

となる領域 (homozygous segment:HS) を自己接合性断片 (autozygous segment:AS) [6]の候補と考え、劣性遺伝疾患の責任遺伝子が AS 中に存在するとして遺伝子同定を行なう。同手法を適応するためには、患者の両親に共通先祖が存在する、すなわち患者両親が近親婚であることを家族歴から確認する必要がある[3]。しかしながら、家族歴にはしばしば誤りがあり、また数代先の縁戚関係は忘れられてしまうことも多く、家族歴での検索には限界がある。近親婚の影響は、AS として具現化されるため、感度、特異度の明確な AS 同定法を確立すれば、各個人の近親婚の影響を客観的に評価でき、家族歴に関わらず Homozygosity mapping を適応できるはずである。現在、HS のいずれを AS と判断するかは各研究者が独自の指標で行なっており[7-9] 確立された客観的な基準がない。

本研究では、全ゲノムレベルの SNP 遺伝型データを用いて施行するための、偽陽性、偽陰性量の推定可能な AS 同定アルゴリズムを作成した。そして、常染色体劣性遺伝疾患である $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症 6 症例 (近親婚家系からの症例 4 例, 近親婚のない症例 2 例) のデータを用い、homozygosity mapping の拡張としての本アルゴリズムの使用法と応用とを検討した。

B. 研究方法

染色体交叉モデル

本論文では、染色体交叉モデルとして Haldane の Poisson 過程モデル[10]を使用し、全ての計算をこのモデルに基づいて行った。このモデルは、1 cM 遺伝距離がある場合、1 回の減数分裂で 1%の確率で

その領域で交叉が起こるとする古典的なモデルである。このモデルを用いた場合、交叉間の距離は指数分布に従い、交叉の数は Poisson 分布に従う。GeneChip Human Mapping 100K Set および GeneChips Mapping 500K Array Set (Affymetrix 社) で使用されている SNP の染色体上での位置、相互の遺伝距離などのデータは、GeneChip annotation files (100Kは 6/15/2006 版, 500Kは 11/28/2007 版: Affymetrix のウェブサイトから入手) に記載されているものを使用した。このファイルに記載の各 SNP の各染色体単腕断端からの遺伝距離は、deCODE genetics 発表の、両性の平均データ[11]から補間計算したものである。

自己接合性断片 (autozygosity segment:AS) と近交係数

近親婚家系では家系図に環が存在する。この環の弧の両側を伝わって、両親の共通先祖 (父親側で m 世代前, 母親側で n 世代前) の一本の染色体由来の断片 (同祖断片: segment identical by descent, IBD) が、特定の個人でホモ接合になる (図 1)、このホモ接合部分が AS である。AS 上に劣性疾患遺伝子がある場合、疾患遺伝子はホモ接合となり遺伝疾患が発症する可能性がある。近交係数 (inbreeding coefficient) F は、個人の一对のアレルが祖先の単一の染色体に由来する確率である。よって F は、

$$F = \frac{\text{全ての AS の遺伝長の合計}}{\text{全常染色体の遺伝長の合計}}$$

で計算できる。

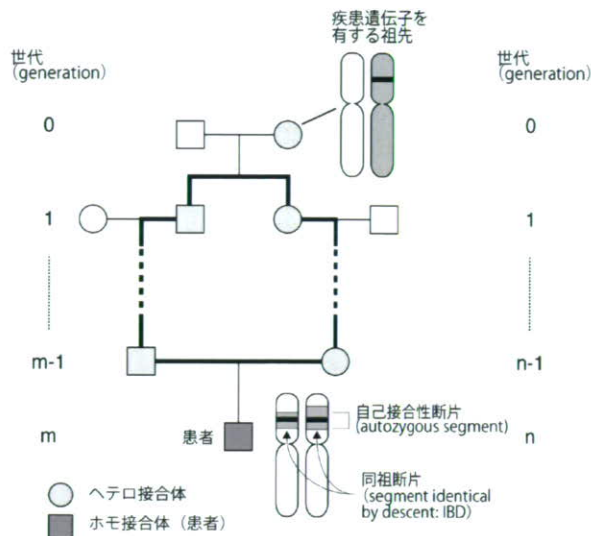


図1 近親婚と自己接合性断片 (AS)

近親婚家系で見られる家系内の環を太線で示す. 疾患遺伝子を有する祖先の単一染色体の一部がホモ接合となったものが AS である.

AS の長さ

被検者が共通先祖から父系をたどって m 代目, 母系をたどって n 代目の場合(図1), Haldane の Poisson model を用い, 染色体を無限長とすると, AS の長さは

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad \lambda = \frac{m+n}{100} (cM^{-1}). \quad (\text{式 1})$$

の指数分布に従う. 染色体長は有限なので, 実際の値は式1よりわずかに異なるが, 通常解析では AS cutoff は染色体長より十分に短いので, 式1を使用して近似する.

RHS(ホモ接合 SNP 連続領域: run of homozygous SNPs), 偽陰性, A 型偽陽性, B 型偽陽性

RHS を SNP が連続してホモ接合であり, 遺伝長が閾値(RHS cutoff)以上の長さ

の領域と定義する. AS では SNP は全てホモ接合となるため, RHS は AS を同定する手がかりとなる. ここで我々は3種の過誤を定義する(図2). 偽陰性: AS にも関わらず, RHS に含まれていないもの. A 型偽陽性: RHS で AS を含んでいないもの. B 型偽陽性: RHS と, それが包含する AS との間隙. これらの3種の過誤は, 以下のように計算できる.

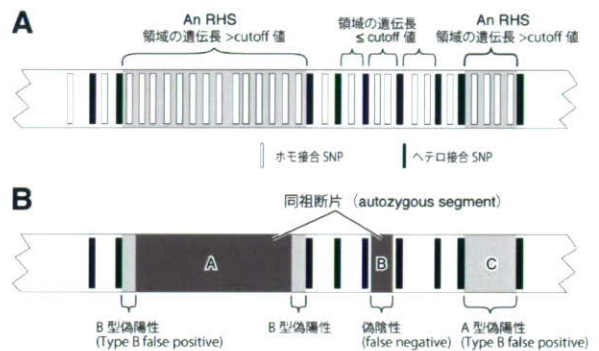


図2 偽陰性, A 型偽陽性, B 型偽陽性

(A) ホモ接合 SNP 連続領域 (RHS) の検出. RHS はカットオフ値より長い遺伝長を有する. (B) RHS と AS の関係. AS を濃い灰色で, RHS を薄い灰色で示す. 3種の過誤を定義している.

(i) 偽陰性の全 AS 長に対する割合 ($R_{\text{false negatives}}$)

式1より AS カットオフ値 c に対する $R_{\text{False negatives}}$ は

$$R_{\text{False negatives}} \approx \frac{\int_0^c x f(x) dx}{\int_0^\infty x f(x) dx},$$

$$= 1 - e^{-\lambda c} (1 + \lambda c)$$

で与えられる.

(ii) A 型偽陽性の, 全常染色体領域に対する割合 ($R_{\text{Type A false positives}}$)

N_{SNP} を型決定を行えた全 SNP 数と

し、 P_n と Q_n を n 番目の SNP のメジャーアレルとマイナーアレルの存在比率とする。メジャーアレルとマイナーアレルの平均存在比率 ($\bar{F}_{major\ allele}$) および ($\bar{F}_{minor\ allele}$) は

$$\bar{F}_{major\ allele} = \frac{\sum_{n=1}^{N_{SNP}} P_n}{N_{SNP}}, \quad \bar{F}_{minor\ allele} = \frac{\sum_{n=1}^{N_{SNP}} Q_n}{N_{SNP}},$$

そして遺伝子型が不一致な SNP の数 ($N_{heterozygous\ SNP}$) は、概算

$$N_{heterozygous\ SNP} \approx 2(\bar{F}_{major\ allele})(\bar{F}_{minor\ allele})N_{SNP},$$

