

SMXAリコンビナント近交系マウスを用いたアレルギー遺伝子の同定と解析

●長谷川好規 ◆川部 勤

名古屋大学 医学部

〈研究の目的と進め方〉

我々はSMXAリコンビナント近交 (SMXA RI) 系マウスを用いて、気管支喘息の遺伝要因のゲノム的解析を行ってきた。気管支喘息は、環境要因と遺伝要因が関与した多因子疾患であり、また同時に多数の遺伝子が関与している複雑遺伝子疾患である。そのため気管支喘息のゲノム的解析は困難であり、未だ決めてとなる遺伝子は同定されていない。本研究は気管支喘息の責任遺伝子の探索を行うことを目的とする。気管支喘息の発症機序において、環境因子の関与は重要であり、環境因子を同一にでき純粋に遺伝要因が解析できるという点で動物疾患モデルを用いての解析は非常に有用な手段と考えられる。我々は、リコンビナント・インブレッド (RI) 系を用いて、気管支喘息の遺伝要因のゲノム的解析を行ってきた。我々が用いるSMXAリコンビナント近交系 (SMXA-RI系) マウスは、SM/J系とA/J系マウスの両系間F2から兄妹交配を繰り返した30系統からなる本格的なRI系である。既に先祖型であるSM/J系とA/J系の間で全染色体上にわたり多型を示す500遺伝子座の標識遺伝子についてStrain Distribution Patterns (SDPs) が確定されている。このSMXA-RI系マウスを用いて卵白アルブミン (OVA) により感作し、その後吸入暴露することで喘息モデルを作成する。アレルギー反応性の差を各系統で10匹以上の解析データをもとに即時型および遅延型喘息反応に関与する遺伝子のQTL解析を行い原因遺伝子座、さらに原因遺伝子の同定と進める。

〈研究開始時の研究計画〉

実際のアレルギー性疾患は疾患自体が均一ではなく多様な集合であると考えられる。病態に関与している機序を即時型喘息反応 (IgE値)、好酸球の気道への集積、また気道過敏性につき以下のようにして研究する。

6から8週のSM/J系およびA/J系の両親系統の (SM/JXA/J)F1マウスおよび18系統のSMXA RI系マウスの計21系統について解析する。各系統10匹以上を用いてアラムとともに卵白アルブミンを実験開始日と14日後に腹腔内投与して感作する。2度目の感作7日後より3日間吸入にて卵白アルブミンを暴露する。感作前と最後の吸入日に採血し血清分離する。1系統10匹以上について分離した血清より抗原特異的IgE値を測定する。またEDTA加PBSを用いて気管支肺胞洗浄をし、サイトスピンにてえられた検体をPappenheim染色後に細胞分画を調べ好酸球比率を算定する。また気道過敏性に関しては、アセチルコリン生理食塩水溶液を吸入し生ずる気道抵抗を測定する。

以上の方法にて得られた各系統の即時型喘息反応 (IgE値)、好酸球の気道への集積、また気道過敏性より得られた表現型を数値化し、多型を示す約500遺伝子座の標識遺伝子 (SDP) の情報とともにQTL cartographerソフトをもちいて解析する。QTL解析により絞り込まれた感受性遺伝子座に存在する多数の遺伝子の中から気管支喘息の病態に関連すると考えられる候補遺伝子をリストア

ップする。これらの候補遺伝子の塩基配列を確認し多型の塩基配列を決定することを最初の目的とする。次に既知の純系マウスにおいてこの決定した候補遺伝子の多型と問題とする表現系との関連を解析し確認する。以上を検討のうえ、疾患感受性遺伝子とその多型の表現型に及ぼす意義をその遺伝子を過剰にもしくはドミナント・ネガティブに発現させた細胞を用いてin vitroの系で解析するとともに、ロックアウトマウスやトランスジェニックマウスの系にてin vivoでの意義を、さらに疾患感受性遺伝子の多型が表現型に及ぼす意義をロックインのマウスを作成し解析する。このように解析した疾患感受性遺伝子を最終的にヒトでpopulation studyを行い、その意義を確認する。

〈研究期間の成果〉

- ・SMXA RI系マウスを用いたQTL解析の結果、気管支喘息の病態に関連する疾患感受性遺伝子座として気道過敏性に1ヶ所、肺内への好酸球浸潤には2ヶ所significant levelの領域を同定した。抗原特異的IgEの産生については4ヶ所のsuggestive levelの領域を確定した。

- ・気道過敏性に関連する疾患感受性遺伝子座は第17番染色体に1ヶ所、肺内への好酸球浸潤には第9および第16番染色体に2ヶ所のsignificant levelの領域を同定した。抗原特異的IgEの産生に関連する疾患感受性遺伝子座はわれわれの解析ではsignificant levelの領域を同定し得なかったが、第10および第19番染色体に1ヶ所ずつ、また第17番染色体に2ヶ所の合計4ヶ所のsuggestive levelの領域を確定した。

