研究では多因子疾患のゲノムワイドな遺伝的相関解析を

想定し、約3万個の多型マイクロサテライトマーカーの収集・設定を行った。精力的な収集の結果、全染色体にわたって83kbに1個の密度で、34,269個の多型マイクロサテライトマーカーの設定を完了し、収集した多型マイクロサテライトマーカーのプレートセット化を行った。いずれのマーカーも多型性に富んだマーカーであり、疾患の遺伝的解析のみならず、ヒトの進化研究を進める際に、有益な参考情報を与えるものと期待される。また、Pooled DNA法の検証を行い、個別タイピングと近似する結果が得られた。ただし、頻度が極端に低い対立遺伝子においては、Pooled DNA法によって検出されない場合が認められる。しかしながら、本研究の最終目的は相関解析であり、通常、頻度の高い対立遺伝子が疾患と相関を示すと期待される。したがって、極端に頻度の低い対立遺伝子の検出の有無は問題にならないと考えられ、Pooled DNA法を利用することでより簡便かつハイスループットな全ゲノム相関解析が可能となる。

全ゲノムを網羅する多型マイクロサテライトマーカーおよびPooled DNA法により確立されたこの高速タイピング系を用いて、効率的に疾患感受性候補領域を100 kb以内に絞り込んだのち、その絞り込まれた領域内についてSNP解析を行うことで、迅速に疾患感受性遺伝子および疾患特異的な変異の同定を行うことができると期待される。

E. 結論

全ゲノムを網羅する 34,269 個の多型マイクロサテライトマーカーの設定を完了した。さらに、それら多型マイクロサテライトマーカーのプレートセット化および Pooled DNA 法の検証を行い、ゲノムワイドな遺伝

的相関解析の高速なタイピング系を構築した (図 6)。この業績は世界に類を見ないのであり、今まで困難であった多因子疾患の感受性遺伝子の同定が日本を基点として推進できることとなった。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

- 1) Nakanishi K, **Inoko H**: Combination of HLA-A24, -DQA1*03, and -DR9 contributes to acute-onset and early complete {beta}-cell destruction in type 1 diabetes: longitudinal study of residual {beta}-cell function. *Diabetes* (2006) 55: 1862-1868.
- 2) Ohtsuka M, Ishii K, Kikuti YY, Warita T, Suzuki D, Sato D, Kimura M, **Inoko H**: Construction of mouse 129/Ola BAC library for the targeting experiments using E14 embryonic stem cells. *Genes Genet Syst* (2006) 81: 143-146.
- 3) Shiina T, Ota M, Shimizu S, Katsuyama Y, Hashimoto N, Takasu M, Anzai T, Kulski JK, Kikkawa E, Naruse T, Kimura N, Yanagiya K, Watanabe A, Hosomichi K, Kohara S, Iwamoto C, Umehara Y, Meyer A, Wanner V, Sano K, Macquin C, Ieko K, Tokunaga K, Gojobori T, **Inoko H**, Bahram S: Rapid Evolution of MHC Class I Genes in Primates Generates New Disease Alleles in Man Via Hitchhiking Diversity. *Genetics* (2006) 173: 1555-1570.
- 4) Renard C, Hart WE, Sehra HK, Beasley HR, Coggill PC, Howe KL, Harrow JL, Gilbert JGR, Sims S, Rogers JR, Ando A, Shigenar A, Shiina T, **Inoko H**, Chardon P, Beck S: The Genomic Sequence and Analysis of the Swine Major Histocompatibility Complex. *Genomics* (2006) 88: 96-110.

