

1. 研究の概要、成果の概要

①研究概要

「日本人ゲノムの多型情報の集積と多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子の同定に関する研究」

(H11年度～H15年度)

平成13年度予算額：2.4億円

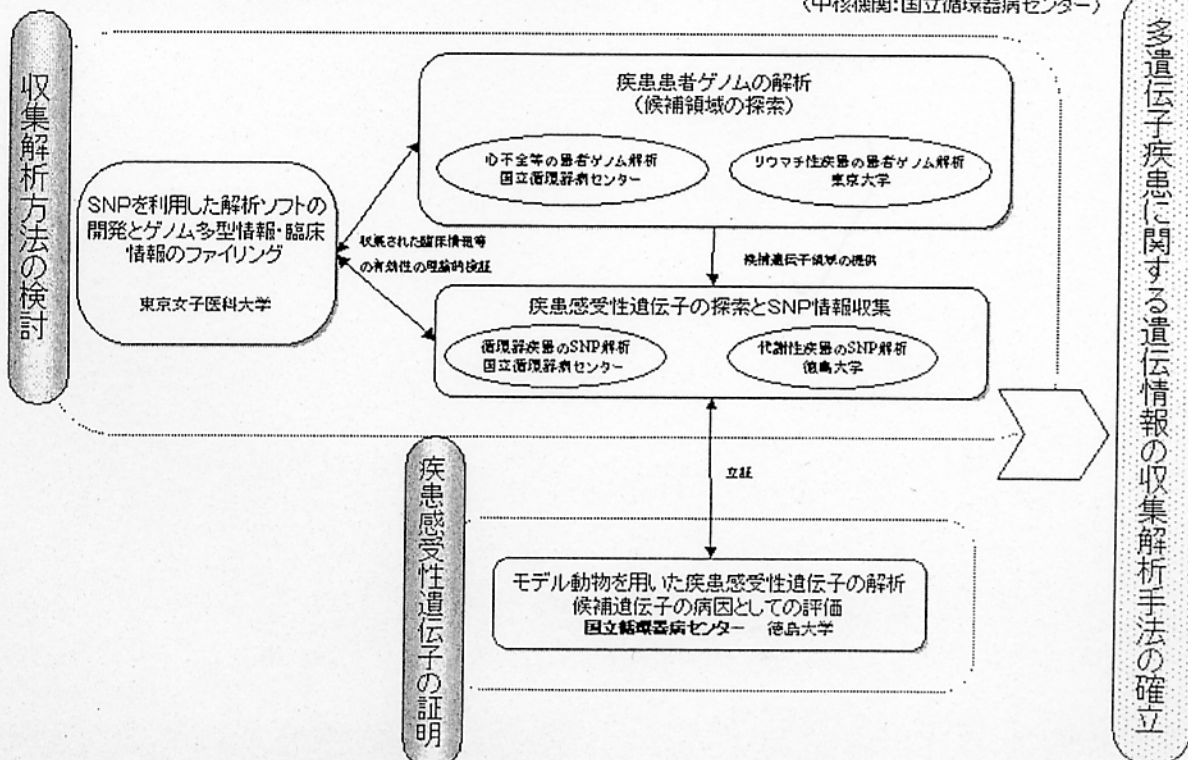
研究代表者：板倉 光夫（徳島大学） 研究体制：国立循環器病センター（中核機関）他3機関

研究の概要・目標	諸外国等の現状	研究進展・成果がもたらす利点
<p>1 何を目標しているのか 日本人ゲノムのSNP情報を有効に活用して、多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子を同定するために必要なサンプル収集・解析手法の構築を行う。</p> <p>第I期の目標： ●モデル疾患（心不全等）のSNP情報を用いた、多遺伝子性疾患の遺伝子の解析技術を開発する。 第II期の目標： ●さらに集積されるSNP情報に対応した、汎用性のある解析技術として確立する。</p> <p>2 何を研究しているのか ・SNP情報と疾患との関連を解析する手法の開発 ・モデル動物を用いた疾患感受性遺伝子の病因としての評価。</p> <p>3 何が新しいのか 今までのゲノム多様性情報より、桁違いに数の多いSNP情報を利用することができる正確で効率的な解析技術の確立が新しい。また、SNP情報解析に耐えうる臨床データを患者サンプルと共に集積する方法を模範例にまで確立することが新しい。</p> <p>SNP：一塩基多型、ゲノム上に数多く存在するため、疾患に関わる遺伝子を見つけるマーカーとして有用。また、薬の感受性の診断にも利用できるといわれる。 多遺伝子疾患：複数の遺伝子の効果によって発症する疾患 疾患感受性遺伝子：病気の原因遺伝子ではないが、病気のなりやすさを決めている遺伝子。</p>	<p>1 現状及び我が国の水準 昨年から世界的にSNP情報の重要性が認識されはじめ、欧米では、積極的にSNP情報の収集を進めはじめているところであるが、SNP情報を利用して多遺伝子疾患の感受性遺伝子を明らかにするための方法について、効率的な技術はいまだ確立されていない。</p>	<p>1 世界との水準の関係 世界に先駆けSNP情報の効率的な解析技術確立することにより、疾患感受性遺伝子の同定において、その差を縮めることが期待される。</p> <p>2 波及効果 疾患感受性遺伝子を明らかにするために必要な条件と解析方法が確立されることにより、他の多遺伝子疾患の研究に応用できる。</p>