- ・気管支喘息の3種の表現型は何れも異なる遺伝子座にあり、気管支喘息の発症には多くの遺伝子座が関与していることが確認された。

- ・抗原特異的IgEの産生に関連する合計4ヶ所のsuggestive levelの疾患感受性遺伝子座について確認するためにconsomic mouse系統を使用した。consomic mouseは染色体供与系統の特定の染色体に注目して計画的に染色体受容系統に戻し交配を繰り返して導入し作成するもので3染色体上にわたる4疾患感受性遺伝子座のうち第17および第19番染色体の3遺伝子座についてはA.SM-Chr17およびA.SM-Chr19(染色体受容系統はA/J系マウス)を使用し抗原特異的IgEの産生に関連することを確認した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ヒトでは現在10以上のポジショナルクローニングによる喘息関連遺伝子の解析結果が報告されており、全染色体上で25を超える領域が喘息と関連があるとされている。しかし環境要因が大きく関与し、また診断基準が明確ではない気管支喘息のゲノム的解析はヒトでは困難であり、未だ決めてとなる遺伝子は同定されていない。このような世界的な研究段階において環境因子を同一にできる動物疾患モデルを用いての解析は非常に有用な手段であり、特にマウスについては現在ゲノム情報が活用できる。RI系を用いての解析は、気管支喘息の遺伝要因のゲノム的

解析をする上で非常に有用なものであり、本格的なRI系であるSMXA-RI系マウスの解析は重要な結果をもたらすものと期待される。本研究でわれわれは即時型喘息反応(IgE値)、好酸球の気道への集積、また気道過敏性という気管支喘息の病態を考える上で重要な因子の疾患感受性遺伝子座を同定し得た。また、抗原特異的IgE値を規定する遺伝子座については気管支喘息では新規の方法であるコンソミックマウスを用いた解析により疾患感受性を確認した。これらの結果は現在報告されている他の論文での結果とまったく異なる新しい疾患感受性遺伝子座をも含んでおり、今後の解析を含めて新知見を世界に向けて発信可能なものと考えられる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

1. QTL解析により絞り込まれた気管支喘息感受性遺伝子座を同定し、候補遺伝子をリストアップすることまでは2年間の研究期間の間に達成できたが、もともと計画していた30系統のSMXA RI系マウスのうちにはほとんど出産せず、結局途絶してしまった系統や系統としては維持されていても十分な匹数がなかなか生まれてこない系統があった。さらにSMXA-27系統のように2度目の卵白アルブミン感作時に70%がアナフィラキシーショックに陥り結局解析よりはるかに少なくはならない場合もあり、気管支喘息感受性遺伝子座の同定に長期間を費やしてしまった。このため当初の目的であった候補遺伝子の塩基配列を確認し多型の塩基配列を決定する段階までには至らなかった。

2. 気管支喘息の病態に関連する疾患感受性遺伝子座のうち抗原特異的IgEの産生についてはsuggestive levelの領域のみの同定となり、significant levelの領域は検出されなかった。このためにconsomic mouse系統を使用したのが、第10番染色体のconsomic mouse系統は利用できなかった。最終的には4疾患感受性遺伝子座のうち第17および第19番染色体の3遺伝子座についてのみ本研究で気管支喘息疾患感受性遺伝子座であることが確認され、第10番染色体の疾患感受性遺伝子座の候補については今後の解析の課題として残った。

〈今後の課題〉

QTL解析により絞り込まれリストアップされた感受性遺伝子座に存在する候補遺伝子の塩基配列を確認し多型の塩基配列を決定すること、および候補遺伝子の発現を確認することが最初の課題である。以上の方法によって疾患感受性が想定された候補遺伝子については開始時の研究計画として計画していた各種実験により疾患感受性遺伝子としての確認をすすめる。

1. 上記の方法により疾患感受性が想定される標的遺伝子についてはノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの系にてin vivoでの意義を確認する。

2. さらに疾患感受性遺伝子の多型が表現型に及ぼす意義をノックインマウスを作成し解析する。

3. 以上の研究で明らかにした情報を元に疾患感受性の標的遺伝子の気管支喘息発症に関わる重要性を最終的にはヒトでpopulation studyを行い、標的遺伝子が気管支喘息に関与することを確認し、遺伝子診断にもっていきたい。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 60, 6921-6926 (2000).

2) Hara T, Nishimura H, Hasegawa Y, Yoshikai Y. Thymus-dependent modulation of Ly49 inhibitory receptor expression on NK1.1+ g/d T cells. *Immunology*. 102, 24-30 (2001).

3) Ando M, Ando Y, Hasegawa Y, Sekido Y, Shimokata K, Horibe K. Genetic polymorphisms of thiopurine S-methyltransferase and 6-mercaptopurine toxicity in Japanese children with acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenetics*. 11, 269-273 (2001).

4) Uno Y, Sakamoto Y, Yoshida K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Koshino T, Inoue I. Characterization of six base pair deletion in the putative HNF1-binding site of human PXR promoter. *J Hum Genet* 48, 594-597 (2003).

5) Hasegawa Y, Sarashina T, Ando M, Kitagawa C, Mori A, Yoneyama M, Ando Y, Shimokata K. Rapid Detection of UGT1A1 Gene Polymorphisms by Newly Developed Invader Assay. *Clin Chem* 50, 1479-1480 (2004).

6) Jinnai N, Sakagami T, Sekigawa T, Kakihara M, Nakajima T, Yoshida K, Goto S, Hasegawa T, Koshino T, Hasegawa Y, Inoue H, Suzuki N, Sano Y, Inoue I. Polymorphisms in the prostaglandin E2 receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin induced asthma: a candidate gene approach. *Hum Mol Genet* 13, 3203-3217, (2004).