- 5) Kawashima M, Tamiya G, Oka A, Hohjo h H, Juji T, Ebisawa T, Honda Y, **Inoko H**, Tokunaga K: Genomewide association analysis of human narcolepsy and a new resistance gene. *Am J Hum Genet* (2006) 79: 252-263.
- 6) Sano K, Shiina T, Shimizu S, Anzai T, Kulski JK, **Inoko H**: Novel cytomolpus macaque MHC-DPB1 polymorphisms in three South-East Asian populations. *Tissue Antigens* (2006) 67: 297-306.
- 7) Ikewaki I, Kulski JK, **Inoko H**: Regulation of CD93 cell surface expression by protein kinase C isoenzyme. *Microbiol Immunol* (2006) 50: 93-103.
- 8) Koishi S, Yamamoto K, Matsumoto H, Koishi S, Enseki Y, Oya A, Asakura A, Aoki Y, Atsumi M, Iga T, Inomata J, **Inoko H**, Sasaki T, Nanba E, Kato N, Ishii T, Yamazaki K: Serotonin transporter gene promoter polymorphism and autism: a family-based genetic association study in Japanese population. *Brain Development* (2006) 28: 257-260.
- 9) Dunn DS, **Inoko H**, Kulski JK: The association between non-melanoma skin cancer and a young dimorphic Alu element within the major histocompatibility complex class I region. *Tissue Antigens* (2006) 68: 135-146.
- 10) Reinders J, Rozemuller EH, van der Weide P, Oka A, Slootweg PJ, **Inoko H**, Tilanus MG: Genes in the HLA region indicative for head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Immunol (Epub)* (2006).
- 11) Luo M, Kim H, Kudrna D, Sisneros NB, Lee SJ, Mueller C, Collura K, Zuccolo A, Buckingham EB, Grim SM, Yanagiya K, **Inoko H**, Shiina T, Flajnik MF, Wing RA, Ohta Y: Construction of a nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) bacterial artificial chromosome (BAC) library and a preliminary genome survey. *BMC Genomic* (2006) 7: 106.
- 12) Itoh Y, **Inoko H**, Kulski JK, Sasaki S, Meguro A, Takiyama N, Nishida T, Yuasa T, Ohno S, Mizuki N: Four-digit allele genotyping of the HLA-A and HLA-B genes in Japanese patients with Behcet's disease by a PCR-SSOP-Luminex method. *Tissue Antigens* (2006) 67: 390-394.
- 13) Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose, Nagai Y, Oka O, **Inoko H**, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T: Multiple candidate gene analysis identifies α -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* (2006) 15: 1151-1158.
- 14) Watanabe M, Nikaido M, Tsuda TT, **Inoko H**, Mindell DP, Murata K, Okada N: The rise and fall of the CR1 subfamily in the lineage leading to penguins. *Gene* (2006) 365: 57-66.

