

マイクロサテライトマーカーによる疾患感受性遺伝子の探索

岡 晃 猪 子 英 俊

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

要約

我々はマイクロサテライトマーカーの利点に着目し、これをゲノムワイドに設定して多因子疾患の感受性遺伝子を網羅的に同定するプロジェクトを推進したマイクロサテライトマーカーの概要を示すとともに、最初に解析が完了した関節リウマチを例に挙げ、その方法論などを解説する。

《キーワード》マイクロサテライトマーカー、ゲノムワイド、SNP、相関解析、関節リウマチ

I. はじめに

ヒトゲノムの全塩基配列決定が完了した現在、今後の「ポストゲノムシーケンシング」として大きな課題の一つは、同定された遺伝子の機能解析であることは間違いない。ある遺伝的多型とヒトでみられる個性的な生物現象との相関を追求することにより、遺伝子とヒトが示す表現型の機能的因果関係、例えば疾患についてはその遺伝要因を解明することが可能となる。このような多様性検索こそが、実験動物で行われる遺伝子ノックアウト操作が許されないヒトについての、ゲノム機能の解析の突破口を開く、と期待される。そこで我々は、世界的に進行しているヒトゲノム多様性プロジェクトの標的である SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 単一ヌクレオチド多型; 遺伝子内の一塩基置換、欠失、挿入による差異にもとづく多型) に比べ、多型に富み、したがってより精度の高いマッピングが可能なマイクロサテライトマーカーに注目した。そこで我々はゲノムワイドなマイクロサテライトを多型遺伝マ

ーカーとする相関解析により、複合遺伝疾患の感受性遺伝子など、ヒト表現型を規定している遺伝要因を同定することを目指した。このようなマイクロサテライトマーカーを用いたゲノム多様性に関する大規模な研究は、疾患に関係する SNP の同定を効率的に推進し、疾患の治療と予防、創薬に役立つのみならず、学習、記憶などの高次行動を始め、ヒトの遺伝子やゲノム機能など、生物種としてのヒトの生命現象の分子レベルでの理解へと展開すると期待される。

II. ゲノムワイドなマイクロサテライトマーカーならびに相関解析

1. マイクロサテライトマーカーの設定

ヒトの遺伝マーカーは古くは血液型に代表されるタンパク質多型が用いられていた。しかしながら、表現型から遺伝子型が推定できない場合もあり、全染色体に配置することは実質的に不可能である。一方、白血球型抗原は遺伝マーカーとして利用され、多型性に極めて富むことから優秀な遺

表1 マイクロサテライトマーカーの多型検索結果

	実験済み	PCR 増幅あり	多型あり
既知マーカー	9,880	9,139	9,099
新規マーカー	56,207	47,045	25,170
計	66,087	56,184	34,269