②研究体制

日本人ゲノムの多型情報の集積と多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子の同定に関する研究

（中核機関：国立循環器病センター）



## ③所要経費

科学技術振興調整費 ゲノムフロンティア開拓研究推進制度

「日本人ゲノムの多型情報の集積と多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子の同定に関する研究」  
所要経費一覧

研究項目	研究担当機関（研究担当者）	所要経費
1. 日本人SNPの収集と疾患感受性遺伝子の探索		
(1) 日本人SNPの収集		
①循環器疾患の疾患感受性候補遺伝子を中心とした日本人SNPの収集と多型解析	厚生労働省国立循環器病センター (森崎隆幸)	171,449
②代謝性疾患の疾患感受性候補遺伝子を中心とした日本人SNPの収集と多型解析	徳島大学ゲノム機能研究センター (板倉光夫)	203,193
③各種疾患発症リスクとしての肥満に関係するY染色体における日本人SNPの収集と多型解析	徳島大学医学部(中堀豊)	6,109
④疾患原因としての遺伝子塩基トリプレットリピートの伸長に関連する日本人SNPなどゲノム多型の収集と解析	徳島大学ゲノム機能研究センター (塩見春彦)	6,211
(2) 各種疾患患者のゲノム情報の収集		
①血管調節障害に基づく疾患の患者ゲノムの収集と病因解析	厚生労働省国立循環器病センター (岩井直温)	12,331
②心不全を中心とした患者ゲノムの収集と病因解析	厚生労働省国立循環器病センター (駒村和雄)	12,132
③リウマチ性疾患を中心とした患者ゲノムの収集と病因解析	東京大学医学部(竹内二士夫)	57,404
(3) ゲノム多型情報と臨床情報のデータベース化と解析方法の確立	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター(鎌谷直之)	46,244
2. モデル動物を用いた疾患感受性遺伝子の解析		
(1) 遺伝子改変動物を用いた疾患感受性遺伝子の解析		
①モデル動物を用いた機能不全の遺伝子解析	厚生労働省国立循環器病センター (重川宗一)	11,946
②モデル動物を用いた心血管病変進展に関わる遺伝子解析	厚生労働省国立循環器病センター (横山知永子)	11,883
③免疫不全モデル動物を用いた遺伝子解析	徳島大学ゲノム機能研究センター (高浜洋介)	10,924
3. 研究推進		3,778
合 計		553,604

