

プール試料を用いたサルコイドーシスの GWASの fine mapping

山口 悦郎*

近年アレイ技術によるゲノム関連解析(GWAS)が、疾患感受性遺伝子検索の標準的手法となりつつある。今回我々はプール試料を用いて、サルコイドーシスのGWASを試み、さらに部分的な fine mapping を行った。

対象は健常者127名、サルコイドーシス患者162名。それぞれの個体由来DNAを各群の中で等量用い、プール試料を作製した。用いたアレイは、Illumina社のHuman610-Quad v1.0 DNA Analysis BeadChipである。

アレイの蛍光強度から推定した発症オッズ比が2以上を示し、その近傍に既知遺伝子が存在するものは158個であった。その中でもサルコイドーシスの病態に照らして関連があると思われる12SNPについて、個別タイピングを実施した。その結果、第6染色体のDQA1近傍のrs7755224が、遺伝子型(共優性仮定)で 5.0×10^{-4} 、アレル頻度で 4.3×10^{-5} の統計学的危険率で、サルコイドーシスの発症と有意な相関を示した。他施設の多数試料で確認検討を行ったところ、十分にGWASレベルの有意水準に達した。部分的 fine mapping ではrs7755224より小さな危険率を示したSNPは無かった。今回の結果は既報の候補遺伝子解析と符合しており、本方法は一定の信頼性があると言える。したがってGWASの第一段階スクリーニング法として有用である。

A Fine Mapping of GWAS for Sarcoidosis Patients by the Use of Pooled Samples

Etsuro Yamaguchi

Division of Respiratory Medicine and Allergology, Department of Medicine, Aichi Medical University School of Medicine

Genome-wide association study (GWAS) has been receiving attention as a new master card for a searching method for disease susceptibility gene. We conducted GWAS using pooled samples and partial fine mapping.

The study subjects were 127 control subjects and 162 patients with sarcoidosis. Pooled DNA samples for each group were prepared by adding equal amount of DNA from individual subjects. We used Human610-Quad v1.0 DNA Analysis BeadChip (Illumina) as a SNP array.

We found 158 SNPs which showed odds ratio greater than 2 predicted from fluorescence intensity of the array and had known genes in adjacent region. Among them, individual genotyping was conducted for 12 SNPs which were thought to be relevant to the pathogenesis of sarcoidosis. Rs7755224 in chromosome 6 was significantly associated with sarcoidosis at a p value of 5.0×10^{-4} for genotype frequency and 4.3×10^{-5} for allele frequency. Replication study using a greater number of samples from the other institution showed a lower p value than that for the original study samples. The combined results were significant at the GWAS level. The current study demonstrate the reliability of GWAS using pooled samples since it could replicate results of previous candidate gene approach. Thus, this method is useful as the first step screening method.

はじめに

サルコイドーシスの疾患感受性遺伝子探索の努力は、今日に至るまで長く続けられている。もっとも古くはHLAとの相関に始まり^{1,2)}、候補遺伝子のSNPマーカーによる関連研究^{3,4)}に次いで、ゲノムスキャンが行われた^{6,7)}。ゲノムスキャン結果の追認は必ずしも成功していないこともあり、さらに多くのマーカーによる検索手法が求められていた。それに対応するのが、急速な進歩を遂げたアレイ技術によるゲノム関連解析(genome-wide association study, GWAS)である。サルコイドーシスに関しては、Hofmannらによって2008年にその第一報が報告された⁸⁾。これまで疾患感受性遺伝子には、人種差があることが広く認められており、日本人についても確認することが求められる。しかしそのためには多額の費用を要することが難点である。

一方で、疾患感受性遺伝子探索には多数検体が必要であり、その遺伝子タイピングは手間と費用がかかる欠点に鑑み、多数検体を対照あるいは疾患群でひとまとめとするプール試料として解析する方法が有用であることが古くから報告されている^{9,10)}。そこで今回日本人サルコイドーシスのプールDNA試料についてGWASを試み、高度に有意な相関を示したSNP周辺領域のfine mappingを行った。

対象・方法

対象は健常者127名、サルコイドーシス患者162名。それぞれの個人由来DNAを各群の中で等量用い、かつ各群合わせて3.5 μgとなるようにDNA試料量を調整して分注し、プール試料を作製した。対照プール試料は4本、患者試料は3本用意した。用いたアレイは、Illumina社のHuman610-Quad v1.0 DNA Analysis BeadChipである。個別タイピングはTaqMan probeを用いた。

アレイとハイブリダイズ後、得られた蛍光データのうち、健常者、サルコイドーシス患者ともに一定以上の蛍光強度がある一塩基多型(SNP)を約59万選択した。次に今年度は昨年との解析とは異なり、2つ

のアレル(X, Y)に対応するアレイの蛍光強度比(X/Y)のサルコイドーシス群に対する健常対照群の比を代替発症オッズ比と見なし、それが2以上ないし、その逆数である0.5以下のSNPを原則的に検討対象とした。

本研究は「アレルギー性呼吸器疾患の遺伝素因に関する研究」として、本学医学部の倫理委員会により承認されている。すべての試料は被験者に対して文書による説明の上、同意書を得て採取した。

結 果

アレイの全60万SNPのうち、まず蛍光強度が十分高い592,000SNPを選択した。次いでアレル頻度があまり小さいものは臨床的意義が少ないと考え、対照群のX/Yが0.05未満あるいはその逆数の20を超えるSNPを除外した。その上で、代替オッズ比が2以上を示したSNPは472個、0.5以下のそれは1435個存在した。2以上を示すSNPのうち、その近傍に既知遺伝子が存在するものは158個であった。その中でもサルコイドーシスの病態に照らして関連があると思われる12SNPについて、TaqMan probeを用いて個別タイピングを実施した(表1)。その結果、第6染色体のDQA1近傍のrs7755224が、遺伝子型(共優性仮定)で 5.0×10^{-4} 、アレル頻度で 4.3×10^{-5} の統計学的危険率でサルコイドーシスの発症と有意な相関を示した。また第4染色体のAnkyrin2近傍のrs7663732は遺伝子型で 6×10^{-3} 、アレル頻度でも 6×10^{-3} の危険率でサルコイドーシスの発症と有意な相関を示した。他施設の多数試料で確認検討をおこなったところ、rs7755224については遺伝子型分布に関して危険率は 2.7×10^{-7} 、アレル頻度に関して 4.6×10^{-8} であり、2施設合わせると 10^{-16} レベルとなり、十分GWASレベルの有意水準に達した。一方Ankyrin2については他施設では有意な相関を示さなかった。

rs7755224近傍領域のゲノムでどこにもっとも強い相関があるかを検討するため、rs7755224周辺100Kbの日本人tag SNPのいくつかについてTaqMan probeによるfine mappingを試みた。しかし選んだSNPの近くに多型が多く存在し、設計されたprimerが正確に機能せず、健常者の遺伝子型分布がHardy-Weinberg平衡を満たさないものが多く出た。その結

表1

順位	rs#	染色体	代替オッズ比	近傍の関連遺伝子	遺伝子型 χ^2	p 値	アレル χ^2	p 値
1	rs17662920	9	12.0	PTPRD	0.069	0.497	0.067	0.800
8	rs4147868	1	4.2	ABC1, member 4	2.55	0.279	3.721	0.054
9	rs11749676	5	4.2	DRD1(dopamine receptor 1)	7.084	0.029	5.832	0.002
21	rs1464500	12	3.5	SOX5	0.638	0.424	0.610	0.435
23	rs2457996	4	3.4	CXCL5	4.642	0.098	0.147	0.702
25	rs7755224	6	3.3	HLA-DQA1	15.218	5.0×10^{-4}	16.749	4.3×10^{-5}
27	rs7431678	3	3.2	SPATA16	1.272	0.529	0.337	0.561
29	rs2994613	10	3.2	ZNF438:Zinc fiber438	0.797	0.671	0.152	0.700
34	rs7663732	4	3.1	ANK2 (ankyrin 2)	7.786	0.006	7.626	0.006
35	rs9286410	X/Y	3.1	GM-CSFRA, isoform c	5.533	0.063	1.339	0.247
53	rs9379858	6	2.7	BTN3A2	2.373	0.305	1.679	0.200
158	rs1035497	5	2.3	C6, transcript variant 1	4.411	0.110	2.382	0.123

