

日本人ゲノムの多型情報の集積と多遺伝子性疾患の 疾患感受性遺伝子の同定に関する研究

研究代表者：板倉 光夫（徳島大学ゲノム機能研究センター）

I 試験研究の全体計画

1. 研究の趣旨

ゲノムの多様性に基づく「ありふれた病気（common diseases）」は、環境因子以外に疾患に対する個人の感受性を決める複数の疾患感受性遺伝子により規定されている。本提案では、日本人ゲノムの多型情報に基づいて、日本人の「ありふれた病気」の疾患感受性遺伝子を明らかにするために必要な条件と解析方法に関する学術的検討を行う。第一の方法として、高血圧と痛風等の「ありふれた病気」の大家系と罹患同胞対を対象として、「マイクロサテライトマーカーを用いる全ゲノムにわたる連鎖解析」、およびこれらと多数の罹患患者を対象として「罹患患者群と健常者群における標的遺伝子局所の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism; SNP, スニップと略称する）の頻度の偏りの解析、すなわち関連解析を行い、日本人の多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子を同定する場合に必要な条件となる「家系数」、「臨床的表現型による層別」、「解析ソフトウェア」等に関する条件と方法を明らかにする。第二の方法として、遺伝子導入・消失等の遺伝子負荷を与えた遺伝子負荷動物を対象とし、「標的遺伝子とそのゲノム多型」が「疾患感受性遺伝子により規定される定量的形質」に与える影響を解析することにより、多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子を同定する場合に必要な条件と解析方法を明らかにする。日本人ゲノム多様性情報の有効利用法に関する学術基盤の整備にあたり、①日本人健常者ゲノムのSNPの収集、②罹患患者を対象とした候補遺伝子のSNPの型と疾患との関連解析により疾患感受性遺伝子を判別する研究、および③多遺伝子性疾患に関する遺伝情報の収集解析システムの開発を行う。本提案では、これらをあわせ、日本人ゲノムの多様性から、疾患感受性候補遺伝子を抽出するために必要な条件と方法に関する研究基盤を確立すると同時に、日本人SNPと疾患感受性候補遺伝子に関する具体的なデータの蓄積を目指す。

2. 研究内容及び目標

1. 日本人SNPの収集と疾患感受性遺伝子の探求

(1) 日本人SNPの収集

- ① 日本人SNPの収集とその特徴を利用した循環器疾患の疾患感受性候補遺伝子を中心とした多型解析
(国立循環器病センター)

「ありふれた病気」の疾患感受性遺伝子は単一の遺伝子異常によるものでなく、複数の遺伝子の変化が関わりと考えられ、その解析に際して日本人のゲノム多型情報を収集することが重要である。一方、「ありふれた病気」と同じあるいは類似する病態を呈する疾患のなかに単一遺伝子病が含まれ、これらの疾患原因遺伝子が疾患感受性遺伝子の一部となっている。そこで、それらを含め、これまでの検索でありふれた循環器疾患の疾患感受性遺伝子候補を手始めに、MF-PCR-SSCPならびにdHPLCなどの方法を駆使して収集する体制、さらに、得られたSNP情報をもとに遺伝子型解析を行う体制を整える。収集して得られた日本人SNP情報の特徴をもとに、多型情報を有効に用いて疾患感受性遺伝子にせまる方法を検討し、その循環器疾患の疾患感受性遺伝子の探索をおこなう。

- ② 日本人SNPの収集とその特徴を利用した代謝性疾患の疾患感受性遺伝子候補遺伝子を中心とした多型解析
(徳島大学ゲノム機能研究センター)

「ありふれた病気」の発症は単一の遺伝子異常によらず、複数の遺伝子の変化が相加的に発症因子として関与する。日本人の多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子を同定するために、マイクロサテライトとSNPを含む日本人ゲノムの多型情報を収集する。その上で、日本人の臨床情報により層別を行った約50罹患同胞対を対象とする「罹患同胞対解析」、大家系の「パラメトリック連鎖解析」により疾患感受性遺伝子の座位が特定できるか否かを検討する。この結果に基づきさらにシミュレーション解析によりどの程度の家系数が必要であるかを検討し、必要な臨床試料の収集の体制を確立する。