#### ④研究成果の概要

- (1) ABI377 DNAシーケンサーを用いたMF-PCR-SSCP法とdHPLC法によるSNPのスクリーニング法を確立し、効率よく新規SNPを探索し、合わせて、比較的高頻度なSNPを選択可能な体制が完成した。MF-PCR-SSCP法については、ABI377 DNAシーケンサー用のオートローダーを開発し、96サンプル/ゲルの分析、さらに、1レーンに3サンプルをロードすることにより288試料/ゲルを高速で行うことができ、SNPsと変異の検出が可能となった。対象疾患および既存の遺伝子情報をもとに遺伝子の座位も参考にしながら候補遺伝子を選定し、その翻訳領域を中心とするエキソン周辺ならびに発現制御領域（プロモーター領域など）を中心とした解析対象領域を選定して、当該領域におけるSNPs収集を上記スクリーニング法によって行った。30を越える遺伝子について総計500ヶ所以上のSNPsを同定し、同定した時点においてはこれらの大半は報告のない新規のSNPsであった。収集されたSNPsについての特徴を明らかにすることができた。日本人を対象にSNPsの収集を行い、日本人ゲノム多型の特徴について解明する目的で他の人種集団との比較を行ったところ、SNPsの人種集団による特異性が明らかとなった。SNPsを中心とした日本人ゲノム多型の連鎖不平衡LDの程度については、日本人は他の人種に比較してややLDの程度が強く、モデル遺伝子領域ではおおむね4-50キロベースに及ぶLDの存在が示された。同程度のLDを示す場合でも集団が異なる場合には多型相互の関係は必ずしも維持されておらず、解析対象集団におけるLDの検討が重要であることが示された。得られたSNPsゲノム多型情報を基に、個人遺伝型ハプロタイプ解析の有用性の検討を開始し、疾患感受性遺伝子候補について遺伝子型解析を行っており、モデル遺伝子において、その遺伝子の疾患感受性遺伝子としての評価を行うべく、患者検体とコントロール検体を用いて遺伝子型解析を進めている。
- (2) 産生過剰型痛風に関する5つの候補遺伝子のイントロン・エキソン構造を明らかにし、産生過剰型痛風患者約200名と健常対照者約100名を対象としてSNPsを収集し、さらに関連解析によりPRPS1 プロモーター、PRPSAP1のイントロンに存在するSNPsに関して、両群間で有意差を認める結果を得ている。糖尿病患者に関して既に約400名の末梢血から抽出したゲノムDNAサンプルを収集した。さらに末梢血Bリンパ球のEBウイルスによる不死化を、糖尿病患者1000名、また健常者500名を目標に収集を開始している。若年性家族性痛風性腎症家系内の罹患者と非罹患者を対象とし、343のマイクロサテライトマーカーを用いて原因遺伝子の座位を検索し、16pの約30cMの領域内をさらに12個のマイクロサテライトマーカーを加えて検索し、2点解析ロッドスコアが6.04 ( $\theta=0$ )、多点解析ロッドスコアが6.14の座位を特定した。さらに、この領域のBACによるゲノム塩基配列とマイクロサテライトを抽出、整理し、この家系内の患者にのみ認められる変異を抽出し、この変異がこの疾患の原因であるか否かを検討中である。我が国の慢性関節リウマチ罹患者の罹患者同胞対を含む55家系を対象として、全ゲノムにわたって358のマイクロサテライトマーカーを用いて解析を推進中であり、約70%の解析を終了した時点でロッドスコア1.5以上の座位を4箇所認めている。今後さらに解析を進めていく。C57BL6/KsJの遺伝的背景を有し糖尿病を自然発症するdb/dbマウスをC3Hマウスに交配したF2マウスを用いて、糖負荷試験、血清中インスリン濃度等の定量的表現型と遺伝型との関連をQuantitative Trait Loci (QTL)解析で検討した。約400匹のF2マウスの解析でLODスコアが4以上の4箇所以上の候補座位を明らかにした。
- (3) Y染色体上の100種類のSTS (sequence tagged site) を使い、DHPLC法やSSCP法などにより、日本人集団におけるY染色体多様性の研究を行った。DHPLC法により従来法では解析が困難であった座位を識別することが可能となり、ハプロタイプ特異的なY染色体構造を探索する上で有用であった。2種類の新規SNPs候補が見出されたが、いずれもY染色体上に複数箇所存在する座位であるためか、塩基配列の決定は困難であった。しかし、現在までに日本人集団のY染色体を6種類のハプロタイプへの分類が行え、さらに現在Y染色体上に存在する遺伝子のプロモーター領域を中心としたDNA多型解析を進めている。また、ハプロタイプ特異的なゲノム構造の違いも見出しており、解析を進めている。
- (4) 脆弱X遺伝子FMR1内に存在するCGGリピートをモデルに、リピート伸長に関連するゲノム多型を同定することを目的し、罹患者群と健常者群におけるFMR1座位近傍の単一ヌクレオチド多型 (SNPs) を収集しているが、まず日本人脆弱X症候群家系の収集を行っている。鳥取大学遺伝子実験施設の難波榮二博士との共同研究にて、現在までに900例以上の精神遅滞患者を検討し、10名以上の脆弱X症候群患者を見いだした。これら患者およびその家族から検体を採取し、EBウイルスによりリンパ芽球を樹立し、同時にFMR1遺伝子のSNPs収集を開始している。また、コーカサス人においてCGG