となる。ヘテロ接合 SNP 間の距離は、 N_{SNP} が大きいと、ハプロタイプブロックや染色体各領域の SNP 頻度の違いの影響を受ける可能性がある。この影響は、患者と同様の遺伝背景を有する健常対照者を用い、染色体の各部分が RHS を有する頻度を用いて補正することで軽減できると考えられる (後述)。よって、ここではハプロタイプブロックの影響を考えない場合の計算を行なう。ヘテロ接合 SNP が、全染色体にランダムに分布していると仮定すると、 $L_{autosome}$ を常染色体の全遺伝長として、2つのヘテロ接合 SNP 間の距離は、確率密度関数

$$f(x) = \lambda e^{-\lambda x} \quad \lambda = \frac{N_{heterozygous\ SNP}}{L_{autosome}},$$

の指数関数に従う。よって、カットオフ値 c について、

$$R_{Type\ A\ false\ positives} = \frac{\int_c^\infty xf(x)dx}{\int_0^\infty xf(x)dx} = (1 + \lambda c)e^{-\lambda c}.$$

となる。

(iii) B 型偽陽性の、全常染色体長に対する割合 ($R_{Type\ B\ false\ positives}$)

AS を含む RHS は、両端にそれぞれ平均カットオフ値/2 の長さの B 型偽陽性を有する。AS を含む RHS と AS を含まない RHS (すなわち A 型偽陽性) を区別することは不可能である。よって、我々は全ての RHS は AS を含むとして $R_{Type\ B\ false\ positives}$ を計算した。この場合、 $R_{Type\ B\ false\ positives}$ の値は過大評価となるが、適切な RHS カットオフ値を決定するためには過大評価の方が過小評価よりも適切であると考えた。

被験者

常染色体劣性遺伝疾患である Siiyama 型 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症[12]患者、および健常対照者の DNA サンプルは、順天堂大学倫理委員会によって承認された手順に基づきインフォームドコンセントを取得した後に、被験者の末梢血を採取し、精製した。患者 1 から患者 6 は、いずれも親戚関係がない。また居住地区も日本の中で異なっている。患者 1 から患者 4 までは両親がいとこ同士の近親婚である。患者 5 と患者 6 では、家族歴から近親婚は認められなかった。GeneChip Mapping 500K Array Set を用いて解析した、互いに親戚関係にない日本人 45 名のデータは、Affymetrix 社のウェブサイトより入手した (http://www.affymetrix.com/support/downloads/data/500K_HapMap270_DM.zip)。

SNP 型の決定

$\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症患者の全ゲノムレベルの SNP 型の決定は、GeneChip Human Mapping 100K Set を使用して行った。以前の解析により confidence value 0.02 以下の測定値は信頼

性が高いと考えられたため[13], confidence value が 0.02 以下の SNP 解析データのみを使用して以後のデータ解析を行った。

一般対照群を用いた解析

RHS を共有する被験者の数を「 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症患者群」と「健常対照者群」とで比較した。ここでは x_1 を RHS を共有する「 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症患者群」被験者数, x_2 を RHS を共有する「健常対照者群」被験者数

$$\hat{p}_1^* = \frac{x_1 + 0.5}{n_1 + 1}, \quad \hat{p}_2^* = \frac{x_2 + 0.5}{n_2 + 1},$$

$$\hat{p}^* = \frac{x_1 + x_2 + 0.5}{n_1 + n_2 + 1}, \quad \text{とした場合,}$$

$$u_0 = \frac{\hat{p}_1^* - \hat{p}_2^*}{\sqrt{\hat{p}^*(1 - \hat{p}^*) \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

が標準正規分布に従うものとして P 値を計算した。P 値は,

$$P = \int_{u_0}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{x^2}{2}} dx$$

で算出した。

モンテカルロ法解析

患者より, 両親の共通先祖までの世代数 (m, n) が $m + n = 4$ から $m + n = 20$ の範囲について, 常染色体上に出現する AS の平均長と平均個数, 出現した AS の最大長の分布とそれから算出した最大長の 95% 存在区間 (片側) を, モンテカルロ法を用いた数値計算により算出した。そ

こでは, AS がいずれかの常染色体上に出現する事象が 500000 回に達するまで試行を繰り返した。モンテカルロ法に使用した疑似乱数は Mersenne Twister 法で発生させた[14]。各常染色体の遺伝長は, Affymetrix 社の annotation file に記載された値を使用した。

コンピュータプログラム

プログラムは ANSI 標準 C 言語で作成した。プログラムは GNU C compiler でコンパイルし, MacOS X (Ver. 10.5.2) を搭載した MacBookPro (CPU: 2.16 GHz Intel Core Duo, 2 GB RAM) 上で走らせた。

(倫理面への配慮)

研究は埼玉医科大学倫理委員会によって承認されたものである。DNA サンプルは, インフォームドコンセントを取得した後に使用した。

C. 研究結果

$\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症患者の解析
RHS cutoff値の設定

まず解析を開始する前に, RHS cutoff 値を 0.1 cM より 0.1 cM 刻みに変化させ, 全常染色体長に対する偽陰性, A 型偽陽性, B 型偽陽性の割合を計算した (図 3)。そして, これらの過誤の影響が最小となる RHS cutoff 値を以後の解析に使用した。

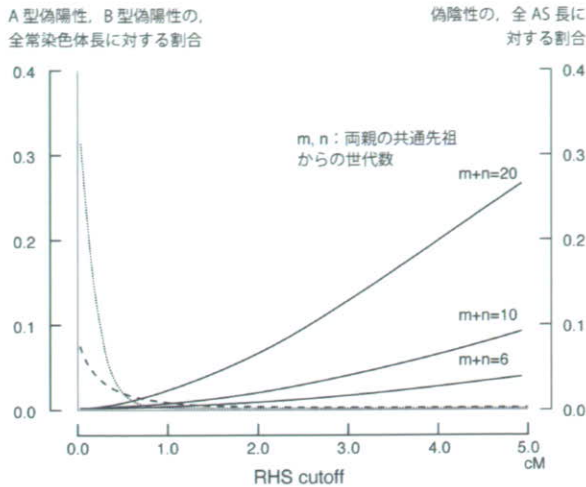


図3 偽陰性，A型偽陽性，B型偽陽性の割合

各RHS値での偽陰性，A型偽陽性，B型偽陽性

本研究では少なくとも4名の患者がいとこ婚両親の子供である ($m+n=6$)。できるだけ偽陽性を押さえながらしかも偽陰性が少なくなる値として，2 cMをRHS cutoffとした。

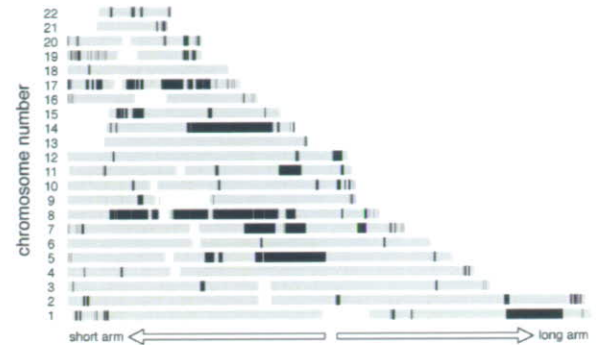
各患者のRHS，および複数の患者で共有されているRHSの計算

RHS cutoff値2.0 cMを用いて各患者のRHSを求めた(図4)。家族歴から近親婚が明らかな患者1-4(図4A-D)と近親婚が明確でない患者5-6(図4E, 4F)に分けて示してある。患者4A-Dでは長いRHSが認められ，近親婚の影響が明確である(RHSの長さとは近親婚に関しては後述)。いとこ婚両親の子供ではあるため，図4A-Dには，A型偽陽性0.000，B型偽陽性0.002，偽陰性0.007(図3参照)で，いとこ婚が原因であるASを推定した領域が示されていることになる。しかし，全ての領域がいとこ婚が原因で生じているか否かは不明である。なぜならば患者両親は，その祖父母以外にも，より昔の世代

