

マイクロサテライトを用いた疾患関連遺伝子探索

●猪子 英俊¹⁾ ◆間野 修平²⁾

1) 東海大学医学部 2) 名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科

<研究の目的と進め方>

急速なヒトゲノムの配列、多型情報の蓄積により、生活習慣病などの多因子性疾患の感受性遺伝子のポジショナルクローニングによる同定への期待が高まっている。我々は、リウマチについて3万個のマイクロサテライトを用いた世界初のゲノムワイドな相関解析を進め、47個の感受性遺伝子候補領域(約100 kb)を同定し、さらにそれらの領域より7個の感受性遺伝子を見出した。このような多くの感受性遺伝子に関する発症の分子機構解明のためには、それぞれの機能を解析するという、気の遠くなる膨大な作業も遂行しなければならない。

そこで本研究は、1) 疾患感受性遺伝子の同定：生活習慣病などの疾患の感受性遺伝子を数多く同定する。そのため、pooled DNA法の導入、独立な4回の相関解析の実施、実際のデータにもとづく検出力の評価、及び連鎖不平衡(LD: linkage disequilibrium)すなわち遺伝的距離にもとづくマイクロサテライトの評価を行う、2) ゲノムワイドな新しい疾患遺伝子マッピング法の開発：疾患について集団遺伝学にもとづく遺伝疫学的解析法を駆使して、遺伝的、環境的要因を見いだすことにより、多因子性疾患の感受性遺伝子の数と遺伝的寄与の様式を明らかにし、効率的にマッピングする方法を構築する、3) ネットワーク解析：同定された感受性遺伝子の情報をもとに、遺伝的要因から発症にいたるネットワークをパスウェイ回路として明らかにすることにより、煩雑な機能解析なしに疾患発症の分子機構を解明して、効率的なゲノム創薬に資すること、を目的とする。

<2007年度の研究の当初計画>

- 1) ベーチェット病、X線感受性、乾癬などの疾患などの複合形質の支配遺伝子を、3万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析による方法を用いてマッピング、同定する。
- 2) マイクロサテライトとSNP間の連鎖不平衡の距離をゲノムワイドに調べ、マイクロサテライトの相関解析での検出力を評価するとともに、3万個のマイクロサテライトを遺伝的距離にもとづいて前年度に引き続き再設定する。
- 3) 多因子性形質に関する新しい遺伝子マッピング法として考えられている、集団中の個体間の同祖性IBD (identical by descent) の推定による連鎖解析を行うLander-Green algorithm法が、inbreedingの高い近郊系集団を用いなければならない欠点があった。そこで近郊系を用いない、一般集団を対象とするLander-Green algorithm法の拡張として、回帰分析を通常の回帰ではなく、一般化推定方程式で行う方法を検討する。具体的には、モンゴルのホトン集団、ハルハ集団、日本人集団各200人について、ゲノムワイドレベルで1,000個のマイクロサテライトの多型情報を資する。最終的には、多因子性形質の新しい遺伝子マッピング法を、現在の相関解析に代わる、あるいは補完する検出力の高い方法として、確立する。
- 4) これまで同定された疾患の複数の感受性遺伝子について、遺伝的要因から発症にいたるネットワークをパスウェイ回路として理解することにより、新たな感受性遺伝子を予測し、それらの遺伝子の多型について、相関解析を行う。このように

して、詳細、かつ整合性の高い疾患発症ネットワークを明らかにすることにより、多因子性疾患の感受性遺伝子の発症機構を明確にする手法を確立し、効率的なゲノム創薬に資する。

<2007年度の成果>

本年度は我々が開発した3万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析による遺伝子マッピング法を評価・改善・応用と機能解析を進めるため研究を遂行し、次のような成果・進捗をえた。

