

免疫担当細胞を用いた免疫疾患特異的なゲノム上での転写活性化領域マッピングの試み

● 沢田 哲治¹⁾ ◆ 山本 一彦¹⁾ ◆ 土肥 眞¹⁾ ◆ 田中 良一¹⁾

1) 東京大学医学部附属病院 アレルギー・リウマチ内科

〈研究の目的と進め方〉

自己免疫疾患は遺伝背景を有する個体に、環境因子が作用することで発症する。自己免疫疾患の遺伝因子に関しては、SNPsの大規模スクリーニングが精力的に行われている(Suzuki A et al 2003)。しかし、全ての自己免疫疾患を対象に大規模スタディーを行うのは困難であり、候補遺伝子がある程度絞り込む必要がある。CpG islandsにおけるシトシンのメチル化は遺伝子発現の抑制に関連する。自己免疫遺伝子を想定した場合、抑制遺伝子のメチル化や、誘導遺伝子の脱メチル化により自己免疫に至る可能性が考えられる。本研究の目標はRAなど自己免疫疾患ゲノム特異的な脱メチル化領域解明のためUracil-DNA glycosidaseとmung bean exonuclease処理を用いたDNAサブトラクション法を用いて、当該ゲノム領域のライブラリーを作成することである。この領域はゲノム上の疾患特異的な転写活性化領域であると考えられる。従って、これらのゲノム領域は自己免疫疾患の疾患感受性遺伝子の有力な候補となる。また、ヒトゲノム上に多数存在する内在性レトロウイルス配列を遺伝的指標として利用し、その周辺ゲノムの脱メチル化状況をSuppression PCR法により検討する解析法は、自己免疫性疾患の病因的意義解明に有用な可能性がある。本研究では免疫担当細胞を用いた検討を行った。

〈研究開始時の研究計画〉

Suppression PCRは分子内アニーリングとその内側の配列へのプライマーアニーリングとを競合させて両端に同じ配列を持った分子の増幅を阻害する方法であり、Clontech社がPCRによるsubtraction方法として採用している。本研究では相同な断片と違いのある断片両者のそれぞれの濃縮にこの原理を利用する。メチル感受性4塩基酵素にて切断できた脱メチル化された領域を優先的に増幅したライブラリーを作成し、このライブラリーを健常人あるいは患者間で比較し、疾患特異的に脱メチル化されている領域を濃縮し、その塩基配列情報に基づきデータベースよりマッピングする。

〈研究期間の成果〉

これまでのところ、Suppression PCR法では十分な結果が得られず、研究期間ではCOP (cloning of polymorphism) 法により健常人末梢血を用いた予備実験を検討した。COP法は、Linker PCRの際、DriverにdUTPを使用し、hybridization後にDriver由来の断片を含むフラグメントをUracil-DNA glycosidaseとmung bean exonuclease処理を用いて消去するRFLP(restriction length poly-morphism)のサブトラクション・クローニング法である。免疫担当細胞として単球について、単球特異的 (vs T細胞) 脱メチル化領域の探索を試みた。

(1) Uracil-DNA glycosidaseとmung bean exonuclease処理を用いるRFLPのサブトラクション・クローニング法であるを用いて、単球 (vs T細胞) 特異的な脱メチル化領域としていくつかのバンドが検出された

(2) メチル化感受性制限酵素 (HpaII) で切断したゲノム断片にアダプターを付与し、内在性レトロウイルスに普遍的なプライマー (U5領域、U3領域) を用いて suppression PCR を行い、内在性レトロウイルス配列を

含むHpaIIの増幅を行い、内在性レトロウイルスの周辺遺伝子のゲノムDNAのメチル化プロファイルを検討した。異なる症例から採取した免疫担当細胞 (好中球とリンパ節組織) のパターンを比較したところ、MspIフラグメントはほぼ同一であり、症例間でMspI/HpaIIによる遺伝多型は検出されなかった。一方、HpaIIフラグメントのパターンは両者で異なっており、ゲノムDNAのメチル化 (Epigenetic factor) の相違を反映するものと考えられた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

自己免疫疾患のゲノムDNAのメチル化に関しては、これまでに、X染色体不活化に関する報告 (関節リウマチ滑膜細胞のクロナリティ検索、多発性硬化症におけるepigenetic因子検索)、慢性関節リウマチの滑膜組織で活性化されている内在性レトロウイルス領域の低メチル化に関する報告、SLEや薬剤性ループスにおけるゲノム全体の低メチル化に関する報告などが散見される。しかしながら、自己免疫疾患の病因・病態に直結したゲノム領域は同定されていない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

Suppression PCRでのクローニングで十分な結果が得られない状況で多検体の処理に進展するのは困難であった。また、当初候補遺伝子の絞り込みは重要と考えられた。しかし、インベーター法や質量分析法などDNAタイピング技術の著しい進歩により、SNPタイピングは大量、高速、高精度でしかも安価に行える時代になっている。また、ハプロタイプブロックのタグSNPを用いることで解析に必要なゲノムDNA試料は少量化し、疾患ごとにホールゲノムで解析することが可能になりつつある。

〈今後の課題〉

がんを中心にEpigenetic研究においてもDNAチップを用いた包括的研究が行われつつある。自己免疫分野においてもライブラリーのsubtraction法以外の方法も検討する必要があると思われる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング

Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiro S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. Nature Genet 34(4), 395-402, 2003

2) データベース/ソフトウェア; 該当なし

3) 特許など; 該当なし

4) その他顕著なもの: 該当なし