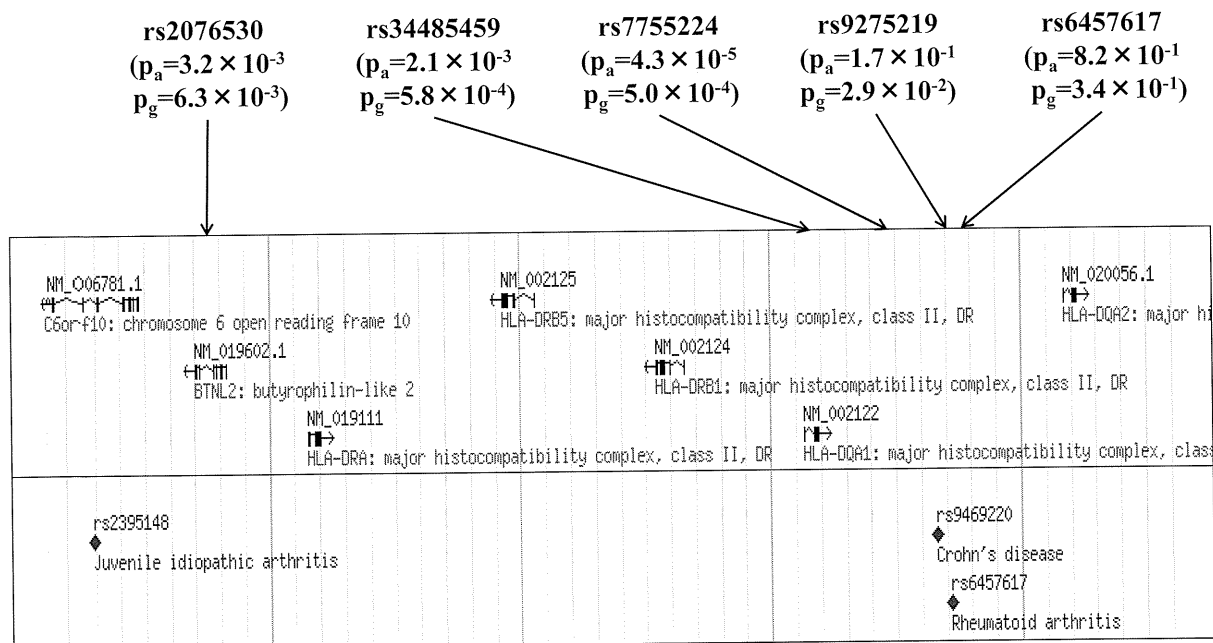


図1：rs7755224 付近の fine mapping (p_a =アレルのp値, p_g =遺伝子型のp値)

果真に詳細な検討をすることができなかったが、得られた結果の限りではrs7755224に相関ピークが存在した(図1).

考案

今回は昨年に引き続き、日本人サルコイドーシスの疾患感受性遺伝子をスクリーニングするために、プール試料を用いたGWASの解析方法をやや変更し、有意な相関を示したSNPについては部分 fine

mappingを行った。プール試料であるため、個別の遺伝子型を求めることは原理的に不可能であり、本法の妥当性は、各アレルに対応するシグナルすなわち蛍光強度の比が、集団としてのアレル頻度比を大筋において反映するであろうとの仮定に依存している。昨年の検討では、擬似 χ^2 検定を行って、一部で個別タイピングを行ったが、必ずしも低いp値が得られずGWAS結果の再現性が確かめられなかった。今年の方法で述べたように単純に蛍光強度の比で個別タイピングを行うSNP候補を選別した。その結

果代替オッズ比が2以上であり、近傍にサルコイドーシスと関連がありそうな遺伝子が存在する158SNPのうち、調査した12SNPの中で2つが有意な相関を示した。特にHLA-DQA1近傍のrs7755224は、他施設の試料でも高度に有意であり、日本人ではおそらく間違いのない相関であろうと推定される。同領域はこれまで候補遺伝子解析により疾患感受性遺伝子があることが強く示唆されており、それが奇しくも再現された。したがって逆に本方法に信頼性があることを示していると考えられる。

しかし今回の検討では、同領域近傍のHLA-DRB1やHLA-DQA2を含めてどの遺伝子との相関が最も強いかを正確に解析することはできなかった。今後多型同定法を見直して、さらに相関のピークを追及して行く必要がある。

文 献

- 1) Kunikane, H. Abe, S. Tsuneta, et al. Role of HLA-DR antigens in Japanese patients with sarcoidosis. *Am Rev Respir Dis* 135: 688-91, 1987.
- 2) Ishihara M, Ohno S, Ishida T, et al. Molecular genetic studies of HLA class II alleles in sarcoidosis. *Tissue Antigens* 43:238-41, 1988.
- 3) Hizawa N, Yamaguchi E, Furuya K, et al. The role of the C-C chemokine receptor 2 gene polymorphism V64I (CCR2-64I) in sarcoidosis in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med* 159:2021-3, 1999.
- 4) Yamaguchi E, Itoh A, Hizawa N, et al. The gene polymorphism of tumor necrosis factor- β , but not that of tumor necrosis factor- α , is associated with the prognosis of sarcoidosis. *Chest* 119:753-61, 1999.
- 5) Zhou Y, Yamaguchi E, Hizawa N, et al. Roles of functional polymorphisms in the interleukin-18 gene promoter in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 22:105-113, 2001.
- 6) Valentonyte R, Hampe J, Huse K, et al. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet* 37:357-64, 2005.
- 7) Nguyen T, Liu XK, Zhang Y, et al. BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol* 176:7354-60, 2006.
- 8) Hofmann S, Franke A, Fischer A, et al. Genome-wide association study identifies ANXA11 as a new susceptibility locus for sarcoidosis. *Nat Genet* 40:1103-6, 2008.
- 9) Arnheim N, Strange C, Erlich H. Use of pooled DNA samples to detect linkage disequilibrium of polymorphic restriction fragments and human disease: studies of the HLA class II loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6970-4, 1982.
- 10) Macgregor S, Zhao Z, Henders A, et al. Highly cost-efficient genome-wide association studies using DNA pools and dense SNP arrays. *Nucleic Acids Res* 36: e35, 2008.

分泌発現系のアクネ菌DNAライブラリーを用いた サルコイドーシス責任抗原の探索

古川あすか¹ 中野 翼¹ 千葉 明子¹ 林 千尋¹ 相川 裕樹¹
関谷 高弘² 峰岸 佳菜¹ 萬 巴里子¹ 内田 佳介¹ 江石 義信^{1*}

【背景】

サルコイドーシスにおけるアクネ菌病因説を確定するためには患者特異的にIV型アレルギー反応を誘導しうる本菌由来の責任抗原を同定する必要があるが、抗原検索法として知られている患者血清を用いたライブラリースクリーニング法は、細胞性免疫反応にのみ疾患特異性がある場合には限界がある。

そこで本研究では、細胞性免疫反応を指標とした新たな抗原スクリーニング法を確立し、本症の責任抗原を同定することを目的とした。このスクリーニング法では患者由来の細胞を大量に必要とするため、アクネ菌感作マウスリンパ球を用いて抗原候補タンパクを選別後、ヒトリリンパ球に移行する2段階スクリーニングを行うこととした。

【方法と結果】

本目的のために、アクネ菌の分泌発現系ゲノムライブラリーを作製した。ライブラリーは枯草菌株に形質転換し、クローン化した。各クローンの培養上清をアクネ菌感作マウス及び未感作マウスのリンパ球に直接添加し、リンパ球刺激試験(LST)を行った。アクネ菌感作マウスのstimulation index (SI)が2.0以上であり、かつ未感作マウスとのSIの比が2倍以上であったクローンを陽性とし、陽性クローンについては挿入遺伝子を解析するとともに培養上清中の分泌タンパクの発現をSDS-PAGEにて確認した。LST陽性クローンは30クローンであったが、そのうち実際に分泌タンパクの発現が確認できたのは1クローンであった。この1クローンの挿入配列がコードしていた遺伝子「糖エネルギー輸送システムマンノース特異的IIB複合体」の全長リコンビナントタンパクを作製し、健常人末梢血単核球でLSTを行ったところ、3例中2例でSIが2.0以上であった。

