

炎症性腸疾患のHLA領域内疾患感受性遺伝子の解析

●下瀬川 徹 ◆木内 喜孝 ◆上野 義之 ◆高橋 成一

東北大学大学院医学系研究科消化器病態学分野

〈研究の目的と進め方〉

炎症性腸疾患の感受性遺伝子はHLA領域に存在すると考えられ (IBD 3)、我々は本疾患感受性遺伝子のHLA領域内でのおよその位置を特定するためmicrosatellite markerを用いてlinkage disequilibrium mapping を行い現在に到っている。その結果、クローン病に関しては感受性座位が絞られつつあるが、潰瘍性大腸炎については、約4Mbの広範な領域におよぶ連鎖不平衡のために絞り込めていない。潰瘍性大腸炎は、多臓器を冒す膠原病とは異なり、大腸特異的な疾患である。そこでHLA領域内に存在していると考えられている本疾患の感受性遺伝子が、消化管 (大腸) に特異的に発現しているという前提に基づき、HLA領域遺伝子群 (約150遺伝子) の中で消化管に発現している遺伝子を同定すること及びさらに症例数を追加してlinkage disequilibrium mappingを行うことが本研究の目的である。

進め方としては、HLA領域の真遺伝子のうち、構造が不明な遺伝子や、すでに各組織において発現情報が得られている遺伝子 (TNF遺伝子など) などを除外した120遺伝子を対象とし、16の組織臓器/培養細胞においてRT-PCRを施行した。さらにHLA領域ゲノムについて、case controlを用いた相関研究を行ない、さらに潰瘍性大腸炎の感受性遺伝子候補部位を狭い領域に特定していくことを計画した。

〈研究開始時の研究計画〉

対象とする120遺伝子について、RT-PCRによる発現スクリーニング、及びmicrosatelliteを用いたHLA領域内におけるlinkage disequilibrium mappingを行う。

1) 発現スクリーニング

RT-PCR (各組織約5 μgのtotal RNAを用いて施行) を用いて発現解析を行った。対象遺伝子はHLA領域の非偽遺伝子のうち、構造が不明な遺伝子や、既に各組織において比較的詳しく発現情報が得られている13遺伝子 (TNFなど) を除外した120遺伝子のうちで、プライマーデザインが成功した117遺伝子。判定法は2%のアガロースゲル電気泳動において得られたbandの蛍光強度をNIH imageにより定量化したのち、内部標準 (βアクチン) との比を算出し、grading (①発現なし、②弱発現、および③強発現)を行った。発現検索対象組織は以下の16の組織臓器/培養細胞において施行した；末梢血単核球、胸腺、脾臓、HL60細胞 (APLの細胞)、胃、小腸、大腸、大腸癌、SW480、COLO 320 DM、HeLa細胞、脳、肝臓、肺、子宮、皮膚。

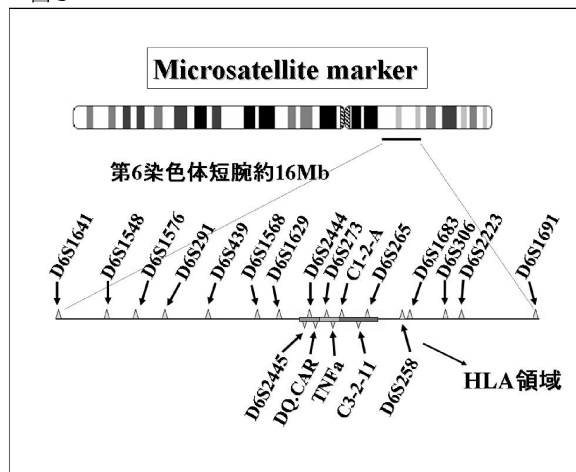
2) linkage disequilibrium mapping

本研究は、1998年5月から2002年1月の期間に東北大学医学部附属病院消化器内科を受診した潰瘍性大腸炎 (以下UC) 183例 (男性102例、女性81例、平均年齢30.3±13.6歳)、および健常対照者 (以下HC) 186例 (男性94例、女性92例、平均年齢29.7±11.9歳) を対象とした。UCの診断は、臨床症状、内視鏡所見、X線所見、組織所見をもとに平成6年度厚生省班会議の診断基準 (案) に従った。またHCは、