I. 知的財産権の出願・登録状況

特許申請

名称: 摂食障害の検査用マーカー遺伝子

発明者: 猪子英俊、白澤専二

出願日: 2006年7月25日

出願人: 東海大学

国内出願番号: 2006-201944

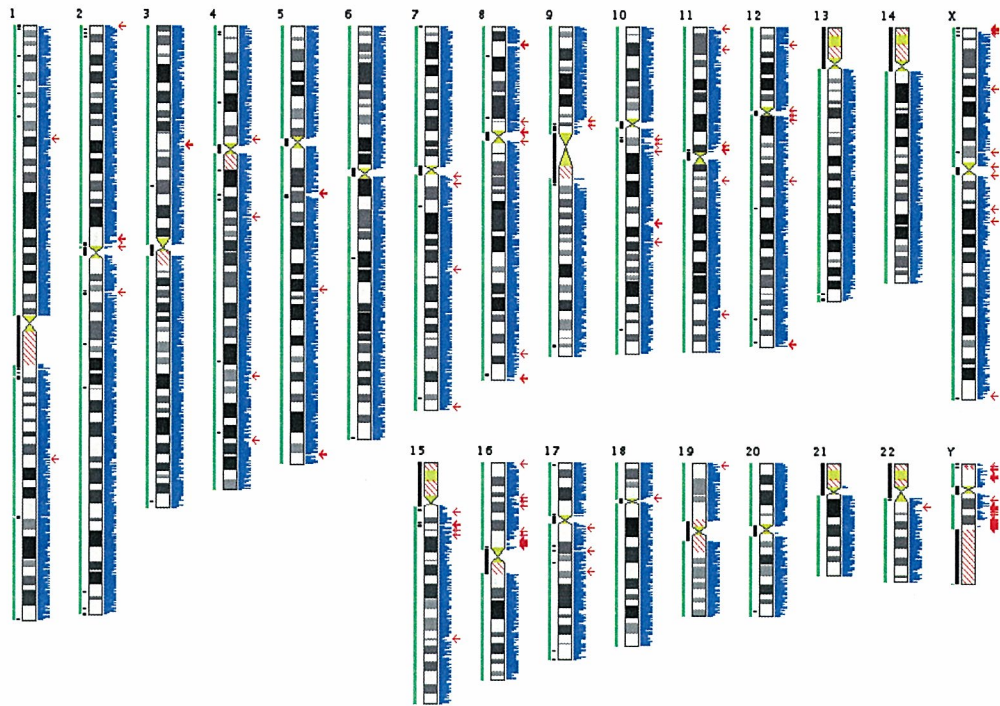


図1. 多型マイクロサテライトマーカーの分布

各染色体上に設定したマイクロサテライトマーカーを青色の横線で示す。全染色体を網羅するように、約83kbごとに34,269個のマイクロサテライトマーカーを設定した。400kb以上のマーカーギャップがあるところは赤矢印で示した。