に共通先祖を有している可能性があるからである。

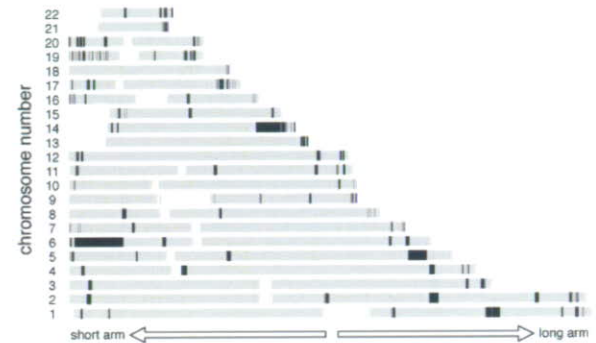
A

患者 1



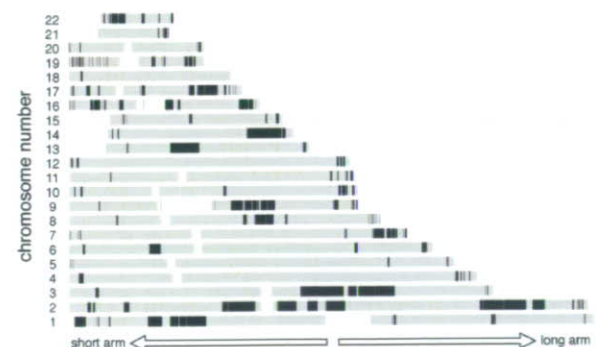
B

患者 2



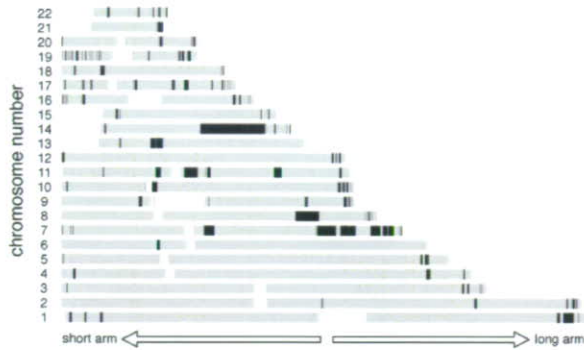
C

患者 3



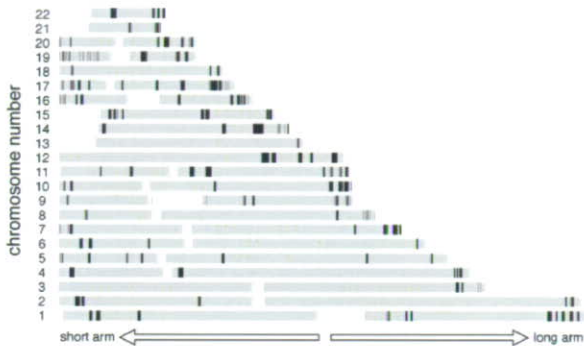
D

患者 4



E

患者 5



F

患者 6

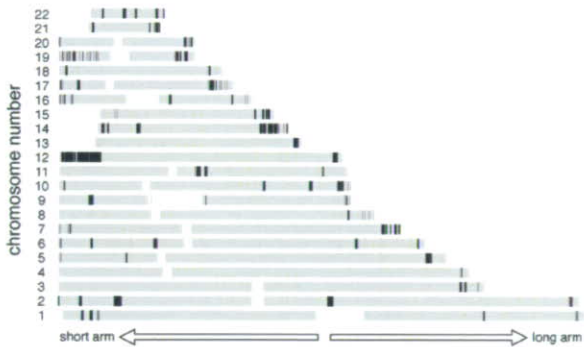


図4 AS同定

Siiyama型 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症各患者のAS. ASは黒で, 他の常染色体領域は灰色で示してある. 各図の横の番号は染色体番号である.

ASに関する計算

図4で得られたデータからさまざまな推定を行なうために, ASに関するいくつ

かの性質を検索した. 偽陰性, A型偽陽性, B型偽陽性の定義 (図2) より, 短いASはそれらの影響を受けやすいが, 長いASは受けにくいことが分かる. よって, 22対の常染色体上で最長のRHSは, 最長のASに対応している可能性が高い.

$m+n$ の値を変え, ASの最大値がどのような分布を取るかをモンテカルロ法で計算した (表1). この分布を用いれば, RHSの最大長から共通先祖までの距離 ($m+n$) を区間推定できる. また, 2名 (1対) の共通先祖由来のASが常染色体上に存在する個数の分布も計算し, 共通先祖人数の目安が得られるようにした.

$m+n$	Fの理論値	ASの平均長	ASの最大長の95%信頼区間 (片側) (cM)	全常染色体に存在するASの平均個数	全常染色体に存在するAS個数の95%信頼区間 (片側)
4	0.25	21.7	57.2 <	40.6	51 >
5	0.125	17.8	38.1 <	24.6	33 >
6	0.0625	15.1	24.2 <	14.5	21 >
7	0.0313	13.2	13.7 <	8.3	13 >
8	0.0156	11.6	6.0 <	4.7	9 >
9	0.00781	10.5	2.2 <	2.6	6 >
10	0.00391	9.4	1.1 <	1.5	4 >
11	0.00195	8.7	0.7 <	0.79	3 >
12	0.000977	8	0.6 <	0.43	2 >
13	0.000488	7.4	0.5 <	0.23	2 >
14	0.000244	6.9	0.4 <	0.12	2 >
15	0.000122	6.4	0.4 <	0.066	1 >
16	0.000061	6.1	0.4 <	0.035	1 >
17	0.000031	5.7	0.3 <	0.019	1 >
18	0.000015	5.4	0.3 <	0.0099	1 >
19	0.0000076	5.1	0.3 <	0.0052	1 >
20	0.0000038	5.1	0.2 <	0.0027	1 >

表1 各 $m+n$ 値におけるASの統計量

図4で示した6名の患者の各種計算値を表2に示す. 両親がいとこ婚の場合のFの理論値は0.625(1/16)であるが, 計算される推定値は全員がこれより高い. 患者5, 6では, 共通先祖までの世代数が不明なため, RHSの最大長を用いて, 両親の最も近い共通先祖までの世代数の片側区間推定を行なった. 95%の確率で, この両者の共通先祖は $m+n \geq 8$ (両親ははとこか, またはそれより遠い関係にある) である. 表1より, $m+n \geq 8$ ではAS数は共通先祖1

ペアあたり平均9個未満であるが、図4E-Fに見られるRHSの数はこれより遥かに多い。患者5, 6の両親にはこの複数ペアの共通先祖がいると考えられる。

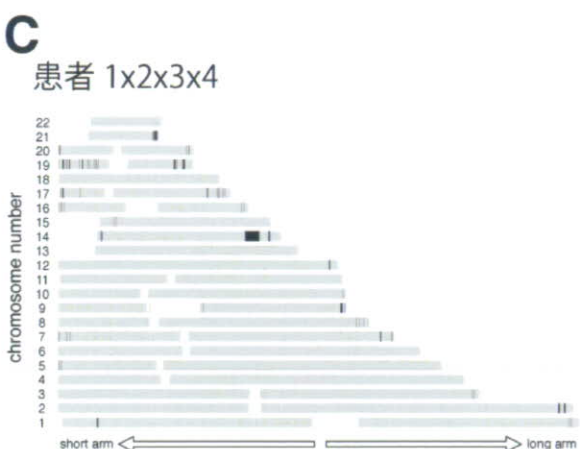
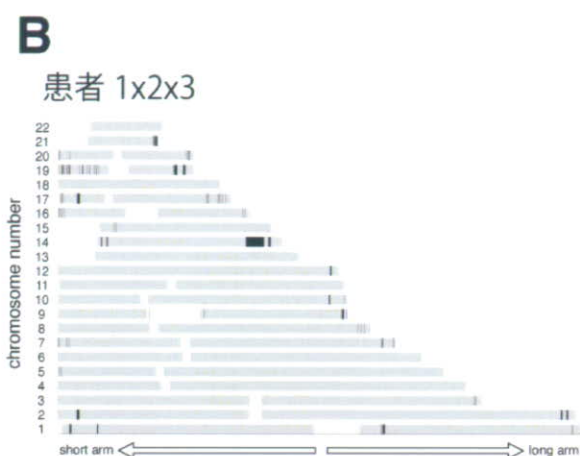
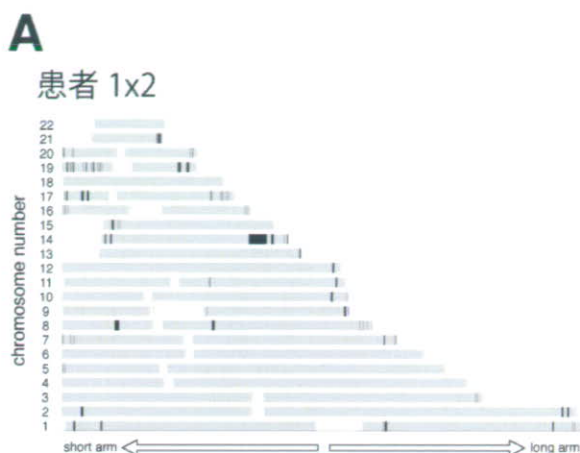
患者番号	RHSの全遺伝長	Fの推定値	各RHSの遺伝長の最大値 (cM)	患者両親の関係	m+n値の95%信頼区間
1	476.4	0.136	43.5	いとこ	
2	308.5	0.088	42.0	いとこ	
3	516.5	0.147	31.2	いとこ	
4	280.7	0.080	36.0	いとこ	
5	341.5	0.097	12.1	不明	8 ≤
6	260.2	0.074	11.3	不明	8 ≤

