

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者呼吸器疾患の発症・制御に関する遺伝子  
・蛋白系の解明と治療応用に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長瀬 隆英

平成21 (2009) 年 3月

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者呼吸器疾患の発症・制御に関与する遺伝子  
・蛋白系の解明と治療応用に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長瀬 隆英

平成21 (2009) 年 3月

## 目 次

### I. 統括研究報告書

- 高齢者呼吸器疾患の発症・制御に関与する遺伝子・蛋白系の解明と治療応用：  
慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を中心に ----- 1  
長瀬 隆英

### II. 研究分担報告

1. ホモ接合ハプロタイプ法による全ゲノム関連解析法の開発と  
それを用いたサルコイドーシス, COPD の解析 ----- 11  
萩原 弘一
2. 炎症性疾患の病態における生理活性ペプチドの関与に関する研究 ----- 22  
栗原 裕基
3. 新規リノホスファチジン酸受容体p2y<sub>5</sub>の同定と機能解析 ----- 40  
石井 聡

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 53

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 56

総括研究報告書

高齢者呼吸器疾患の発症・制御に関与する遺伝子・蛋白系の解明と治療応用：  
慢性閉塞性肺疾患（COPD）を中心に

研究代表者 長瀬隆英 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

高齢化が急速に進行しつつある現在、呼吸器疾患の社会的重要性が強く指摘されている。高齢者における COPD、ARDS、特発性間質性肺炎、嚥下性肺炎などは、炎症を主体とする病態であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患発症機序は未だに不明確であり、画期的な新治療法の開発が急務とされている。特に COPD は高齢者での罹患率が高く、急速に高齢化社会が進む今日、病態の究明と治療法の開発が緊急の課題とされている。本研究では、発生工学的手法による遺伝子改変マウスの作成と解析、siRNA の応用、ホモ接合指紋法を用いた COPD 遺伝子多型解析、など最新手法の開発・応用により、高齢者肺疾患の病態解明を進めた。その結果、以下の新知見が得られた。

- 1) 肺の発生・機能への関与が示唆されている新規転写コアクチベーター TAZ に着目し、高齢者炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索した。その結果、新規転写コアクチベーター TAZ が、高齢者肺疾患の病態に重要な役割を呈している可能性が示された。
- 2) ホモ接合指紋法という画期的な遺伝子多型解析手法が開発され、COPD 遺伝子多型解析の技術基盤が確立された（分担研究者：萩原弘一）。
- 3) 抗菌ペプチド  $\beta$ -defensin の遺伝子改変マウスの解析がなされた（分担研究者：栗原裕基）。

以上の知見は、難治性的高齢者炎症性肺疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが期待される。高齢者肺疾患に対する治療薬開発は医療福祉・経済的にも多大な貢献をなすものであり、厚生行政に寄与することが期待される。

分担研究者

萩原弘一・埼玉医科大学教授

栗原裕基・東京大学大学院医学系研究科

教授

石井 聡・東京大学大学院医学系研究科

准教授

研究協力者

大石展也・東京大学大学院医学系研究科  
講師

高井大哉・東京大学医学部附属病院講師

幸山 正・東京大学医学部附属病院特任  
講師

山口泰弘・東京大学医学部附属病院助教

山本 寛・東京大学医学部附属病院助教

鹿毛秀宣・東京大学大学院医学系研究科

三谷明久・東京大学大学院医学系研究科

## A. 研究目的

高齢化が急速に進行しつつある現在、呼吸器領域疾患の社会的重要性は急増しつつある。気管支喘息、COPDなどの患者数、死亡者数は年々増加しつつあり、増勢に歯止めがかからない状況にある。世界的にも、WHOによる予測では、2020年の死亡要因の第3位が慢性閉塞性肺疾患、第4位が下部呼吸器感染症（肺炎など）、第5位が肺癌、さらに第7位が結核と予想されるなど、呼吸器領域疾患による死亡者数の急増が予想されている。例えば米国においては、過去40年間で、虚血性心疾患や脳血管障害による死亡数が著明に減少しているのに対し、COPDによる死亡数は倍増の勢いであり、今後も増加傾向が続くと予想されている。また、米国ではCOPD治療に要する医療費は莫大であり（約3-4兆円）、大きな社会問題となっている。死亡要因、医療コストの面で、今後、本邦も米国型となることが予想され、COPDを筆頭とする呼吸器領域疾患への対応はまさに急務である。

高齢化社会が急速に進行する今日、高齢者の7人に一人がCOPDに罹患してい

ることが指摘されている。本研究の目的はCOPDなど高齢者呼吸器疾患の病態を解明し、治療への端緒を与え、これらの高齢罹患者の生活の質を改善することである。

また高齢者における重症肺感染症（特に嚥下性肺炎）、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、炎症を主体とする病態であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患発症に関しては、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられ、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8等のサイトカインなどが関与している可能性が報告されている。しかし、サイトカイン以外のメディエーターとの関連については、十分な検討がなされていない。また、治療の標的が不明確であるため、有効な治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている脂質性メディエーター、CGRPファミリー、さらに発生への関与が示唆されている転写コアクチベーターTAZに着目し、高齢者炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索してきた。また、高齢者炎症性肺疾患研究の新たなアプローチとして、人工的肺・気管支モデルの開発を試みてきた。本年度は、特に、肺の発生・機能への関与が示唆されている新規転写コアクチベーターTAZに着目し、高齢者炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索した。

### 転写コアクチベーターTAZ：

転写コアクチベーターTAZ  
(transcriptional co-activator with



PDZ-binding motif) は、14-3-3 proteinをはじめとする、PDZ domainを持つ転写因子と結合しその活性を制御する分子として同定・報告されたものである(*EMBO J* 19: 6778-91, 2000)。TAZは、WW domainを有しており、PPXYモチーフと結合することにより、転写コアクチベーターとしての機能を発現する。