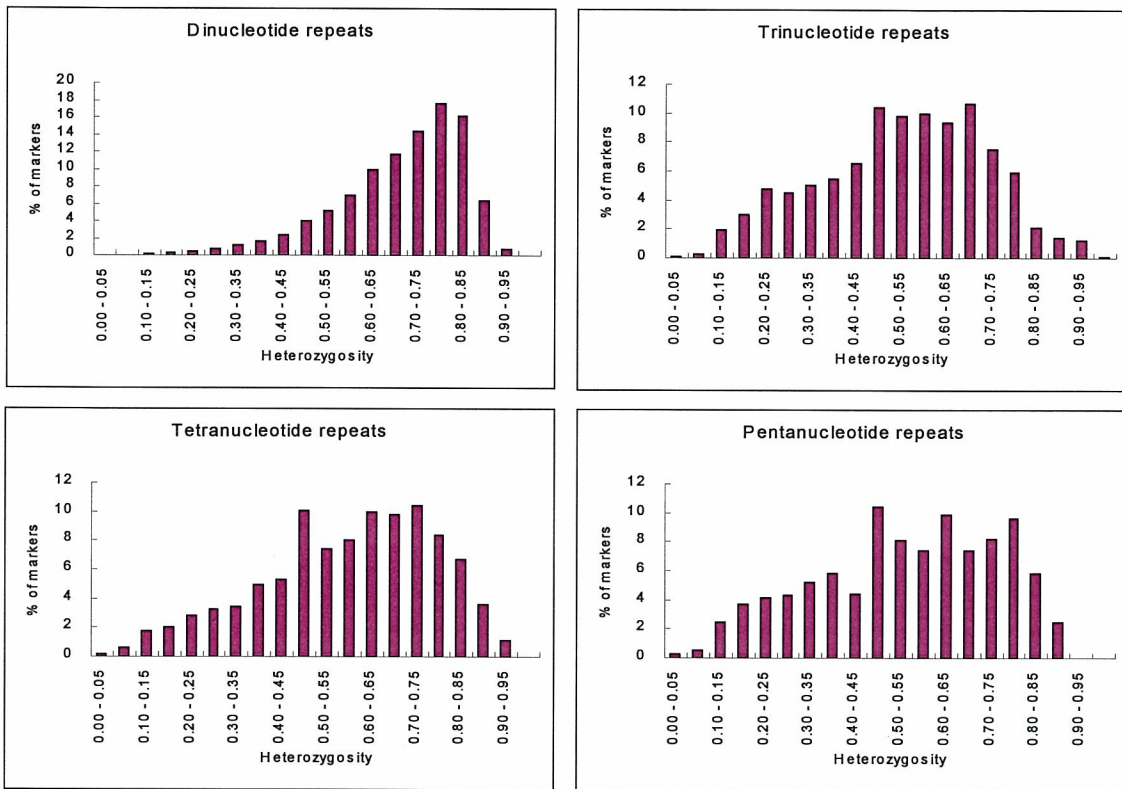


図2. 繰り返し単位ごとのヘテロ接合率の分布

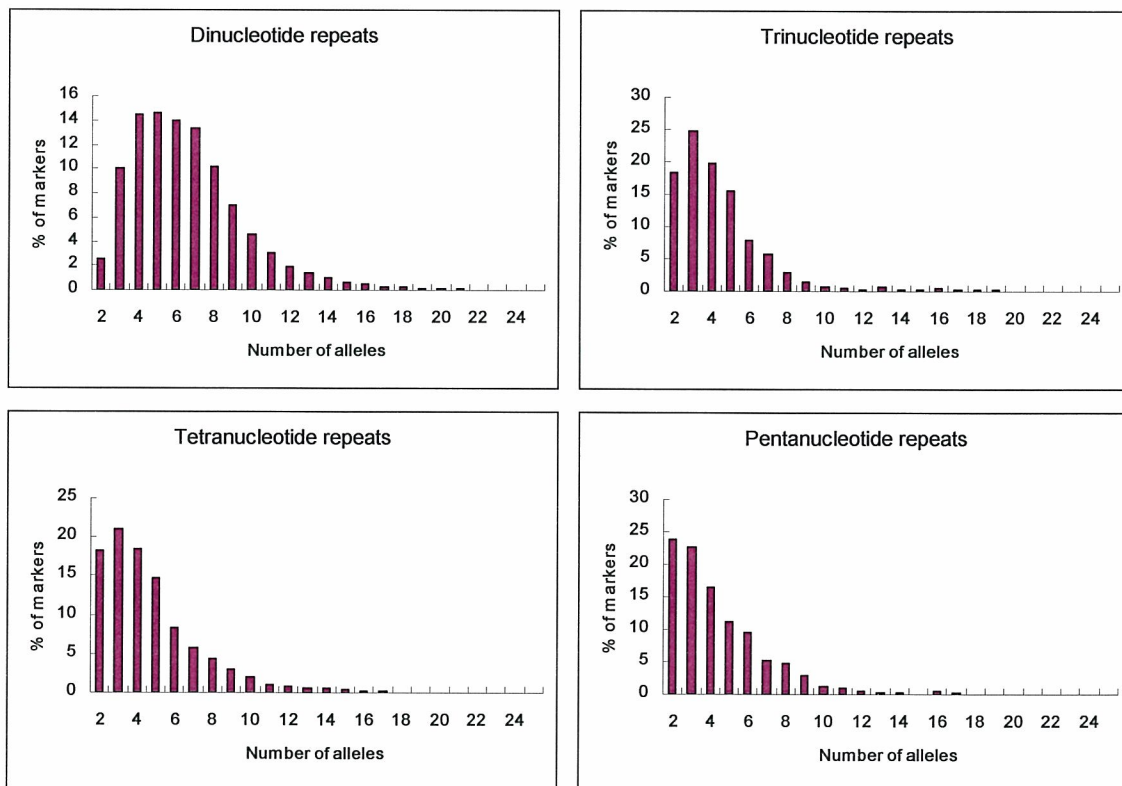


図3. 繰り返し単位ごとのアレル数の分布

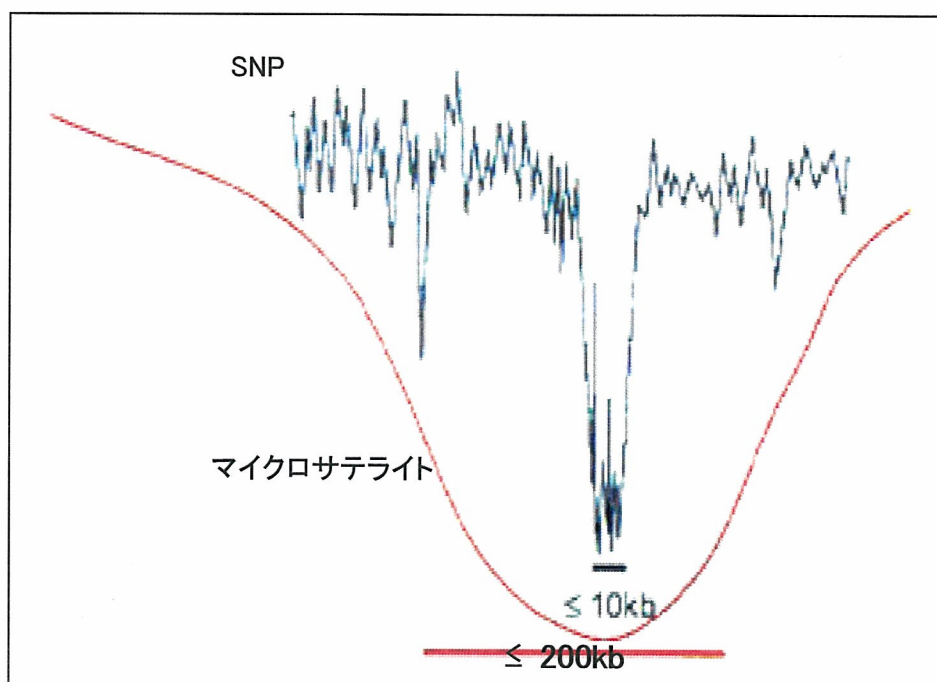


図4. マイクロサテライトとSNPの連鎖不平衡の比較

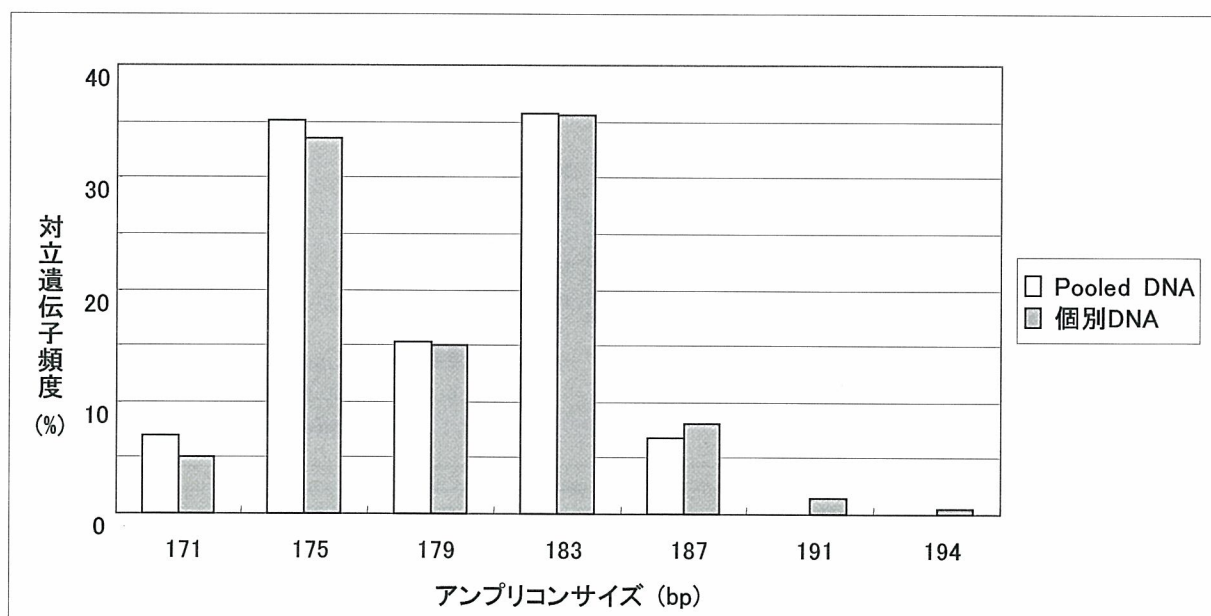