表2 α1アンチトリプシン患者情報

複数患者でのAS共通領域

Homozygosity mappingでは複数患者に共通のAS領域 (AS領域の積集合) に疾患遺伝子が存在すると考える。図4で得られたASを用いて、α1アンチトリプシン遺伝子の同定が行なえるか検討した。

患者1と2 (図5A) の2名だけでも、共通領域はかなり狭いものとなる。1-3 (図5B) , 患者1-4 (図5C:両親がいとこ婚の患者全て) と共通領域は徐々に減少する。患者1-6 (図5D全患者) のAS共通領域の合計は合計24.5 cM. 矢印で示した2.7 cMの領域にα1アンチトリプシン遺伝子が存在する。この領域は遺伝子重複によって生じたと思われるα1アンチトリプシン遺伝子類似遺伝子のクラスターがあり、22の遺伝子を含んでいた (表3) .



D

患者 1x2x3x4x5x6



図5 疾患遺伝子解析

複数の患者のASの積集合を示す。矢印の部分に $\alpha 1$ アンチトリプシン遺伝子が存在する。

C14orf152	Chromosome 14 open reading frame 152
ASB2	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 2
C14orf48	Chromosome 14 open reading frame 48
OTUB2	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2
DDX24	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24
FAM14B	Family with sequence similarity 14, member B
IFI27	Interferon, alpha-inducible protein 27
FAM14A	Family with sequence similarity 14, member A
KIAA1622	KIAA1622
SERPINA10	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 10
SERPINA6	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 6
SERPINA2	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 2
SERPINA1	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 1
SERPINA11	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 11
SERPINA9	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 9
SERPINA12	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 12
SERPINA4	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 4
SERPINA5	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 5
SERPINA3	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 3
LOC390503	Similar to adiponectin receptor 1
SERPINA13	Serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), member 13
GSC	Goosecoid

表3 図4D候補領域に存在する遺伝子

$\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症は、SERPINA1の変異によって起こることが分かっている。

本手法を用いての疾患遺伝子同定には、いくつかの欠点がある。(1) 図3に示したように、本手法では偽陰性は0ではなく、

わずかだが検出できないASもある。その場合、積集合を求める方法では、疾患遺伝子を含むASを除外してしまう可能性がある。(2) 図5Dに示したように、AS共通領域は他にも存在する。特にテロメア付近に数多く認められ、これらはSNP array上のSNPの位置やホモ接合頻度の不均一さが原因となっている可能性が考えられる。(3) 最終的に得られたASの共通領域(図5D)でも22の遺伝子を含んでおり、これらの遺伝子は個別に検索しなければならない。(3)は本手法ではこれ以上改善できないが、(1)、(2)の問題は、健常対象者のSNPデータを用いて軽減できる可能性がある。

コントロールを用いたAS共通領域

前記(1)の影響を軽減するため、ASの積集合の代わりに、ASの累積頻度を使用した(図6A)。この手法ならば累積頻度が最も高い領域が最も疾患遺伝子の存在する可能性が高く、また偽陰性は問題となりにくい。(2)は、健常対象者31名のSNP型データとの比較を行なうことで軽減した。染色体を、検索した全てのSNPで区切られる小領域の集団と考え、各領域に関し、患者および健常対象者がASを持つ比率を計算し、両者の差を値を用いて表した(図6B)。これによりバックグラウンドが減少した。 $\alpha 1$ アンチトリプシン遺伝子を含む領域(図5D矢印と同一)は最も値の高い領域だった。

集団の近交係数とhomozygosity mapping

$\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症の解析結果は、家族歴から近親婚が明確でないサンプルにも本手法を適応できる可能性を示している。単純なモデルとして、遺伝

子異常が疾患Aを引き起こす遺伝子aを考える。aの変異遺伝子a'がホモ接合となると浸透率pで疾患が発症する。a'の遺伝子異常頻度をm、集団構成員の平均の近交係数をFとすると、

$$\begin{aligned} & \text{近親婚が原因で疾患Aが起こる確率} \\ & = a' \text{ がAS内にある確率} \\ & = m \times F \times p \end{aligned}$$

近親婚と無関係に疾患Aが起こる確率は、

$$P(\text{by chance}) = m \times m \times p$$

であるから、両者の比は

$$P(\text{inbreeding})/P(\text{by chance}) = F/m$$

これは、目的とする疾患の集団内の遺伝子頻度よりFが大きければ、半数以上の症例でAS中にaが存在することを示している。

集団の平均近交係数を推定するには、適切なRHS cutoffで各個人のRHS長を求め、その平均を取るのが1つの方法であろう。Affymetrix社が提供している日本人45名の500k SNP解析結果を用いて、RHS長の平均を求めてみた。図2と同様に偽陰性、A型偽陽性、B型偽陽性のグラフを作成する。偽陽性を出来るだけ少なくするため、RHS cutoffを2.0 cM (A型偽陽性 0.0000, B型偽陽性 0.0000) で計算すると、RHS長/全常染色体長の平均値は0.032となる。集団内の疾患遺伝子頻度がこの値以下の疾患は、浸透率に関わらず、本法を適応してみる価値があろう。m=0.032, F=0.032の場合、患者、健常対象者各30例、患者、健常対象者各60例の解析で、aの場所にそ

れぞれ 値が4.4, 8.2のpeakが期待できる。

D. 考察

Homozygosity mappingは強力な疾患遺伝子同定手法であるが、家族歴から近親婚が明確にできる症例は限られている。近親婚の家族歴の明確でない症例にも適応を広げることができれば、その応用範囲は広いものとなる。

Homozygosity mappingでは、多型マーカーが全てホモ接合になる領域を検索する。しかし、ある領域がautozygosity segmentであるか否かの検討は、統計的手法を取る以外はない。本稿のように偽陽性、偽陰性を計算できる定義を使用すれば、客観的な判断が可能となる。高密度SNPをarray用いることで、古い近親婚の痕跡も捉えることが可能となる。

ASでは、全ての遺伝子異常がホモ接合となる。ASに劣性遺伝疾患遺伝子が存在すれば、その疾患が発症する可能性がある。よって、図3のように個人のRHSを描出し、RHS中に存在する遺伝子を列挙することにより、各個人がかかる可能性が高い劣性遺伝疾患のリストが作成できることになる。このリストは疾患遺伝子が偶然にホモ接合となる場合は考慮されていないが、個人の疾患罹患傾向を考慮する上で有用なものとなろう。

AS長を用いて計算した日本人の近交係数は0.032であった。A型偽陽性、B型偽陽性が小さくなるようにRHS cutoffを大きめに取ったが、それでもSNPのアレル頻度、染色体上の不均一が原因となって偽陽性が生じているのかもしれない。しかしながら、近交係数の計算は、家系図を用いて行なったものが多く、実際の近交係数は家系図から計算されるものよ

