

論文の内容の要旨

論文題目 Polymorphisms in Cytokine Genes: Their Effect on Expressional Regulation and Geographic Distribution

(サイトカイン遺伝子の多型 —その発現制御に及ぼす影響と地理的分布—)

氏名 木村 亮介

サイトカインとは、種々の細胞で産生され、特に免疫系において重要な役割を担う生理活性物質の総称である。近年の遺伝疫学研究により、サイトカイン遺伝子の多型が多因子疾患と関連するという知見が報告され、これらの多型の多くは発現制御に影響を及ぼすものであると推測されている。しかし、これまでにその発現制御への影響が実証された例は多くない。本研究では、第一に、二つのサイトカイン遺伝子 (*ILB* と *SDF1*) に注目し、多型と発現制御との関連を調べるため、Epstein-Barr virus (EBV) 感染 B 細胞株を用いて *in vitro* 系での実験を行った。本研究の第二の目的は、アジア太平洋地域の集団における今後の遺伝疫学研究のために、同地域における *SDF1* 遺伝子のアリル頻度やハプロタイプ頻度を明らかにすることである。また、これらの情報は、移動や遺伝的交流といった集団の歴史を推測する上でも役立つ。

インターロイキン-1 β (IL-1 β) は、代表的な炎症性サイトカインであり、*IL1B* 遺伝子における多型は、様々な病原菌感染や炎症性疾患などに関連するとして注目されている。特にプロモーター領域に存在する C-31T 多型は、T のとき TATA ボックスを形成するため、遺伝子発現制御に強く関与すると考えられてきた。しかし、*in vitro* における観察では IL-1 β 産生量に遺伝子型間の違いは検出できず、*in vivo* における観察では-31C アリルが高 IL-1 β 量と炎症促進に関連することが示されている。そこで本研究では、遺伝子発現にはたらく多型のシス作用を検出するため、アリル特異的転写産物定量を行った。本方法は、転写領域にある C+3954T 多型に関してヘテロ接合の細胞を利用して、アリル間の mRNA 発現量の差を調

べる方法である。まず、243 個体について、*IL1B* 多型を PCR-RFLP 法によりタイピングし、更に、両多型ともヘテロ接合である個体に関しては、アレル特異的 PCR 法と PCR-RFLP 法を組み合わせることによりハプロタイプを確定した。そして、C+3954T 多型がヘテロ接合の 23 個体に由来する細胞でアレル特異的転写産物の比を測定した結果、C+3954T 多型は遺伝子発現に影響を及ぼさないこと、-31T アレルは-31C アレルに比べ約 2.2 倍の転写産物を産生することが示唆された (図 1)。本研究とこれまでの研究との結果の不一致に関しては、従来の遺伝子型間を比較する方法における検出感度の悪さ、細胞の種類による違い、また *in vivo* では個々の細胞の IL-1 β 産生量ではなく産生量の総計を測定していることが原因としてあげられる。本研究は、*IL1B* 多型が如何に疾患と関係するかを解く鍵を示すとともに、ハプロタイプ解析と組み合わせたアレル特異的転写産物定量が発現制御に関わる多型を同定するのに有用であることを示した。

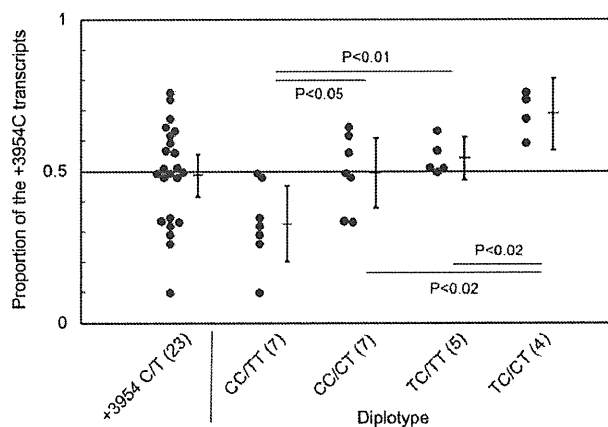


図 1. *IL1B* 多型とアレル特異的転写産物比

個々の細胞株の値、平均値、95%信頼限界を示した。ディプロタイプ CC/TT は、ハプロタイプ-31C+3954C およびハプロタイプ-31T+3954T の組み合わせ。他も同様。括弧内は調べた細胞株の数。