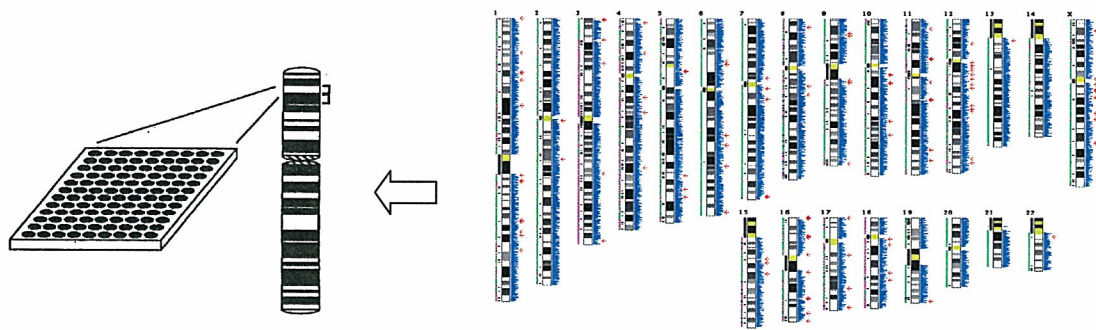


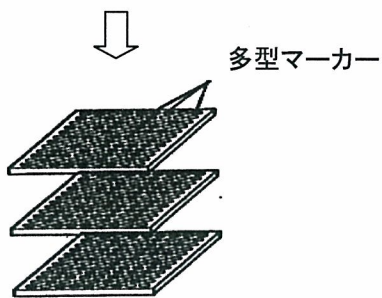
図5. 同一の100検体を用いたpooled DNAタイピングと個別タイピングによる対立遺伝子頻度の比較

縦軸はマイクロサテライトマーカー094E01における両集団の対立遺伝子頻度を、横軸はPCR産物のアンプリコンサイズを示す。