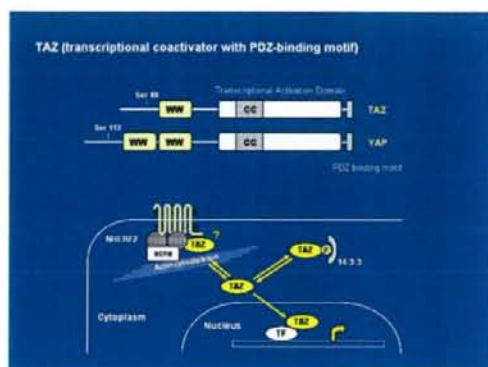


図1 転写コアクチベーターTAZは、WW domainを有し、PPXYモチーフと結合して機能を発現する。

また最新の研究により、転写コアクチベーター TAZ が、TTF-1(thyroid transcription factor-1)やPax3と協調的に働くことにより、発生に大きく関わる事が明らかにされつつある(*J Biol Chem* 279: 17384-90, 2004) (*Biochem Biophys Res Commun* 339: 533-9, 2006)。

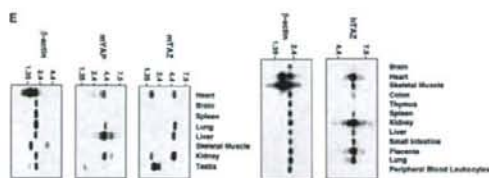
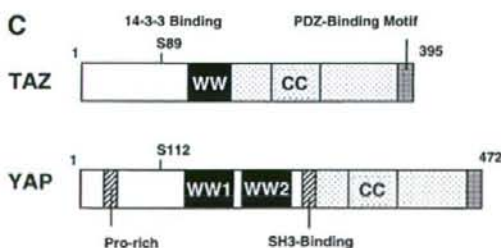


図2 転写コアクチベーターTAZは、Yes-associated protein (YAP)とホモロジーを有する。また、肺にも強く発現している (*EMBO J* 19: 6778-91, 2000)。

例えば、本研究分担者(栗原)は、神経管、神経堤、骨格筋などの発生に重要な役割を持つ Pax3 と協調的に働く因子を探す目的で、酵母 Two hybrid 法により Pax3 に結合する分子をスクリーニングした結果、TAZ タンパクを同定した。in vitro アッセイの結果、Pax3-TAZ の結合には、Pax3 C 末端側の PPXY モチーフ及び TAZ N 末端側の WW domain が深く関わっていることが示された。TAZ の発現を in situ hybridization で調べると、胎生 10.5 日マウス胚において神経管内側、鯉丘の外胚葉性間葉、体節で発現が見られており、TAZ は Pax3 などの転写因子と相互作用して形態形成に関わっている可能性が考えられる。さて、転写コアクチベーターTAZは、発見当初より、腎臓および肺において強く発現していることが報告されている。本研究では、転写コアクチベーターTAZの遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を検討する。

<本研究の意義> 脂質性メディエーター、CGRPなどの生理活性物質、ある

いは発生への関与が示唆されている転写コアクチベーターTAZなどは、呼吸器系炎症の発症・制御に寄与している可能性が高く、治療薬開発の標的として有望であることが期待される。本研究成果は、COPDをはじめとする難治性の高齢者呼吸器炎症性疾患に対する新治療薬開発の実現化に寄与することが予想される。本研究は、1)難治性炎症性疾患の病態解明、2)ゲノム創薬、を志向した独創的なものであり、高齢者炎症性肺疾患治療の戦略的開発展開を目指している。社会的重要性の高い高齢者炎症性肺疾患に対する治療薬開発は、社会医学・医療福祉・医療経済的にも莫大な貢献をなすものであり、厚生行政に寄与することが期待される。

## B. 研究方法

### 転写コアクチベーターTAZ：

#### <転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZの遺伝子改変マウスを作成し、呼吸器系における病態生理学的意義および呼吸器疾患発症への関与の可能性を探索した。まず、TAZ ノックアウトマウスの作成を行い、次にその解析に着手した。

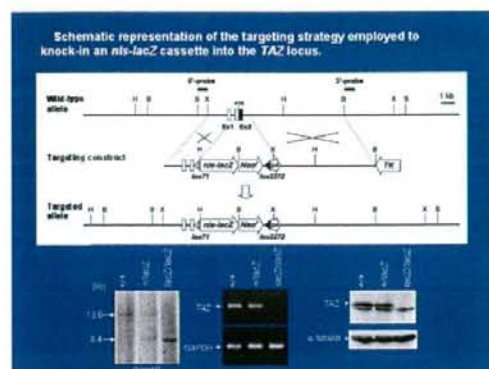


図3 TAZ ノックアウトマウスの作成

また、RT-PCR には、以下の primer を用いた。

Table 1

Gene	Primer Sequence		Size (bp)
	Forward (5'→3')	Reverse (3'→5')	
GAPDH	96AGCCAGACCCCACTACCA	GCCTTCCCATG0T0GT0AA	90
TAZ	TACAGTGTCCCCACCACTCC	CAGAGCAGACTCTACATCAATG	205
TTF-1	CCAGGACACCATGCGAACCA	GCCATGTTCTTGCTCACGT	182
SPA	ACTTACGAGATCAACATCAGATCTCTG	AGTTGACTGACTGCCATTGCT	113
SPB	9CTGTCTTCTACCTCTCT9CT	CCAGGCTTTT9CACCA9AAT	95
SPC	CCACTG9CATGTTGTGTATG	GTA9GTTCTG9A9CTG9CTTA	89
SPD	AT9GAC99AATG9GAG9A9A	TCTCTTTG9G9TCCAACTG9G	115
CCSP	AAGCTTCCAACTCTACCATG	AT9TCC9A9A9GCT9A9CTG	85
BMP4	9AGCCACACTGT9A9A9GT	TGCT9CT9A9G9TT9A9A9G9	102
FR1	AGCTGT9CTCTGT9GTTCT	TTCTGT9T9CT9A9GCTT9G9G	93
PDGF-A	AGTCAGATCCACAGCATCC9	CTC999CAGCAT99TTA9A9G	123
PDGFR-α	CC99AT99TACACTT9CTAC	CCCTTCTCCAG9A9ACTA9G	144
α1-AT	TTTG9A9ATC9A9G9A9G9C	9TTC9A9ATC9A9A9G9CT	189
MMP2	CACCAT99CCATCATCA9G	TCCTT9999C9A9CCAT9A9A	100
MMP9	9T9GTCTCCCA9A9ACTT	9CTTCTCTCCCATCATCT99G	112
MMP12	9CT9CTCCCAT9A9T9AC9A	9CCCA9TT9CTTCTA99CCCA	193
MT1	CTA99CT9CACCA9ACTTTC	TCTT9CA99A999999CACTT9	170
MT2	AT99ATCT9CTCT9CT9CT	99A99CCTT9T9CA9A9T9C	134
Tim4S11	AC9ACTCT9C9CC9T9T9G9G	9CA9CAACCA9CA9CA9TCT	149
F999	9CA9T9CA9A9A999CTT9G	CC9CACTT9999T99A9CA9A	120
CT9F	CTTCTCT9G9ATTC999CTC	CTTT99A999999999999CT	117