ストローマ細胞由来因子 (SDF-1) は、白血球の遊走において重要な役割をもつケモカインのひとつである。その受容体である CXCR4 は、T 細胞親和性 HIV-1 の細胞侵入に利用され、SDF-1 は HIV-1 の T 細胞侵入を競合的に阻害する。*SDF1* 遺伝子の G801A 多型におけるアレルは、この多型が 3'非翻訳領域に位置することから *SDF1*-3'G/3'A と呼ばれ、AIDS の進行や I 型糖尿病の罹患に関与することが報告された。本研究では、末梢血白血球を EBV で形質転換させることにより *SDF1*mRNA が産生されることから、異なる 42 個体 (各遺伝子型につき 14 個体) に由来する細胞株を用いて、*SDF1* 遺伝子の発現、および遺伝子制御因子のひとつである DNA のメチル化を調べた。Bisulfite 法を用いて 5'領域と 3'非翻訳領域のメチル化を調べたところ、末梢血白血球ではみられなかった 3'非翻訳領域における部位特異的脱メチル化が、EBV 感染細胞株において観察された。その脱メチル化のレベルは、*SDF1*mRNA の発現レベルと有意に相関していたことから、遺伝子発現に関わっていることが示唆された。しかし、遺伝子型間の比較においては、*SDF1*mRNA レベルおよびメチル化レベルに有意な差は無かった。また、ヘテロ接合の細胞で、アレル特異的転写産物の比に 1:1 からの有意なずれはみられなかった。これらの実験により、G801A 多型は *SDF1* 遺伝子発現に関与していないことが示唆された。よって、これまでに報告されている G801A

多型の疾病への関与は、タンパクの翻訳効率、あるいはこの多型と連鎖不平衡にある別の多型に起因する可能性が考えられた。

そこで、*SDF1* 遺伝子のハプロタイプを解析し、ハプロタイプ間で転写産物量が異なるかを、アリル特異的転写産物定量を用いて調べた。まず、12 個体について 5' 領域の約 2 kb をシーケンシングすることにより幾つかの新規多型を検出した後、データベース上にある既知の *SDF1* 遺伝子多型とあわせ 15 多型について PCR - SSCP および - RFLP 法を用いて 105 個体をスクリーニングした。その結果から、主要なハプロタイプを識別するのに必要な 10 多型を選出し、更に 243 個体を調べた。また、dbcAMP あるいは TPA で EBV 感染 B 細胞株を刺激することで *SDF1*-mRNA 量が増加することを見出し、G801A 多型においてヘテロ接合である 60 細胞株を用いて、アリル特異的転写産物の比、dbcAMP および TPA 刺激によるその比の変化を調べた。その結果、*SDF1*-mRNA 発現量はハプロタイプ間で有意に異なり、5' 領域の C-668G 多型、イントロン 2 の A+6201G 多型が発現量の違いと関連していることが示された (図 2)。また、-668G をもつ細胞株は TPA 刺激において、-1652T をもつ細胞株は dbcAMP 刺激においてアリル特異的転写産物比が有意に変化した。この 2 つの多型がそれぞれ AP-1、AP-2 の認識配列に位置することから、これらの転写因子の活性化が転写産物比の変化と関与している可能性が考えられる。*SDF1*-mRNA 量に関連する多型の存在が示されたことは、これまでに報告された *SDF1*-G801 多型と疾患との関連が別の多型に起因する可能性を強く示唆した。発現制御に影響を及ぼす多型を同定するには、更に詳細なハプロタイプ解析および多型が及ぼす影響の機構の解析が必要である。

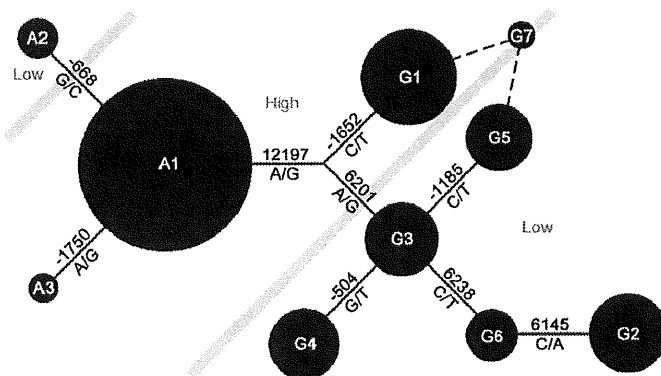


図 2. 主要な *SDF1* ハプロタイプの最小変異・組み換えネットワーク
 円はハプロタイプ、その大きさは頻度、
 実線は変異、点線は組み換えをそれぞれ表す。
 12197 の多型が *SDF1*-3'G/3'A に相当する。