両集団の対立遺伝子頻度間の統計的有意性は2x2および2xm分割で検定した場合、それぞれP値0.53と0.94であった。

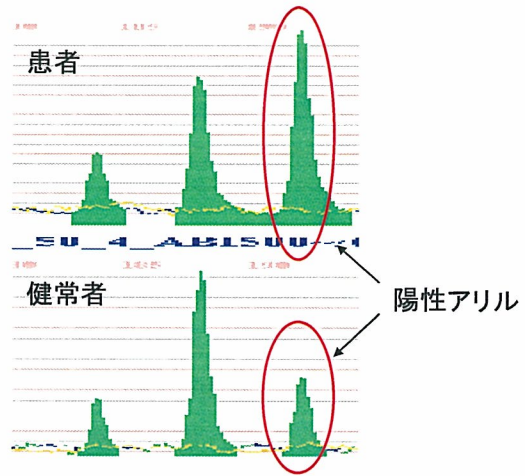


バンドごとにプレート化

多型マイクロサテライトマーカーの設定



マーカープレート約300枚



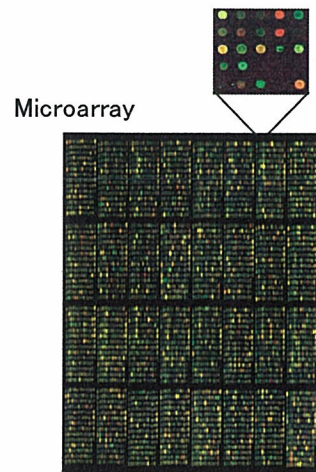
全染色体を対象としたゲノムワイドな
疾患感受性遺伝子スクリーニング
(1次、2次、3次Pooled DNAタイピング)