### (倫理面への配慮)

本研究で行う予定の遺伝子組換え実験は、平成16年9月10日の東京大学医学部組換えDNA実験安全委員会において承認を受けた生化学分子生物学・細胞情報学講座「脂質メディエーター受容体、

合成酵素遺伝子欠損マウスならびにタンパク質過剰発現細胞を用いた脂質メディエーター機能の解明、セマフォリン遺伝子欠損マウスを用いた嗅覚系神経回路形成機構の解明」、および呼吸器内科学講座「テトラサイクリン誘導性 siRNA ベクターを用いた DNA メチルトランスフェラーゼの抑制及びメチル化の変化に関する解析」に含まれており、適切な拡散防止措置がとられた。

動物実験に際しては、東京大学医学部動物実験施設内規に則して、動物愛護への配慮を最大限に行った。

## C. 研究結果

### 転写コアクチベーターTAZ :

#### <転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成と解析>

転写コアクチベーターTAZ ノックアウトマウスの作成に着手した。キメラマウスの中で、germ line にノックアウトDNAコンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体 TAZ ノックアウトマウスが得られた。なお外表所見上では重大な奇形を生じていないが、9ヶ月令 TAZ ノックアウトマウス個体の肺の組織標本において、肺胞の異常が示された。

また呼吸生理学的にも、TAZ ノックアウトマウスでは、PV カーブにおいて典型的な「肺気腫」型の所見 (PV カーブの上方移動、コンプライアンス増加) を認めた。

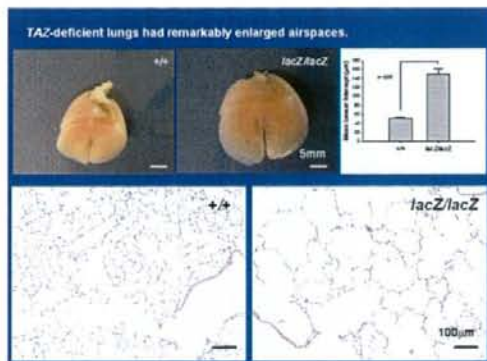


図4 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見

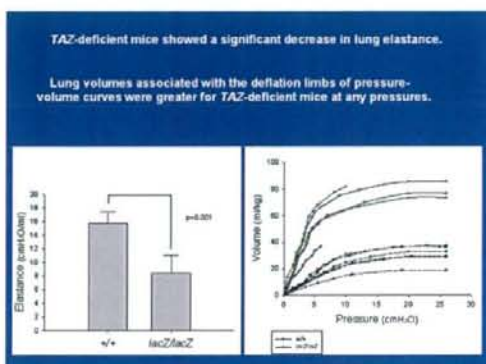


図5 野生型マウスと、TAZ ノックアウトマウスの肺生理学的解析

次に、胎生期から成体までの、野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見を検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスの肺は、胎生期においては、ほぼ正常の発育であるが、生後 5 日以降には気腔の拡張が認められ、その後、気腔の拡張が増大していた。



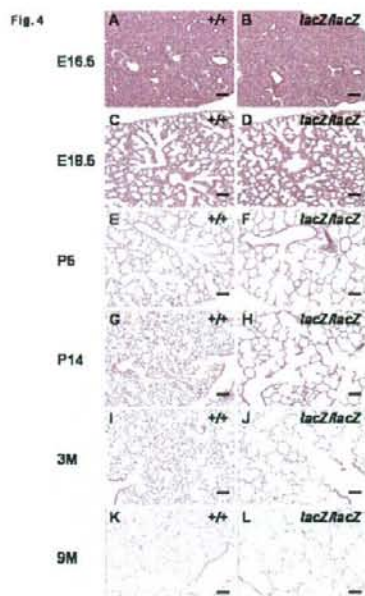


図6 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺組織所見 (胎生期から成体まで)

### <TAZ ノックアウトマウス肺における遺伝子発現の解析>

胎生期から成体までの、野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、肺の発達・成長に必須とされる TTF-1 の発現が、TAZ ノックアウトマウスにおいても野生型と変わらないことが示された。

一方、2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では、MMP 12 (macrophage elastase) が著明に発現していることが明らかになった。

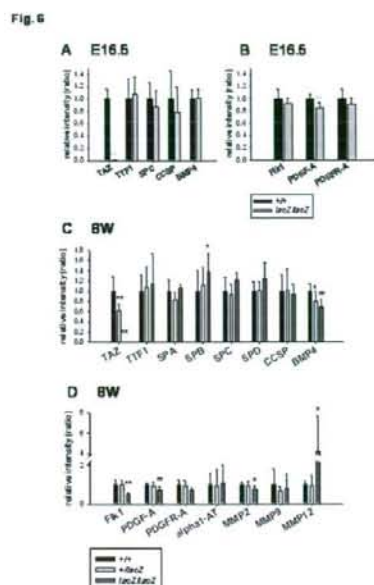


図7 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現

次に、胎生期の野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現を microarray 解析を用いて検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスにおいて発現低下が認められた遺伝子を5つ選び、さらに real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、2ヶ月令の TAZ ノックアウトマウスの肺では、Fln5 と CTGF の発現が有意に低下していることが明らかになった。

Fig. 7

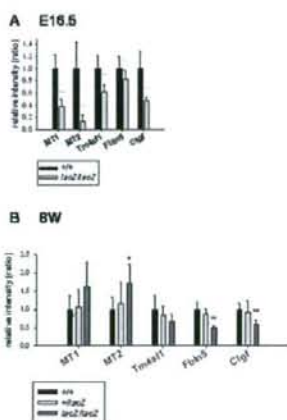


図8 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における各種遺伝子発現

<TAZ siRNA を用いた検討:培養細胞における遺伝子発現の解析>

次に、培養細胞 LA4 および TAZ siRNA (TAZ-994)を用いて、TAZ ノックアウト細胞における各種遺伝子発現を real time RT-PCR を用いて検討した。その結果、TAZ ノックアウト細胞では、CTGF の発現が有意に低下していることが明らかになった。