りかなり高いのかもしれない。近親婚が多いアラブの近交係数は同程度の高いものがある[15]。日本も近年まで近親婚は普通の結婚形態であった[16]。集団の個体数が限られている場合は必然的に近親婚が生じ、集団構成員の平均近交係数は上昇する。世代 k での集団の有効な個体数が N_k の時、近交係数を計算する漸化式[17]

$$F_k = \frac{1}{2N_k} + \left(1 - \frac{1}{2N_k}\right) F_{k-1}$$

を用いて計算すると、 N_k が 300、20 世代で近交係数は 0.03 となる。 N_k は実際の個体数よりかなり少なくなることが多いため、ほぼ 400 年、人の移動の少ない社会的背景を有した日本の歴史を考えれば、集団の近交係数は 0.03 程度になっても良いかもしれない。より多くの SNP の遺伝型測定、また、近年現実化して来ている全ゲノムシーケンスを用いれば、より正確な推定値が得られると思われる。

E. 結論

本研究で、我々は homozygosity mapping の拡張としての homozygosity fingerprinting 法を導入し、その使用方法を報告した。多くの国は、政治的、地理的に人々の動きを制限してきた歴史を有している。また、近親婚の多い地方は現在でも多数ある。特に近交係数の高い集団において、その集団で他集団より多く認められる疾患を標的にすることで、本論文で示した homozygosity fingerprinting 法は、疾患遺伝子同定の有力な方法となるとと思われる。

参考文献

- [1] Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45.
- [2] McKusick VA. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. *Am J Hum Genet*. 2007 Apr;80(4):588-604.
- [3] Lander ES, Botstein D. Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children. *Science*. 1987 Jun 19;236(4808):1567-70.
- [4] Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, et al. An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature*. 1998 Jul 23;394(6691):388-92.
- [5] Kobayashi K, Sinasac DS, Iijima M, Boright AP, Begum L, Lee JR, et al. The gene mutated in adult-onset type II citrullinaemia encodes a putative mitochondrial carrier protein. *Nat Genet*. 1999 Jun;22(2):159-63.
- [6] Clark AG. The size distribution of homozygous segments in the human genome. *Am J Hum Genet*. 1999 Dec;65(6):1489-92.
- [7] Woods CG, Valente EM, Bond J, Roberts E. A new method for autozygosity mapping using single nucleotide polymorphisms (SNPs) and EXCLUDEAR. *J Med Genet*. 2004 Aug;41(8):e101.
- [8] Lencz T, Lambert C, DeRosse P, Burdick KE, Morgan TV, Kane JM, et al. Runs of homozygosity reveal highly penetrant recessive loci in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 11;104(50):19942-7.

[9] Broman KW, Weber JL. Long homozygous chromosomal segments in reference families from the centre d'Etude du polymorphisme humain. *Am J Hum Genet.* 1999 Dec;65(6):1493-500.

[10] Haldane JBS. The combination of linkage values, and the calculation of distances between the loci of linked factors. *J Genet.* 1919;8:299-309.

[11] Kong A, Gudbjartsson DF, Sainz J, Jonsdottir GM, Gudjonsson SA, Richardsson B, et al. A high-resolution recombination map of the human genome. *Nat Genet.* 2002 Jul;31(3):241-7.

[12] Seyama K, Nukiwa T, Takabe K, Takahashi H, Miyake K, Kira S, Siiyama (serine 53 (TCC) to phenylalanine 53 (TTC)). A new alpha 1-antitrypsin-deficient variant with mutation on a predicted conserved residue of the serpin backbone. *J Biol Chem.* 1991 Jul 5;266(19):12627-32.

[13] Huqun, Izumi S, Miyazawa H, Ishii K, Uchiyama B, Ishida T, et al. Mutations in the SLC34A2 gene are associated with pulmonary alveolar microlithiasis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007 Feb 1;175(3):263-8.

[14] Matsumoto M, Nishimura T. Mersenne twister: a 623-dimensionally equidistributed uniform pseudo-random number generator. *ACM Transactions on Modeling and Computer Simulation.* 1998;8(1):3-30.

[15] Bener A, Alali KA. Consanguineous marriage in a newly developed country: the Qatari population. *J Biosoc Sci.* 2006 Mar;38(2):239-46.

[16] Imaizumi Y. A recent survey of

consanguineous marriages in Japan. *Clin Genet.* 1986 Sep;30(3):230-3.

[17] Crow JF, Kimura M. *An Introduction to Population Genetics Theory.* . New York, Evanston, London: Harper and Row Publishers 1970.

G. 研究発表

論文発表

1) Mutations in the SLC34A2 gene are associated with pulmonary alveolar microlithiasis. Huqun, Izumi S, Miyazawa H, Ishii K, Uchiyama B, Ishida T, Tanaka S, Tazawa R, Fukuyama S, Tanaka T, Nagai Y, Yokote A, Takahashi H, Fukushima T, Kobayashi K, Chiba H, Nagata M, Sakamoto S, Nakata K, Takebayashi Y, Shimizu Y, Kaneko K, Shimizu M, Kanazawa M, Abe S, Inoue Y, Takenoshita S, Yoshimura K, Kudo K, Tachibana T, Nukiwa T, Hagiwara K. *Am J Respir Crit Care Med.* 175(3):263-268, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願中

産業財産権（PCT出願）：
PCT/JP2006/313616 萩原弘一 ホモ接合指紋法による同祖領域判定方法，同祖領域判定装置，及び遺伝子スクリーニング法

厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

炎症性疾患の病態における抗菌ペプチドの関与に関する研究

分担研究者 栗原裕基 東京大学 教授
研究協力者 山口泰弘 東京大学 助教

研究要旨

- 1) マウス β -defensin-6 過剰発現マウスにおいて、筋ジストロフィーに相当する骨格筋線維の変性、再生の所見と筋力低下を認めた。
- 2) 当該マウスは、筋線維の変性に加えて、寿命の短縮、るいそう、骨密度低下など、老化の促進に相当する表現型を示した。また、尿中 8-OHdG/クレアチニン比の上昇を認め、老化促進に酸化損傷が関与していることが予想された。
- 3) 培養細胞に対するディフェンシンの急性の細胞傷害性が確認され、細胞膜透過性亢進がその主要な原因と考えられた。この細胞膜の透過性亢進は、P2 受容体拮抗薬である PPADS により阻害された。

A. 背景

高等脊椎動物には、後天的、特異的な獲得免疫機構が備えられているが、侵入する微生物に対して常に最も迅速に反応しているのは、自然免疫であると考えられる。そして、その自然免疫の中核として、高等脊椎動物にも数 kD の小さな抗菌ペプチドが存在することが明かとなった。ヒトの代表的な抗菌ペプチドとして、defensin や cathelicidin が知られている。

defensin は、他の多くの抗菌ペプチドと同様に、塩基性アミノ酸により陽性に帯電している。加えて、defensin は、特異的な 6 つのシステイン配列と 3 つの分子内ジスルフィド結合を保存している。このシステイン配列の相違から、 α -defensin と β -defensin の二つのサブファミリーに分

類されている。そのほか、サルでは 2 分子が 3 つの分子間ジスルフィド結合をつくり defensin と同じ構造をつくる環状 θ defensin が知られている。ヒト α -defensin ファミリーとしては、好中球の顆粒中に存在する human neutrophil peptide-1, 2, 3, 4 (HNP-1, 2, 3, 4) と腸管のパネス細胞に存在する human defensin-5, -6 が知られている。これらについて、細菌、真菌、ウイルスへの抗菌作用、抗ウイルス作用が報告されている。ヒトの β -defensin としては、1995 年に human β -defensin-1 (hBD-1) が、1997 年に human β -defensin-2 (hBD-2) が報告され、その後、human β -defensin-3, 4 (hBD-3, 4) が報告された。そのほか、HE2 β 1 は、精巣上体に発現する EP2 フ

ファミリーの選択的スプライシングの一つとして報告されたが、 β -defensin に特異的なシステイン配列を保つことが後に明らかとなった。さらに、我々は、2002年に精巣上体に特異的に発現する新規のヒト β -defensin である human β -defensin-5 (hBD-5)、human β -defensin-6 (hBD-6) を同定し報告した。

