

[別紙1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 マイクロサテライト多型との連鎖不平衡を利用  
した肉芽腫性肺疾患感受性遺伝子の探索

指導教官 山本 一彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成11年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 田中 剛

複数の遺伝因子および環境因子の関与する多因子疾患について疾患感受性遺伝子を同定していく場合、検出力の問題などから関連解析は有力な方法であると考えられている。しかし、従来行われてきた候補遺伝子アプローチのように、候補遺伝子を一つずつ解析する方法では限界がある。そこで、最近、明らかにされつつあるヒトゲノム配列の情報を利用して、多数の候補遺伝子群や全ゲノム領域についてスクリーニングする方法が提案されている。このようなスクリーニング法を確立するため、連鎖不平衡の構造に関する研究が注目されており、それらの結果をもとに一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) を中心とした多型マーカーの設定方法が検討されているが、これまでのところ決定的な方法はない。

短い縦列繰り返し配列の多型すなわちマイクロサテライト多型は、これまで家系を扱う連鎖解析で使用されてきたが、多型性に富むことから多くの遺伝情報が得られ、設定、タイピングも比較的簡便であることが知られている。

本研究では、候補遺伝子領域をスクリーニングするマーカーとしてマイクロサテライト多型を利用することが可能であるか否かを明らかにすることを目的として、関連解析を計画した。

[別紙 1]

研究対象となる疾患には、原因不明の肉芽腫性肺疾患であるサルコイドーシスを選択し、その病変形成に重要な役割を果たすと考えられている Th1 系免疫に関わる遺伝子群を候補遺伝子とした。そして、実際に、候補遺伝子内のマイクロサテライトを利用した解析を行った。

旧厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班の診断基準により診断されたサルコイドーシス症例 83 例，日本人一般集団 96 例を対象とした。候補遺伝子群として、Th1 系免疫応答に関わる、IFN- $\gamma$  レセプター 1, 2, IL-12 レセプター  $\beta$  1, 2 及び STAT1, STAT4 の合計 6 つの遺伝子を選択した。各マイクロサテライトマーカーは、候補遺伝子内もしくは近傍の 2~5 塩基の繰り返し配列をデータベースより検索し、PCR で増幅した後に、多型性を検討した。多型性を示したものをマーカーとして設定し、ABI PRISM 377 DNA シーケンサー(Applied Biosystems)を使用しタイピングした。一塩基多型 (SNP) は、候補遺伝子領域のエクソン、プロモーター領域を中心に、PCR 増幅し、直接シーケンス法によりタイピングした。連鎖不平衡については、expectation-maximization algorithm (EM algorithm)を利用したハプロタイプ推定から  $D'$ ,  $r^2$  を計算し評価した。疾患との関連解析には、 $\chi^2$  検定もしくは Fisher's exact 検定を行い、 $p$  値 0.05 以下を有意差ありとした。マイクロサテライトマーカーを用いた解析では、それぞれのマーカーで解析に利用した対立遺伝子数で補正した。

多型性が確認され、利用可能なマイクロサテライトマーカーは 8 種類であっ

表 1 解析に用いたマイクロサテライトと多型性

遺伝子座	繰り返し配列	対立遺伝子数	ヘテロ接合度
IFN- $\gamma$ R1 (6q23.3)	(CA) $n$	11	0.78
IFN- $\gamma$ R2 (21q22.11)	(TAAA) $n$	8	0.73
	(CA) $n$	3	0.53
IL-12R $\beta$ 1 (19p13.11)	(TGGG) $n$	3	0.67
IL-12R $\beta$ 2 (1p31.2)	(CA) $n$	10	0.66
	(TAAA) $n$	5	0.50
STAT1 (2q32.2)	(CA) $n$	8	0.66
STAT4 (2q32.2)	(CA) $n$	9	0.67

た。STAT4 遺伝子以外では、これらのマーカーをそれぞれ 22kb-90kb にわたる候補遺伝子領域内に設定することが可能であった。STAT4 遺伝子で設定したマーカーは、5'側上流、約 30kb に位置していた。マーカーは、2~4 塩基の繰り返し配列を持ち、対立遺伝子数は平均 7.1 個、ヘテロ接合度は 0.50~0.78 であった (表 1)。

マイクロサテライトマーカーと対応する各遺伝子の 5'および 3'末端付近の SNP を検討したところ、STAT1, STAT4 領域以外ではマイクロサテライトマーカーの対立遺伝子と SNP 間の  $D'$  値は、0.6-1.0 程度で、また  $r^2$  もいずれかの対立遺伝子で少なくとも 0.1 以上を示し、

[別紙 1]

強い連鎖不平衡を認めた。

クラスターを形成する STAT1 および STAT4 遺伝子の領域では、連鎖不平衡の程度は他の候補遺伝子領域と比較し強いものではなかったが、候補領域内の SNP の多くは、尤度比検定でマーカーの対立遺伝子と連鎖不平衡にあることが明らかになった。

