

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590337
 研究課題名（和文）ゲノムワイド関連解析により見出した尋常性乾癬感受性遺伝子の機能解析
 研究課題名（英文）Functional analysis for psoriasis susceptibility genes discovered by genome-wide association study
 研究代表者
 岡 晃（OKA AKIRA）
 東海大学・医学部・講師
 研究者番号：80384866

研究成果の概要：遺伝学的に見出した尋常性乾癬の 2 個の感受性遺伝子を対象として、遺伝子型判定による診断基準を創設すると共に、新たな治療薬開発へ向けた基盤の構築をののために、まず基礎的情報を得ることを目標に、これらの遺伝子の機能的解析を実施した。その結果、2 個の遺伝子は共に、遺伝子型と遺伝子発現との関連が認められ、さらに 1 個の遺伝子については乾癬発症機序への関与が示唆される結果を得ることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：尋常性乾癬、マイクロサテライトマーカー

1. 研究開始当初の背景

尋常性乾癬(以下乾癬)は炎症と表皮細胞増殖により特徴づけられ、炎症性角化症に分類される皮膚疾患である。乾癬は慢性疾患であり基本的に完治することは極めて稀であることから、臨床医が病名を告げることも躊躇する場合がある。さらにその皮膚症状により外出もままならなくなり日常生活に影響を与えてしまうこともしばしばである。したがって、この疾患発症が患者の QOL(quality of life)を著しく損なう結果となっている。

一方、残念ながらこの乾癬を完治させる治療法は存在しない。寛解・増悪を繰り返すのみで、極力軽い症状で抑えるようコントロー

ルすることが現在考えられる最善の「治療法」である。乾癬は T 細胞を中心とした自己免疫疾患の一種と考えられていることから、その発症機序に関する研究により、免疫誘導機序の存在は明らかになりつつあるが、乾癬特異的な免疫反応を誘導する抗原が特定できておらず、また病体を免疫学的に説明できる総合的な理論は未だにみられない。つまり、乾癬発症に関してどの要因が本質的な役割を演じているのかが不明である。一方、疫学データなどにより乾癬の遺伝性は間違いなく存在するが、単純なメンデル遺伝性は示さず、環境要因も考えられることが明らかである。さらに遺伝子座異質性も観察されており、

乾癬は複合遺伝性疾患である。

したがって、乾癬発症機序に関与する遺伝子を特定、機能的解析を実施することにより、遺伝子型判定による診断基準を創設すると共に、新たな治療薬開発へ向けた基盤を構築する必要があると考えられる。

2. 研究の目的

乾癬の感受性遺伝子を同定する目的で、当研究室において独自に開発した全ゲノムに配置した約 30,000 個のマイクロサテライトマーカーを用い、乾癬患者群 561 個体ならびに健康対照群 561 個体を用いた関連解析を実施した。その結果、既知の感受性遺伝子が存在する HLA 遺伝子領域を含め 17 個の遺伝子座に絞り込んだ。

さらに、これらの領域を対象として、より高密度に配置したマイクロサテライトマーカー、さらに 1 個/5kb の密度で配置した SNP マーカーにより網羅的に関連解析を実施した結果、統計量の補正後も患者ならびに健常者群で、極めて有意な頻度差を示すマーカーが存在する 3 領域を見出すことに成功した。

この 3 領域の内、1 領域は HLA 遺伝子領域であったが、残る 2 領域は全く新たに見出されたものであった。さらに、1 つの領域においては排他的なマイクロサテライトならびに SNP マーカーを用いた解析により、感受性アリルが 1 つのマイクロサテライト配列であると推察された。またこのマイクロサテライトの約 900bp 下流には GPCR (G-Protein Coupled Receptor) 遺伝子が存在することから、この遺伝子が感受性遺伝子と考えられた。

また、もう 1 つの領域では SNP そのものか、もしくは SNP ハプロタイプが感受性アリルと推定され、この領域はイムノグロブリンスーパーファミリー遺伝子の第 1 イントロンに位置することから、この遺伝子が感受性遺伝子であると考えられた。さらに RT-PCR により発現組織特異性を調査した結果、両遺伝子共に皮膚組織ならびに末梢血 T 細胞、免疫組織での発現が確認された。

