

## 審査の結果の要旨

氏名 川嶋実苗

本研究は、ヒトナルコレプシーの新規感受性領域の同定を “マイクロサテライトマーカ―を用いた pooled DNA によるゲノムワイドな関連分析法” という新たな戦略により同定する事を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 3 つのマイクロサテライトマーカ― (M2\_2\_22、M2\_4\_25、C1\_3\_2) を使用し、pooled DNA のタイピング結果より推定されたアレル頻度と、pooled DNA に用いた個別試料のタイピング結果から導かれたアレル頻度をカイ二乗検定により比較することで、pooled DNA 法の信頼性を確認した。その結果、双方間で有意差は認められず、pooled DNA 法が個別試料タイピング法のアレル頻度を反映している事が示された。また、pooled DNA タイピング結果間において非常に高い再現性が確認された。
2. この戦略により、既に関連が知られている HLA とナルコレプシーとの関連を検出できるか否かの評価をするため、6 番染色体上の 1,265 個のマイクロサテライトマーカ― (平均間隔 125.7kb) を用いた関連解析を行った。一次スクリーニングの結果、202 のマーカ―で少なくとも 1 つの統計解析法について有意差を示した。それら 202 マーカ―を対象として 2 次スクリーニングを行ったところ、42 マーカ―において依然として有意差が見られ、また、期待通り *HLA-DR-DQ* 遺伝子近傍マーカ―において両スクリーニングを通して強い関連が見出された ( $p < 10^{-34}$ )。HLA 領域を詳しく解析するため、さらに細かく設定したマイクロサテライトマーカ―を使用して解析したところ、5.5 メガベースをカバーする 30 マーカ―のうち 22 マーカ―で有意差を示した。以上の結果より、およそ 100kb 毎に設定したマイクロサテライトマーカ―を用いた関連解析によって、疾患感受性候補領域を検出することが可能であることが示唆された。
3. ゲノムワイドに分布した 23,381 個のマイクロサテライトマーカ― (平均間隔 130.3kb) を対象とした関連解析を行った。一次スクリーニング終了後、3,077 マーカ―で少なくとも 1 つの統計解析法について有意差を示した。それら 3,077 マーカ―を使用して 2 次スクリーニングを行った結果、339 マーカ―において依然として有意差が確認され、また、1 次スクリーニングの結果との再現性も確認できた。pooled DNA を使用した関連解析で検出された有意差を確認するため、個別試料を用いたタイピングを行ったところ、3 つのマイクロサテライトマーカ― (マーカ―名 : NA1.3, NA2.3, NA3.4) で顕著に低い p 値を示した ( $p < 0.001$ )。これら 3 マーカ―

周辺領域をナルコレプシーの候補領域とした。2 マーカー (NA1.3, NA3.4) は 21 番染色体上に、1 マーカー (NA2.3) は 2 番染色体上に存在した。これらの領域は、ナルコレプシーの新規候補領域である。

4. 関連が確認された 3 マイクロサテライトマーカー周辺の 500-700kb をカバーする領域をさらに詳細に設定したマイクロサテライトマーカーを用いて検討することで、ナルコレプシー候補領域を狭めた。Fine mapping の結果、3 マーカーの近傍マーカーにおいても同様に有意差を示した。特に、NA3.4 マーカーから 70kb 離れたマーカー (NA3.L) は、NA3.4 マーカーよりも強い関連を示した ( $p=0.00045$ )。以上のマイクロサテライトマーカーを用いた解析から、マーカー NA1.3 周辺 42kb、NA2.3 周辺 100kb、NA3.4 周辺 70kb まで候補領域を狭めることができた。
5. さらに候補領域を狭めるため、平均 5kb 間隔で設定した SNP を使用し、患者 190 名対照者 190 名の個別試料を用いて解析を行ったところ、3 マーカー近傍において有意差に至る SNPs を複数見出した。特に強い関連を示した NA3.L マーカー近傍の 2 つの SNPs (C-7:  $p=0.0010$ 、C-4:  $p=0.0016$ ) について全個別試料を用いた解析を行った結果、マイクロサテライトマーカーよりも強い関連を示した ( $p=0.0002$ ,  $OR=5.4$ ,  $p<0.0001$ ,  $OR=7.02$ )。さらに  $D'$  を指標として連鎖不平衡がどの程度及ぶか検討したところ、NA3.L マイクロサテライトマーカーと近傍の 2 つの SNPs は 1 つの連鎖不平衡ブロックに入ることがわかった。したがって、このブロックの中に何らかのナルコレプシー感受性遺伝子が存在する可能性が示唆された。このブロックの中には既知の遺伝子は存在しないが、隣接して 3 つの予測遺伝子が報告されていることから新規遺伝子の存在が示唆される。またその中の 2 つはヒト脳由来 cDNA を用いた RT-PCR により、脳での発現が示された。

以上、本論文は新たな疾患感受性領域を同定するために提案された新たな戦略により、網羅的な解析を行う事が可能であることを示した。また、その方法を用いてヒトナルコレプシーの解析を行い、新たな感受性領域の同定を行った。今回用いた戦略は高血圧や糖尿病といった他の多因子疾患における疾患感受性領域の同定にも応用できる事、また、今回同定された領域は新たなナルコレプシー感受性領域であり、今後のナルコレプシー研究の発展に大きく貢献すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。