

論文の内容の要旨

論文題目 肺抗酸菌症の疾患感受性遺伝子の探索

指導教員 長瀬 隆英 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

庄嶋 淳子

肺に病変をつくり、ヒトの健康を害する肺抗酸菌症は、結核症と非結核性抗酸菌症に大別される。我が国は現在でも世界的にみて肺結核症の中蔓延国であり、今後は高齢者結核、さらに結核に対する免疫を持たない若年層の増加や、途上国からの結核感染者流入など、感染症のグローバル化について対策が求められている。一方、非結核性抗酸菌症はその 7 割以上を占める *Mycobacterium avium complex* (MAC) 症が明らかな免疫学的異常を検出できない中高年の女性に多く、難治性であることから、結核罹患率の低下した国々で問題となっており、その病態解明と新しい治療法の開発が望まれている。

抗酸菌感染症の成立と発症には環境、菌側の要因、そして宿主側の要因が複雑に関係する。結核菌に感染した 1 割のみが肺結核症を発症することから、宿主側の要因が示唆されてきた。性別、人種のほか、遺伝素因として、Human leukocyte antigen (HLA) 遺伝子、Natural resistance associated macrophage

protein 1 (NRAMP1) 遺伝子、ビタミン D 受容体遺伝子、Mannose binding lectin 遺伝子などが報告されてきた。一方、肺 MAC 症においては弱毒菌にも関わらず、健康な宿主に感染し発症することから、内的な素因が発症に重要と推測されてきた。この遺伝的素因については HLA 型、NRAMP1 遺伝子、cystic fibrosis transmembrane conductance regulator 遺伝子などが報告されているが、ごく限られたものである。このように抗酸菌症発症には多数の遺伝子が関与し、その遺伝子型頻度は各集団の遺伝的進化の過程における抗酸菌の関わり方によっても異なると考えられる。本研究では、日本において問題となる肺 MAC 症の疾患感受性領域のゲノムワイドな探索と、結核高蔓延国であるベトナムのハノイ市において問題となる肺結核症の疾患感受性遺伝子の探索を行った。いずれもマイクロサテライトマーカールを用いた患者対照関連解析の手法を用いた。

肺 MAC 症の疾患感受性領域の探索は、国立病院機構近畿中央胸部疾患センターおよび国立病院機構の関連施設、国立病院機構東京病院、東海大学医学部と国立国際医療センターの共同研究として行われた。1997 年の American Thoracic Society の診断基準に沿って診断された日本人肺 MAC 症患者集団 300 例と、性別を一致させた日本人対照集団 794 例を対象とした。対照集団は 2 パネルに分かれ、300 例をプールド DNA 検体とそれに続く個人解析に用い、残り 494 検体は個人解析に用いた。100 人分の DNA 検体からなるプールド DNA を患者対照 3 セット作成した。約 100 kb 間隔でゲノムワイドに設置された 19,651 個のマイクロサテライトマーカールについてプールド DNA のタイピングを行った結果を患者対照間で比較し、いずれかのアレルで P 値が 0.05 未満であれば陽性マーカールとして選択した。1 次から 3 次のスクリーニングにより 74 マーカールを選出した。74 マーカールについて偽陽性を除去する目的でプールド DNA に供した個人 DNA を用いて再度解析を行った。Bonferroni による多重検定補正後に、患者対照者間で有意差を示したマーカールはなかったが、D13S791、D11S0536i、D6S0009i、D17S1290 の 4 マーカールでは、3 セットの比較において同じアレルで繰り返し P 値が 0.05

未満であり、疾患との軽度の関連を示している可能性があった。このうち P 値が最も小さく (A6 アリルにおいて $P=0.0007$, $OR=1.53$)、HLA 領域の MHC class1 chain-related A (MICA) 遺伝子の exon5 に存在する D6S0009i マーカー (MICA-TM マーカー) を候補として選出した。他の 3 マーカーは、周囲に機能的に疾患と関連する可能性のある既知遺伝子が存在せず、さらなる解析を行わなかった。新たな 494 例の対照集団を用いて MICA-TM マーカーの A6 アリルと疾患との弱い関連を確認した ($P=0.0475$, $OR=1.25$)。関連は原因不明の MAC 症が多く見られる女性のみで比較するとさらに強まった ($P=0.0007$, $OR=1.55$)。