マウスの β -defensin としては、4つのアイソフォーム、mouse β -defensin-1, -2, -3, -4 (mBD-1, -2, -3, -4) が報告された。mBD-1、mBD-3 は、それぞれ hBD-1、hBD-2 のマウスホモログである。さらに我々は、2001年に mouse β -defensin-6 (mBD-6) を同定し、その抗菌活性を証明した。また、2002年にヒトの HE2 β 1、hBD-5、hBD-6 のマウスホモログとして、それぞれ mouse EP2e (mEP2e)、mouse β -defensin-12 (mBD-12)、mouse β -defensin-11 (mBD-11) を報告した。hBD-3 のマウスホモログとして、mBD-14 遺伝子の存在が明らかになっており、我々の以前の研究では、マウスの舌、食道に加えて、精巣上体や精巣での発現が RT-PCR で認められた。

hBD-3 は、ヒトの皮膚から単離されたが、気道系での発現も確認されている。他の β -defensin である、hBD-1、hBD-2、hBD-4 が、Na 濃度依存性に殺菌作用を示すのに対して、hBD-3 は、Na 濃度非依存性に殺菌作用を示すと報告されている。また、グラム陽性球菌に対しても強い抗菌活性を示すことも特徴である。

一方、抗菌ペプチドが、抗菌活性とともに、哺乳類細胞自身に作用し、炎症の制御因子としても機能しうることが報告されてきた。たとえば、hBD-2 は、CCR6 受容体を活性化することにより、未分化な樹状細胞やメモリーT細胞に対してケモアトラクタントとして機能することが報告されている。また同様に、mBD-2 は、toll-like receptor 4 の内因性のリガンドとして、樹状細胞の成熟を促すことが報告されている。

そのほか、defensin について、増殖の促進、サイトカイン分泌の促進、ヒスタミン分泌の促進、細胞接着の促進など様々な機能が報告されている。これらの機序については不明な点も多いが、p38 や ERK MAPK の関与の報告がされている。また、 α -defensin が P2Y6 受容体を通して IL8 の産生を促すことも報告されている。

さらに、高濃度の defensin が細胞毒性を有することも、特に α -defensin である HNP-1 について以前から知られていた。細胞膜透過性の亢進と引き続き起こる DNA 損傷が原因とされているが、その機序は、やはり不明な点が多い。

我々は、今回、 β -defensin の細胞傷害性における、P2X 受容体の関与について検討した。P2X 受容体は、ATP や ADP に反応するイオン透過性チャネルである。さらに、活性化された P2X7 受容体は、非選択的なポア形成に寄与することが知られており、P2X 受容体の細胞死への関与は、特に P2X7 受容体について指摘されている。

これまでも、他の抗菌ペプチドである cathelicidin について、cathelicidin によるインターロイキン 1 β 分泌において、P2X 受容体、特に P2X7 受容体が寄与しているとの報告がなされている。

近年、個体レベルでの抗菌ペプチドの機能の解析も進んできた。matrilysin 欠損マウスは、マウス腸管の α -defensin に相当する cryptdin の前駆体から pro segment を切断できないことが明らかとなった。このように機能的に cryptdin を欠いた matrilysin 欠損マウスは、腸管において細菌に対する易感染性を示した。また、mBD-1 欠損マウスでは、インフルエンザ桿菌の肺への感染が長びくことや、尿路の常在菌数の増加することが明らかにされた。また、過剰発現モデルとして、HD-5 を発現するトランスジェニックマウスが、サルモネラ症への抵抗性を獲得することが報告されている。

しかし、炎症反応は、対異物作用の総体であると同時に、コントロールの異常により宿主自身への傷害性を示しうる。これまでの遺伝子改変マウスの評価では、defensin の感染防御上の重要性が明らかにされてきたが、炎症反応の一翼を担う defensin 発現の異常が、同時に様々な炎症性疾患の病態生理に関わることも予想される。実際、最近の研究で、ヒトゲノム上の β -defensin 遺伝子のコピー数の増加とともに、乾癬の発症リスクが上昇することが報告された。

我々は、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、炎症性疾患や老化への関与を検討した。さらに、in vitro の実験により、defensin の細胞毒性の特性、分子機序を検討した。

B. 研究方法

1) mBD-6 過剰発現マウスの作製

我々は、食道の cDNA をテンプレートに、mBD-6 遺伝子の開始コドンの前に kozak シークエンス を連結した DNA プライマー (5'-ACCATGAAGATCCATTACCTG-3') と、mBD-6 遺伝子の 3' 端非転写領域に作製した プライマー (5'-TGTGCATATTCACGAAGAAG-3') を用いて、mBD-6 cDNA を増幅した。

得られた mBD-6 cDNA を、pCAGGS ベクターに挿入した。このベクターでは、挿入された mBD-6 遺伝子は、human cytomegalovirus immediate-early enhancer とそれに続く chicken β -actin promoter により駆動される。chicken β -actin の第一エクソンおよびイントロンに続いて、mBD-6 cDNA が位置し、mBD-6 自身のストップコドンの後、rabbit β -globin poly(A) sequence が、その下流に位置するように設計されている (図 1)。

この mBD-6 cDNA を含む pCAGGS ベクター 100 μ g を、BamH I, Dra I, Sal I, Pst I により切断し、mBD-6 cDNA を含む 2.1 kb の DNA 断片を抽出し、トランスジーンとした。

上記のトランスジーンを C57BL/6 マウスの受精卵に注入し、それを仮親マウスの卵管内に移植して出産させた。これらの操作は、熊本大学動物資源開発研究センターとの共同で行われた。

2) サザンプロット

マウスのゲノム DNA 5 μ g を Bgl II により切断し電気泳動した後、Hybond-N+ (Amersham) にトランスファーした。サザ

ンブロットのためのプローブは、mBD-6 遺伝子第二エクソンの一部からなる、250 bp の DNA フラグメントを利用した。この DNA フラグメントを、random primed DNA labeling kit (Roche) を用いて、 $[^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ によりラベルし、ExpressHyb Hybridization Solution(Clontech) を用いて、60 °C、一晩、ハイブリダイゼーションを行った。シグナルの検出には、BASS2000 (富士フィルム) を用いた。

2 系統において、次世代への遺伝が確認されたが、一方の系統 TgCAGmBD6-1 マウスは、ICR および C57BL6/J で維持し、もう一方の系統 TgCAGmBD6-2 マウスは、C57BL6/J で維持した。

4) RT-PCR

外来遺伝子の発現を確認するために、変異マウスとその同腹仔を頸椎脱臼により安楽死させた後、骨格筋を切り出し、液体室

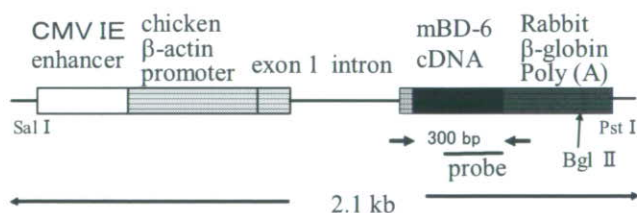


図1 トランスジーン構成。

mBD-6 を過剰発現するために、pCAGGS ベクターを利用した。矢印は、スクリーニングに使用した PCR プライマーの位置を示す。Probe は、サザンブロットに利用したプローブの位置を示す。

CMV IE enhancer;

cytemogalovirus immediate-early enhancer

素にて凍結した。これらの組織の全 RNA は、ISOGEN (Nippon gene) を用いてプロトコールに従い抽出した。抽出した 5 μg の RNA をランダムプライマーにより superscript II (Invitrogen) を用いて逆転写した。PCR のプライマーとして、mBD-6 cDNA 上にセンスプライマー (5'-ACCATGAAGATCCATTACCTG-3')、rabbit β -globin 上にアンチセンスプライマー (5'-ATTTGTGAGCCAGGGCATTG-3') を作製した。real-time PCR を、Fluorescent Quantitative Detection System Version 3.02 (LineGene) を用いて施行した。