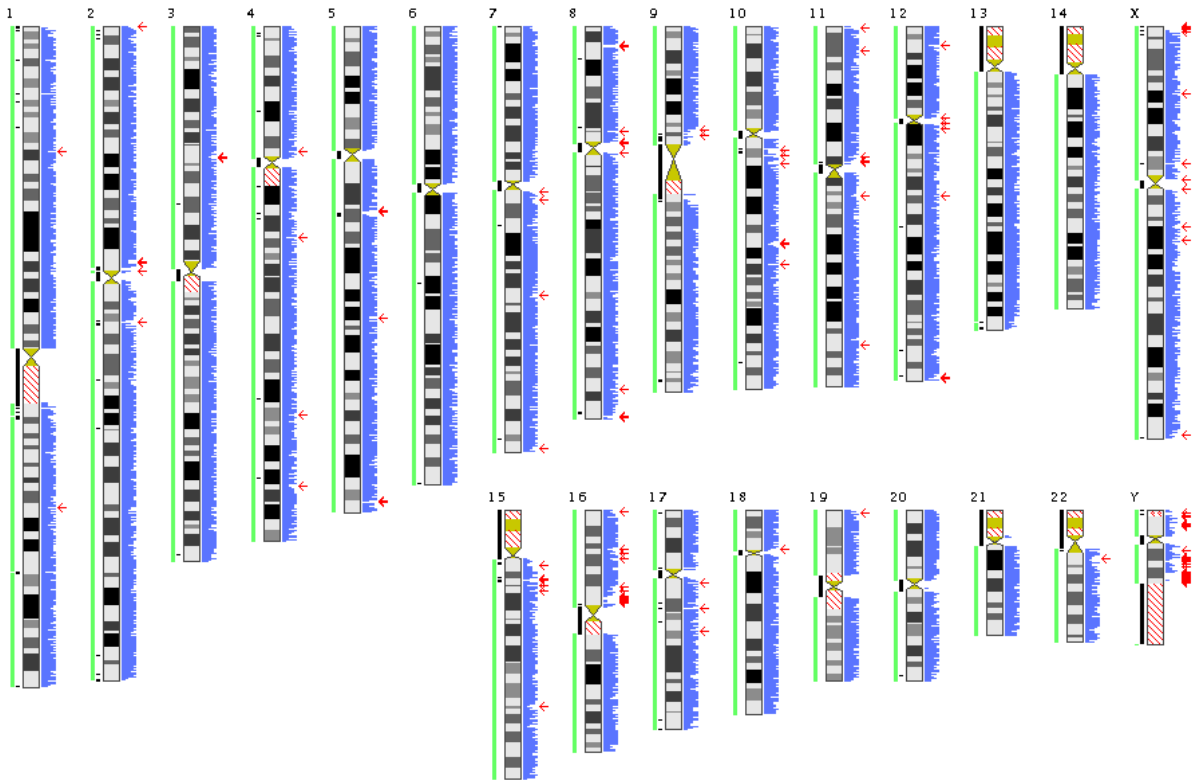


図2 マイクロサテライトマーカーの分布

各染色体上のマイクロサテライトマーカーの位置を青のバーで表すと共に500kb 単位でのマーカー数を横に倒したヒストグラムで表記した。赤の矢印は400kb 以上のマーカーギャップ位置（セントロメアの領域を除く）を示した。なおマッピングに使用したゲノム配列は goldenPath July 2003 (<http://genome.ucsc.edu/>) を参照した。

して25,170個のマイクロサテライトマーカーを見いだした。一方、国外の研究機関によって白人集団を用いて同定されているマイクロサテライトマーカー9,880個についても日本人集団を用いてタイピングを行い、9,099個が多型を有することが明らかとなった。以上を総計して、多型マイクロサテライトマーカー34,269個を設定することに成功

した。当初の目標であった、30,000マーカーを超えるものであった。

またマイクロサテライトマーカーの平均解像度は83.2 kb/マーカーであり、また平均のヘテロ接合率とアリル数はそれぞれ0.69と7.0個と計算され、遺伝的相関解析を行うに足る、多型性に富んだマーカーをゲノム全体にわたって高密度に収

集することに成功した。

2. 相関解析

非メンデル遺伝性疾患の遺伝学的解析で、罹患同胞対解析に代わる方法として提唱されたのは、相関解析であった。この方法自体は目新しい方法ではなく、連鎖解析よりも古くから利用されてきた。相関解析は疾患遺伝子と近傍のマーカー対立遺伝子が、両遺伝子座の距離に依存して集団中で共伝達されやすくなることを期待している。異なる遺伝子座の対立遺伝子の相引関係が集団中で平衡に達しているとする仮定からの偏り（不平衡状態）を検定するので、連鎖不平衡解析とも呼ばれている。

図3にその原理を示す。連鎖平衡を健常者集団、連鎖不平衡を患者集団とする。健常者集団の祖先世代においてA1, B1の対立遺伝子をもつ染色体、A2, B2の対立遺伝子をもつ染色体しか存在しないとす。しかし、世代を経るごとに組換えが生じ、A1 B1/A1 B2/A2 B1/A2 B2それぞれの染色体が発生する。またここでこの集団が十分に大き