そこで本申請の主目的は上記の 2 つの遺伝子の分子機能を総合的に解明することである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子間相互作用

すでに HLA-C 遺伝子が古くから感受性遺伝子として同定されている。そこで、マイクロサテライトによる関連解析により新たに見出した遺伝子座および HLA-C 遺伝子の各感受性アリルとの相互関係を、いくつかの指標にて層別化することにより明らかにした。

(2) 遺伝子発現組織特異性

すでに CD4+T 細胞において感受性遺伝子の発現を確認している。そこで CD4+T 細胞中、

どのサブポピュレーションで発現しているかを各種抗体にて細胞を分取、RNA を分離して、GPCR 遺伝子の転写産物を Real Time PCR 法により定量した。

(3) 皮膚組織を用いた転写産物量の定量

8 個体の乾癬患者からバイオプシーにて無疹部ならびに皮疹部の表皮組織を採取し、RNA を抽出した。これら 16 サンプルを対象に GPCR 遺伝子の転写産物を Real Time PCR 法により定量し比較検討した。

(4) 末梢血単核球を用いた転写産物量の定量

合計 133 個体の末梢血単核球から RNA を抽出し、GPCR 遺伝子の転写産物を Real Time PCR 法により定量し、各アリルと転写産物量との関連を検討した。

(5) レポーターアッセイ

GPCR 遺伝子上流 950bp に感受性アリルを有するマイクロサテライト配列が存在することから、この配列を含む領域をレポーターアッセイ用のベクターへクローニングし、いくつかの細胞へトランスフェクトすることにより、レポーターアッセイを実施し、その領域の転写活性の有無を調査した。

(6) モノクローナル抗体の作製

極めて相同性が高い GPCR 遺伝子がヒトゲノム中に存在することから、抗体の特異性を確保するために、合成ペプチドを抗原として抗 GPCR タンパクモノクローナル抗体の作製を実施した。さらに作製した抗体を用いて、患者皮疹部のバイオプシーサンプルを対象に免疫組織染色を実施しこの GPCR タンパクの局在を追及した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子間相互作用

マイクロサテライトならびに HLA-C 遺伝子の全アリルについて、すべての組み合わせで層別化による解析を行った結果、マイクロサテライトの感受性アリルと HLA-Cw*0102 のみ、遺伝学的な相互関係が示唆された (図 1)。

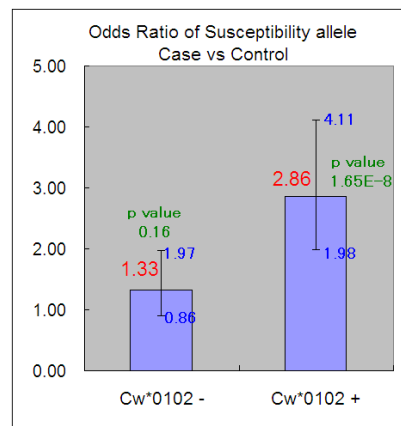


図 1. HLA-Cw*0102 での層別化

HLA-Cw*0102 以外のアリルを有する患者・健常者群でのオッズ比が 1.33(95% CI 0.86-1.97)であるのに対し、それ以外のアリルを有する患者・健常者群でのオッズ比は 2.86(95% CI 1.98-4.11)と大きく上昇していた。すなわち、両アリルを有する個体では1つのアリルを有する個体よりもはるかに発症へのリスクが上昇していることが明らかとなった。

(2) 遺伝子発現組織特異性

磁気ビーズ、フローサイトメトリーならびに、各細胞集団特異的抗体を用い、末梢血単核球から、樹状細胞、単球、Naive CD4+細胞、Memory CD4+細胞、Th17 細胞を分離し、それぞれの細胞から RNA を抽出して GPCR 遺伝子の転写産物を定量した結果、Naive CD4+細胞でのみ特異的に発現していることが明らかとなった。すなわち感受性遺伝子として見出した GPCR 遺伝子はヘルパーT細胞の分化の決定に関与する表面抗原をコードする遺伝子である可能性が示唆された。