多遺伝子性疾患の発症や予後が単一遺伝子疾患の原因遺伝子や候補遺伝子の発現の異常を介して制御されるので、これまでに明らかにされた単一遺伝子疾患の疾患原因遺伝子と候補遺伝子に関し、主として代謝性疾患を中心に、これらの疾患原因遺伝子に関してのイントロン・エキソン構造とプロモーターの配列を明らかにし、これらの領域に存在するSNPを、MF-PCR-SSCP等の方法を用いて収集する体制を整える。日本人のゲノム多様性に関するデータベースの実用化を図る。

- ③ 代謝疾患発症リスク因子として関係するY染色体における日本人SNPの多型解析
(徳島大学医学部)

これまでの男性の体重・身長データとY染色体上のDNA多型の解析より、Y染色体上に肥満を促進する遺伝子が存在することが示唆されている。このY染色体上に存在する肥満促進因子について、SNP解析によりその遺伝子

(または遺伝子群)を同定して、この因子による肥満と高血圧の関連について疫学的に解析する。すなわち、まず、Y染色体上のSNPをカタログ化し、肥満に関係した領域を特定する。そのために、Y染色体上のSNPを探索して得られたSNPを使って肥満の関連解析を行う。さらに、候補領域を狭めると共に、領域内に存在する候補遺伝子cDNAについてSNPのカタログ化を行い、肥満や高血圧との関連を分子疫学的に解析する。

④ 疾患原因としての遺伝子塩基トリプレットリピートの伸長に関連する日本人ゲノム多型の解析

(徳島大学ゲノム機能研究センター)

1991年にCGGとCAGリピートの伸長によって引き起こされることが証明されて以来、多くのヒトの遺伝病が同様の単純なトリプレットリピートの伸長の結果起こることが明らかとなってきた。しかし、トリプレットリピートの伸長機構は殆ど理解されておらず、トリプレットリピートの近傍に存在する特異的な配列とそれを認識する細胞因子との相互作用の結果誘導されるクロマチンの構造変化がDNA複製時のDNAポリメラーゼの「滑りやすさ (slippage)」を促進し、その結果、特定の遺伝子内のトリプレットリピートの伸長を促すと考えられているものの、まだ不明の点が多い。本研究ではCGGリピートの伸長に関連するゲノム多型の同定を試み、種々の疾患におけるFMR1座位、特にCGGリピート近傍のSNPをMF-PCR-SSCPならびに直接DNA配列決定により収集する。検出されたSNPの意義を患者群と健常者群におけるSNPの頻度の偏り、すなわち、関連解析により詳細に検討して、最終的にありふれた疾患とトリプレットリピートとの関係を明らかにする。

(2) 各種疾患における病因解析

① 血管調節障害に基づく疾患の患者ゲノム多型による病因解析

(国立循環器病センター)

一つの素因遺伝子が、高血圧発症に寄与する程度は、それほど大きなものとは考えられず、対立遺伝子の頻度にもよるが、かなり大きな対象集団が必要と思われる。現在までに、一般住民からランダムに抽出されたサンプルを約5000(吹田スタデー)、大学病院にて疾患特異的に集められたサンプルを約1200(心筋梗塞 400, 狭心症 300, 高血圧 500)を保持しているが、国立循環器病センターにおいて更に収集を図る。疾患感受性遺伝子を絞り、意義ある変異を検索後、その変異と疾患の関連を検索する方向で研究を進めるため、高血圧モデルラットを用いた連鎖解析より見出した複数の候補座位とヒトとのcomparative mappingよりいくつかの候補遺伝子を見出し、これらにおける変異検索をすすめて疾患感受性遺伝子にせまる。

② 心不全を中心とした患者ゲノム多型による病因解析

(国立循環器病センター)

国立循環器病センターにおいて患者ゲノム収集・保存に必要な取り扱い基準の整備、インフォームドコンセントの

整備を行い、ゲノムDNA試料の収集に関する、問題点を解決しながらゲノムDNAバンクとしての遺伝子検体管理室を運用して、病因解析のための基盤を構築する。多遺伝子性疾患の病因に単一遺伝子病で同定された遺伝子の関与のあることが知られることから、患者ゲノム、臨床情報の収集と同時に、家族性心筋症およびそのほかの心不全患者について疾患感受性を決める候補遺伝子の解析、さらに、他の疾患感受性候補遺伝子について順次解析をおこなう。最終的に、家族性の心不全をきたす疾患の新規病因遺伝子ないし疾患感受性遺伝子について関連解析を行い、最終的にその同定を目指す。