く、すべての突然変異が起きた後に十分な時間が経ち、さらに対立遺伝子頻度に変化がなければ連鎖平衡が達成できると予想される。疾患集団中で祖先世代に疾患対立遺伝子が突然変異にて生じ、健常者集団と同様に時間が経過し、またこの疾患対立遺伝子が組換えを発生しても分離しにくいほどB遺伝子座の近傍にあったと仮定する。現世代においてA遺伝子座およびB遺伝子座を両集団で検査し、両遺伝子座の対立遺伝子頻度を両集団間で比較すれば、患者集団中におけるB2対立遺伝子の頻度が有意に健常者集団より高いはずである。

この方法は行程が簡便で、解像度と検出力が高いことから好んで用いられているが、一方で、行った検定数に依存して偽陽性が生じやすく、多くのマーカーを用いて確実な結果を得ることは不可能であると考えられていた。しかしながら、近年になりゲノム中に多くの遺伝マーカーを配置して相関解析を行うモデルが提唱された。とりわけ、弱い効果しか持たないと予想される非メンデル遺伝

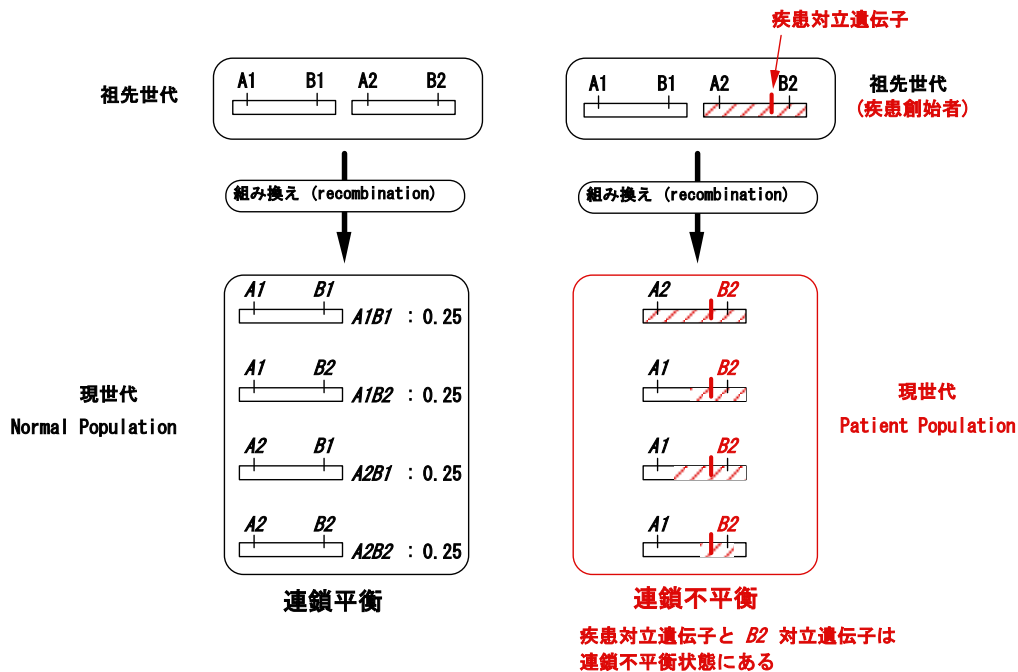


図3 連鎖不平衡

連鎖不平衡に関する概念図を健常者集団ならびに患者集団に分類示した。調査対象とする遺伝マーカーの、ある対立遺伝子頻度は、疾患感受性遺伝子座に近ければ近いほど、それら2集団間で差が見られるはずである。

性疾患の感受性遺伝子のマッピングは、罹患同胞対解析では十分な検出力を維持するには不可能なほど多くのサンプル数を必要とし、サンプル数が少なればほとんどの感受性遺伝子を取り逃してしまうが、相関解析では妥当なサンプル数でこれを行えるとの試算がなされている。