これらのマイクロサテライトマーカーを用い疾患との関連解析を行った結果、STAT4 に対応するマーカーの一つの対立遺伝子とサルコイドーシスとの間に有意な関連が認められた (表 2, 表 3)。さらに探索し、そのアリルと連鎖不平衡にあり、疾患との関連解析で有意差を認める SNP がそのプロモーター領域、イントロン領域で見出された (表 4)。

表 2 マーカーを使用したサルコイドーシスの関連解析

遺伝子座	繰り返し配列	$\chi^2$ 値 (最大値*)	p 値	補正 p 値†
IFN- $\gamma$ R1	(CA)n	1.12	0.29	NS
IFN- $\gamma$ R2	(TAAA)n	1.95	0.16	NS
	(CA)n	2.67	0.10	NS
IL-12R $\beta$ 1	(TGGA)n	2.30	0.12	NS
IL-12R $\beta$ 2	(CA)n	-	0.09‡	NS
	(TAAA)n	1.01	0.31	NS
STAT1	(CA)n	1.87	0.17	NS
STAT4	(CA)n	9.40	0.002	0.008

\* 対立遺伝子毎に解析した  $\chi^2$  値のうち最大となるもの

† 解析に利用した対立遺伝子数で補正,

‡ Fisher's exact検定で解析

表 3 STAT4マーカーとサルコイドーシスの関連解析

対立遺伝子	症例 n= 83	対照 n= 96
254 / 254; 254 / その他	76 (0.92)	71 (0.74)
その他 / その他	7 (0.08)	25 (0.26)
オッズ比 (95%信頼区間) 3.82 (1.56 - 9.39), $\chi^2$ 値 9.40, p 値 0.002, 補正 p 値 0.008 ( )内は対立遺伝子頻度		

表 4 STAT4 遺伝子の SNPs とサルコイドーシスの関連解析

SNP 位置	対立遺伝子	症例(n= 83)	対照(n= 96)	$\chi^2$ 値	p 値
-977	T/T, T/C	67 (0.807)	88 (0.917)	4.59	0.032
	C/C	16 (0.193)	8 (0.083)		
+19664	A/A, A/G	83 (1.000)	89 (0.927)	-	0.016*
	G/G	0 (0)	7 (0.073)		

( )内は対立遺伝子頻度, \* Fisher's exact検定で解析

本研究では、多型性に富み、ハプロタイプ構造によらず多くの遺伝情報が得ることができるマイクロサテライトをマーカーとして設定し、連鎖不平衡を利用して候補遺伝子領域をスクリーニングし、疾患と関連する変異、特に SNP を探索することが可能であるか否か検討を行った。マイクロサテライトマーカーは、設定やタイピングが比較的容易であり、また、PCR 産物のサイズが異なる

[別紙1]

ようにプライマーを設計することで、同時に複数のマーカーをタイピングできるなど、従来の連鎖解析が実施できる施設であれば、比較的大量のタイピングが行える利点もある。しかし、これまでに報告されている連鎖不平衡についての研究は、SNP-SNP 間もしくはマイクロサテライト-マイクロサテライト間で解析されたものが中心であり、マイクロサテライト-SNP 間についてはまとめられた報告はない。そこで、まず、設定したマイクロサテライトマーカーと候補遺伝子の 5'もしくは 3'末端付近に位置する SNP のタイピングを行い、それらが連鎖不平衡にあること、すなわち、マーカーとして候補領域をカバーしていることを確認した。そして、これらのマーカーを利用したスクリーニングから、疾患との関連を認める SNP を同定できる可能性を示した。今回、見出された STAT4 遺伝子領域の変異は、マーカーとの連鎖不平衡が比較的弱い SNP であり、また、疾患との関連も有意差は認めるものの、それほど強いものではなかった。そのため、これらの SNP を真の感受性変異と考えるよりは、マーカーと同様に STAT4 遺伝子内もしくはマーカー近傍の別の遺伝子内における未知の真の感受性変異と連鎖不平衡にあるために有意差がでている可能性も考えられた。このようなスクリーニングで得られた結果を確定的なものとするためには、別の症例・対照群で解析結果の再現性を確認して偽陽性の可能性を排除した後に、マーカーと連鎖不平衡にある領域の詳細なマッピングを行い、さらに、関連の示唆される変異の意義を機能解析で確認する必要がある。また、限られた領域における少数の多型のみ解析であり、他の領域での連鎖不平衡の構造や検出力の予測などの問題は残されているが、特にサルコイドーシスのような原因不明で候補遺伝子を絞りきれない疾患を扱う場合、このような多数の候補遺伝子領域をスクリーニングする方法も一つの有効な選択肢となり得ると考えられた。また、さらに発展させていくことで、全ゲノム領域など大規模なスクリーニングにマイクロサテライトを利用する場合にも、このようなアプローチは応用できる可能性が考えられた。