③ リウマチ性疾患を中心とした患者ゲノム多型による病因解析

(東京大学医学部)

(徳島大学ゲノム機能研究センター)

リウマチ性疾患(慢性関節リウマチ・痛風)の遺伝要因を、兄弟例を用いた罹患同胞対法で検討する。そのため、各50家系を集め、患者ゲノムDNAの収集を行いデータベースを構築する。遺伝分析には、まず全染色体に分布する約400のマイクロサテライト(MS)マーカーを用いる。疾患の分析にあたり、従来情報が不十分な日本人正常人のMS多型の頻度についても検討する。以上より推定される疾患感受性領域と疾患の関連を関連解析で検討するが、これにはランダムな患者サンプルを用いる。また、推定されるMS近傍の他のMSや遺伝子、SNPを検討するためのPCRなどの基礎検討を行う。

(3) ゲノム多型情報と臨床情報のデータベース化と解析方法の確立(東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター)

多遺伝子性疾患に関する遺伝情報を収集解析するためには、SNP等のゲノム多様性に関する情報をデータベース化すると同時に臨床情報をデータベース化する必要がある。多数の臨床データの中から、疾患感受性遺伝子により決定されると考えられる病態の特徴を、典型的な「ありふれた病気」に関して選定する。これらの臨床情報は、患者群をこれらの特徴に応じて層別し、臨床情報とゲノム多様性との関連解析を行うために必須である。臨床情報としてデータベースするための項目と表示の方法を考案し、これらの情報をデジタル情報として入力しデータベース化するシステムを開発する。また、連鎖解析、あるいは広い意味では遺伝情報と表現型との関係を分析するために必要なソフトウェア、および補助ソフトウェアを開発し、患者や一般人から得られたDNAサンプルを用いたSNPや他の多型の分析結果をそれらのソフトウェアで解析する。疾患については初期には痛風と慢性関節リウマチ、それらが解決した後は膠原病や類似疾患、さらには疾患以外の表現型について解析する。最終的に多くの研究者が広く連鎖解析を行えるためのソフトウェアパッケージを開発する。また、SNPおよび他の多型と表現型が集団内でどのように変化し、維持されるかをシミュレーションソフトウェアを開発し分

析する。さらに、実験的DNA分析の結果を分析し解析するための自動化システムと必要なソフトウェアを開発し、同時に、将来、患者のSNPが分析されるようになった場合、それを患者の利益になる方向で即座に臨床応用するために必要な医師と患者間のインターフェースの原形を開発する。

2. モデル動物を用いた疾患感受性遺伝子の解析

(1) 遺伝子改変動物モデルを用いた疾患感受性遺伝子の解析

① モデル動物を用いた心機能不全の疾患感受性遺伝子の機能解析 (国立循環器病センター)

心不全モデル動物としてジストロフィン結合蛋白質遺伝子の異常を持つハムスターモデル及びこの蛋白質又は関連蛋白質を欠損させたマウスモデルを用いて、心不全の発症と病態の進行に関与する遺伝子を同定してその機能解析を行い心機能変化との関連を明らかにする。また、遺伝子操作動物モデルを作成することにより、同定した遺伝子産物の分子・細胞レベルの機能評価と *in vivo* の心筋機能変化との関連を明らかにしてこれらの遺伝子の病態的役割を評価する。

② モデル動物を用いた血管疾患の疾患感受性遺伝子の機能解析 (国立循環器病センター)

動脈硬化や心筋梗塞などの循環器疾患の要因として、アラキドン酸から生合成されるプロスタサイクリン (PGI) とトロンボキサン (TX) のバランス異常が考えられている。本研究は、このバランス異常がどのように循環器疾患の発症と進展に結びついているかを、遺伝子改変マウスをモデルに使用して解明することを目的とする。具体的には、PGIとTX合成の鍵を握るPGI合成酵素とTX合成酵素を欠損したマウスの解析と、両酵素を過剰発現するトランスジェニックマウスの作成と解析を行う。特に、PGIとTXのバランス異常と心血管病変の発症進展の関連を、動物個体と遺伝子変異動物から得られる組織や細胞を材料に、分子生物学的手法を使って解析する。

③ モデル動物を用いた免疫疾患の疾患感受性遺伝子の機能解析 (徳島大学ゲノム機能研究センター)