Pooled DNAタイピングにおける
陽性マーカー波形

Individual DNAタイピング

絞り込んだ100kb内外の領域でSNP解析

疾患感受性遺伝子、疾患特異的変異の同定



疾患の遺伝子診断キットの開発

- ・ 各SNPの相対危険率の算出
- ・ 将来かかる疾患の予測とその確立
- ・ 予め将来かかる疾患の予防策の開始

ゲノム創薬の開発

- ・ 遺伝子情報をもとに疾患に関わる蛋白(標的分子)を同定
- ・ 標的分子を手がかりに医薬品の開発

図6 マイクロサテライト多型解析の流れ

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

ゲノムワイドなマイクロサテライトによる相関解析を用いた
正常眼圧緑内障の感受性遺伝子の検索に関する研究

分担研究者 伊藤典彦 横浜市立大学医学部眼科学 助手

研究要旨 緑内障は眼圧上昇や虚血などにより視神経に傷害を来す進行性の難治性疾患である。放置すれば視野狭窄が進行し失明することのある疾患で、本邦の失明原因の第2位を占めている。緑内障は多くの危険因子(疾患感受性遺伝子)が多数重なることにより発症する多因子疾患であると考えられている。本研究では23,465個のマイクロサテライト(MS)マーカーを用いて全染色体を網羅的にスクリーニングすることにより、本邦に多い正常眼圧緑内障 (NTG: normal tension glaucoma) の疾患感受性遺伝子の同定を行う。今回、22本の常染色体およびX、Y性染色体すべてにおいて一次スクリーニングを終了し、3,125個の陽性MSマーカーが得られた。今後、二次および三次スクリーニングを行うことにより、疾患感受性遺伝子の候補領域をさらに絞り込んで行く予定である。

A. 研究目的

緑内障は視神経に傷害をきたす進行性の難治性疾患である(図1)。緑内障では一度失った視野(死んだ細胞)は回復することはできないため、その治療の基本は進行予防、進行抑制であり、早期発見、早期治療が非常に重要である。従来、緑内障は眼圧の上昇により視神経が圧迫され、視野狭窄が生じると考えられており、眼圧の上昇が緑内障診断の重要な基準となっている。しかしながら、眼圧の上昇を伴わず、視野狭窄を来たす正常眼圧緑内障 (NTG: normal tension glaucoma) も存在し、近年の緑内障疫学調査により日本人ではNTGが最も高頻度に存在することが知られている。NTGは眼圧が正常範囲にあるため、健康診断や通常的眼科の診察では見落とされることも少なくない。また、NTGは本人の自覚症状も少なく、本人が気付かないうちに視神経傷害

(視野障害) が進行していることが多いため、NTGの迅速な診断の確立が必要とされる。NTGは遺伝的危険因子(疾患感受性遺伝子)が多数重なることにより発症する多因子疾患であると考えられており、NTG感受性遺伝子を同定し、それをもとに迅速遺伝子診断キットを開発することは、NTGの早期発見しいては早期治療へとつながり、医学的価値は非常に高いといえる。

本研究では全ゲノムを網羅する多型性豊富なマイクロサテライト (MS) マーカーを用いてゲノムワイドに全染色体をスクリーニングすることにより、NTGの疾患感受性遺伝子の同定を行う。その後、同定した疾患感受性遺伝子のSNP解析によりNTG特異的遺伝変異を同定し、それらをもとにNTGの迅速遺伝子診断キットを作成する予定である。