

論文内容の要旨

論文題目

Molecular- and ethno-epidemiology of ovalocytosis in Asian-Pacific region

(アジア太平洋地域における卵形赤血球症の分子-民族疫学)

氏名 木村 正子

赤血球形態の顕微鏡観察により、これまでに、卵形赤血球症 **ovalocytosis** がアジア太平洋地域に住む人類集団中に比較的高い頻度で見出されてきた。世界の他の地域で見つかる卵形赤血球症および楕円形赤血球症は、孤発的で溶血性貧血を伴うものがほとんどだが、このアジア太平洋地域で多く見つかる卵形赤血球症は、多いところでは集団中の約半数までの高い頻度で見つかる点、臨床的に無症状である点が特徴とされ、東南アジア型/メラネシア型卵形赤血球症 **Southeast Asian/Melanesian ovalocytosis (SAO)** と呼ばれるようになった。

SAO が高い頻度で報告される地域がマラリア流行地にあること、マラリア流行地における調査で同一集団中で子供より大人に SAO の頻度が高いことが報告され、SAO がアジア地域におけるマラリア抵抗性形質の一つであると考えられてきた。SAO のマラリア抵抗性を示唆する報告は次々となされたが、SAO の遺伝様式、マラリア感染率にあたる影響、抵抗性を示すマラリア原虫種などに関しては、報告間で異なり、矛盾を残したままであった。

マラリアに対して抵抗性を持つ遺伝的形質としては、有名な例としてアフリカで見られる鎌型赤血球貧血症があげられるほか、G6PD 欠損症、サラセミア、Duffy 血液型などが知られている。それらの形質の分子機序として、ヘモグロビン、赤血球酵素、膜タンパク質などの異常が解明されており、マラリア抵抗性を示す機構についてもほぼ明らかになっている。一方、SAO の原因となる分子機序としては、1991年にバンド3タンパク質をコードするバンド3遺伝子の27塩基対欠失 (**B3Δ27**) が報告された。バンド3タンパク質は赤血球膜に存在し、膜貫通ドメインが陰イオントランスポーターとして、膜内ドメインが細胞骨格系タンパク質を膜につなぎとめるアンカーとして働く。**B3Δ27** を持つバンド3遺伝子

の産物は、膜貫通ドメインと膜内ドメインの境界部位の 9 アミノ酸が欠失しており、その両ドメインの働きが影響を受けることが明らかにされている。この欠失はヘテロ接合で存在すると卵形赤血球症を呈するが、ホモ接合体の生存例が見つかっていないことからホモ接合体は胎児期に致死であるとされている。B3Δ27 による卵形赤血球症が、そのマラリア抵抗性によって選択されてきたならば、B3Δ27 はマラリアによる淘汰圧の下での平衡多型の例として考えられる。ほとんどの B3Δ27 の報告がアジア太平洋地域からなされていることを考えると、アジア太平洋地域における人類集団のマラリアへの遺伝的適応という観点からも、この形質は非常に興味深い題材であるため、卵形赤血球症とマラリアについて分子・民族疫学的研究をおこない、そこで得られた知見を本論文としてまとめた。本論文の第 I 部では、卵形赤血球症についてこれまでになされてきた研究を中心に本研究の背景を紹介し、第 II 部では、B3Δ27 についてその分布と起源についての研究結果をまとめた。第 III 部では、B3Δ27 とそれ以外の機序による卵形赤血球症についてマラリア抵抗性との関連を調べ、第 IV 部では本研究全体の総括をおこなった。

B3Δ27 が SAO の分子機序として報告された以後、少数の個体や集団でその存在が確認されたとの報告はあったものの、広くアジア太平洋地域での分布は明らかにされていなかった。そこで、本論文第 II - 1 章では、タイからマレーシア、インドネシア、台湾、フィリピン、パプアニューギニアにかけての地域に住む 44 集団、計 3881 人について PCR 法を用いて B3Δ27 のスクリーニングをおこない分布を明らかにした。その結果、赤血球形態の観察によってこれまでに報告されてきた SAO の頻度と比較して、B3Δ27 の頻度が低いことが判明し、これまでに赤血球形態の観察により報告されてきた SAO には B3Δ27 以外の原因によるものが含まれていた可能性と、同じ民族集団とされている中でも B3Δ27 の分布が集団によって大きく異なっている可能性が考えられた。そして、本研究では B3Δ27 の分布がオーストロネシア語族の集団の分布とよく一致していることが観察された。オーストロネシア語族の集団は、現在ではアジアから遠く離れたマダガスカル島などの地域にも住んでおり、それらの地域にも B3Δ27 が分布しているとの報告があることを考えると、B3Δ27 は、オーストロネシア語族の集団の移動とともに、アジア太平洋地域に拡散していったと考察された。

B3Δ27 の分布がアジア以外までの非常に広い地域にわたっていること、また、赤血球形態観察によりマレー半島とパプアニューギニアで高い頻度で見つかる SAO が同起源のものか否かで議論があったことなどから、第 II - 2 章では、B3Δ27 の起源を探るべく、バンド 3 遺伝子の塩基配列の変異を調べ B3Δ27 の連鎖多型を明らかにし、ハプロタイプ解析をおこなった。対象としたのは、アジア太平洋地域に住む様々な集団中の B3Δ27 をもつ個体、およびアジア太平洋地域と他の地域の一般集団であり、ハプロタイプの推定は、SSCP 法を用いて個々の多型の遺伝子型を決めたのち PHASE プログラムを用いておこなった。さらに、B3Δ27 についてはハプロタイプの推定のみではなく allele-specific PCR 法によって直接、連鎖多型を決定した。この結果、B3Δ27 を持つバンド 3 遺伝子が、全て同じハプロタ