生体防御の司令塔として自己・非自己の識別を担うTリンパ球は、胸腺にて発生分化する。しかし、多能性の造血前駆細胞がどのようにして胸腺環境でTリンパ球への分化方向を決定づけられるのか不明である。私たちはこれまでに、様々な遺伝子改変マウスを作成してきたが、最近、トランスジェニックマウスのうちの1系統に興味深い遺伝子挿入変異を発見した。このマウスにおいては、Tリンパ球分化が完全に停止しており、そのかわりに胸腺内でリンパ系前駆細胞が選択的にBリンパ球へと異常分化していた。最近、このマウスの異常は導入遺伝子の発現によるのではなく、遺伝子の挿入による変異であることを明らかにした

ので、本研究においてはまず、このマウスの遺伝子挿入ゲノム座の解析を進めることによってTリンパ球への分化系譜を決定する責任分子の解明を目指す。さらに、血液、免疫系だけでなく、代謝性疾患や循環器疾患との関係についても詳細に検討する。

3. 年次計画

本プロジェクトでは世界的にみて遺伝的背景が均一で疾患感受性遺伝子の抽出に有利な日本人ゲノムの多型情報に基づいて、日本人の「ありふれた病気」の疾患感受性遺伝子を明らかにするために必要な条件と解析方法に関する学術的基盤の確立を目標とする。

第I期では、まず、多遺伝子性疾患の疾患感受性遺伝子が存在する座位の特定に用いるマイクロサテライトマーカーとしては70%以上のヘテロ接合体率を示すことが求められるので、日本人を対象とし、平均約0.75センチモルガンにひとつの頻度で、この要件を満たすマイクロサテライトマーカーを明らかにする。これらの情報を用いて、大家系のパラメトリック連鎖解析、あるいは「ありふれた病気」の疾患感受性遺伝子の座位がノンパラメトリック連鎖解析のひとつである罹患同胞対解析により、約50罹患同胞対を対象として座位を特定することができるか否かを慢性関節リウマチと痛風を対象として検討する。

単一遺伝子疾患の原因遺伝子や候補遺伝子の発現の異常を介して多遺伝子性疾患の発症や予後が制御される。主として、特に高血圧、痛風、慢性関節リウマチ等の「ありふれた病気」を対象として、これまでの検索で明らかにされた単一遺伝子疾患の疾患原因遺伝子と候補遺伝子のイントロン・エキソン構造とプロモーターの配列を明らかにし、これらの領域に存在する一塩基多型 (SNP) を効率よく収集し、疾患との関連を多検体で解析できる体制を整える。

これらと平行して、①候補座位と候補遺伝子に関するデータベース、②集団遺伝学用のソフトウェア、および③SNPの位置と頻度に関するデータベースの開発を進め、具体的なデータの収納を介して、その有用性を向上させる。

第II期では「ありふれた病気」の疾患感受性遺伝子の候補遺伝子に関してSNPの型の頻度を疾患患者と健常人で比較することにより、疾患感受性遺伝子感受性遺伝子であるか否かを順次明らかにする。大家系の連鎖解析では、マイクロサテライトマーカーで明らかにされた座位に存在する候補遺伝子のSNPの多型を順次検討し、これを用いて連鎖解析を進め、求める単一遺伝子疾患の疾患原因遺伝子に迫る。より多数の単一遺伝子疾患の疾患原因遺伝子と候補遺伝子のイントロン・エキソン構造とプロモーターに存在するSNPの頻度を関連解析により比較検討し、これらが疾患感受性遺伝子として機能する可能性を順次検討する。