次に、アジア太平洋地域における今後の遺伝疫学研究のために、*SDF1* 多型の地理的分布を調査した。まず、疾病への関与が報告された *SDF1*-3'A の東南アジアからメラネシアにかけての分布を詳細に調べた。26 集団 1848 個体を対象に、PCR-RFLP 法を用いて遺伝子型タイピングを行った結果、*SDF1*-3'A の頻度は、東南アジア大陸部で 0~0.355 と比較的 low、メラネシアで 0.620~0.637 と高かった。東南アジア島嶼部では 0.233~0.733 であり、西から東へと上昇する傾向がみられた。このような *SDF1*-3'A の分布は、東南アジア島嶼部のオーストロネシア語民集団においてオーストラロイド集団との遺伝的交流が東に行くほど大きかったことを示唆した。

更に、上述の10個のハプロタイプタグ多型を用いて、東南アジアの10集団について *SDF1* ハプロタイプ頻度を推定し、発現解析で示された mRNA 発現量が低いハプロタイプの頻度を調べたところ、集団間でその頻度に大きな違いはみられなかった。また、集団の遺伝的分化を観察するために、ハプロタイプ頻度から F_{ST} 値を算出した。東南アジア大陸部の3集団（タイ人、アカ族、ムラブリ族）間で F_{ST} 値を比較すると、ムラブリ族と他の二集団との遺伝的分化が進んでいることが判った。このことは、ムラブリ族が集団サイズの小さい孤立した集団であるため、遺伝的浮動が大きく働いていることに起因すると考えられた。オーストロネシア語民集団（ジャワ島民、ボルネオ島のダヤク族、スラウェシ島のブギス族とトラジャ族、フローレス島民、チモール島民）においては、ニューギニア高地人との F_{ST} 値が、東経、および大陸部の集団との F_{ST} 値と逆相関していた（図3）。この結果は、東南アジア島嶼部のオーストロネシア語民集団における大陸集団からの遺伝的分化に、オーストラロイド集団からの遺伝子流入が大きな役割を果たしており、その大きさは西から東へと大きくなることを示唆していた。

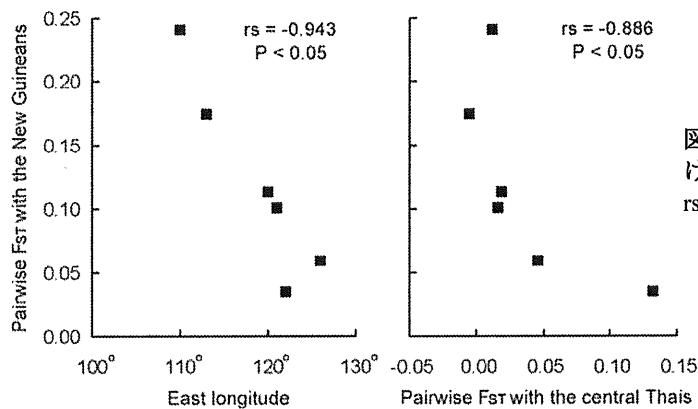


図3. オーストロネシア語民集団における他集団からの遺伝的分化
rs はスピアマンの順位相関係数。

本研究では、*IL1B* および *SDF1* 遺伝子において、アリルおよびハプロタイプ間の転写産物量の相違を検出し、また、*SDF1* 多型の分布を明らかにした。これらの結果は、これまでの遺伝疫学研究の解釈や今後の研究にとって有意義なものである。本研究で示したように、ハプロタイプ情報に基づいたアリル特異的転写産物定量は、多型が発現制御に及ぼすシス作用を検出する上で有効な手段であり、遺伝子多型解析に強力な戦略をもたらす可能性を秘めている。また本研究で、*SDF1* 多型の分布から、アジア太平洋地域の人類集団の歴史を理解する上で示唆に富んだ情報を得た。今後、遺伝的浮動、ボトルネック、遺伝子流動などゲノム全体に影響する過去の出来事に対する知識を更に深めるためには、ゲノムワイドな多型データの収集が必要不可欠である。そのような研究は、自然選択などによる単一座位への効果を検出することも可能にし、遺伝疫学研究を含む多型が及ぼす影響の解析と併せて、人類の遺伝的適応という現象を理解する上で重要な役割を果たす。