- 1) 遺伝子マッピングの検出力を高めるために、4回の独立集団の相関解析やpooling法の改善などにより、3万個のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析の戦略を確立した。本法を用いて、新たに尋常性乾癬とベーチェット病について3個の感受性遺伝子を同定した。また、X線感受性については、第3次スクリーニングまで進捗し、30個あまりの候補遺伝子まで絞り込んだ。
- 2) 多因子性形質に関する新しい遺伝子マッピング法として考えられている、集団中の個体間の同祖性IBD (identical by descent) の推定による連鎖解析を行うLander-Green algorithm法の拡張として、一般集団を対象とする一般化推定方程式で行う方法の開発を試みた。その結果、例えば日本人集団各200人について、ゲノムワイドレベルで1,000個のマイクロサテライトの多型情報を検索することにより、多因子性形質の新しい遺伝子マッピング法を現在の相関解析に代わる、あるいは補完する検出力の高い方法として開発した。本法を用いて、モデル系として尋常性乾癬の感受性遺伝子のマッピングに応用し、その有効性が確認された。
- 3) 1) で遺伝学的に同定したリウマチ感受性遺伝子の一つであるNFkBIL1について、遺伝的要因から発症にいたるパスウェイ回路についてタンパク化学的解析を行い、破骨細胞におけるNFkBシグナル伝達系の一つであるalternative pathway NIK/p100経路のp52/RelB蛋白による転写調節機能の制御を通じて、NFkBIL1が破骨細胞の分化を誘導することにより、リウマチの発症に至ることを明らかにし、マイクロサテライトの相関解析により遺伝学的に同定した感受性遺伝子が機能的にも発症に関わることを証明した。

<国内外での成果の位置づけ>

マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析による多因子性疾患の感受性遺伝子の同定の試みは、我々のみが現在行っている独自のかつ強力な系である。SNPを用いたゲノムワイドな相関解析も精力的に行われているが、マイクロサテライトはマイクロサテライト多型の誕生時期がSNPそれに比べ新しいため、SNPとは異なる疾患感受性遺伝子多型を検出するので、マイクロサテライトによる遺伝子同定は重要な意義と特色がある。また、一般集団(例えば、日本人)を対象に同祖性を指標にしたマイクロサテライトを用いた連鎖解析による新マッピング法は我々独自の方法であり、その応用が期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

疾患感受性遺伝子周辺について、ゲノムワイドな連鎖不平衡(LD)マップとの関連を調べることにより、マイクロサテライ

トが周辺の数個の SNP のハプロタイプブロックを越えて、疾患感受性 SNP と連鎖不平衡にあり、それらの SNP を相関解析により検出できることが明らかとなり、マイクロサテライト法の有効性がしめされたことは心強い。ただ、他研究室から報告されているゲノムワイドな SNP を用いた相関解析によって同定された疾患遺伝子との比較では、HLA のような強い遺伝要因である遺伝子を除き、両者に重複することが少ない。この結果はマイクロサテライト多型の起源が新しい (2~3 万年前) に対して、SNP 多型は古い (10 万年~20 万年前) ため、マイクロサテライトは比較的若い感受性多型を同定しやすく、SNP は古い感受性多型を同定しやすいことをしめしているのかもしれない。この点についての検証は、今後の課題である。

<今後の課題>

今後の研究計画はこれまでの研究課題である、1)、同定した疾患間感受性遺伝子の機能解析によるマイクロサテライトを用いた相関解析法の検証、2) 一般集団を対象に同祖性を指標にした、マイクロサテライトを用いた連鎖解析によるマッピング法の多因子性疾患遺伝子マッピング同定への応用による検証、を中心に進める。