リピートの伸長と相関のあるSNPとして同定されたATL1 (A/G)の日本人での頻度を検討を開始している。

- (5) 血管調節障害に関して、住民集団の4000人余りについて13種類の遺伝子に関する研究について施設内倫理委員会の承諾を得、平成13年度は、候補遺伝子として、アミロライド感受性ナトリウムチャンネル・ $\gamma$ サブユニット(SCNN1G)、アルデステロン合成酵素(CYP11B2)、ALDH2遺伝子を対象とした。SCNN1Gのプロモーターに4種類、エクソン領域に6種類のSNPを見出した。各SNPの連鎖不平衡の程度より、exon3のT474C及び、プロモーターのG(-173)A変異を選び、4000人の遺伝型をTaqMan法を用いて決定した。A(-173)アレルの出現頻度は8.5%と低頻度ながら、この遺伝型を持つ者に低血圧が高頻度に認められた。プロモーター領域を用いたリポーターアッセイにて、A(-173)遺伝型の転写活性がG(-173)遺伝型の転写活性よりも低い事が認められ、SCNN1Gの発現低下が、ナトリウム再吸収低下につながり低血圧を発症するメカニズムが考えられた。CYP11B2と高血圧の関連は認められなかったが、ALDH2遺伝型は、アルコール摂取量に大きな影響を及ぼし、wild type 遺伝型を持つ男性で大量飲酒者が多く、結果高血圧を持つ者の割合も有意に高かった。男性ではALDH2遺伝型はアルコール摂取行動を支配することから高血圧の発症に関与するものと考えられた。
- (6) 心機能不全(心筋症)患者77名より、ゲノムDNAを用いた研究に関する承諾を文書で再取得し、塩基配列決定を行い、 $\beta$ ミオシン重鎖ならびにトロポニンT遺伝子に関し、ミスセンス変異を12名に、翻訳領域のSNP5種を1~61名に見いだしたが、心筋症臨床病型との関連は見いだせなかった。
- (7) 全国に協力医師を確保し、正常人100例のDNA、兄弟発症慢性関節リウマチ、痛風の家系サンプルからのDNA採取を行った。RA53家系については完了し、痛風については継続中である。RA患者臨床データベースをほぼ完了した。家系サンプルのマイクロサテライト多型スクリーニングを継続中である。正常コントロールのマイクロサテライト多型の一次スクリーニングはほぼ完了した。基礎データとなる正常人多型頻度及びheterozygosityのdataが得られた。慢性関節リウマチ患者のHLADRタイピングを行い相関を家系例で検討し、DRは優性に作用し、Lod値は0.8であった。又、DRの関与は家系例、非家系例でも同等であった。慢性関節リウマチ患者の解析で、Lod値1.5以上を示す5つの候補領域が明らかにでき、この5つの疾患感受性遺伝子候補遺伝子(領域)をTIRAI-5と名付けた。
- (8) 多型データをMAPMAKER/SIBで分析する際に必要なデータ処理法を考案した。疾患感受性遺伝子(マーカー)を相関分析するためのランダムサンプルの収集を開始し、継続中である。SNP分析法の基礎検討をいくつかのgeneについて行った。連鎖不平衡の尺度(例えばD)の信頼区間を以下のように計算する方法を編み出し、それを算出するためのプログラムを作成した。これは、周辺分布のパラメータによりセル内の度数分布がある分布となる確率が超幾何分布をすることを利用するものであり、母数であるxの値を少しずつ変える事により、サンプル統計量の得られる確率を算出し、95%信頼区間を計算する。これを用いて、実際にモデル遺伝子(SAA遺伝子、NAT2遺伝子、smoothelin遺伝子)のデータ解析に用いた。その結果、本方法は極めて協力で、実際のデータ分析に有効に用いることができることが証明され、これらの遺伝子内の多型に強い連鎖不平衡があることが明らかとなった。さらに、今回、多元分割表における独立性の検定を、Markov Chain Monte Carlo法(以下MCMC法)を用いて行うことにより連鎖不平衡の検定を行うプログラムを開発し、二つのMCMCのサンプラー(Metropolis-HastingsサンプラーおよびGibbsサンプラー)の両者とも同様の有効性が証明された。このプログラムを用いて、SAA遺伝子の疾患と関連が疑われる変異は多数あったが、我々のプログラムによりプロモータの-13Tが原因の変異であることが明らかとなり、本プログラムが強力な方法であることが証明された。
- (9) 心筋症および正常型ハムスター骨格筋培養細胞の種々の性状を比較した結果、心筋症ハムスターでは、伸展刺激の強度に依存して開口確率が増加する比較的特異性の低い陽イオンチャンネルが活性化されており、これを介して細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入が増大していること、また、一定レベル以上の同じ伸展刺激に対して細胞質CPKが培養上清へ遊離されることなどを見出した。こうしたモデル実験系が原因遺伝子欠損に伴い特異的に発現変化遺伝子の検索や、検索された遺伝子の心筋症との関連性の評価など、今後の解析に利用できることが示された。心筋症および正常型ハムスター作成した骨格筋培養細胞モデル実験系からサブトラクションcDNAを調製し、心筋症ハムスター心臓で発現が増加しているクローンを選択し、約30種類の遺伝子を同定した。また、種特異性の問題を回避し、