III. 関節リウマチのゲノムワイドな感受性遺伝子マッピング

そこでまず我々は多因子疾患である関節リウマチをターゲットに、設定したゲノムワイドなマイクロサテライトマーカーを用い、その感受性遺伝子の同定を目指した⁶⁾。

1. 関節リウマチの疫学

関節リウマチ (RA ; rheumatoid arthritis) は、関節滑膜細胞の増殖、関節、軟骨、骨の破壊を伴う進行性の慢性炎症性疾患で、全身性エリテマトーデスと共に代表的な全身性自己免疫疾患である。全人口に占める関節リウマチ患者の割合は、世界中で0.5~1.0%程度であり、日本では70~100万人程度の患者数が想定されている。関節リウマチの病態に関しては、昨今の分子生物学的手法の進歩によりサイトカインカスケード等の免疫

学的側面をはじめとした理解が飛躍的に進んだが、根源的な病因に関しては、いくつかの状況証拠が得られてはいるものの未だ直接に全体像を解明するには至っていない。

しかしながら、家系内集積性、一卵性双生児における発症の一致率といった疫学データから、関節リウマチには遺伝性が存在することを示唆する結果が得られている。すなわち、関節リウマチにおける家系内発症率は8%程度であり、一般集団における発症率が約1%であることから、家系内集積性を図る指標である λ_R 値(=家系内発症率/一般集団での有病率)はおよそ8であると推定される。これまで、一卵性双生児での発症一致率が二卵性双生児よりも4倍程度高いことが報告されており、関節リウマチ発症における遺伝的要因の関与を示唆するものである。また一方では、二卵性双生児において発症一致率が急速に低下することから、原因となる遺伝的要因、すなわち関節リウマチ関連遺伝子は染色体上に複数存在するとの予想もなされている。また、この疾患はHLA領域のDRB1遺伝子座のDRB1*0101、DRB1*0404、DRB1*0405の各対立遺伝子と相関することが知られている。これらの対立遺伝子

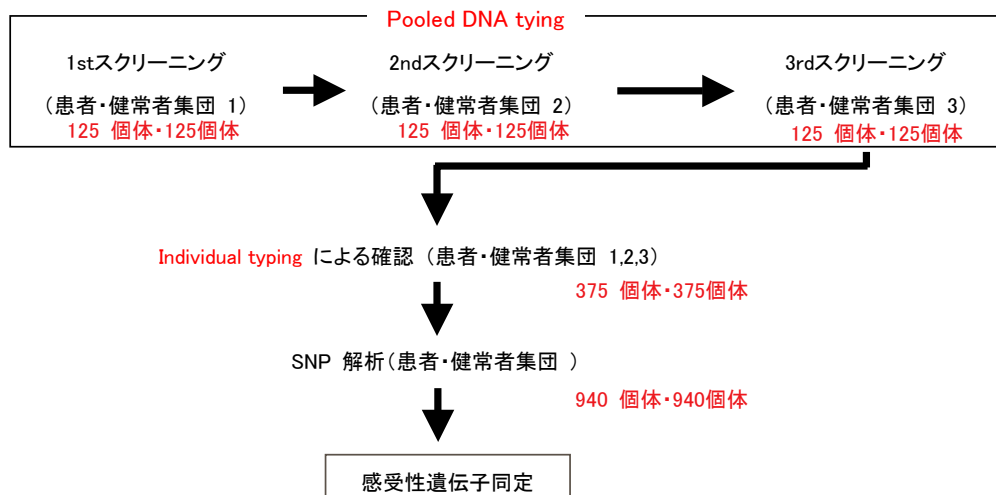


図4 関節リウマチ感受性遺伝子マッピング方法

マイクロサテライトマーカーによる Pooled DNA typing ならびに Individual typing にて感受性候補領域を絞り込み、その候補領域内の SNP マーカーを詳細に解析することにより疾患感受性対立遺伝子を同定する。また各段階において独立した集団を用いて偽陽性を排除する。