Fig. 8

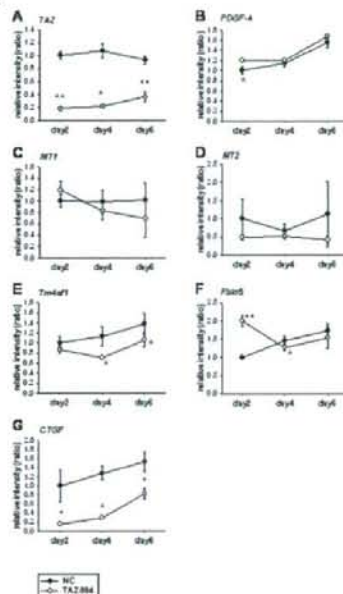


図9 TAZ siRNA (TAZ-994)による TAZ ノックアウト細胞における各種遺伝子発現

<TAZ ノックアウトマウス肺における CTGF 発現の解析>

胎生期の、野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における CTGF の発現を免疫組織染色を用いて検討した。その結果、TAZ ノックアウトマウスの肺では、CTGF の発現が低下していることが明らかになった。

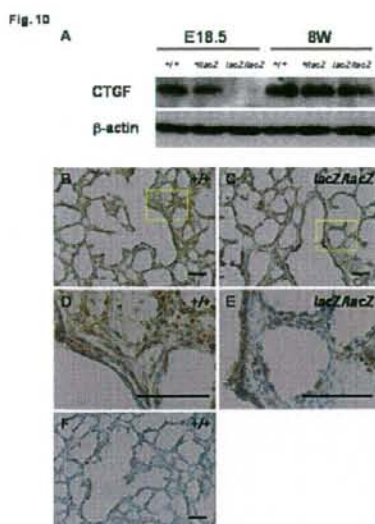


図10 野生型マウスと TAZ ノックアウトマウスの肺における CTGF の発現 (免疫組織染色)

#### D. 考察

##### 転写コアクチベーターTAZ :

TAZ ノックアウトマウスを用いることにより、転写コアクチベーターTAZ の呼吸器系における病態生理学的意義の検討が可能となった。転写コアクチベーターTAZ は、肺の発生・成長に重要な役割を担う可能性が高い。また、TAZ ノックアウトマウスが画期的な新規 COPD 動物モデルとなる可能性があり、生理学的、生化学的、分子生物学的検討を進めることが必要であろう。転写コアクチベーターTAZ は、特に COPD をはじめとした呼吸器系炎症性疾患発症に対して、防御的な役割を担うことが推察される。そのため、エラストーゼ気管内投与あるいは喫煙負荷 (COPD モデル)、プレオマイシン

気管内投与 (間質性肺炎) などの動物モデルに投与し、TAZ 遺伝子発現と炎症性肺疾患の関係について評価・検討を加えることが今後の課題である。

TAZ ノックアウトマウスからの知見により、COPD や間質性肺炎などに対する全く新しい治療薬が実用化されることも期待される。

##### <本研究成果の重要性>

高齢者における炎症性肺疾患は、社会的に極めて重大な疾患となっている。特に、COPD、ARDS、特発性間質性肺炎は、難治性において他に類をみない程、重篤な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。肺炎や気管支喘息は、世界的にも発症頻度、死亡率が増大しつつあり、画期的な治療薬の開発が期待されている。これら炎症性呼吸器疾患の発症分子機構は、極めて複雑であり、より一層の研究が必要である。

COPD は、高齢者における重要な炎症性呼吸器疾患であり、その発症には喫煙など外的刺激物質の関与が想定されている。しかしながら、COPD の発症機序については未解明の部分が多く、その解明には関連遺伝子の探索を含めた研究が必須と考えられる。一方、近年、遺伝子改変マウスが次々と開発されており、疾患関連遺伝子の解明に有用であることが報告されている。

今日まで、COPD の病態を理解するためには呼吸生理学的アプローチが必須であり、その成果は GOLD ガイドラインの作成という形で結実している。一方、まさしく GOLD ガイドラインにあるように、COPD 発症分子機構の解明のためには、多様な学問領域を結集・統合したア



アプローチを必要とするであろう。例えば米国では、2005年より COPD が NIH 特別研究推進テーマに採択されたが、まず当面の目標として COPD 動物モデルの作成・解析が主研究テーマと位置付けられているのが現状である。

本研究では、COPD モデルの構築・解析および COPD 発症分子機構の解明を目指し、呼吸器内科学と分子生物学の世界最先端の技術を融合した研究アプローチを提示する。

本研究の成果により、脂質性メディエーター、CGRP ファミリー、転写コアクチベーター TAZ、defensin、などをはじめとして、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いと思われる。発生工学的手法や siRNA を用いたアプローチは、難治性炎症性疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供する独創的なものであり、本研究の成果は炎症性肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。また発生工学的技術を用いた研究は、薬剤開発のプロセスを短縮し、実用化に大きく寄与することが予想される。高齢者における COPD、重症肺炎、ARDS、特発性間質性肺炎、難治性気管支喘息に対する治療薬の開発は、社会医学的にも医療福祉・医療経済的にも莫大な貢献をなすことが期待される。

## E. 結論

発生への関与が示唆されている転写コアクチベーター TAZ に着目し、高齢者炎症性肺疾患発症との関連を発生工学的手法を駆使して探索した。その結果、転写コアクチベーター TAZ が、高齢者肺疾患

の病態に重要な役割を呈していることが示された。

以上の知見は、難治性の高齢者呼吸器系炎症性疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nakajima T, Jo T, Meguro K, Oonuma H, Ma J, Kubota N, Imuta H, Takano H, Iida H, Nagase T, Nagata T. Effect of dexamethasone on voltage-gated Na<sup>+</sup>-channel in cultured human bronchial smooth muscle cells. *Life Sci.* 82:1210-1215, 2008.
- 2) Kawakami M, Matsuo Y, Yoshiura K, Nagase T, Yamashita N. Sequential and quantitative analysis of a murine model of elastase-induced emphysema. *Biol Pharm Bull* 31: 1434-1438, 2008.
- 3) Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, Mitani A, Nagase T, Yatomi Y, Aburatani H, Nakagawa O, Cobo-Stark P, Igarashi P, Murakami M, Tominaga J, Sato T, Asano T, Kurihara Y, Kurihara H. Multiple renal cysts with concentration defects and pulmonary emphysema in mice lacking TAZ. *Am J Physiol* 294: F542-53, 2008.
- 4) Kage H, Kohyama T, Kitagawa H, Takai D, Kanda Y, Ohishi N, Nagase T. Non-Infectious Bronchiolitis as an Early Pulmonary Complication of Hematopoietic Stem Cell