(3) 皮膚組織を用いた転写産物量の定量

患者 8 個体の皮疹部ならびに無疹部のペアから RNA を抽出し、GPCR 遺伝子の転写産物を定量した結果、すべての個体において皮疹部でその発現が低下していることが明らかとなった (図 2)。

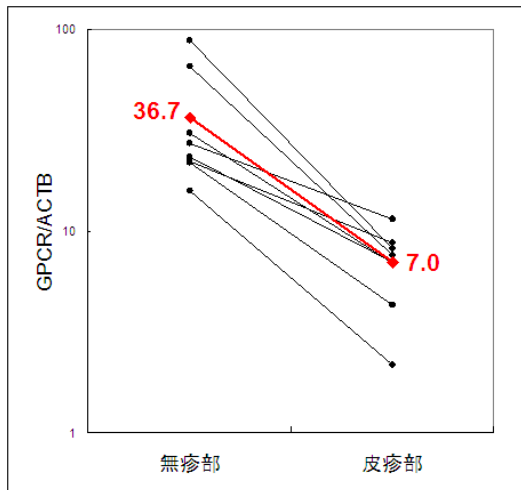


図 2. GPCR 遺伝子の皮疹部・無疹部での定量

この 8 個体の平均で約 1/5 に皮疹部で発現量が低下している結果となった。生物学的な解釈は現時点で困難であるが、見出された感受性遺伝子の発現量が皮疹部および無疹部間で大きな差を検出したことは非常に興味深い。

(4) 末梢血単核球を用いた転写産物量の定量

① GPCR 遺伝子

患者 71 個体、健常者 62 個体の末梢血単核球から RNA を抽出し、GPCR 遺伝子の転写産物を定量した結果、その両者間での量比に有意差は認められなかった。しかしながら、感受性アリルで層別化したところ、感受性アリルを持つ個体群で有意にその転写産物量が上昇していた (Mann-Whitney の U:P value 0.0051)。

② イムノグロブリンスーパーファミリー遺伝子

イムノグロブリンスーパーファミリー遺伝子についても GPCR 遺伝子と同様に転写産物の定量を実施した。その結果、転写産物が認められる個体と、全く転写産物を検出できない個体に 2 分された。そこで、この転写産物の有無と感受性アリルの関係を調査した。

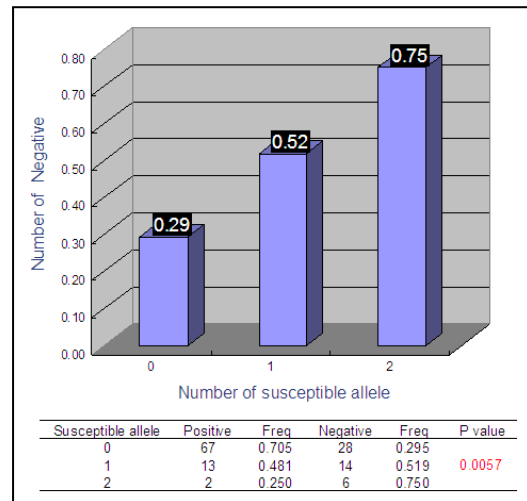


図 3. 感受性アリル数と遺伝子発現有無

その結果、感受性アリルを 2 個有する個体群における未発現個体頻度は、感受性アリルを持たない個体群の約 2.5 倍となった

(t-test : P value 0.0057) (図 3)。この感受性アリルは健常者群で有意にその頻度が高い、いわゆる疾患抵抗性アリルと考えられる。したがって、このアリルを持つことによりこの遺伝子発現が抑制されていることを考慮すると、非常に理にかなっている結果となった。

さて、遺伝学的に疾患と関連があるアリルを有する遺伝子座が存在することと、その近傍に発現遺伝子があることは、基本的には独立である。すなわち感受性アリルとその遺伝子との何かしらの機能的関連を見出さなければ、感受性遺伝子を突き止めたことにはならない。したがって、これらのアリルと発現量の関連を検出した意義は非常に大きい。