MICA 分子は NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、CD8 陽性 T 細胞上の NKG2D 受容体のリガンドの一つであり、上皮細胞や単球、樹状細胞、マクロファージが様々なストレスを受けることにより発現し、免疫反応を引き起こすことが知られている。本疾患への MICA 分子の関与を検討する目的で、肺 MAC 症患者病変部と肺癌患者非癌部の病理組織に対し抗 MICA 抗体を用いて免疫染色を行った。細気管支上皮と肺泡マクロファージは両組織にて染色が認められ、肺 MAC 症の中心病変である肉芽腫の類上皮細胞や多核巨細胞でも染色陽性であった。次に有意アリル A6 の機能的意義を調べるため、正常なヒト気管支上皮培養細胞におけるアリル特異的な mRNA レベルの発現解析を行った。A6/nonA6 ヘテロ接合型の 42 細胞において、MICA-TM と完全な連鎖不平衡にある exon3 の G/C SNP を含む領域の RT-PCR 産物について SSCP で一本鎖に分離し、A6 と non A6 由来バンドの蛍光度比を算出した。一標本 t 検定において、A6 由来の mRNA レベルでの発現が有意に高いことが示された。一方マーカー周囲に感受性遺伝子が存在する可能性を考え、100 kb 内上下流に位置する既知候補遺伝子 HLA-B と HLA-DRB1 遺伝子について、患者と対照それぞれ 300 例の解析を行ったが Bonferroni 多重検定補正後も有意なアリルは無かった。MICA-A6 を含めたハプロタイプは、B*5201-A6-DRB1*1502 と B*4403-A6-DRB1*1302 の二つに分かれることが示されたが、いずれも統計学的に有意な関連を示さなかった。HLA-B、MICA-TM、-DRB1 の 3 遺伝子のうち MICA-A6

アリルが最も強く関連していた。

抗酸菌感染症において機能する Th1 系免疫に関わる遺伝子近傍に設置されたマイクロサテライトマーカーを用いて、ベトナム人肺結核症の疾患感受性遺伝子の探索を行った。喀痰の抗酸菌塗抹検査で過去 1 ヶ月以内の 1 回以上の陽性を診断基準とした。肺結核症患者集団 100 例と対照集団 200 例について関連解析を行い、IFNGR2 遺伝子上流 2000 bp と intron2 内にある 2 マーカーが Bonferroni 多重検定補正後も対照集団に有意に多いことが示された (IFNGR2-1 マーカー; 補正後 $P=0.0096$, $OR=0.47$, IFNGR2-2 マーカー; 補正後 $P=0.0216$, $OR=0.46$)。2 マーカーの有意アリル同士は連鎖不平衡状態にあった ($D' =0.92$, $r^2=0.64$)。マーカーと連鎖不平衡にある疾患関連性多型を探索する目的で、HapMap プログラムの中国漢民族のデータを用いてマーカー周囲 100-200 kb 内の 27 個のタグ SNP を選出し、肺結核症患者集団 277 例と対照集団 506 例について関連解析を行った。単独で有意差を示した SNP はなかった。タグ SNP によるハプロタイプ関連解析でも有意差を示したハプロタイプはなかったが、二つのマイクロサテライトマーカーの有効領域において、両マーカーを含む A-325-GGCAT-252-CT ハプロタイプが関連解析で疾患抵抗性を示した ($P=0.0021$)。本ハプロタイプは IFNGR2 遺伝子とその周囲領域に存在し、疾患関連性の機能的多型を探索する目的で IFNGR2 遺伝子のプロモーター領域 (翻訳開始点から-990 bp まで) と全エクソン (exon1-7) についてベトナム対照集団から任意に選出した 16 検体を用いて SNP スクリーニングを行った。タグ SNP 以外に検出されたプロモーター領域の既知の 3SNP について、患者集団 100 検体と対照集団 200 検体を解析した。単独で有意差を示した SNP はなかったが、関連解析で 3SNP のハプロタイプ ATC 弱い疾患抵抗性を示した ($P=0.0409$)。これらの SNP は Rhee らの既報における転写制御領域内にほぼ含まれ、また 3 つの SNP のうち最も上流の SNP は転写因子 NF- κ B の結合部位に存在していることがわかった。統計学的にはこれらのハプロタイプの有意差はスクリーニングに用いたマイクロサテライトマ

ーカーを越えなかったが、機能的な変異である可能性があり、さらに今後の検討が必要と考えられた。

本研究ではマイクロサテライトマーカーを用い肺抗酸菌症の疾患感受性遺伝子の探索を行った。ゲノムワイドな研究 A からは上皮やマクロファージ系細胞を介して炎症を誘導する MICA 遺伝子を見出し、続く機能解析から気道上皮での MICA の発現量の違いが気道炎症に影響し、肺 MAC 症の疾患感受性因子となりうつ可能性が示唆された。また候補遺伝子アプローチ的な研究 B からは Th1 系免疫においてマクロファージの活性化に関わる IFNGR2 遺伝子のプロモーター領域の疾患抵抗性ハプロタイプを検出した。今後、MICA の気道炎症への関与や IFNGR2 発現制御の機構が明らかになり、さらに新たな候補遺伝子の探索と機能解析の結果が集積されることにより、宿主の病態からみた治療への道が開かれることが期待される。