患者との遺伝的背景が異なることのないようUC同様に全例日本人とし、採血時健康な東北大学学生、および医療従事者が選択された。これらのUC、HCは採血時期によって2群に分類し、それぞれstage1、stage2とした。UC stage1 (1998年5月から1999年12月まで採取: 男性48例、女性43例、平均年齢30.6±12.7歳)、UC stage2 (2000年1月から2002年1月まで採取: 男性54例、女性38例、平均年齢29.4±7.0歳)。同様にHC stage1 (男性47例、女性45例、平均年齢30.4±8.9歳)、HC stage2 (男性47例、女性47例、平均年齢29.1±14.2歳)。これら2群間には重複はなく、また年齢、性別、その他統計上の項目で両群間において有意差は認められなかった。まずstage1で統計解析を行い、その結果にfalse positive、false negativeがないことを確認する目的でstage2において同様に統計解析を行った。両stageで再現性が得られれば、より高い信頼性を持つ結果であると考えられる。さらにこの研究は、科学技術会議「ヒトゲノム研究に関する基本原則」、厚生省「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応する指針」および文部省「大学等における遺伝子解析研究に係わる倫理問題への対応について」に基づいて施行され、東北大学医学部倫理委員会の承認のもと、遺伝子解析である旨を対象者に説明し文書で同意を得て行った。

第6染色体短腕のHLA領域を中心とする約16Mbの範囲に、最初のステップとして計20個のmicrosatellite markerを設定した。microsatellite markerの位置は図1を参照とした。また、強く相関を認めた領域であるHLAクラス。のcentromere側に更に詳細にマッピングするために4個のmicrosatellite markerを追加した。markerの位置、プライマー配列の一部は、過去の論文、Genome Database (<http://www.gdb.org/>)、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を参考にした。

図1



〈研究期間の成果〉

1) 発現スクリーニング

・RT-PCR施行117遺伝子において、他臓器よりも消化管

において比較的強い発現が認められた遺伝子は、class I 領域で4遺伝子、class II 領域で1 遺伝子、class III 領域で11遺伝子であった。

・本領域内遺伝子の中で脳および皮膚組織のみで発現を認めた遺伝子も確認した。

2) HLA内のいくつかのマーカーにおいて潰瘍性大腸炎、健常対照者群間で対立遺伝子頻度の分布に差が認められた。特にクラス I 領域のcentromere側からクラス III 領域のtelomere側にかけて強い相関を認め、最終的に全てのマーカーの中で最も強い相関を認めたのはC2-4-4.allele239 (クラスI: [Tel282kb] /HLA-B : Pc=2.9×10⁻⁹:OR=3.74、95% CI = 2.50 - 5.60)であった。また、HLA-B とのhaplotype解析、連鎖不平衡解析を行った結果、本研究で潰瘍性大腸炎と強く相関を認めたマーカー内の対立遺伝子はいずれも従来日本人潰瘍性大腸炎との相関が報告されているB*52と強い正の相関、正の連鎖不平衡の関係にあることが認められた。この内最も強い連鎖不平衡定数を認めたのはC-2-4-4.allele239-HLA-B*52 haplotypeであった(R=0.858)。以上の結果より、日本人潰瘍性大腸炎の感受性遺伝子は、HLA内、特にクラスIのcentromere側からクラスIIIのtelomere側にかけて存在し、B*52 (論文1)と強い連鎖不平衡を呈していると考えられた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

HLA 領域内遺伝子の諸臓器における包括的な発現状況を検索した解析はいまだに行われておらず、今後この結果は、臓器特異的疾患でHLA領域に感受性遺伝子が存在すると考えられる疾患遺伝子の同定に役立つと考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

達成できなかったこととして、一部遺伝子のRT-PCR用プライマーデザイン及び、予想外の困難として各遺伝子のエクソンイントロン構造に関する情報収集及びその再現性が得られない遺伝子も存在した。

その理由：①構造が完全に明らかでない遺伝子も存在するため。②対象とする遺伝子数が非常に多いため。③遺伝子重複のためか、相同な配列が多いため。

〈今後の課題〉

各種組織臓器／培養細胞における、HLA領域内遺伝子の発現状況の検討を継続する。また、手術標本などより精製したm-RNAを用いて、HLA領域遺伝子群の下部消化管における発現状況を検討する。

具体的には、現在までに解析が終了していない残りのHLA領域内遺伝子について、遺伝子解析ソフトを利用して適切なプライマーをデザインし、前述した16の組織臓器／培養細胞におけるRT-PCRを施行していく。また、倫理委員会の承認を得た上で大腸腺管分離法を用いて、大腸粘膜におけるHLA 領域内野遺伝子の発現状況をみるためにRT-PCRおよびNorthern blottingなどを行う。手術標本から、大腸粘膜を分離し、RNA を精製する過程において、困難が予想されるが、首尾よくすすめていく予定である。