- Transplantation. *Internal Medicine* 47: 61-64, 2008.
- 5) Kohyama T, Yamauchi Y, Takizawa H, Itakura S, Kamitani S, Kato J, Nagase T. Clarithromycin inhibits fibroblast migration. *Respir Med.* 2008 ; in press
- 6) Kihara Y, Yanagida K, Masago K, Kita Y, Hishikawa D, Shindou H, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor production in the spinal cord of experimental allergic encephalomyelitis mice via the group IVA cytosolic PLA2-LysoPAFAT axis. *J Immunol* 181; 5008-5014, 2008.
- 7) Hikiji H, Takato T, Shimizu T, Ishii S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. *Prog Lipid Res* 47; 107-126, 2008.
- 8) Kikuchi K, Kohyama T, Yamauchi Y, Kato J, Takami K, Desaki M, Okazaki H, Nagase T, Rennard SI, Takizawa H C reactive protein modulates human lung fibroblast migration. *Experimental Lung Research* 35; 48-58, 2009.
- 9) Nakajima T, Kubota N, Tsutsumi T, Oguri A, Imuta H, Jo T, Oonuma H, Soma M, Meguro K, Takano H, Nagase T, Nagata T. Eicosapentaenoic acid inhibits voltage-gated sodium channels and invasiveness in prostate cancer cells. *Br J Pharmacol* 2009 in press
- 10) Kikuchi Y, Tateda K, Fuse ET, Matsumoto T, Gotoh N, Fukushima J, Takizawa H, Nagase T, Standiford TJ, Yamaguchi K. Hyperoxia exaggerates bacterial dissemination and lethality in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Pulm Pharmacol Ther* 2009 in press
- 2.学会発表
- 1). 慢性閉塞性肺疾患 :第 50 回日本老年医学  
会総会 (発表者:長瀬隆英、教育企画), 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(出願準備中 1件)  
発明者:栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘  
発明の名称:筋ジストロフィー症の病態モデル哺乳  
動物、及びその製造方法

分担研究報告書

ホモ接合ハプロタイプ法による全ゲノム関連解析法の開発と  
それを用いたサルコイドーシス, COPD の解析

研究分担者 埼玉医科大学呼吸器内科教授 萩原弘一

研究要旨

- 1) ホモ接合ハプロタイプ法を用いて全ゲノム関連解析を行う新たな手法を確立した
- 2) この手法を用いて、旭川地方のサルコイドーシスの解析、埼玉県中央部のCOPDの解析を施行中である。
- 3) ホモ接合ハプロタイプ法を用いた全ゲノム関連解析は、現在解析手法に乏しい「良く見るが集団内の頻度が1%以下」という、教科書に載っていない
- 4) るようなほとんどの疾患の疾患遺伝子解析を加速すると考えられる。

A. 研究目的

疾患は、遺伝因子と環境因子の相互作用により発症すると考えられる。遺伝因子の関与の強い疾患、環境因子の関与の強い疾患がそれぞれ存在すると想定されているが、多くのヒト疾患では疾患遺伝子が明らかとなっておらず、遺伝因子と環境因子の関与割合は明確ではない。ヒトの遺伝子総数は約 22000 と推定されているが、疾患との関連が示されている遺伝子は 2000 に過ぎない(McKusick VA, Am J Hum Genet. 80:588-604, 2007)。疾患遺伝子解析に使用される方法は複数ある。複数の構成員が疾患を有する大家系が使用可能な稀少疾患では連鎖解析、よくある疾患(common disease)では全ゲノム関連解析が使用される。前者は疾患遺伝子頻度が高い疾患、浸透率が低い疾患、高齢で発症する疾患には効率が悪い。後者は疾患遺伝子頻度が単塩基多型(SNP)のマイナーアレル頻度より低い疾患(1%以下)には効率が悪い。

そのため、両法の適応が難しい疾患が数多ある。疾患遺伝子の同定は、疾患原因の同定や治療法開発に直接結びつく情報であるため、上記のような疾患に対して適応可能な疾患遺伝子同定法の開発は重要である。

我々は、ゲノム上の情報を集約する新たな概念として Homozygosity haplotype を提唱し、それを用いた家系解析法を報告した(Miyazawa et al. Am J Hum Genet 80:1090, 2007)。この手法は、従来使用されて来た連鎖解析のほとんどの置き換えるものである。ノンパラメトリックな解析法であるため、家系図は不要であり、浸透率にも影響されない。単純なメンデル遺伝形式を取る疾患には極めて有効に働くと考えられる。

近年、全ゲノム関連解析(GWAS)による結果が報告されるようになって来た。しかし、GWAS によって求められる疾患関連 SNP はほとんどが相対危険度の低いものであり、疾患に深く関与し、さらに臨床応用可能な

疾患遺伝子を求めることは容易でないことが明らかとなって来た。この状況を打ち破るためには、一般集団に適応可能な新たな疾患遺伝子解析法を開発する必要がある。我々は homozygosity haplotype 法 (HH 法) を改良し、疾患遺伝子を集団内に広めた最近の共通先祖 (most recent common ancestor: MRCA) が数千年前に存在するような集団から、MRCA が疾患内に広めた疾患遺伝子 (founder gene) を効率的に検出できるようにした。さらに、同手法を用いてサルコイドーシス、及び COPD の解析を行っている。サルコイドーシスの遺伝型決定は埼玉医科大学ゲノム医学研究センターで行い、既に 48 例の解析が終了している。COPD の遺伝型決定は Denmark の AROS 社で行なっているが、現時点では終了していない。本報告書では HH 法による GWAS 手法の開発、およびサルコイドーシス解析の中間結果を報告する。

## B. 研究方法

HH 法による GWAS の開発には MacPro (MacOSX10.5, Intel Xeon Microprocessor, 8 GB RAM) 上で動く XCODE3.0, GCC4.0 を用いた。サルコイドーシス患者 DNA は、旭川医科大学呼吸器内科が収集したものを使用した。COPD 患者 DNA は、埼玉医科大学呼吸器内科で収集したものを使用した。SNP 遺伝型は Affymetrix 社の SNP6.0 を用いて決定した。