【考察】

分泌発現系ライブラリーを用いた本スクリーニング法は、細胞性免疫反応を検討するスクリーニングに有用であると考えられる。今後、本検討で得られた感作抗原候補タンパクのサルコイドーシス患者における免疫反応性を確認するとともに、スクリーニングを継続し、本症患者特異的に強い細胞性免疫反応を誘導する責任抗原を同定する予定である。

¹ 東京医科歯科大学大学院人体病理学

² 東京医科歯科大学医学部附属病院病理部

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

【はじめに】

サルコイドーシスのようなIV型アレルギーを主病態とする疾患において、患者特異的に細胞性免疫反応を誘導する責任抗原を同定することは、病因解明だけでなく、抗原決定部位の合成ペプチドを使用したパッチテストによる診断法の確立や抗原特異的な免疫反応の修飾を目的とした治療法の開発に結び付く可能性がある。

責任抗原の検索法としては、患者血清を用いたライブラリースクリーニング法(Serological analysis of recombinant cDNA expression libraries; SEREX)法がよく知られている¹⁾。通常の外因性感染症の場合、原因微生物の感作により感染抗体価が上昇するため、従来のSEREX法で抗原を同定することが出来る。しかしながら、サルコイドーシスは常在性の高い物質がアレルゲンとなる内因性感染症であるため、責任抗原の同定には患者由来の細胞を用いて“細胞性免疫反応を指標とした”スクリーニングを行う必要がある。

本研究では、細胞性免疫反応を指標としたサルコイドーシス責任抗原の、直接的なスクリーニング法の開発を目指した。

このようなスクリーニングを行う問題点として、アクネ菌由来の全タンパクを個々に精製し、患者リンパ球との反応を調べる必要があるが、大変大きな労力を必要とする。また、スクリーニングにはサルコイドーシス患者の細胞を多数必要とするが、実際に用いることは難しい。そこで本研究では、精製の手間を軽減できるようアクネ菌の分泌発現系ライブラリーを作製し、アクネ菌感作マウス由来の細胞を用いて責任抗原候補タンパクを選別した後、患者由来の細胞に移行する2段階スクリーニングを行うことにし、その有用性を検討した。

【材 料】

ライブラリー作製に使用したアクネ菌患者分離株

アクネ菌はサルコイドーシス患者の皮膚病変部から分離培養された臨床分離株を使用した。GAM培地(ニッスイ)で増菌後ガラスビーズを用いて物理的に破碎し、proteinaseKとSDSで一晩反応させ、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿をし、

RNase処理後ゲノムDNAを精製した。

形質転換に使用した菌株

分泌発現系ライブラリー作製で用いた大腸菌は*Escherichia coli* HST08 Premium Competent Cells (TAKARA)を、枯草菌は*Bacillus subtilis* RIK1285株 (TAKARA)を使用した。リコンビナントタンパク作製で用いた大腸菌は*E.coli* JM109株(TAKARA)を使用した。

アクネ菌感作マウス

C57BL/6Jマウス(Crea Japn inc)にアクネ菌のlysateとComplete Freund's Adjuvant (BD)を混合させたエマルジョンを両後足底から100 μ Lずつ免疫した。その後1週間おきに尾起始部の皮下に200 μ L、計3-4回免疫を行った。最終免疫から1-2週間の個体を実験に使用した。

末梢血単核球の分離

本教室の健常人ボランティア4名から新鮮末梢血をヘパリン加ナトリウム含真空採血管に採血した。滅菌PBSで2倍希釈した末梢血をFicoll-Paque (GE Healthcare)に静かに重層し、22 $^{\circ}$ Cにて1300 rpm、30分遠心した。Ficoll-Paque上の単核球層をピペットで吸い取り、滅菌PBSに浮遊させた。1200 rpm、5分遠心し、細胞を回収した。RPMI1640 medium (Sigma)で洗浄後再度RPMI1640 mediumに細胞を浮遊させ、細胞数をカウントした。

【方 法】

分泌発現系ライブラリーの作製

アクネ菌のゲノムDNAを制限酵素Hpa IIで部分分解した。各断片の末端をBlunting、メチル化、EcoR I リンカー付着、EcoR I 切断処理し、同じくEcoR I 切断処理しておいたpBE-S DNAベクター(*B. subtilis* Secretory Protein Expression System, TAKARA)とライゲーションを行った。ライゲーション液を*E. coli* HST08 Premium Competent Cells (TAKARA)に形質転換し、アンピシリン含LB寒天培地でコロニーを形成させた。コロニーを全て集め、菌体からPlasmid Midi kit (QIAGEN)用いて plasmid DNAを抽出し、ライブラリーを完成させた(図1)。

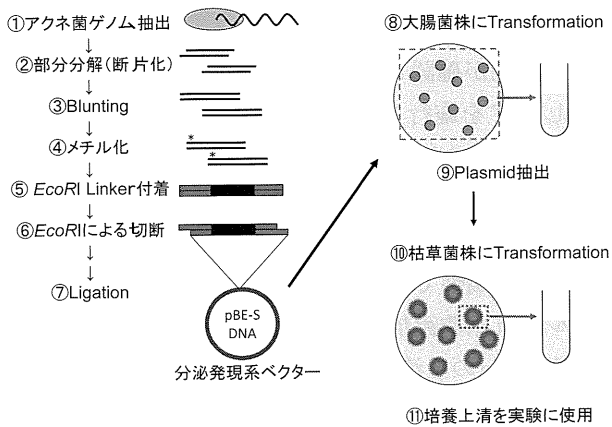


図1 分泌発現系ベクターを用いたアクネ菌DNAライブラリーの作製

B. subtilis を用いた分泌タンパクの作製

B. subtilis RIK1285株はLB寒天培地に広げて37°Cで一晩培養した。翌日1コロニーを2mLのLB液体培地に植菌した。28°Cで一晩前培養した菌液は5mLのSP I mediumに50μL摂取し、37°Cで吸光度660nm = 0.7-0.8になるまで培養し、この培養液0.5mLを4.5mLのSP II mediumに加え、37°Cで90分培養した。90分後50 μLの100mM EGTAを加えてさらに10分間振とうした。培養液300μLあたり、1μgのplasmid DNAを加えて37°Cで90分培養した。カナマイシン含LB寒天培地にまき、37°Cで一晩培養後、形質転換されたコロニー(クローン)を得た。

得られたクローンを1つずつ回収し、滅菌水 50 μLに懸濁した。その懸濁液2μLをtemplateとし、TaKaRa *Ex Taq* (Mg²⁺ free Buffer)を用いて作製したmixtureと計20μLとなるように調整した。調整した液を、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem)でPCR (95°C・30秒, 58°C・30秒, 72°C・2分を25サイクル)を行った。PCRにはpBE-Sベクターのアーム部分で設計したプライマー、pBE-SMCS-F (5'-CTTAAGCAAAAGGAGAGGGACG-3')とpBE-SMCS-R (5'-GCGTTAGCAATTTAACTGTGA TAAA-3')を用いた。

PCR産物は1%アガロースゲル電気泳動でバンドを確認し、insert陽性と判定したクローンについては、カナマイシン含LB液体培地で37°Cにて一晩培養した。24時間後、10000rpm, 15分遠心して上清を回収し、0.2μmのフィルターを通したサンプルを以下の実験に使用した。

リンパ球刺激試験 (Lymphocyte Stimulation Test; LST)

アクネ菌感作マウスからリンパ節を採取し、RPMI1640 medium (Sigma)で単一にした細胞を5×10⁵個(健常人では1×10⁵個)ずつ96-well plate (Coster)に播種した。その後刺激抗原を添加し、37°C, 5% CO₂インキュベーター内で培養した。培養3日目(健常人では5日目)に³H-thymidine (PerkinElmer)を添加(37 kBq/well)し、37°Cで24時間培養後、cell harvesterでUniFilter-96GF/C (PerkinElmer)に吸収させた。その後Filterの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

刺激抗原に対する反応性の有無は、同一抗原を添加した3 wellの平均を求め、抗原添加値を抗原非添加値にて除したStimulation Index (SI)を求め、判定した。