はその HLA 分子において同一のアミノ酸モチーフを保持している。したがって、このモチーフが機能的に関節リウマチ発症に関与していると想定されている。

2. 感受性遺伝子マッピングの方法

患者および健常者それぞれ125検体を1つの解析セットとし、マイクロサテライトマーカーを用いた Pooled DNA typing^{註1)} による3段階のスクリーニングを行った(図4)。1st スクリーニングでは全マーカーについて相関解析を行い、陽性マーカー(アレルの頻度の有意差は2 by 2ならびに2 by mの分割表から得られた Fisher's exact test による P value で評価し、いずれかがもしくは共に0.05以下の値を示したマーカーを陽性マーカーと定義した)についてのみ、2nd スクリーニングを行った。さらに2nd スクリーニングにおいて陽性となったマーカーについて3rd スクリーニングを実施した。この3rd スクリーニングでの陽性マーカーに対し、この3段階のスクリーニングで使用した全患者・健常者それぞれ375検体に対し、Individual typing^{註2)} を行った。これは Pooled DNA typing でのアレル頻度はあくまでも推定であるため、この実験によって、このアレル頻度を確定する目的で実施した。またこの複数段階のスクリーニングは、高い統計学的検出力を維持しつつ、タイプ I エラーを極力排除することを可能とする。

3. 関節リウマチ感受性遺伝子の同定

最終的に3rd スクリーニングにて133マーカーが陽性であった。これらの陽性マーカー数は統計学的に期待される数よりも多かったが、これは Pooled DNA typing 法に依存する実験的偽陽性と考えられた。続いて Individual typing により推定アレル頻度を確定するとともに、実験的偽陽性を排除した。その結果、Pooled DNA typing での陽性マーカー47個に絞り込んだ。さらにこの47個のマーカー中、23マーカーが有意な頻度差を示すアレルを持ち、24マーカーが陰性マーカーと判断した。またこの Individual typing により見出された23個の陽性マーカーを Bonferroni's correction により多重検定を補正したところ、7

個のマーカーに絞り込まれ、これらの内4個は6p21.3に存在し、その他3個はそれぞれ11q13.4, 10p13, 14q23.1に存在していた。

次にこの4個の領域について、SNP マーカーによる解析を実施した結果54個の SNP マーカー陽性であった。さらに、陽性となった54マーカーについて、患者および健常者それぞれ565検体追加し、SNP typing を実施した結果、45個の陽性マーカーを獲得し、さらに Bonferroni's correction での補正を加えた解析では24個の SNP マーカーが陽性であった。すべての SNP マーカーから得られたデータについて、EM アルゴリズムにて推定ハプロタイプ頻度を算出して、患者および健常者間で遺伝的相関解析を実施するとともに LD ブロック^{註3)} の推定も行った(図5)。

これらの結果、6p21.3において既知の *DRB1*、*IkBL* 遺伝子(現在は *NFKBIL1* 遺伝子)、また新規に *NOTCH4*、*TNXB* (Tenascin-XB) 遺伝子を見出し、さらに11q13.4では *MRPL48*、10p13では *DKFZP761F241*、14q23.1では *reticulon 1* 遺伝子を同定することに成功した。

一連のハイスループットな解析の中、ポジティブコントロールである *DRB1* ならびに *IkBL* 遺伝子が正確にマッピングできたことの意義は大きい。さらにこの *HLA-DRB1* 遺伝子から比較的近距离(250 kb)にある *TNXB* ならびに *NOTCH4* を関連遺伝子として同定した。従来の研究ではおそらく *HLA-DRB1* から派生する強い連鎖不平衡により検出ができなかったと考えられるが、複数の解析手法を取り入れることにより、独立して検出することに成功した⁶⁾。またこの *TNXB* 遺伝子の変異はコラーゲン組織における結合組織の欠損を引き起こすと考えられている Ehlers-Danlos 症候群の感受性アレルとして同定されている⁷⁾。関節リウマチの病態を考慮すると非常に興味深い遺伝子である。さらに *NOTCH4* 遺伝子は正常な滑膜繊維芽細胞と比較し、関節リウマチの滑膜繊維芽細胞での発現量が上昇しているとの報告があり⁸⁾、今後遺伝子産物の機能解析が待たれる。