### (倫理面への配慮)

本計画の研究計画書は各施設の倫理委員会にて審査を受けた。患者 DNA の採取は、患者に文書で説明を行い、同意書に署名を得た後に行なった。

## C. 研究結果

### (A) HHによるGWASの開発

HHはSNPハプロタイプのサブセットである。HHを求めるには、まずヘテロ接合のSNPを除去する(図1-(i))。すると全てのSNPはホモ接合となるため(図1-(ii))、残ったホモ接合のSNPに関してハプロタイプを一意に決定することができる(図1-(iii))。これがHHである。

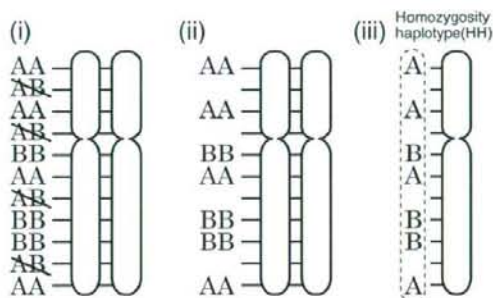


図1 HH

2本の染色体は同一のホモ接合ハプロタイプを有する。ヒトは二倍体であるため各染色体あたり2種類のハプロタイプがあるが、ホモ接合ハプロタイプは一種類のみであり、ヒトをあたかも1倍体であるかのように解析することができる。2名の個人のホモ接合ハプロタイプを比較する場合は、比較できるSNP (compSNP)のみを比較する(図2)。



comparable SNPs(compSNPs)

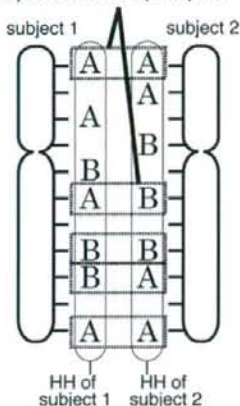


図2 HHの比較

2名の個人が同一先祖由来の染色体断片 (shared fragment) を有している場合, shared fragmentの部分ではホモ接合ハプロタイプは一致する. 逆に, ホモ接合ハプロタイプが一致している場合, 2名の個人のそれぞれいずれか片方の染色体がshared fragmentである可能性がある(図3).

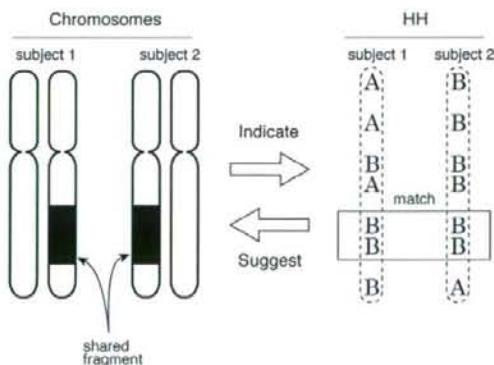


図3 HHが一致する意味

RCHHは, 閾値(RCHH cutoff)よりも長い遺伝長でホモ接合ハプロタイプが一致する領域である. RCHHはshared fragmentの目安となる(図4).

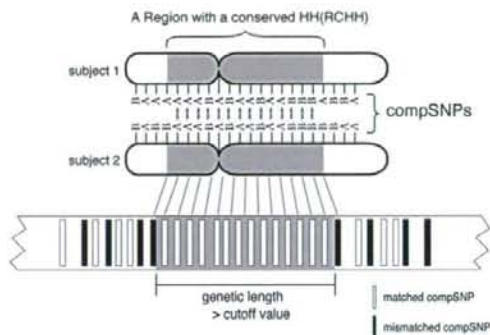


図4 RCHH

減数分裂がHaldaneのPoisson process modelに従って生じると仮定し, 2名の個人が共通先祖からm, n世代離れているとすると, RCHH cutoff = c(cM)において, RCHHはshared fragmentのうち

$$e^{-\lambda c}(1 + \lambda c), \lambda = \frac{m+n}{100}$$

を検出することができる. また, SNPの密度が十分に高いなら, 偶然にRCHHが生じる可能性, 即ちRCHH cutoff長に亘ってcompSNPが偶然に一致する可能性は十分に小さくなる(Miyazawa et al. Am J Hum Genet 80:1090, 2007). 例えばm=n=50, RCHH cutoff=0.83 cMの場合, shared fragmentの0.8を検出できる一方, 偶然に生じるRCHHは常染色体全領域の0.004程度に留まる. これは2名の疾患患者がおり, その疾患の原因が50世代前の共通先祖に由来する疾患遺伝子である場合, ホモ接合ハプロタイプにより十分にshared fragmentが検出可能なことを意味している. しかしながら, 2名の共通先祖は多数あり得るため, 疾患遺伝子同定のためには別の共通先祖由来のshared fragmentを除去せねばならない. これは多数の患者を組み合わせることで可能となる. 一人の共通先祖から疾患遺伝子



を受け継いでいる多数の患者の全ての2名のペアでRCHHを求め、その数を染色体の各領域で積算する。RCHHが得られる頻度が最も多い領域が疾患遺伝子領域と推定される。コントロールとして100名の健常対照者を用意する。染色体の各部位で、RCHHを共有する人数を求め、caseとcontrolの比較によりP値を計算すれば、疾患遺伝子領域を $-\log_{10}(P)$ のpeakとして描出することができる(図5, 6)。

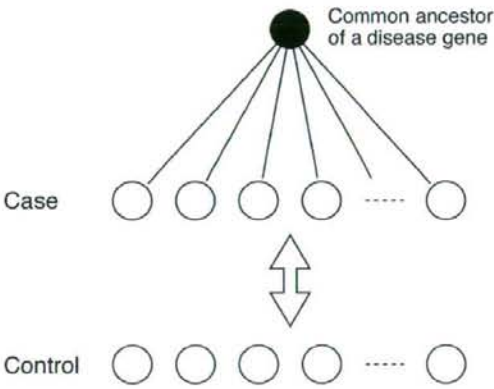


図5 HHを用いた疾患遺伝子検索の strategy

図6では、SNP6.0で検出できる90万のSNPのうち、25000番目、50000番目、75000番目、... 875000番目に50世代前のMRCA由来の疾患遺伝子があるデータを作成し、それをHHを用いたGWASによって検出している。RCHH cutoff は0.80 cMである。