挿入配列中の遺伝子同定と分泌タンパク確認

LST陽性クローンはカナマイシン含LB液体培地で増菌後、NucleoSpin Plasmid Quick Pure kit (MACHEREY-NAGEL)を用いて plasmid DNAを抽出した。抽出した plasmid DNAはベクター側のプライマーとBigDye反応させ、AB3100シークエンサー (AB)にて塩基配列を解析した。同クローンの培養上清はSDS-PAGEを行い、銀染色で分泌タンパクを確認した。

リコンビナントタンパク作製

LST及び分泌タンパクの発現が陽性であった1クローンのリコンビナントタンパクをpGEX6P発現ベクターを用いて作製した。発現したGSTとの融合タンパクに対し、PreScission Proteaseを添加して単体に切断後、Glutathione Sepharose 4B (Amersham Bioscience K.K.)により精製を行った。LPS除去はDetoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel (Thermo SCIENTIFIC)を使用し、SDS-PAGEで確認した。

ELISPOT assay

Multiscreen 96well Plate (Milipore)を35%エタノール・滅菌MQで洗い、anti-IFN-γ mAb, (Mabtech)を4°Cで一晩固相化した。健常人リンパ球は1×10⁵個ずつ96-well plateにまき、刺激抗原として作製したリコンビナントタンパクを細胞に加えた。37°C, 5% CO₂インキュベーター内で18時間培養後、biotinylated anti-IFN-γ mAb (Mabtech)を加え、室温

で2時間反応させた。Streptavidine - HRP (DAKO) を加えて室温で1時間反応させ、AEC kit (VECTOR) を用いて室温で30分発色を行ったのち、spotをカウントした。

【結 果】

PCRによる挿入配列の確認

*B. subtilis*の10055クローンに対してPCRを施行し、挿入配列の確認を行った。約100bpに見られるバンドはpBE-Sベクターのみでも見られるバンドであり、そのため他のサイズにバンドが見られたクローンを陽性と判定した。その結果、10055クローンのうち1132クローンに約400-4000 bpのバンドが確認でき、陽性と判定した(図2)。

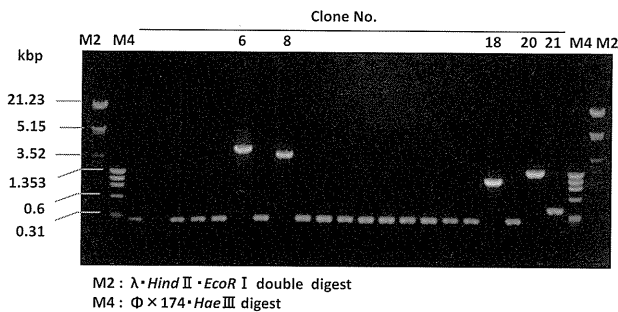


図2 PCRによる各クローンの挿入配列の確認
クローンNo. 6, 8, 18, 20, 21に挿入配列を確認

LSTによるスクリーニング

挿入配列が確認された*B. subtilis*の1132クローンに対しLSTを施行した。「アクネ菌感作マウスリンパ球でSIが2.0以上(図3A)」、「未感作とのSI比が2.0以上(図3B)」の2つの条件を満たすクローンを陽性と判定した。その結果、1132クローンのうち30クローンが陽性であった。なお、ネガティブコントロールは抗原非添加、ポジティブコントロールはアクネ菌 lysate の上清を使用した。

LST陽性クローンの解析

1) クローンの挿入配列

解読した30クローンの挿入配列は既存のアクネ菌全ゲノム・データベース (GenBank accession no. AE017283) と相同性検索し、コードしている遺伝子を同定した。クローンの挿入配列はそれぞれ別の遺伝子をコードしていた。挿入配列のフレームが適切であったのは4クローンであった。フレームが適切であった4クローンの挿入配列がコードしていた遺伝子はそれぞれ、糖エネルギー輸送システム (PTS system) のマンノース特異的IIB複合体, NAD-glutamate dehydrogenase, Transcription-repair coupling factor, DNA topoisomerase Iであった。

2) 分泌タンパクの発現確認

LST陽性クローン培養上清のSDS-PAGEの結果を図4に示す。挿入遺伝子にIIBCが確認できたクロー

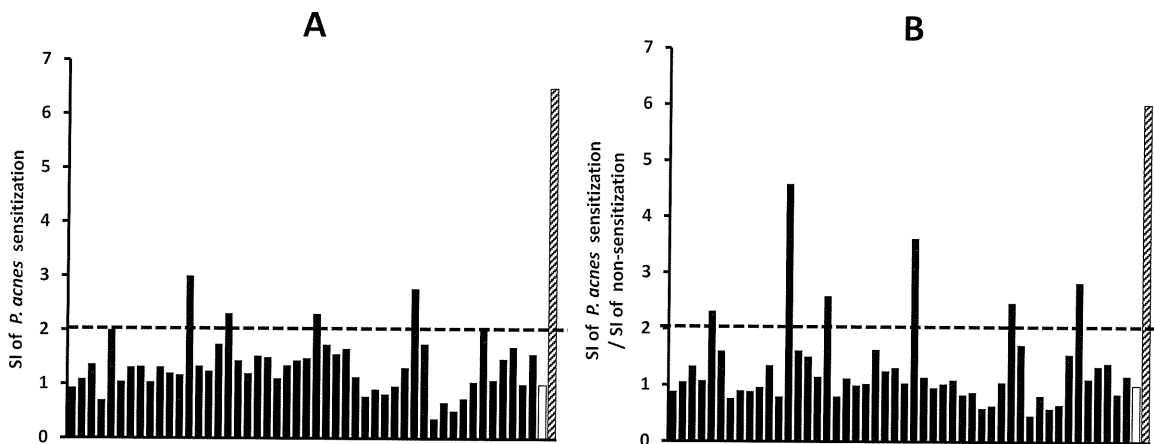


図3 LSTにおけるSIと陽性クローンの判定

A: アクネ菌感作マウス細胞におけるSI

抗原非添加(white bar)のcpmを1とし、各クローン(black bar)ならびに陽性コントロールとして使用したアクネ菌 lysate(hatched bar)を抗原とした際のSIを算出した

B: アクネ菌感作/未感作マウス細胞におけるSIの比

各抗原のアクネ菌感作/未感作マウスにおけるSIを算出した

ンには、挿入配列から推定される約20～30kDa付近に複数のバンドが確認された。約40 kDa付近でも他のクローンでは見られないバンドが確認された。IIBC以外のLST陽性クローンは、pBE-S DNAベクターのみを*B. subtilis*に形質転換したネガティブコントロールと同様、約20 kDaに共通したバンドが確認できた。

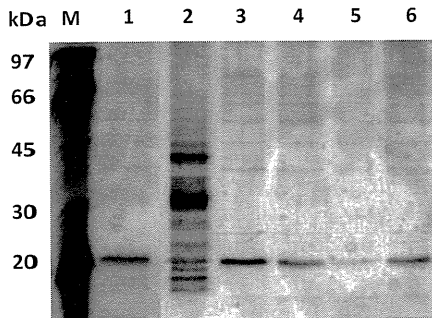


図4 分泌タンパクの発現確認
LST陽性クローンの培養上清をSDS-PAGEにて泳動後銀染色して判定した
Lane 1, 3, 4, 5: LST陽性クローン
Lane 2: LST陽性クローン(IIBC)
Lane 6: vector control

IIBC培養上清を刺激抗原としたLST

*B. subtilis*のIIBC培養上清のタンパクの濃度を0.001, 0.01, 0.1, 1 μ g/mlとし、アクネ菌感作・未感作マウス・健常人2例のリンパ球でLSTを施行した。マウスリンパ球ではアクネ菌感作マウスでのみ濃度依存的にSIの上昇を認めた(図5A)。またアクネ菌感作・未感作マウスにおけるSI比も2倍以上であり、濃度依存的にSIの上昇を認めた(図5B)。健常人2例では、1例のみSIが2.0以上であり、濃度依存的にSIの上昇を認めた(図5C)。