我々は約5年をかけ、マイクロサテライトマーカーの設定から、1つの疾患について感受性遺伝

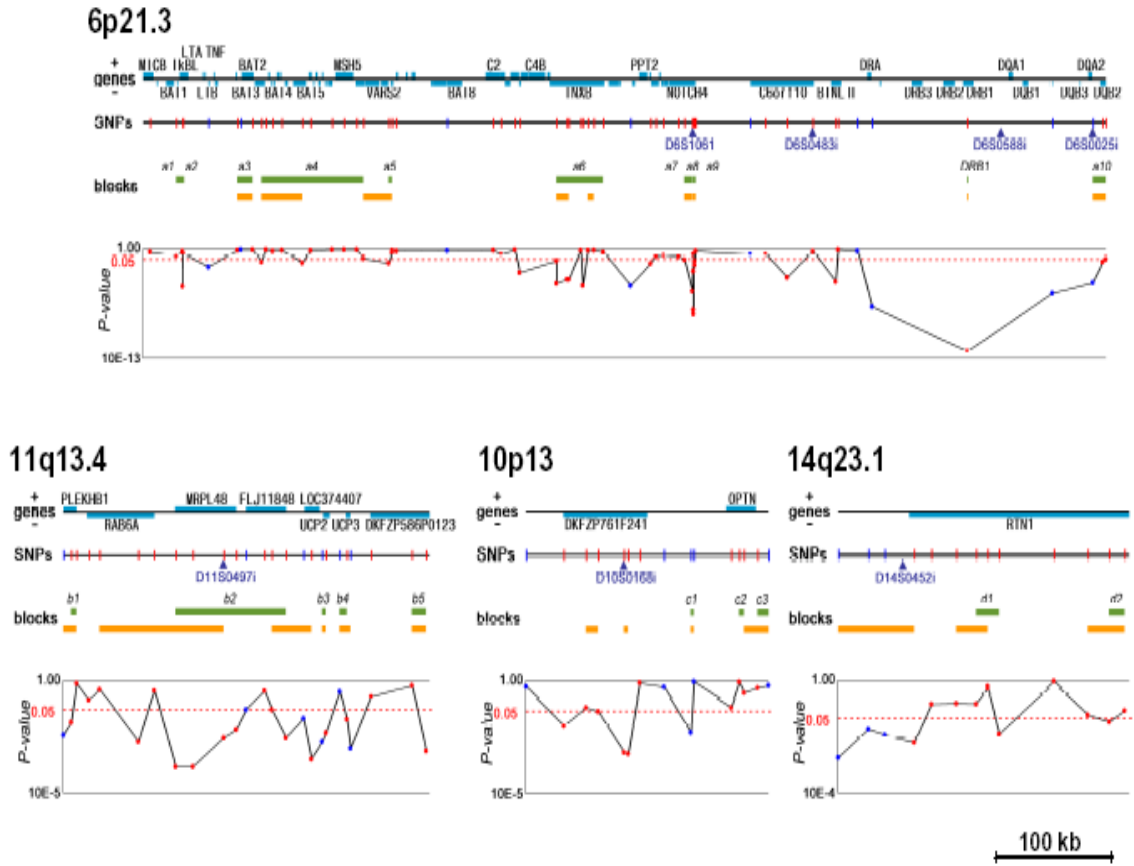


図5 関節リウマチ感受性領域のSNP解析

各候補領域内のSNPアレルの関節リウマチとの相関について、物理位置を反映させた地図にて示した。各領域の最上段は遺伝子、2段目はSNPならびに相関を示したマイクロサテライトマーカー、3段目は、EMアルゴリズムで規定したLDブロックを緑色で、Clarkアルゴリズムで規定したLDブロックをオレンジ色で示し、最下段のグラフはP valueを対数スケールにて表示した。このグラフの赤のスポットは各遺伝子のコード領域内に存在するSNPで、青のスポットはそれ以外の領域にマップされるSNPを示している。