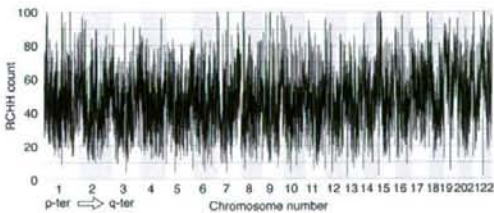


図6-1 case

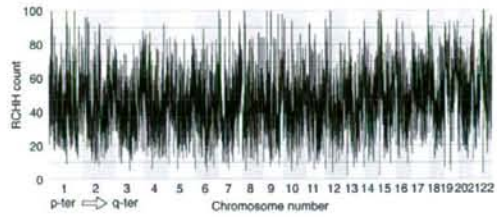


図6-2 control

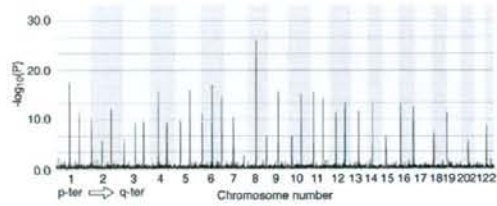


図6-3  $-\log_{10}(P)$ . それぞれの疾患遺伝子の場所が描出されている。

上記の計算方法は、染色体上でホモ接合ハプロタイプの多様性の多い領域ではうまく働く。しかしながら、ハプロタイプの多様性の乏しい領域ではうまく行かない。図6で示すように特にテロメアの近くでは、多くの被験者がRCHHを共有してしまう。これは、RCHH cutoffの値をSNP単位で変化させることで解決できる。RCHH cutoffが大きくなれば、より長い領域でホモ接合ハプロタイプが一致しない限りRCHHとして検出できないためである。RCHH cutoffとRCHHの定義を拡張する(図7)。これは古い定義を包含している。

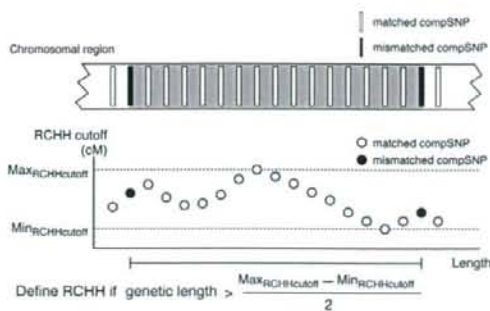


図7 RCHH cutoffの拡張

この新しい定義を利用した計算手順は図8のようになる。

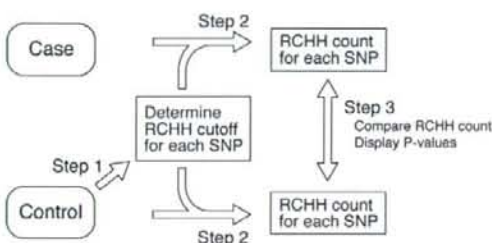


図8 拡張 RCHH cutoffを利用した計算手順

コントロールを100名が、全ての染色体領域でRCHHを共有する人数が40名以下となるようにRCHH cutoffを変化させる(図9)。

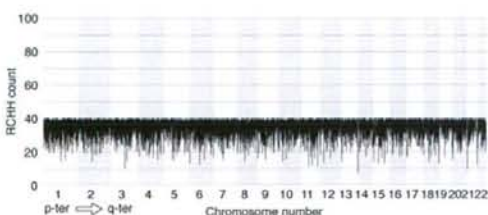


図9 RCHHの共有数が全常染色体で40名以下となるようにする。Controlの図

このようにすると、ハプロタイプの多様性の乏しい領域でも、検出力は低いが出検でき

るようになる(図10)。

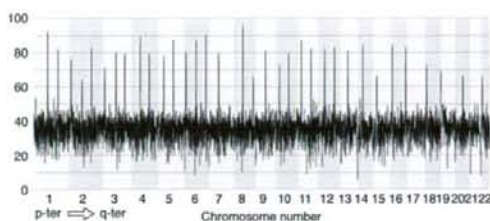


図10-1 RCHHの共有数が全常染色体で40名以下となるようにする。Caseの図

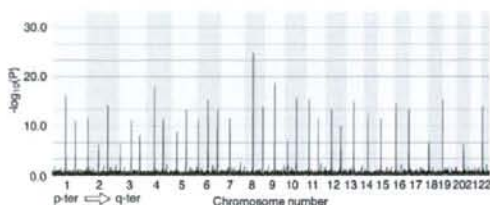


図10-2 RCHHの共有数が全常染色体で40名以下となるようにする。-Log10(P)の図

染色体全域では150世代前のfounder geneでもかなりの確率で検出できるようになる。この手法のもう一つのメリットは、多重検定の問題をpermutationによって避けることができることである(図11)。

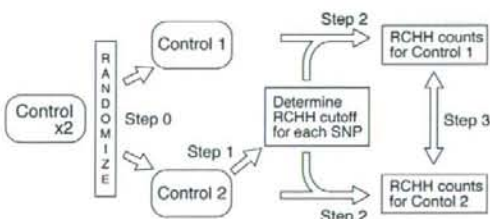


図11-1 Permutationによる有意水準の検出。これを100回繰り返して-log10(P)の最大値を有意水準とする

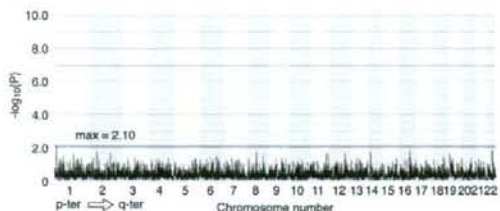


図 11-2 Permutation による有意水準の設定. 100 回繰り返した  $-\log_{10}(P)$  の最大値は 2.10 となった. これ  
が有意水準となる

患者100名のうち同一のfounder geneによるものの割合が低い場合など, 条件を変えたシミュレーション結果を図12に示す.

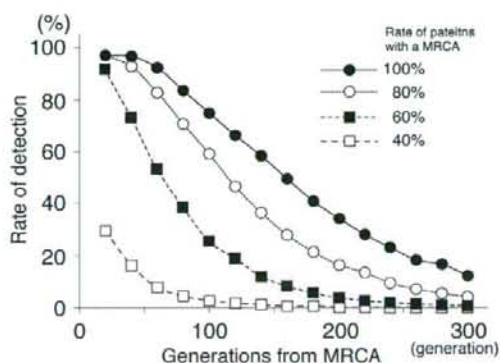


図 12-1 Case 中に同一の MRCA からの遺伝子を有している患者が 100%, 80%, 60%, 40% の場合のシミュレーション. SNP6.0 を使用した場合の結果.