5) 筋組織からのペプチドの抽出とウエスタンブロット

変異マウスとその同腹仔を頸椎脱臼により安楽死させた後、骨格筋を切り出し、液体室素にて凍結した。組織 100mg あたり 1ml の ISOGEN (Nippon gene) を用いて筋組織をホモジナイズした後、プロトコールに従い蛋白を抽出した。抽出した蛋白のペレットから、0.5% 酢酸水に 4 °C 下、一晩で溶出した成分を 10% アンモニア水で中和した。上記サンプルをトリシン SDS-PAGE を用いて分離し、PVDF 膜にトランスファーした。一次抗体として、mBD-6 抗血清と 4 °C、一晩反応させ、洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗ラビット IgG 抗体 (ICN) と室温にて一時間反応させ、シグナルは、ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。

6) マウス筋力の評価

マウスを、高さ 20 cm に水平に置いた直径 10 cm の円形の網にぶらさげ、下の敷いたマット上に落下するまでの時間を 2 分間測定した。同じ個体につき 2 回テストを施行し、長い方の記録を採用した。

7) マウス筋組織標本の作製

ジエチルエーテル吸入により麻酔したマウスの腹部大動脈より全血を採血した後、目的の骨格筋を切り出した。切り出した骨格筋は、水で練ったトラガカントゴムを用いて、小コルク片に固定した後、液体窒素により冷却したイソペンタン内で急速に凍結した。この組織標本から、クライオスタット内で、厚さ 10 μm の切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色 (H E 染色) は、型通りに施行した。

8) マウス骨密度の測定

マウスの大腿骨を摘出し、骨量、骨密度を pQCT 骨密度測定装置により計測した。

9) マウス尿中 8-OHdG の測定

マウスの尿を採取後、3000 回転 5 分遠心、上清の 8-OHdG 濃度を高感度 8-OHdG Check Elisa (日本老化制御研究所) を用いて測定した。尿中クレアチニンは、SRL にて測定した。尿中 8-OHdG 濃度を尿中クレアチニン濃度でわることにより補正した値を、DNA の酸化損傷の指標とした。

10) defensin 合成ペプチド

hBD-1, hBD-2, hBD-3 および HNP-1 の合成ペプチドは、ペプチド研より購入し、

0.001 % 酢酸溶液に 2 mg/ml の濃度で溶解した。

hBD-2 や mBD-3 でのシグナルペプチドの切断箇所から、mBD-6 についてもシグナルペプチドの切断箇所を推定し、C 端より 40 残基からなるペプチドをペプチド研究所にて化学合成した。同様に、mBD-14、すなわち hBD-3 のマウスホモログのシグナルペプチド切断部位を、hBD-3 から類推し、C 端より 45 残基からなるペプチドをペプチド研究所にて化学合成した。いずれも、3 つのジスルフィド結合を空気酸化の手法で合成し、合成物の逆相高速液体クロマトグラフィーにてシングルピークを確認し、最終産物を質量分析により解析した。

11) 細胞培養

ヒト肺癌由来の A549 細胞および EBC-1 細胞は、東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより購入した。細胞は、25 U/ml ペニシリン, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン (Invitrogen) および、10 % (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地にて培養した。

12) トリパンブルー染色

我々は、hBD-3 を含む 0.9 mM Ca^{2+} 、0.33 mM Mg^{2+} 含有 PBS (PBS+) 溶液中で 30 分細胞を培養した後、トリパンブルー染色を施行した。トリパンブルー染色は、培養液をトリパンブルー染色液に置換し、5 分後に、染色液を再び PBS+ 液に置換することにより、トリパンブルーを排出できない死細胞の有無を判断した。

13) TUNEL 染色

A549 細胞を、100 $\mu\text{g/ml}$ の hBD-3 とともに 10 % (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清含有 DMEM 培地下で 9 時間培養した後、in situ cell death detection kit (Roche) を用いて、プロトコールに従い TUNEL 染色を施行した。TUNEL 陽性細胞は、共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。

14) ヨウ化プロピジウム(PI) による染色

細胞膜の傷害を観察するために、defensin とともに PBS+液で 10 分間培養後、propidium iodide (PI) と Hoechst 33342 による染色を施行した。また、より長時間の defensin の効果を検討するために、10 % (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地下で、指定時間、defensin とともに培養の後、同様の染色を施行した。細胞膜の傷害を受けた死細胞の割合は、培養皿中央の 0.43mm^2 内の PI 陽性細胞を、同視野の核の総数で割ることにより判定した。

15) P2X 受容体の阻害

我々は、hBD-3 の細胞膜傷害に対する P2X 受容体拮抗薬の影響を検討した。PPADS 存在下で細胞を 2 時間培養した後、hBD-3 の効果をトリパンブルー染色や PI 染色により評価した。

また、KN-62 (10 μM) については、hBD-3 を投与する 1 時間前から投与した。Suramin (100 μM) については、hBD-3 を投与すると同時に投与した。

16) LDH活性の測定

hBD-3 を含む HEPES buffer 溶液(140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1.25mM CaCl_2 , 1mM NaH_2PO_4 , 5mM HEPES, 11 mM glucose, 0.2% bovine serum albumin, pH 7.4) 下で A549 細胞を 45 分培養した後、上清の LDH 活性を測定した。LDH 活性の測定には、LDH-Cytotoxic Test (Wako, Osaka-shi, Japan)を使用した。

17) FITC ラベル mBD-6 ペプチドの観察

FITC ラベル mBD-6 ペプチドは、ペプチド研究所にて作成した。我々は、100 μM FITC ラベル mBD-6 ペプチドを、100 μM hBD-3 ペプチドとともに 10 % (v/v) 非働化済ウシ胎仔血清を含む DMEM 培地下で A549 細胞に投与し、9 時間後の FITC ラベル mBD-6 ペプチドの分布を、共焦点蛍光顕微鏡にて観察した。

(倫理面への配慮)

実験動物であるマウスに無用な苦痛を与えないように十分に配慮した。具体的には、採血や尾の採取は、エーテル麻酔下で行った。他の実験は、頸椎脱臼による速やかな安楽死、もしくは、深麻酔下の全採血あるいは脱血による安楽死の後に行った。

C. 研究結果

1) 遺伝子改変マウスの作製

6匹のF0マウスにおいて、PCR法およびサザンブロット法により、トランスジーン挿入の確認され、2系統において、次世代への遺伝が確認された。

サザンブロット法により、一方の系統では、トランスジーンが複数含まれていることが予想され、もう一方の系統では、トランスジーンが1コピー含まれていることが予想された(図2)。ここでは、これらの遺伝子改変マウスを、順に、TgCAGmBD6-1マウス、TgCAGmBD6-2マウスと呼ぶことにする。なお、3匹のメスのF0マウスは、仔を生まず、生後3ヶ月以内に死亡した。

2) TgCAGmBD6マウスにおけるmBD-6過剰発現の解析

トランスジーン発現を、TgCAGmBD6マウスの骨格筋より抽出した全RNAを用いてRT-PCR法により確認した。トランスジーンを特異的に増幅するプライマーを用いることにより、TgCAGmBD6マウスのいずれの系統においても、トランスジーンが骨格筋に発現していることが確認された(図3)。ゲノム上のコピー数に関連して、TgCAGmBD6-1マウスでの発現は、TgCAGmBD6-2マウスの3.4倍であった。

次に、我々は、蛋白レベルでのmBD-6の発現量を確認するために、等量の骨格筋より抽出した蛋白をウエスタンブロットし、mBD-6抗血清により解析した。図4のようにTgCAGmBD6マウスにおいてのみ、

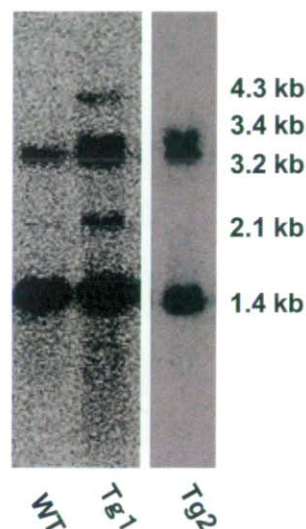


図2. トランスジーン挿入のサザンブロット

野生型(WT)では、内因性のmBD-6遺伝子による1.4kbのシグナルと偽遺伝子による3.2kbのシグナルを認めた。TgCAGmBD6-1マウス(Tg1)では、内因性のシグナルに加えて、トランスジーンが隣接して挿入されたことによると思われる2.1kbのシグナルと約4.3kbと3.4kbのシグナルを認めた。TgCAGmBD6-2マウス(Tg2)では、約3.4kbの位置にのみトランスジーンによるシグナルを認めた。

mBD-6ペプチドを検出することができ、発現の上昇が蛋白レベルで確認された。しかし、TgCAGmBD6-1マウスに比較して、TgCAGmBD6-2マウスでのシグナルは非常に弱く、mBD-6の発現は、やはりTgCAGmBD6-1マウスにて有意に高いことが示された。