研 究 項 目	11 年 度	12 年 度	13 年 度	14 年 度	15 年 度
1. 日本人SNPの収集と疾患感受性遺伝子の探求					
(1) 日本人SNPの収集					
① 日本人SNPの収集とその特徴を利用した循環器疾患の疾患感受性候補遺伝子を中心とした多型解析	← 候補遺伝子の SNP 収集 →			← 連鎖不平衡解析 →	
② 日本人SNPの収集とその特徴を利用した代謝性疾患の疾患感受性遺伝子候補遺伝子を中心とした多型解析	← 候補遺伝子の SNP 収集 →			← 連鎖不平衡解析 →	
③ 代謝疾患発症リスク因子として関係するY染色体における日本人SNPの多型解析		← Y染色体の多様性の評価 →		← 関連解析 →	
④ 疾患原因としての遺伝子塩基トリプレットリピートの伸長に関連する日本人ゲノム多型の解析		← CGG リピートの多様性の評価 →		← 関連解析 →	
(2) 各種疾患における病因解析					
① 血管調節障害に基づく疾患の患者ゲノム多型による病因解析	← 患者ゲノム DNA 収集 マーカー解析 →			← 連鎖解析・不平衡解析 →	
② 心不全を中心とした患者ゲノム多型による病因解析	← 患者ゲノム DNA 収集 マーカー解析 →			← 連鎖解析・不平衡解析 →	
③ リウマチ性疾患を中心とした患者ゲノム多型による病因解析	← 患者ゲノム DNA 収集 マーカー解析 →			← 連鎖解析・不平衡解析 →	
(3) ゲノム多型情報と臨床情報のデータベース化と解析方法の確立	← 解析ソフトウェアの開発・ファイリングシステムの開発と運用 →			← 自動解析システムの構築・ゲノム・臨床情報の統合 →	
2. モデル動物を用いた疾患感受性遺伝子の解析					
(1) 遺伝子改変動物を用いた疾患感受性遺伝子の解析					
① モデル動物を用いた心機能不全の疾患感受性遺伝子の機能解析	← 心不全モデル動物の作製 →			← 心機能関連遺伝子の解析 →	
② モデル動物を用いた血管疾患の疾患感受性遺伝子の機能解析	← 血管病モデル動物の作製 →			← 血管病変関連遺伝子の解析 →	
③ モデル動物を用いた免疫疾患の疾患感受性遺伝子の機能解析	← 免疫不全モデルの解析 →			← ありふれた病気と免疫不全との関連解析 →	
所 要 経 費 (合 計)	180 百万円	185 百万円	189 百万円	231 百万円	197 百万円

4. 平成 15 年度における実施内容と達成目標

1. 日本人 SNP の収集と疾患感受性遺伝子の探求

(1) 日本人 SNP の収集

① 日本人 SNP の収集とその特徴を利用した循環器疾患の疾患感受性候補遺伝子を中心とした多型解析

(国立循環器病センター)

前年度に引き続き正常日本人由来ゲノム DNA (100 アリル以上) を用いて、循環器疾患感受性候補遺伝子のそれぞれについて、翻訳領域、プロモーター領域について MF-PCR-SSCP 解析ならびに dHPLC 解析による SNP の収集を継続しながら、公的データベースも活用し、日本人 SNP 情報について活用可能な情報源として用いて、SNP の位置情報ばかりでなく頻度情報さらに個々の SNP 間の連鎖不平衡についても検討する。さらに、SNP ハプロタイプ解析を日本人ゲノム多型について行い、得られた情報を元に、循環器病モデル疾患についてハプロタイプ解析など新しい手法に基づく相関解析をおこなって、国立循環器病センター、徳島大学、東京女子医科大学、東京大学の共同研究者とともに効率的に解析を進め、疾患感受性遺伝子にせまる。

② 日本人 SNP の収集とその特徴を利用した代謝性疾患の疾患感受性遺伝子候補遺伝子を中心とした多型解析

(徳島大学ゲノム機能研究センター)

今年度は昨年度までの成果を活用し、以下の項目につき解析し、代謝性疾患の疾患感受性遺伝子候補遺伝子の抽出と検討を行う。①「糖尿病」および「関節リウマチ」の不死化細胞株の蓄積：「糖尿病」に関して1000例以上の不死化を達成する。健常対照者に関して500例を目標として不死化細胞株を樹立する。②等間隔-高頻度SNPs検出プロブセットの開発：日本人46名でアレル頻度が15%以上であることを検証し、10kbに1個以上のSNPsを検出するプロブセットを、候補座位を対象として開発する。③等間隔-高頻度SNPsを検出するプロブセットを用いる二段階のローカスワイド関連解析：「糖尿病」に関して、複数人種に関して複数の独立した関連解析により、共通して認められた座位を抽出する。「糖尿病」の候補座位に関して、日本人で検証された、等間隔-高頻度SNPsを検出するプロブセットを用いて二段階のローカスワイド関連解析を行う。④「家族性若年性痛風性腎症」の原因遺伝子の機能解析：「家族性若年性痛風性腎症」の大家系のパラメトリック連鎖解析により明らかにした、16p12領域に存在し、アミノ酸置換を伴う候補遺伝子の変異につき検討する。(東京女子医科大学 鎌谷直之教授との共同研究)⑤QTL解析により得られた座位のコンジェニックマウスを用いる解析：レプチン受容体を欠損し糖尿病を発症するC57BL6/KsJの遺伝的背景を持つクローン化マウスをC3Hマウスの系統と交配した雑種第二世代を対象とした、QTL (Quantitative Trait Loci; 定量的形質を決める座位) 解析で、雌雄を分