<成果公表リスト>

1) 論文

- 1 0801111610
Ota M, Fukushima H, Kulski JK, Inoko H: Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nature Protoc* 11: 2857-2864, 2007.
- 2 0801111503
Bahram S, Inoko H: Microsatellite markers for genome-wide association studies. *Nature Reviews Genetics* 8: 164, 2007.
- 3 0701261656
Yasuno K, Ando S, Misumi S, Makino S, Kulski JK, Muratake T, Kaneko N, Amagane H, Someya T, Inoko H, Suga H, Kanemoto K, Tamiya G. Synergistic association of mitochondrial uncoupling protein (UCP) genes with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144: 250-253, 2007.
- 4 0701261710
Ota M, Katsuyama Y, Hamano H, Umemura T, Kimura A, Yoshizawa K, Kiyosawa K, Fukushima H, Bahram S, Inoko H, Kawa S. Two critical genes (HLA-DRB1 and ABCF1) in the HLA region are associated with the susceptibility to autoimmune pancreatitis. *Immunogenetics* 59: 45-52, 2007.
- 5 0701261720
Ohtsuka M, Mizutani A, Kikuchi YY, Kulski JK, Sato M, Kimura M, Tanaka M, Inoko H. One-step generation of recombineering constructs by asymmetric-end ligation and negative selection. *Anal Biochem* 360: 306-308, 2007.
- 6 0701261722
Kikuchi T, Naruse TK, Onizuka M, Li S, Kimura T, Oka A, Morishima Y, Kulski JK, Ichimiya S, Sato N, Inoko H: Mapping of susceptibility and protective loci for acute GVHD in unrelated HLA-matched bone marrow transplantation donors and recipients using 155 microsatellite markers on chromosome 22. *Immunogenetics* 59: 99-108, 2007.
- 7 Reinders J, Rozemuller EH, van der Weide P, Oka A, Slootweg PJ, Inoko H, Tilanus MG: Genes in the HLA region indicative for head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Immunol* 44: 848-855, 2007.
- 8 0701261725
- 9 0704171437
Yatsu K, Mizuki N, Hirawa N, Oka A, Itoh N, Yamane T, Ogawa M, Shiwa T, Tabara Y, Ohno S, Soma M, Hata A, Nakao K, Ueshima H, Ogihara T, Tomoike H, Miki T, Kimura A, Mano S, Kulski JK, Umemura S, Inoko H: High-resolution mapping for essential hypertension using microsatellite markers. *Hypertension* 49: 446-452, 2007
- 10 0801111508
Morishima Y, Yabe T, Matsuo K, Kashiwase K, Inoko H, Saji H, Yamamoto K, Maruya E, Akatsuka Y, Onizuka M, Sakamaki H, Sao H, Ogawa S, Kato S, Juji T, Sasazuki T, Kodera Y: Effects of HLA allele and killer immunoglobulin-like receptor ligand matching on clinical outcome in leukemia patients undergoing transplantation with T-cell-replete marrow from an unrelated donor. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 315-328, 2007.
- 11 0801111518
Hayashi T, Inoko H, Nishizaki R, Ohno S, Mizuki : Exclusion of transforming growth factor-beta1 as a candidate gene for myopia in the Japanese. *Jpn J Ophthalmol* 51: 96-99, 2007.
- 12 0801151654
Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T: Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. *Blood* 110: 1055-1063, 2007.
- 13 08011115432
Ikewaki N, Fujii N, Onaka T, Ikewaki S, Inoko H: Immunological actions of Sophy β -Glucon (β -1,3-1,6 Gulucan), currently available commercially as a health food supplement. *Microbiol Immunol* 51: 861-873, 2007.
- 14 0801151110
Kimura T, Shimada A, Sakai N, Mitani H, Naruse K, Takeda H, Inoko H, Tamiya G, Shinya M Genetic analysis of craniofacial traits in the medaka. *Genetics*. 177: 2379-2388, 2007.
- 15 0801151107
Ikewaki N, Tamauchi H, Inoko H: Decrease in CD93 (C1qRp) expression in a human monocyte cell line (U937) treated with various apoptosis-inducing chemical substances. *Microbiol Immunol* 51: 1189-1200, 2007..

2) データベース

1. 3 万個のマイクロサテライトの位置、PCR プライマー、多型頻度などの情報に関するデータベース
<http://www.jbirc.aist.go.jp/gdbs>

3) 特許など

1. 発明の名称: NF- κ B 活性化経路を調節する薬剤
 - ① 発明者: 浅井常章、猪子英俊
 - ② 出願日: 2006 年 11 月 20 日
 - ③ 出願人: 東海大学
 - ④ 国内出願番号: 2006-313109