全長IIBCリコンビナントタンパクの解析

LSTにおいて、健常人リンパ球に精製した全長IIBCリコンビナントタンパク(1 μ g/ml)を添加して5日目の状態の位相差顕微鏡写真を図6に示す。健常人3例及びanti-human CD3を刺激抗原としたポジティブコントロールでリンパ球の幼若化を確認した。全長IIBCリコンビナントタンパクの濃度を0.001, 0.01, 0.1, 1 μ g/mlとし、健常人3例のリンパ球でLSTおよびELISPOTを行った。LSTでは健常人2例でタンパク濃度1 μ g/mlにピークが見られ、SIは2.0以上であった(図7A)。ELISPOTでは健常人2

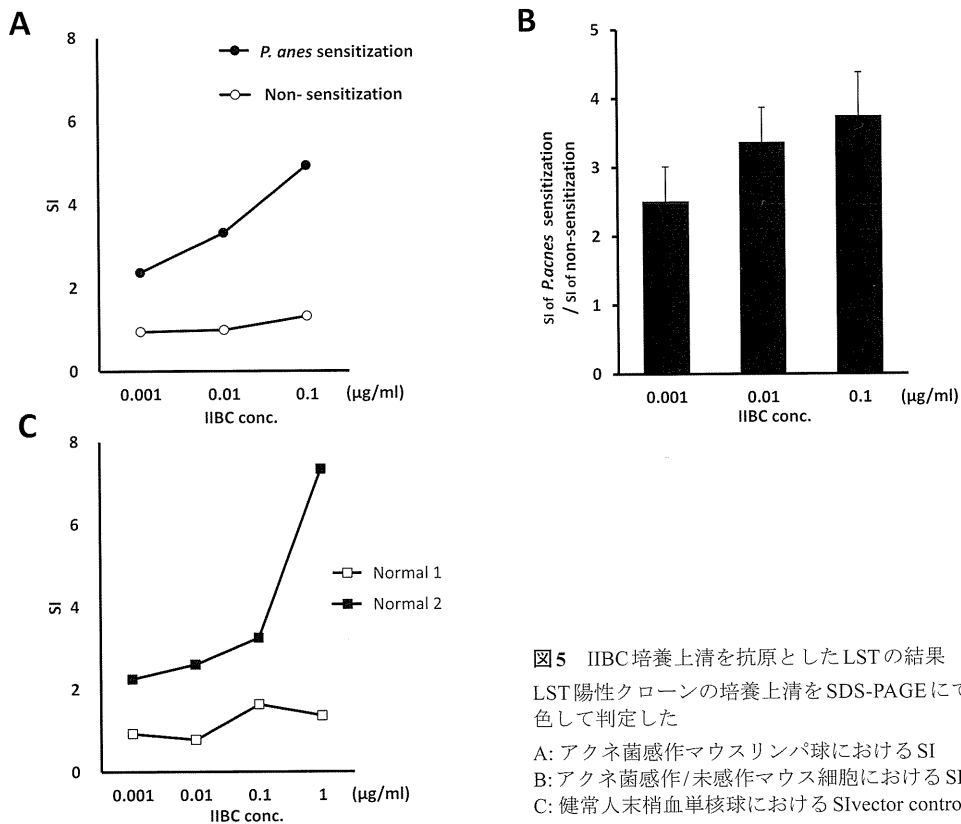


図5 IIBC培養上清を抗原としたLSTの結果
LST陽性クローンの培養上清をSDS-PAGEにて泳動後銀染色して判定した
A: アクネ菌感作マウスリンパ球におけるSI
B: アクネ菌感作/未感作マウス細胞におけるSIの比
C: 健常人末梢血単核球におけるSI/vector control

例でタンパク濃度0.1µg/mlにピークが見られた(図7B).

【考 察】

本研究で初の試みであった分泌発現系ベクターを用いたゲノムライブラリーは、挿入配列の導入効率が約1/10となったが、宿主に*B. subtilis*を用いることで発現タンパクにLPSが混入せず、LSTにおいて非特異的な反応を起こさなかったことから、本研究

の目的である細胞性免疫反応系のスクリーニングに有用であると考えられる。

今回細胞性免疫反応を誘導しうる抗原の候補として、糖エネルギー輸送システム(PTS)マンノース(フルクトース)特異的IIB複合体(IIBC)が浮上した。大腸菌内の機能としてIIBCは、糖代謝において外部から糖を輸送する透過酵素(permease)であるEnzyme IIの複合体の一部である。9回膜貫通型タンパクIICに結合し、フルクトースの輸送・リン酸化を制御するタンパク質と報告がある²⁾。しかしIIBCが疾患の病原因子となっている報告はない。

これまで本研究室では、患者血清を用いたファージライブラリースクリーニング法により trigger factor がクローニングされた。trigger factor タンパクはサルコイドーシス患者の約2割に疾患特異的な免疫反応を誘導し³⁾、またマウスに感作免疫すると約3割の個体に肉芽腫が形成されることが確認されている⁴⁾。このことから trigger factor タンパク以外にも抗原が存在し、複数個の抗原の関与により細胞性免疫反応が誘導される可能性がある。今回同定しIIBCはその中の1つとなるかもしれない。

B. subtilis 培養上清のSDS-PAGEの結果ではバンドが複数本確認され、明確IIBCのバンドは検出されなかった。しかしLSTでは、アクネ菌感作マウスと未感作のSIに有意な差を見出し、マウスだけでなく健常人においてもSI=2.0以上が確認された。そのため全長IIBCリコンビナントタンパクを作製し、

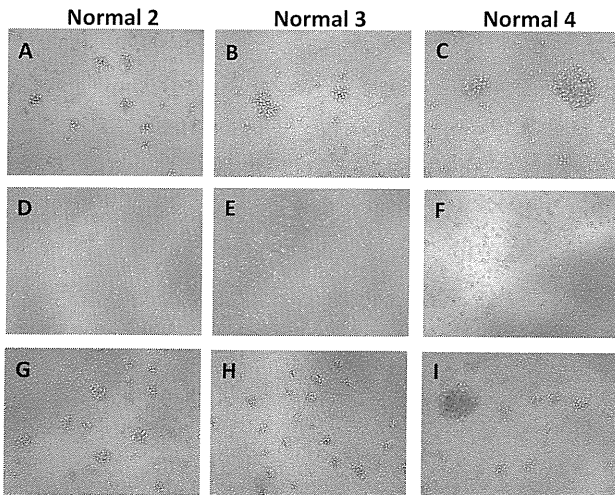


図6 全長IIBCリコンビナントタンパクを刺激抗原とした健常人単核球の位相差顕微鏡像

A-C: 全長リコンビナントタンパク (1µg/ml)
 D-F: Negative control (Non-stimulation)
 G-I: Positive control (anti-human CD3 antibody, 1ng/ml)

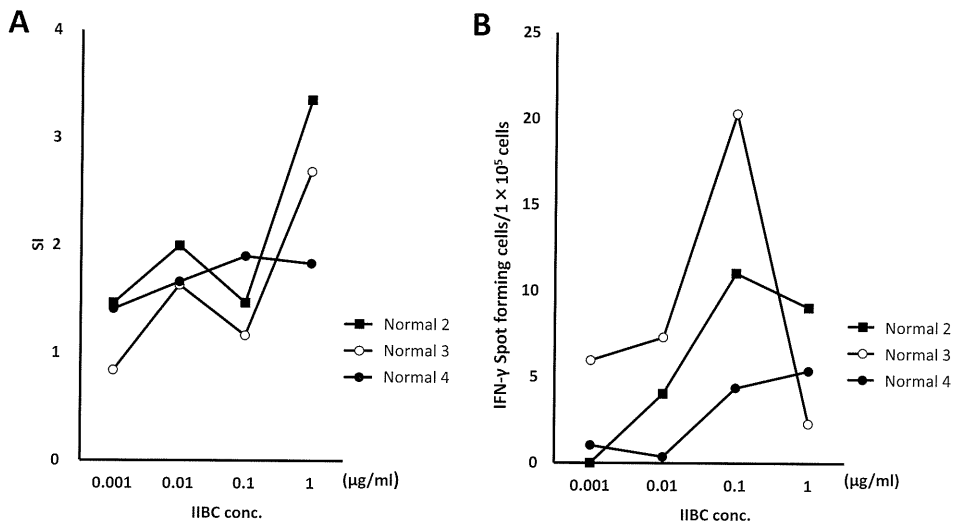


図7 全長IIBCリコンビナントタンパクを抗原とした健常人における免疫反応性

A: リンパ球刺激試験
 B: ELISPOT assay(抗原非添加の spot 数を引いた値をプロット)