ける解析で得られた座位に関するコンジェニックマウスを作成し、マウスゲノム配列から候補遺伝子を抽出する。⑥候補遺伝子アプローチで発見されたGFAT1遺伝子の解析：糖尿病の疾患感受性遺伝子として糖尿病患者と健康対照者との関連解析により有意差を認めるグルタミンフルクトース6-リン酸アミドトランスフェラーゼ1 (GFAT1) が、糖尿病発症に関わる機序を患者由来のリンパ芽球にて検討するとともに、周辺のSNPsに関してより多数の患者と健常者を対象として関連解析を拡大する。

③ 代謝疾患発症リスク因子として関係するY染色体における日本人 SNP の多型解析 (徳島大学医学部)

前年度に引き続いてY染色体上の個々の遺伝子のエクソンにプライマーを設定し、DHPLC法やSSCP法を中心とした手法によってSNPsの収集を行う。さらに特定の遺伝子についてはイントロンの一部も解析範囲に加えてSNPsおよび塩基配列の欠失、挿入多型の検索を行う。最終的にY染色体上のSNPs等のbiallelic DNAマーカーとマイクロサテライトDNAマーカーを組み合わせることによってY染色体の詳細な分類を行い、BMIなどの体格指標とY染色体ハプロタイプとの関連解析を行う。また体格指標に関連した常染色体やX染色体上の遺伝子の多型とY染色体多型との組み合わせの影響についても解析を行う。

④ 疾患原因としての遺伝子塩基トリプレットリピートの伸長に関連する日本人ゲノム多型の解析

(徳島大学ゲノム機能研究センター)

脆弱X症候群は、最も頻度の高い遺伝性精神遅滞症であり、X染色体遺伝子FMR1内に存在するCGGリピートの伸長がこの疾患の原因である。CGGリピート数は多型を示し、正常集団中では5~50の間に分布する。病気の兆候を見せないキャリアーはリピート数60~200を有し、この状態を前変異 (premutation) とよぶ。一方、患者ではリピート数の大きな伸長が起こっており、200以上、時には数千に達する (full mutation)。患者は子孫を残さないため、full mutationはヒト遺伝子プールから失われていく。新しいfull mutationは、女性キャリアーがpremutationを子供に伝える時のみ生じる。したがって、この疾患の頻度はpremutationの頻度と相関する。諸外国におけるpremutationの頻度は約1/300 X染色体である。日本人における脆弱X症候群発症頻度の低さは、premutation頻度を反映していると予想される。これを検定するため、収集した約3,000人の正常人サンプル (約4,500のX染色体) について、PCR法を用いてFMR1遺伝子内に存在するCGGリピート数を解析する。

(2) 各種疾患における病因解析

① 血管調節障害に基づく疾患の患者ゲノム多型による病因解析 (国立循環器病センター)

これまでに引き続き、順次候補遺伝子を選び出し、それらのシーケンスより見出した変異を用いての関連研究を規

模を拡大して行っていく。更に、関連が認められた遺伝子に関しては、更に広範囲にわたってシーケンスを行い、実際の遺伝的変異が、どういったメカニズムで血圧調節に繋がるのかを明らかにする機能的検証実験を行う。以上を通して、血管調節障害に基づく疾患特に高血圧症の疾患感受性遺伝子領域に迫る。

② 心不全を中心とした患者ゲノム多型による病因解析
(国立循環器病センター)

心不全のモデルとして特発性心筋症患者をとりあげ、ゲノムDNAを採取し、原因遺伝子変異ならびに関連遺伝子多型につき解析し、患者の重症度・予後との関連につき検討する。その他の心不全患者について疾患感受性に関わる候補遺伝子の解析、更に他の疾患感受性候補遺伝子につき順次解析を行う。

③ リウマチ性疾患を中心とした患者ゲノム多型による病因解析
(徳島大学ゲノム機能研究センター)