子を複数個同定することに成功した。この分野では、一般的にはSNPがゲノムワイドな相関解析の遺伝多型マーカーとして用いられようとしていることから、このマイクロサテライトを用いた戦略は世界に発信しうる独創的なプロジェクトであると自負している。一方、我々のマイクロサテライト戦略の有効性が次第にこの分野の研究者などに理解されはじめ、国内海外から多くの共同研究の申し込みが殺到し、現在20以上の疾患サンプルが我々の研究室に集積している。

このように疾患に関与する遺伝子を特定する新しく極めて有効な方法を見出したことは、経済・社会の発展、豊かな国民生活の実現につながり、

我が国の創造性豊かな学術研究を大学主導により実施できたと確信している。

IV. おわりに

我々のマイクロサテライト技術による生活習慣病の遺伝子同定と発症の分子機構の解明を機に、それらの情報を基礎にした、最適な疾患関連分子を標的とする効率的な医薬品の開発、遺伝子診断やオーダーメイド医療などのゲノム医療が現実のものとなりつつある。それゆえ、このマイクロサテライト技術を用いた本研究による、“遺伝子同定から医療応用まで”の一連のゲノム医療の戦略を確立は、日本国民の保健、医療、福祉向上に大

大きく貢献しうるものと信ずる。また、個人のゲノム多型情報をもとにした、個人に優しいオーダーメイド医療による“健康で安心して暮らせる”社会の実現を加速する大きな原動力にもなりうる。

それら本事業で生まれた新技術・新知見は全て特許化され、製薬企業、CRO、検査企業、遺伝子診断開発企業、健康ビジネス関連企業、疾患モデル動物作成企業、バイオ関連企業に対し、事業を国際的に展開しうる。これらの市場10年後の世界的な事業規模は100兆円と予想されていることから、我々の新技術・新知見は豊かな国民生活の基盤となる日本発の知的財産を形成し、経済活性化にも役立てうるであろう。

文献

- 1) Oka A, et al: Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptibility locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric to the HLA-C gene. *Hum Mol Genet* 8: 2165-2170, 1999
- 2) Ota M, et al: The critical region for Behçet disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46-kb segment centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsatellite mapping. *Am J Hum Genet* 64: 1406-1410, 1999
- 3) Ota M, et al: A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70-kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics* 71: 263-270, 2001
- 4) Matsuzaka Y, et al: Susceptibility locus for non-obstructive azoospermia is localized within the HLA-DR/DQ subregion: primary role of DQB1 *0604. *Tissue Antigens* 60: 53-63, 2002
- 5) Oka A, et al: Localization of a non-melanoma skin cancer susceptibility region within the major histocompatibility complex by association analysis using microsatellite markers. *Tissue Antigens* 61: 203-210, 2003
- 6) Tamiya G, et al: Whole genome association study of rheumatoid arthritis using 27 039 microsatellites. *Hum Mol Genet* 14: 2305-2321, 2005
- 7) Gonzalez-Gay M A, et al: Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum* 31: 355-360, 2002
- 8) Ando K et al: Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts. *Oncogene* 22: 7796-7803, 2003

注釈

- 1) Pooled DNA typing : 作業の効率化ならびにコスト削減を目的として、対象とする集団のDNAを正確に等量ずつ混合し、個々のマイクロサテライトマーカーをタイピングするものである。今回紹介した関節リウマチでは、患者および健常者それぞれ125検体ずつのPooled DNAを作製し、実験に供した。
- 2) Individual typing : Pooled DNA タイピングで得られた「推定」のアリル頻度を確定する目的で、1個体毎のDNAを個々のマイクロサテライトマーカーでタイピングするものである。
- 3) LDブロック : 減数分裂時に生じる組換えは、ヒトゲノム中発生しやすい領域とそうではない領域があると考えられており、特に組換え頻発点は「ホットスポット」と呼ばれる。すなわち、このホットスポット間はあまり組換えが生じない領域と考えられ、この領域をLDブロックと呼ぶ。