(5) レポーターアッセイ

(4)の結果ではGPCR 遺伝子の発現量がマイクロサテライト配列によって制御を受けている可能性が示唆された。そこでこのマイクロサテライト配列から GPCR 遺伝子の近傍までのフラグメントとさらにマイクロサテライト配列から上流配列も含めたフラグメントの2種を対象にレポーターアッセイを行った。その結果、特にT細胞由来の Jurkat セルラインで null vector に対して6.2倍のレポーター遺伝子の発現上昇が確認された(図4)。

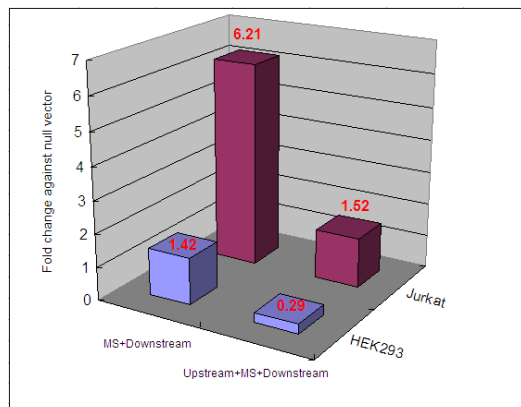


図4. GPCR 遺伝子の皮疹部・無疹部での定量

一方、腎臓由来のセルライン(HEK293)では1.4倍とレポーター遺伝子の発現上昇はほとんど認められなかった。

すなわち、感受性遺伝子として同定した GPCR 遺伝子はT細胞での発現が確認されていることから、マイクロサテライトを含む遺伝子上流にこの細胞に含まれる転写因子が特異的に結合し、転写を制御していることが考えられた。

(6) モノクローナル抗体の作製

GPCR タンパクに対するマウスモノクローナル抗体の作製を行った結果、特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ(LK16-3)を1クローン確立することに成功した。

さらにこのLK16-3抗体を用い、健常者ならびに患者皮膚切片に対し、免疫組織染色を実施した結果、健常者表皮ならびに患者無疹部の顆粒層に特異的な染色が認められる一方、患者皮疹部では表皮に染色が認められず、これは前述の定量的RT-PCRの結果と一致していた。

表皮には他のGPCRファミリーがある種の抗菌ペプチドとインタラクトし、それが innate host defense や adaptive immunity

へ影響を与えていることが知られている。今回見出したGPCRが同様な機能を有している可能性もあり、今後の解析が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4件)

- (1) Mano S, Endo TA, Oka A, Ozawa A, Gojobori T, Inoko H. Detecting linkage between a trait and a marker in a random mating population without pedigree record. Detecting linkage between a trait and a marker in a random mating population without pedigree record. PLoS ONE. 2009;4(3):e4956. 査読有
- (2) Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerei G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I, Inoko H. Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. Hum Genet. 2008 Jul;123(6):655-60. 査読有
- (3) Hui J, Oka A, James A, Palmer LJ, Musk AW, Beilby J, Inoko H. A genome-wide association scan for asthma in a general Australian population. Hum Genet. 2008 Apr;123(3):297-306. 査読有
- (4) Kawase T, Akatsuka Y, Torikai H, Morishima S, Oka A, Tsujimura A, Miyazaki M, Tsujimura K, Miyamura K, Ogawa S, Inoko H, Morishima Y, Kodera Y, Kuzushima K, Takahashi T. Alternative splicing due to an intronic SNP in HMSD generates a novel minor histocompatibility antigen. Blood. 2007 Aug 1;110(3):1055-63. 査読有

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

産業財産権の名称: PCT

発明者: 岡 晃、猪子 英俊

権利者: 東海大、ジェノダイブファーマ

産業財産権の種類、番号: PCT/JP2008/000095

出願年月日: 2008年1月25日

国内・外国の別: 国際

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 晃 (OKA AKIRA)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：80384866

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者