昨年度までに引き続き、慢性関節リウマチなどリウマチ性疾患を中心として、患者ゲノムの収集に基づく病因解析を次の様に進めて病因の同定をめざす。①「関節リウマチ」の不死化細胞株の蓄積：「関節リウマチ」に関し1000例以上の不死化を達成する。健常対照者に関して500例を目標として不死化細胞株を樹立する。②等間隔-高頻度SNPs検出プローブセットを用いる二段階のローカスワイド関連解析：「関節リウマチ」に関して、複数人種に関して複数の独立した関連解析により、共通して認められた座位を抽出する。「関節リウマチ」の候補座位に関して、日本人で検証された、等間隔-高頻度SNPsを検出するプローブを用いて二段階のローカスワイド関連解析を行う。

(3) ゲノム多型情報と臨床情報のデータベース化と解析方法の確立(東京女子医大膠原病リウマチ痛風センター)

今年度も、ゲノム多型情報を用いた解析に必要なプログラムの開発を進める。連鎖不平衡、またはハプロタイプ情報はSNP、マイクロサテライト座位での遺伝子型を含んだ、個人の遺伝情報の完全情報である。通常の遺伝子型情報、あるいは集団のハプロタイプ頻度情報は特定の遺伝子についてのすべての情報を抽出していない。従って、SNP、マイクロサテライト多型についての個人情報解析が続くにつれ、その情報を完全に抽出した個人のディプロタイプ形、集団の連鎖不平衡の解析が進むと思われる。それらの解析のためには遺伝子型データを遺伝統計学的手法により解析するツールが多数必要であるので、そうしたツールなどを整備し、これらの解析法が妥当かどうかを検証するためのデータを遺伝子型解析により求め、ツールの有効性と妥当性を検討する。これらをもとに、実際に疾患関連遺伝子を特定するべく解析を進める。

2. モデル動物を用いた疾患感受性遺伝子の解析

(1) 遺伝子改変動物モデルを用いた疾患感受性遺伝子の解析

① モデル動物を用いた心機能不全の疾患感受性遺伝子の機能解析
(国立循環器病センター)

本年度は、これまでに、病態モデル動物培養筋細胞とトランスジェニックマウスを用いた検討から、心機能不全と密接に関連する可能性が高い遺伝子として同定したストレッチ感受性非特異的カチオンチャンネルについて、このカチオンチャンネルの病態に果たす役割を確定するために以下の検討を行う。(1)心筋症ハムスター個体を用い、細胞レベルでの解析から有効性が確認されたこのカチオンチャンネルに対する阻害薬を用い慢性薬理学的実験をおこなう。また、ドミナントネガティブおよびアンチセンスチャンネル遺伝子をウィルスベクター等を用いて遺伝子導入し、心機能不全の修復実験を行う。(2)他の種々の心機能不全モデル(特定の原因遺伝子異常を持つ心筋症モデル動物、機械的負荷による心機能不全モデル、心筋梗塞後リモデリング心不全モデル等)を用いて、同様な慢性薬理学的実験および遺伝子導入実験を行い、このチャンネルの発現や活性を抑えることにより病態が改善するかどうか検討する。また、可能ならば、ヒト心筋症患者の検体を用いて非特異的カチオンチャンネルの異常の有無を検討する。(3)網羅的な検索により心筋症特異的に発現変化する約50種類の遺伝子群やYeast two hybrid systemを用いて同定した非特異的チャンネルに結合するタンパク質群については、複数の異なる心機能不全モデルにおいて共通に発現変化するものを選択し、それらの細胞機能への作用や遺伝子操作動物の表現型の解析など病態との関連性を評価し、さらに、病態における役割を検討する。

② モデル動物を用いた血管疾患の疾患感受性遺伝子の機能解析
(国立循環器病センター)

動脈硬化や心筋梗塞などの循環器疾患の要因として、アラキドン酸から生合成されるプロスタサイクリン(PGI)とトロンボキサン(TX)のバランス異常が考えられている。本研究は、このバランス異常による循環器疾患の発症と進展に関連する遺伝子を探索するために、遺伝子改変マウスをモデルに用いて解析することを目的とする。血管障害を発症するPGI合成酵素欠損マウスと本酵素過剰発現細胞を用いたDNAアレイ解析によって発現変動を示す遺伝子を比較し、血管障害発症と進展に関与する可能性のある遺伝子を絞り込む。未知遺伝子については単離、解析を行い、ヒト遺伝子に還元する。また、TX合成酵素欠損マウスならびにPGI合成酵素、TX合成酵素、PGE合成酵素の過剰発現マウスの表現型を解析し、心血管系に対する影響を調べ、関連遺伝子を調べる。