イプを持つことが示され、B3Δ27 が単一起源であることが強く示唆された。B3Δ27 が生じた染色体のものと考えられるハプロタイプの分布を一般集団中で調べたところ、その頻度は低いながらも、東南アジア大陸部からインドネシア島嶼部にかけて見つかるのに対し、オーストロネシア語族の起源とされている台湾には見つからず、またフィリピン、ニューギニア高地でも見つからなかった。このことから、B3Δ27 は、ニューギニアや台湾の方よりは、アジア大陸から島嶼部で起きた可能性が高いと考えられた。考古学的・言語学的研究から推定されているオーストロネシア語族の移動の時期と、現在の B3Δ27 の分布とを考えると、B3Δ27 は紀元前三千年から紀元前二千年くらいの時期に、アジア太平洋地域に拡散してゆくオーストロネシア語族の集団中の遺伝子プール内に増え、その後、創始者効果や遺伝的浮動、またマラリアによる選択淘汰を通じて広がっていったと考察された。

赤血球形態の観察によって報告されてきた SAO と今回明らかにした B3Δ27 の頻度の間に大きな差があったこと、実際に B3Δ27 を持たない卵形赤血球症の例も見つかったことなどから、SAO として報告されたものの中に含まれるのが、B3Δ27 だけではない可能性が示された。SAO とマラリアの関係については報告間で異なった結果を示すものが多かったため、卵形赤血球症とマラリアの関係を明らかにするには、分子機序の異なるものは、個々についてマラリア抵抗性を評価することが重要となる。そこで第Ⅲ部において、卵形赤血球とマラリアの関係を明らかにすべく、卵形赤血球症を B3Δ27 によるものとそれ以外のものに分類し、それぞれについてマラリア感染率および感染しているマラリア原虫の種類について研究をおこなった。

第Ⅲ-1章では、まず B3Δ27 による卵形赤血球症について、マラリア感染による症状を呈する人(n=129)と健常人(n=231)の間で B3Δ27 の頻度を比較したが、有意な差はみられず(P>0.8)、B3Δ27 はマラリア感染による有症状率には影響を与えないことが明らかになった。また、マラリア感染者については感染原虫の種類についても分類し、原虫種ごとに B3Δ27 の頻度を比較したが、マラリア原虫の種類による差はないことが判明した。最近のニューギニアにおける研究の報告では、B3Δ27 は脳性マラリアに対して抵抗性を示すことが明らかにされており、本研究の結果とあわせて考えると、B3Δ27 は感染を防ぐのではなく感染後の症状の重篤化を防ぐことにより、マラリアへの抵抗性に寄与していると考えられた。

次に第Ⅲ-2章では、ボルネオ島東部の人類集団中に見られた B3Δ27 以外の原因による卵形赤血球症について、塗沫標本上でみられる卵形赤血球の割合と、マラリア感染との関係を調べた。その結果、赤血球のうち 50 から 100%が卵形を示す個体では、有意にマラリア感染率が低下していることが観察された(P<0.05)。この集団でみられたように、B3Δ27 以外の機序によっておきる卵形赤血球症で、マラリア感染率を有意に低下させる働きを持つものがあることが示されたことから、SAO のマラリア抵抗性に関する報告に見られる矛盾点は、複数の異なる機序による卵形赤血球症を SAO という一つの形質として扱ったことによって生じたものと考えられた。

そこで、このような B3Δ27 以外の卵形赤血球症の分子機序を明らかにすることを目的と

して、第Ⅲ－3章では赤血球膜タンパク質の研究をおこなった。第Ⅱ部のスクリーニングの過程で見られた B3Δ27 以外の原因による卵形赤血球症の血液試料について、卵形赤血球症をきたす原因として報告がある膜タンパク質のグリコフォリン、スペクトリン、バンド 4.1 についてウェスタンブロットティング法を用いて調べた。その結果、スペクトリンとバンド 4.1 のいずれかのタンパク質が検出されないもの、および発現量が低下しているものが見つかったが、異なる泳動度を示すものは見られず、また今回調べたタンパク質については異常が検出されないものもあった。このことから、アジア太平洋地域において見られる卵形赤血球症には、B3Δ27 以外の原因によるものが複数存在し、その原因としては、スペクトリン、グリコフォリン、バンド 4.1 やその他の分子機序を持つものが含まれる可能性が示された。

以上の研究の結果より、赤血球形態の観察によってアジア太平洋地域で SAO として報告されていた卵形赤血球症は、B3Δ27 による単一の形質ではなく、バンド 3 タンパク質以外の様々な分子機序の関与があったと考えられた。B3Δ27 は、ハプロタイプ解析の結果から単一起源であると考えられ、紀元前三千年から紀元前二千年頃に東南アジア島嶼部のオーストロネシア語族の集団中で頻度が高くなった後、マラリアによる選択も手伝って人類集団の分布拡散に伴い、現在のようにアジア太平洋地域に住む様々な人類集団中に広く存在するようになったと考えられた。B3Δ27 のマラリア抵抗性は感染を防ぐというより、マラリア感染後の症状の重篤化を抑えることによると考えられた。それに対し、本研究ではマラリア原虫の感染に抵抗性を示す例が B3Δ27 以外の機序による卵形赤血球症で見いだされた。今後アジア太平洋地域における卵形赤血球症とマラリアの関係を解き明かしていく上で、その分子機序の解明が、非常に重要となると考えられた。