また、発現系の構築を迅速に行うために、翻訳領域全体を含む正規化cDNAのアレイライブラリーを作成し、検索を行っている。

- (10) マウスPGIおよびTX合成酵素遺伝子を単離し、酵素活性部位を欠失させたノックアウトマウスを作製し、遺伝子背景を均一化した。PGI合成酵素遺伝子欠損マウスはPGI<sub>2</sub>産生が完全に阻害されており、PGI<sub>2</sub>と同様にPGI<sub>2</sub>から産生されるTXやPGE<sub>2</sub>の産生増加が認められた。PGI欠損マウスの表現型を解析した結果、加齢に伴い血圧の上昇と腎臓に形態変化を伴う異常を発症し、腎動脈に動脈硬化様の内膜肥厚や狭窄、中膜平滑筋層の肥厚が観察され、血管障害、特に腎血管の狭窄による虚血性腎症のモデルマウスとしての可能性が示唆された。DNAマイクロアレイを用いた解析で、細胞外マトリックス、細胞接着因子などに関与する遺伝子の変化する可能性が認められた。一方、TX合成酵素遺伝子欠損マウス、PGIおよびTX両酵素過剰発現マウスの作製に着手し、ほぼ完了している。
- (11) 2種類のモデル動物を用いて、免疫病をもたらすゲノム素因の解析を進めているが、ヒトCD3εトランスジェニックマウスでは胸腺でのTリンパ球分化が初期停止する重症免疫不全モデルを見出し、この異常をもたらす遺伝的原因を、挿入ゲノム部位のクローニング及びDNAチップによる遺伝子発現プロファイル解析から進めている。細胞質内キナーゼASK1の欠損変異マウスでは、全身性自己免疫疾患様の皮膚症状がひきおこされ、ASK1の免疫病発症における関与が明らかになった。Stat3の胸腺上皮細胞特異的欠損マウスにより、胸腺器官構築の維持に胸腺上皮細胞のStat3が関与することが明らかになった。免疫病をもたらす遺伝要因を網羅的に明らかにするために、順遺伝学的スクリーニングの可能な小型魚類メダカを用いて胸腺Tリンパ球につき変異体のゲノムワイドスクリーニングを開始した。

#### ⑤研究成果公表等の状況

##### 【研究成果発表等】

	原著論文による発表	左記以外の誌上発表	口頭発表	合計
国内	2 件	66 (6) 件	93 件	161 (6) 件
国外	45 (8) 件	7 件	14 (1) 件	66 (9) 件
合計	47 (8) 件	73 (6) 件	107 (1) 件	227 (15) 件

(注：既発表論文について記載し、投稿中の論文については括弧書きで記載)

【特許出願等】 0 件 (国内 0 件、国外 0 件)

【受賞等】 2 件 (国内 1 件、国外 1 件)

平成12年 8月 米国Cure Autism Now Foundation Pilot Research Award 塩見春彦

平成12年11月 日本免疫学会賞 高浜洋介

【主要雑誌への研究成果発表】

Journal	Impact Factor	サブテ-71	サブテ-72	合計
Immunity	20.563		1	20.563
J. Clin. Invest.	10.921	1		10.921
Proc. Natl. Acad. Sci. USA	10.260		1	10.260
J. Biol. Chem	7.666	2		15.332
J. Immunol	7.145	1	2	21.435
Arthritis & Rheumatism	7.054	1		7.054
J. Clin. Endocrinol. Metab	5.805	1		5.805
Diabetol	5.177	2		10.354
Hypertension	4.913	2		9.826
Am J Physiol Cell Physiol.	3.485		1	3.485
Eur. J. Biochem.	3.307	1		3.307
Biochem. Biophys. Res. Commun.	3.161	2		6.322
J. Med. Genet.	2.986	1		2.986
J Rheum	2.879	1		2.879
Neuromuscular Disord	2.749	1		2.749
Hum Mut	2.642	4		10.568
Biochim. Biophys. Acta	2.590	2		5.180
Hum Immunol	2.558	1		2.558
Anyloid	2.371	1		2.371
Pflugers Arch.	2.352		1	2.352
Gene	2.258	1		2.258
J. Biochem.	2.191	1		2.191
その他		10	3	16.925
主要雑誌小計		26	6	160.756
発表論文合計		36	9	177.681