同様にLSTを行った。精製した全長IIBCリコンビナントタンパクでも健常人でSI=2.0以上を示したが、培養上清中のIIBCと比較するとピーク時でSIが約3.0低かった。これは*B. subtilis*培養上清中のIIBCが部分的なタンパク構造であり、全長にしたことでその抗原性の高い構造が変化してしまったと考えられる。*B. subtilis*培養上清中の部分的なIIBCはエピトープの解析につなげることができるかもしれない。IFN- γ 産生細胞の数は健常人では最大で23個/ 1×10^5 であった。LSTとの濃度の相関は取れなかったが、ELISPOT assayにおいてもリンパ球に何らかの刺激がかかったと考えられる。今回、LSTおよびELISPOT assayによる解析では、どちらも健常人リンパ球で反応が認められた。次のステップとして、サルコイドーシス患者リンパ球を用いての解析により、健常人より有意に高いSIを認めることができれば、IIBCが責任抗原である可能性が高い。

本研究で確立したスクリーニング法は、サルコイドーシスだけでなく細胞性免疫反応を主体とする他の疾患（夏型過敏性肺炎、鳥飼病など）においても同様の手法で責任抗原の探索が可能となる。責任抗原が同定されれば、エピトープの解析により、最終的には病因論に基づいて新たな治療法およびパッチ

テストなどによる診断への応用が期待できる。

【引用文献】

- 1) Y. Matsunaga, Y. Usui, and Y. Yoshizawa, TA-19, a Novel Protein Antigen of *Trichosporon asahii*, in Summer-type Hypersensitivity Pneumonitis. **Am J Respir Crit Care Med.** 2003, 167:991-998.
- 2) A. Charbit, J. Reizer, and M. H. Saier, Jr. Function of the Fructose Permease of *Escherichia coli*. **J Biol Chem.** 1996, 271(17): 9997-10003.
- 3) Y. Ebe, S. Ikushima, T. Yamaguchi, et al. Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from *Propionibacterium acnes* DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis. **Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.** 2000, 17 (3):256-265.
- 4) J. Minami, Y. Eishi, Y. Ishige, et al. Pulmonary granulomas caused experimentally in mice by a recombinant trigger- factor protein of *Propionibacterium acnes*. **J Med Dent Sci.** 2003, 50 (4):265-274.

C. びまん性汎細気管支炎

閉塞性細気管支炎

BO・DPB 部門(長谷川好規)

びまん性汎細気管支炎・閉塞性細気管支炎 部門報告

第2回閉塞性細気管支炎全国調査研究
—一次アンケート調査—

長谷川 好規, 橋本 直純, 今泉 和良

これまで世界的に見ても閉塞性細気管支炎症例を集積した研究は限られており、診断の手引きも存在しない。我が国においては、いち早くびまん性肺疾患調査研究班において、2004年に我が国初の全国調査を実施した。しかし、診断が困難であること、疾患概念が呼吸器内科専門医においてさえも普及していないことから、前回調査では、病態・診断基準を示すに足りる情報解析が出来なかった。本年度における部門の活動として、2004年以降に診断された閉塞性細気管支炎症例の第2回全国調査(一次アンケート)を実施した。本研究は、患者数の把握など今後の閉塞性細気管支炎に関する疾患疫学調査の基礎となる情報となることが考えられる。

Study group of diffuse panbronchiolitis and Bronchiolitis Obliterans
The second nation-wide case search for constrictive bronchiolitis obliterans
- primary case survey-

Yoshinori Hasegawa, Naozumi Hashimoto, Kazuyoshi Imaizumi

Department of Respiratory Medicine,

Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan

There have been few reports for the nation-wide survey of Bronchiolitis Obliterans (BO) cases, and neither the guidance booklet for the diagnosis of BO. This study group conducted the first nation-wide survey for constrictive type of BO in 2003. The report in 2004 showed that only 23 cases were collected in detail review, which were pathologically diagnosed by surgical lung biopsy. The report indicated that this rare condition causes diagnostic difficulty by simulating other airway obstructive diseases. As 7 years passed from the first survey, we have planned to conduct the second-nation wide survey for constrictive type of BO in 2011. Cases were surveyed from April 2011 through May 2011 at 1815 hospitals. 477 patients were reported, in which 19% of patients were diagnosed pathologically. We will start to collect detail information as a secondary case reviewing.

研究の背景

閉塞性細気管支炎は、特発性もしくは様々な原因により、細気管支領域における包囲性狭窄や細気管支内腔の閉塞をきたす疾患である。最終的に細気管支の不可逆的閉塞をきたし呼吸不全となり、著しく日常生活を損なう疾患である。稀な疾患と考えられていたが、骨髄移植や心肺移植などの移植医療に伴う閉塞性細気管支炎の合併が報告され、新たに注目を集めている疾患である。病因は不明であり、診断は困難である。確立された治療法はなく、予後不良の疾患である。以上の背景から、これまで世界的に見ても閉塞性細気管支炎症例を集積した研究は限られており、診断の手引きも存在しない。我が国においては、いち早く厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業：びまん性肺疾患調査研究班)において、2003年～2004年に我が国初のアンケート全国調査を実施した。また、厚生科学研究費補助金により原因探索のため動物モデルや細胞を用いた研究を推進してきた。しかし、病理組織においても診断が困難であること、疾患概念が呼吸器内科専門医においても普及していないことから、アンケート調査では、病態・診断基準を示すに足る情報解析が出来なかった。本研究課題では、閉塞性細気管支炎の診断の手引きとなる情報収集を目的として全国から症例を集積し、専門家による複数の臨床医・画像診断医・病理医からなるチームによる詳細な症例解析を実施する。最終的に症例解析集を作成し、診断の手引きとすることを目的とする。

研究の目的

本研究は閉塞性細気管支炎の全国調査研究を実施することにより、我が国における本疾患の病態ならびにその実態を明らかにし、今後の閉塞性細気管支炎の病態・治療研究構築のための基礎データとすることを目的とする。その際に、画像診断、肺機能検査を含めた検査所見を詳細に集積、解析するために、可能な症例については検査の追加を計画する。さらに、専門家チームによる詳細な症例解析を実施し、最終的に症例解析集を作成し、診断の手引きとすることを目的とする。また各症例の治療状況などもあわせて解析し現在の治療成績、予後、新たな治療の

可能性を探ることも行う。本年度は、症例スクリーニングを目的とした一次アンケートを計画した。

対象と方法

一次アンケート(スクリーニング)

目的：全国の医療機関に対してアンケートを送付し閉塞性細気管支炎またはその疑いがある症例(主治医診断、基礎疾患は問わない)について、データ収集の研究協力の可否を問う。

方法

(1) 研究の種類

後ろ向き症例集積疫学研究

(2) 調査方法

アンケート調査による症例スクリーニング

(3) 調査のアウトライン

1. 準備：疫学研究に関する倫理指針(文部科学省・厚生労働省平成14年6月17日)に従って、倫理審査委員会の承認を得た(名古屋大学倫理委員会承認2010年11月15日 承認番号1095)。
2. 閉塞性細気管支炎全国調査データ解析センター本部の設置：名古屋大学医学部内にデータセンターを置き、以後のアンケート結果あるいは症例データの集積をここで行う。
3. 1次アンケートの作成と発送：全国医療機関への手紙による1次アンケートを実施し、症例のスクリーニング調査を行い、調査協力を依頼する。ここでは閉塞性細気管支炎症例を広くスクリーニングすることを目的とし担当医が閉塞性細気管支炎を疑う症例を広く集積し調査協力を依頼する。症例は2004年以後に該当する症例とし、前回調査時の2003年以後の症例を対象とする。2003年に集積した症例については再調査を行わない。

結 果

- 1) 全国1815病院にアンケートを送付した。
- 2) 595部門から回答があり、症例なしが445部門、症例有りが150部門であった。
- 3) 病理学的に確定診断された症例が93例、臨床診

(一次アンケート調査票)

貴施設名・診療科名：

御担当者：

御住所：(〒)

TEL:

FAX:

E-mail:

記入年月日： 201 年 月 日

貴施設／貴診療科で経験された閉塞性細気管支炎の患者数についてお答えください
(概略で結構です)。

- 1 病理学的に確定診断された閉塞性細気管支炎症例がございますか？
現在通院中または入院中 人
過去に通院または入院していた 人

- 2 臨床的に閉塞性細気管支炎(疑い含む)と診断されたが病理診断はついていない
症例がございますか？
現在通院中または入院中 人
過去に通院または入院していた 人

- 3 上記で閉塞性細気管支炎の症例の経験ありと答えられた施設の先生にお尋ねし
ます。

各症例についての血液、病理、画像データなどの詳細な調査にご協力いただけ
ますでしょうか？(患者あるいは親族の方の同意が必要です。ご協力いただけ
る場合には研究協力者として貴施設の倫理委員会に承諾をいただく必要があり
ますが、準備書類や同意書等は当方にて準備いたします。)

協力できる 協力できない
条件つきなら協力できる(具体的に下にお書きください)

表1

	第1回全国調査(2003年)	第2回全国調査(2011年)
送付先	1118 施設	1815 施設
症例発生期間	2003年以前	2004年～2011年
回答機関数	505	595
BO 症例あり	133 部門 (287 症例)	150 部門 (477 症例)
病理診断例	105 例	93 例
臨床診断例	182 例	384 例
協力可能施設		69/150 部門
協力施設における病理診断例	23 例	60 例
協力施設における臨床診断例	21 例	186 例

断例が384例であった。

- 4) 150部門の中で詳細な2次症例調査研究に協力可
能と回答が69部門から得られた。
5) 協力可能と回答した69部門における症例の内訳
は、病理による確定診断60例、臨床診断例186例
であった。

考察・結論

表1に第1回全国調査(2003年)と今回の調査結果
を比較した結果を示す。前回は症例発生期間を定め
なかったが、今回は2004年からの7年間という期間
に限定して調査を実施したが、BO症例の合計は
287例から477例と大幅に増加した。このことは、

BOに対する疾患認識が2003年の時点から比較すると明らかに向上していることを推測させる。内訳を見ると、臨床診断例が182例から384例と増加しているが、病理診断例は105例から93例へ減少してみえる。臨床診断例の増加は、BOに対する疾患認識の向上という側面と、反面で以前より指摘されている病理的確定診断の困難さを示している。しかし、7年間の限定された期間に93例が病理的確定診断されていることから、やはり疾患に対する理解は向上

してきていると考えられる。

次年度は、2次調査に協力の承諾を得られた69部門(246例)の中で、病理診断が得られている60症例について、症例を集積し、複数の臨床医・画像診断医・病理医からなるチームによる症例解析を予定する。最終的な症例解析集の作成は、国内・国外でも例が無く、我が国における今後の疾患疫学調査の基準となり、患者数の把握など今後の疫学研究に必要であるとする。

びまん性汎細気管支炎に関連する ムチンの遺伝的多型の研究

土方美奈子¹ 松下 育美¹ 野口 智史¹ 本間 栄^{2*}
田口 善夫^{3**} 吾妻安良太^{4*} 工藤 翔二⁵ 慶長 直人^{1**}

びまん性汎細気管支炎 (DPB, diffuse panbronchiolitis) は、東アジア系集団にみられる HLA class I 関連疾患である。6 番染色体 HLA 領域の DPB 疾患感受性候補領域の中には、我々がクローニングした 2 つの新規ムチン様遺伝子 *PBMUCL1* (*MUC22*), *PBMUCL2* (Hijikata *et al.* Hum Genet 2011) と、*DPCRI*, *MUC21* のあわせて 4 つのムチン(様)遺伝子がクラスターを形成している。*PBMUCL1* (*MUC22*) には、DPB と関連する遺伝的多型が複数存在し、その一部はヨーロッパ系集団ではみられない多型であった。また、11 番染色体のムチン遺伝子クラスターの中の、気道の主要な分泌型ムチン *MUC5B* のプロモーター領域に、我々は DPB 抵抗性に関連する 2 塩基欠失多型を見いだしている (Kamio *et al.* AJRCCM 2005)。一方、ヨーロッパ系集団において、*MUC5B* プロモーター領域に、肺線維症と関連する別の遺伝的多型が報告された (Seibold *et al.* NEJM 2011)。今年度、我々は *MUC5B* の遺伝的多型の DPB 関連解析、ハプロタイプ解析を行い、ヨーロッパ系集団での頻度との比較を行った。その結果、*MUC5B* 領域の遺伝的多型のうち、DPB と有意に関連するものが複数見いだされたが、一番強い関連を有するのは 2 塩基欠失多型で、Seibold らの報告した肺線維症関連アリルは日本人では認められなかった。また、多型のアリル頻度、ハプロタイプ構造及びその頻度ともに、日本人とヨーロッパ系集団では大きく異なることがわかった。アジア人の DPB 疾患感受性、抵抗性に関わる遺伝的多型は、アジア人固有のものである可能性が示唆された。

¹ 独立行政法人国立国際医療研究センター 研究所
呼吸器疾患研究部

² 東邦大学 呼吸器内科

³ 天理よろづ相談所病院 呼吸器内科

⁴ 日本医科大学 内科学(呼吸器・感染・腫瘍部門)

⁵ 複十字病院

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

A. 研究目的

びまん性汎細気管支炎 (DPB, diffuse panbronchiolitis) は、東アジア系集団にみられる HLA class I 関連疾患である。日本人では HLA-B54 との関連が非常に強いことはいくつかの報告で確認されているのに対し (Sugiyama *et al.* ARRD 1990, Keicho *et al.* AJRCCM 1998), 韓国人では HLA-B54 との関連はなく、かわりに HLA-A11 との関連が強いとされた (Park *et al.* AJRCCM 1999)。このことから、HLA そのものが DPB に関連しているのではなく、HLA-B 遺伝子座と HLA-A 遺伝子座の間に DPB の疾患感受性遺伝子が存在するという仮説がたてられ、マイクロサテライトマーカーなどの遺伝マーカーを用い、候補領域はおおよそ *S* 遺伝子から *TFIIH* 遺伝子までの 200kb までせめられた (Keicho *et al.* Am J Hum Genet 2000)。我々は候補領域内で新規遺伝子のクローニングを試み、2つのムチン遺伝子 (*PBMUCL1*, *PBMUCL2*) をクローニングして報告した (Hijikata *et al.* Hum Genet 2011)。*PBMUCL1* は HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) により mucin22 (*MUC22*) という遺伝子名も与えられた。既に報告されている *DPCR1* 遺伝子と *MUC21* 遺伝子をあわせると、候補領域内は4つのムチン(様)遺伝子がクラスターを形成していた。*PBMUCL1* (*MUC22*) には、DPB と関連する遺伝的多型が複数存在した。

また、我々は気道の主要な分泌型ムチンである *MUC5B* のプロモーター領域に、DPB 抵抗性に関連する2塩基の欠失多型 (CA/-) を見だし、この欠失多型を有するハプロタイプのプロモーターが、他の配列より転写活性が低いことをレポーターアッセイで見いだした (Kamio *et al.* AJRCCM 2005)。最近、Seibold らは、ヨーロッパ系集団において、*MUC5B* プロモーター領域に肺線維症と関連する別の遺伝的多型を報告し、この感受性アリルを有するものは肺での *MUC5B* 遺伝子発現が多いことが示した (Seibold *et al.* NEJM 2011)。

今年度、我々は日本人 DPB 患者と健常コントロールにおいて、上記 Seibold らにより報告された肺線維症関連多型および HapMap データベースから得られた *MUC5B* のタグ SNP のタイピングを行い、ヨーロッパ系集団との比較を行いつつ、関連解析、ハプロタイプ構造の解析を行った。

B. 研究方法

日本人 DPB 患者 92 例、日本人健常コントロール 128 例のゲノム DNA を用いた。ヨーロッパ系集団のコントロールとして、NIGMS Human Variation Panel (HD50CAU of Caucasian individuals - Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ) 50 例を用いた。*MUC5B* 領域のタグ SNP の選定は、HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.ja>) からアジア人 (CHB および JPT) genotype データを抽出し、Haploview4.2 を用いて行った。プロモーター領域、central exon (exon 31), 3' 側にてでタイピングした。