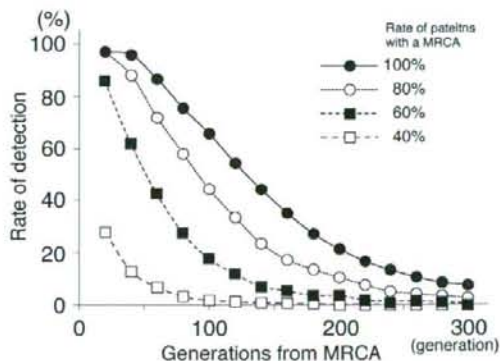


図12-2 図12-1と同様. 500kGeneChipを用いた場合のシミュレーション

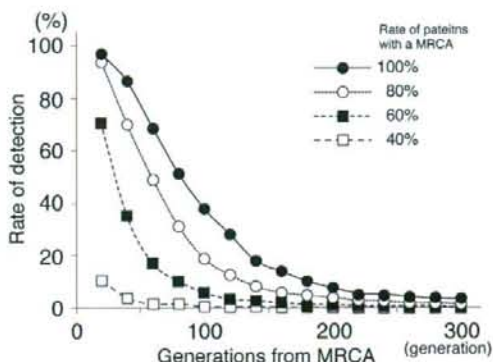


図12-3 図12-1と同様. 250kNSPGeneChipを用いた場合のシミュレーション

MRCAがより近い世代に存在する場合(例えば100世代以下), 図9で示した「RCHHを共有する患者の割合」を5%にすることで, より少ない患者でも効率的に検出することができるようになる(図13).

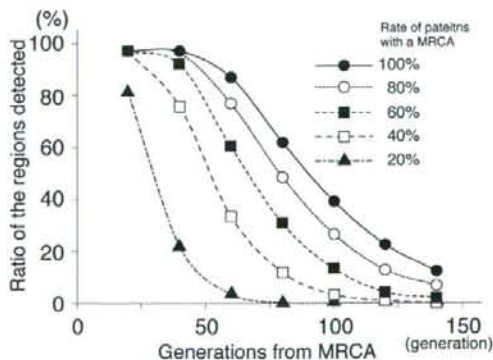


図13-1 Case中に同一のMRCAからの遺伝子を有している患者が100%, 80%, 60%, 40%の場合のシミュレーション. SNP6.0を使用した場合の結果.



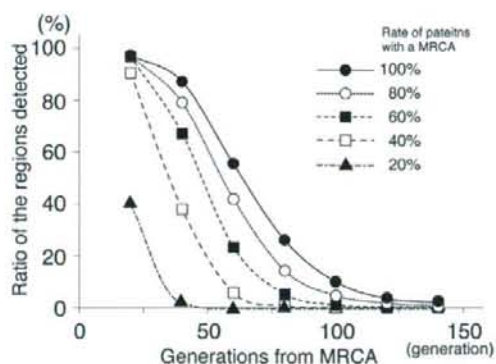


図13-2 図12-1と同様. 500kGeneChipを用いた場合のシミュレーション

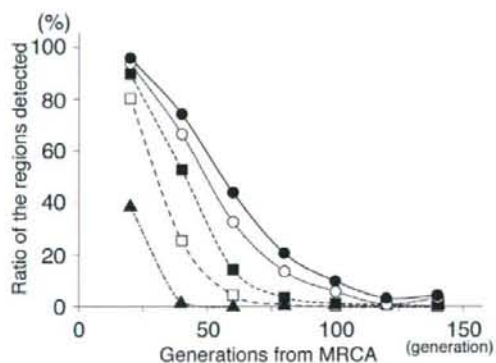


図13-3 図12-1と同様. 250kNSPGeneChipを用いた場合のシミュレーション

### (B)HHによるGWASを用いたサルコイドーシス解析

サルコイドーシスは、原因不明の全身性肉芽腫性疾患である。遺伝的な素因(遺伝因子)に、細胞性免疫を活性化する外的要因(環境因子)が作用して発症すると考えられている。家族性発症(患者同胞や親族での高い罹患頻度)、人種間での罹患頻度の相違(黒人の発症率は白人の3.5倍)、HLAとの高い相関(HLA-DRB1やHLA-DQB1)など、遺伝因子の関与を示唆する所見は多い(Iannuzzi M.C. and Rybicki B.A. Proc

Am Thorac Soc 4:108, 2007)。ヨーロッパでは精力的な遺伝因子同定研究が行われており、マイクロサテライトマーカー検索でBTNL2遺伝子(Valentonyte R et al. Nature Genet 37:357,2005)が、全ゲノム関連解析でANXA11遺伝子(Hoffman S et al. Nature Genet 40:1103,2008)が同定されている。サルコイドーシスは多因子疾患と考えられ、病態に民族差があることから各民族で関与する遺伝子も異なると思われるが、日本人では遺伝学的研究はほとんど行なわれていない。

旭川地方の人口は、明治維新前後より始まった移民(移住)により成立した。このような歴史的背景がある集団では遺伝構造が単純化するため、効率的な疾患遺伝子解析が行なえると考えられる。

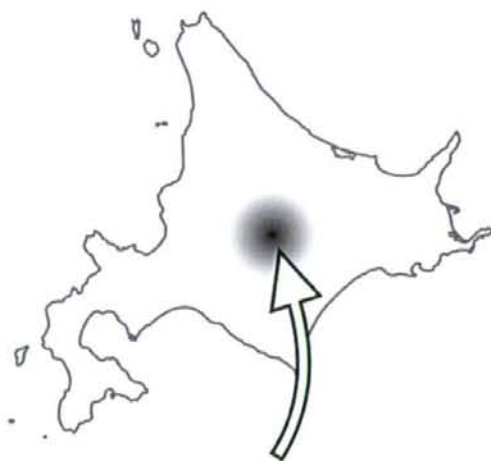


図14 旭川地方. 近代の移民によって成立した集団では、「瓶の首効果」により遺伝構造が単純化するため、疾患遺伝子解析が容易になる。

この仮説に基づき、我々は旭川地方の48名のサルコイドーシス患者の全ゲノムSNP解析を行い、それをHHを用いたGWASにより解析した。コントロールとしては、東京地方