3) TgCAGmBD6マウスの低体重

出生時、TgCAGmBD6-1マウスと野生型の同腹仔との間に外見上の相違は認め

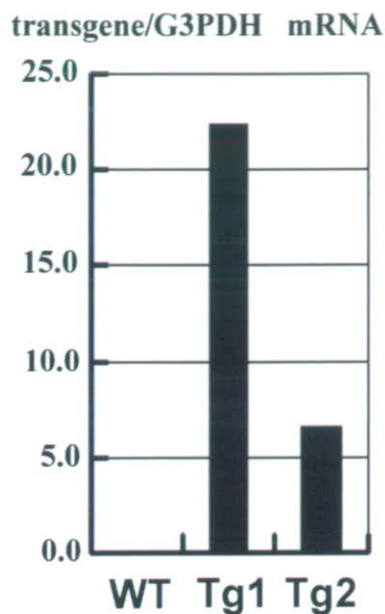


図 3. RT-PCR によるトランスジーン発現解析.

TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1)、TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) の骨格筋におけるトランスジーン発現を real-time PCR により確認した。TgCAGmBD6-1 マウスでの発現は、TgCAGmBD6-2 マウスの 3.4 倍であった。

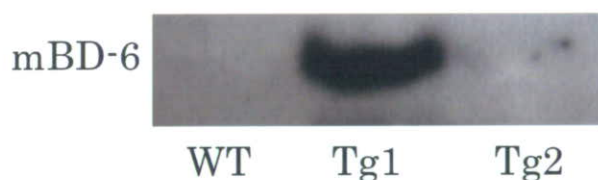


図 4. ウェスタンブロットによる mBD-6 ペプチド過剰発現の確認.

TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1)、TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) の骨格筋より抽出した蛋白中に、4 kD の mBD-6 ペプチドが検出された。しかし、TgCAGmBD6-2 マウスの mBD-6 分泌量は、TgCAGmBD6-1 マウスに比べて非常に少なかった。

られなかった (図 5A)。しかし、生後 6 週頃には、TgCAGmBD-6-1 マウスの低体重が認められるようになり、生後 8 週での平均体重は、野生型の同腹仔に比べて、有意に小さく、その約 80% であった (図 5B)。加齢に伴い、野生型では体重増加を続けるが、TgCAGmBD-6-1 マウスでは、体重増加が認められなかった。(図 5C)。

TgCAGmBD-6-2 マウスは、TgCAGmBD-6-2 マウスのような著しい低体重を示さないが、生後 6 ヶ月の TgCAGmBD-6-2 マウスの体重は野生型の同腹仔と比較して有意に小さかった ($p < 0.05$) (図 5)。

4) TgCAGmBD-6-1 マウスの摂食量

低体重に関連して、我々は、TgCAGmBD-6-1 マウスの摂食量を評価した。生後 5 週の TgCAGmBD-6-1 マウスの摂食量は、 3.31 ± 0.12 g/日であり、野生型の同腹仔の摂食量は、 4.00 ± 0.29 g/日であり、TgCAGmBD-6-1 マウスの摂食量が有意に少なかった ($p < 0.05$)。

5) TgCAGmBD6-1 マウスの寿命の短縮

C57BL6/J をバックグラウンドに維持した TgCAGmBD-6-1 マウスの寿命を記録した (図 6)。TgCAGmBD-6-1 マウスの寿命は、野生型の同腹仔と比較して有意に短く、ほぼすべてのマウスが生後一年以内に死亡した。著明な体重減少以外に、癌などの特定の死因は認められず、老衰ともいふべき状態であった。

TgCAGmBD-6-2 マウスは、1 年以上生存した。

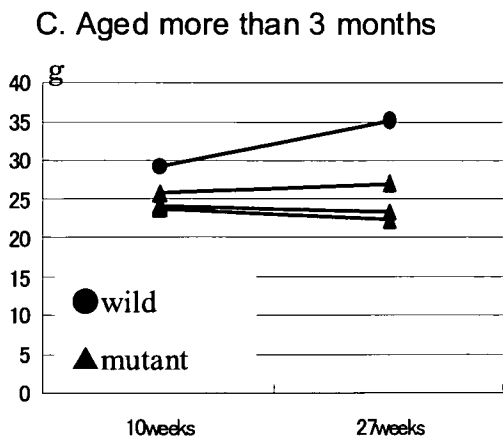
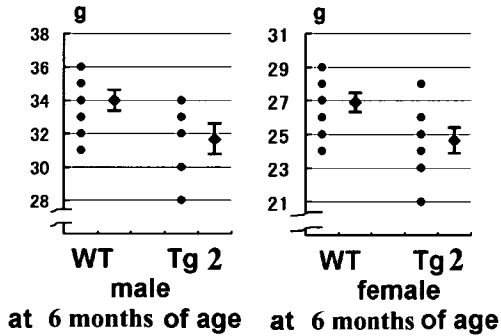
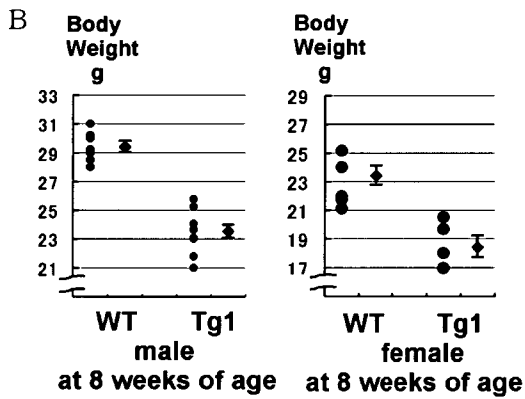
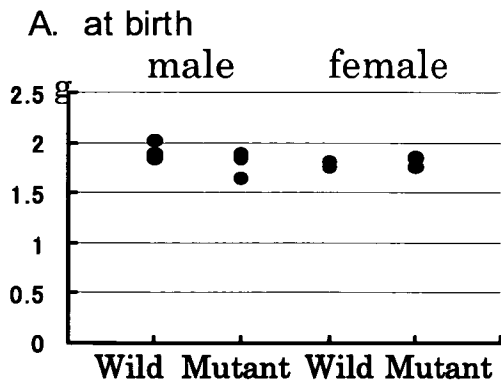


図 5. TgCAGmBD6-1 マウスの体重.

各時期の TgCAGmBD6-1 マウス (Mutant, Tg1)、TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2)の体重を野生型 (Wild, WT) と比較した。A. TgCAGmBD6-1 マウスの出生時の体重の比較。有意な差は認められなかった。B. 生後 8 週の TgCAGmBD6-1 マウスの体重を野生型同腹仔 (WT) と比較。TgCAGmBD6-1 マウス (Tg1) の体重は有意に軽い ($p < 0.01$)。生後 1 年の TgCAGmBD6-2 マウス (Tg2) の体重を野生型同腹仔 (WT) と比較。TgCAGmBD6-2 マウスの体重は有意に軽い ($p < 0.05$)。C. ●、▲は、生後 3 ヶ月以降の各個体の体重を示す。野生型では体重増加を続けるが、TgCAGmBD6-1 マウスでは、体重増加が認められなかった。

6) TgCAGmBD6-1 マウスの筋力低下

興味深いことに、生後 6 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスでは、進行性の亀背を認めた (図 7)。このような所見は、他の筋ジストロフィーマウスの多くで報告されたように、マウスにおける筋力低下の特徴的な所見である。

次に、生後 4 ヶ月の TgCAGmBD6-1 マウスを水平においた網の下にぶらさげ、落下までの時間を比較した。ほとんどの野生型の同腹仔は、120 秒以上、体を保持していたが、多くの TgCAGmBD6-1 マウスが 60 秒以内に落下し ($p < 0.01$)、その筋力低下が確認された。