(倫理面への配慮) 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した当センターの遺伝子解析に関する倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

(1) 肺線維症関連多型の日本人でのタイピング

表1に示すように、Seibold らにより報告された肺線維症関連 rs35705950 の T アリルは、日本人 DPB 患者、コントロールともに全く認められなかった。一方で、我々が報告した DPB 抵抗性のプロモーター 2 塩基欠失多型 (rs17235353) は、ヨーロッパ系集団では稀であり、これらの2つの遺伝的多型は人種特異的に分布することが示唆された。

(2) *MUC5B* 領域の遺伝的多型の関連解析

HapMap から選んだ7個のタグ SNP (内2個は $r^2 > 0.8$)

表1 肺線維症関連 rs35705950 の日本人 DPB 患者とコントロールでの遺伝子型

rs35705950 G/T

TCCTTCCTTTATCTTCTGTTTTTCAGC [G/T] CCTTCAACTGTGAAGAGGTGAATC						
Genotype	DPB (n=92)		Control (n=128)		Europeans (n=50)	
G/G	92	(100%)	128	(100%)	37	(74%)
G/T	0	(0%)	0	(0%)	13	(26%)
T/T	0	(0%)	0	(0%)	0	(0%)

rs17235353 CA/-

GCATGGCCAGGAGACTCTGGGCT [CA/-] GTTCCCTTGAATGTGAACCTTGA						
Genotype	DPB (n=92)		Control (n=128)		Europeans (n=50)	
CA/CA	73	(79%)	70	(55%)	49	(98%)
CA/-	18	(20%)	51	(40%)	1	(2%)
-/-	1	(1%)	7	(5%)	0	(0%)

表2 MUC5B多型のDPB関連解析

SNP	MAF (minor allele frequency)					
	DPB (184 alleles)	Control (256 alleles)	P value	Caucasians (100 alleles)		
1 rs35705950	G/T	5'near	0.000	0.000	0.130	
2 rs885454	G/A	promoter	0.217	0.340	0.005	0.110
3 rs17235353	CA/-	promoter	0.109	0.254	0.0001	0.010
4 rs7118568	G/C	promoter	0.473	0.387		0.100
5 rs2735738	C/T	promoter	0.391	0.480		0.240
6 rs2943528	T/G	exon31	0.130	0.133		0.110
7 rs4963031	C/T	exon31	0.033	0.008		0.240
8 rs2943512	C/A	exon31	0.198	0.301	0.02	0.410
9 rs11040869	G/A	3'near	0.125	0.238	0.003	0.010

表3 日本人とヨーロッパ人で推定されるハプロタイプとその頻度 (SNP番号は表2に対応, 5%以上推定されるものを示す.)

			DPB									Control	permutation* P value
			1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Japanese	JPN_H1 (EUR_H3)	G	G	I	G	C	T	C	C	G	0.417	0.343	P=0.01
	JPN_H2 (EUR_H1)	G	G	I	C	T	T	C	C	G	0.239	0.207	
	JPN_H3	G	A	D	C	T	T	C	A	A	0.090	0.183	
	JPN_H4 (EUR_H5)	G	A	I	C	C	G	C	C	G	0.088	0.094	
European	EUR_H1 (JPN_H2)	G	G	I	C	T	T	C	C	G		0.340	
	EUR_H2	G	G	I	C	T	T	T	A	G		0.209	
	EUR_H3 (JPN_H1)	G	G	I	G	C	T	C	C	G		0.100	
	EUR_H4	T	G	I	C	T	T	C	A	G		0.099	
	EUR_H5 (JPN_H4)	G	A	I	C	C	G	C	C	G		0.090	
	EUR_H6	G	G	I	C	T	T	C	A	G		0.061	

*number of permutations 1,000,000

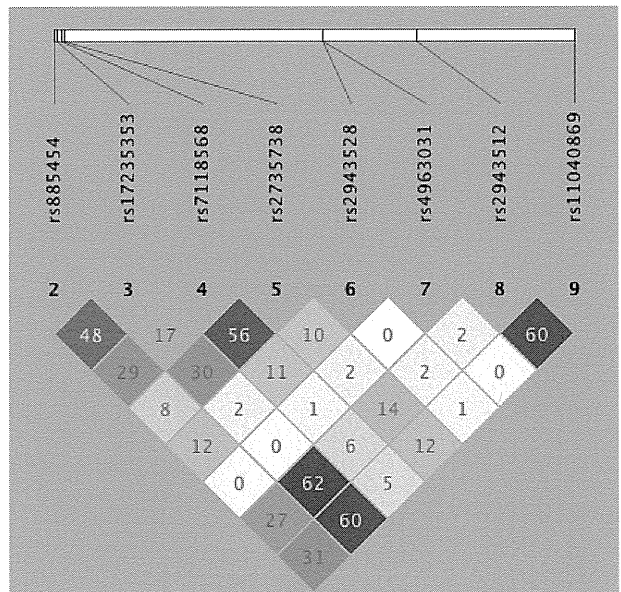
の別SNPで代用)をPCRダイレクトシーケンス法によりタイピングした。日本人DPB患者・健常コントロール, ヨーロッパ集団における頻度を, (1)に記載した2多型とあわせ, 表2にまとめて示す。

DPBと有意な関連を有する多型は, プロモーター領域から遺伝子3'側に存在するrs11040869までMUC5B遺伝子領域全体で認められたが, 一番強い関連を有するものは既報のプロモーター2塩基欠失多型(rs17235353)であった。他のDPB関連多型は, rs17235353と緩い連鎖不平衡状態にあった(図1)。よって, 機能的に意味のある多型は, 我々が既に報告した低発現に関わるプロモーターのrs17235353だと考えられた。また, 日本人でのアレル頻度と, ヨーロッパ系でのアレル頻度が大きく異なる多型が複数存在した。

(3) ハプロタイプ構造解析

アジア人とヨーロッパ人で上記のようにアレル頻度が大きく異なる多型があり, 両者でハプロタイプ構造とその頻度を検討した。その結果, 表3に示すように, 日本人とヨーロッパ人では推定されるハプロタイプとその頻度は大きく異なっていた。

図1 日本人のMUC5B領域遺伝的多型の連鎖不平衡の状態(r²)



D. 考案

DPB疾患感受性候補領域内に新しくクローニングしたムチン遺伝子PBMUCL1(MUC22)は, HLA領域に存在しており, その遺伝的多型はHLA型と連

鎖不平衡状態にあるものもあり、人種特異性があることが想定されるが、今年度我々が検討した11番染色体のムチン遺伝子クラスター内の気道の主要な分泌型ムチンのひとつである *MUC5B* の遺伝的多型も、アジア人とヨーロッパ人で頻度が大きく異なることがわかった。

肺線維症関連 rs35705950 は、転写開始点より約 3kb 上流にあり、我々が DPB との関連を示した rs17235353 (転写開始点より約 650 塩基上流) とは位置が大きく異なっている。周囲の遺伝的多型のタイピングをすすめて、連鎖不平衡 (LD) ブロックの構造の解析を行い、肺線維症関連 rs35705950 が別の LD ブロックに含まれる可能性を検討する必要がある。

また、我々が見いだしたプロモーター 2 塩基欠失多型は DPB 抵抗性に関わっており、アジア人固有の DPB 感受性に関わる遺伝的多型は今年度の検討では見いだされなかった。今回対象とした多型は、全長 40kb にわたる *MUC5B* 遺伝子のうち、プロモーター領域、中央のエクソン 31、3' 側の限られた狭い領域のものであり、今後さらに検討が必要であると考えられた。

E. 結論

気道の主要な分泌型ムチンのひとつである *MUC5B* 遺伝子に、DPB に関わるアジア人固有の多型が見いだされた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Keicho N, Hijikata M. Genetic predisposition to diffuse panbronchiolitis. *Respirology*. 2011 May;16(4):581-8.

2. 学会発表

Minako Hijikata, Ikumi Matsushita, Hideyuki Ito, Jun Ohashi, Sakae Homma, Yoshio Taguchi, Arata Azuma, Shoji Kudoh, Naoto Keicho. Genetic analysis of two novel mucin-like genes in the disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *European Respiratory Society Annual Congress 2011*.

H. 知的財産権の出願・登録状況