③ モデル動物を用いた免疫疾患の疾患感受性遺伝子の機能解析
(徳島大学ゲノム機能研究センター)

免疫病の原因となるゲノム素因の解明に向けて、2種のモデル動物を用いた解析を進める。そのうちのひとつは遺伝子改変マウスを用いた解析で、トランスジーン挿入によ

りTリンパ球分化が初期停止する独自のモデルマウスを用いて、重症免疫不全の原因となるゲノム素因の解析を中心に進める。もうひとつのモデル動物は順遺伝学的スクリーニングの可能な小型魚類メダカで、これまでに化学誘発変異体のゲノムワイドスクリーニングにより、胸腺形成不全症をもたらす単一遺伝子劣性形質変異体を26変異体得て

いる。これらの新規変異体を対象にポジショナルクローニングを行うことによって、胸腺形成遺伝子の網羅的解明をめざす。これら2種類のモデル動物から得られる情報を組み合わせることによって、高次生命に固有の免疫システムがどのように構築されどのように破綻するのか理解を進めることができると期待される。

II 平成15年度における実施体制

研究項目	担当機関	研究担当者
1. 日本人SNPの収集と疾患感受性遺伝子の探求		
(1) 日本人SNPの収集		
① 日本人SNPの収集とその特徴を利用した循環器疾患の疾患感受性候補遺伝子を中心とした多型解析	厚生労働省国立循環器病センター	森 崎 隆 幸
② 日本人SNPの収集とその特徴を利用した代謝性疾患の疾患感受性遺伝子候補遺伝子を中心とした多型解析	徳島大学ゲノム機能研究センター	◎板 倉 光 夫
③ 代謝疾患発症リスク因子として関係するY染色体における日本人SNPの多型解析	徳島大学医学部	中 堀 豊
④ 疾患原因としての遺伝子塩基トリプレットリピートの伸長に関連する日本人ゲノム多型の解析	徳島大学ゲノム機能研究センター	塩 見 春 彦
(2) 各種疾患における病因解析		
① 血管調節障害に基づく疾患の患者ゲノム多型による病因解析	厚生労働省国立循環器病センター	岩 井 直 温
② 心不全を中心とした患者ゲノム多型による病因解析	厚生労働省国立循環器病センター	駒 村 和 雄
③ リウマチ性疾患を中心とした患者ゲノム多型による病因解析	徳島大学ゲノム機能研究センター	板 光 夫
(3) ゲノム多型情報と臨床情報のデータベース化と解析方法の確立	東京女子医科大学膠原病リウマチ痛風センター	鎌 谷 直 之
2. モデル動物を用いた疾患感受性遺伝子の解析		
(1) 遺伝子改変動物を用いた疾患感受性遺伝子の解析		
① モデル動物を用いた心機能不全の疾患感受性遺伝子の機能解析	厚生労働省国立循環器病センター	森 隆 幸
② モデル動物を用いた血管疾患の疾患感受性遺伝子の機能解析	厚生労働省国立循環器病センター	横 山 知 永 子
③ モデル動物を用いた免疫疾患の疾患感受性遺伝子の機能解析	徳島大学ゲノム機能研究センター	高 浜 洋 介
3. 研究管理	厚生労働省国立循環器病センター	森 崎 隆 幸

(注：◎は研究代表者)

Ⅲ 研究推進委員会

委 員	所 属
[プロジェクト内委員]	
○板 倉 光 夫	徳島大学 ゲノム機能研究センター 教授
森 崎 隆 幸	厚生労働省 国立循環器病センター 部長
鎌 谷 直 之	東京女子医科大学 膠原病リウマチ痛風センター 教授
[プロジェクト外委員]	
辻 省 次	東京大学 大学院 教授
加 藤 久 雄	厚生労働省 国立循環器病センター 名誉所員
増 保 安 彦	東京理科大学 薬学部 教授

(注：○は研究推進委員長)

Ⅳ 研究連絡会議

委 員	所 属
板 倉 光 夫	徳島大学 ゲノム機能研究センター 教授
森 崎 隆 幸	厚生労働省 国立循環器病センター 部長
鎌 谷 直 之	東京女子医科大学 膠原病リウマチ痛風センター 教授
中 堀 豊	徳島大学 医学部 教授