

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21300155

研究課題名（和文） 生物医学研究推進のためのカニクイザルMHC多型情報基盤の整備

研究課題名（英文） Elucidation of MHC polymorphism information in cynomolgus macaque (*Macaca Fascicularis*)

研究代表者

椎名 隆 (SHIINA TAKASHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：00317744

研究成果の概要（和文）：カニクイザルMHCクラスIおよびII遺伝子における多型解析法の開発ならびに200個体を用いたジェノタイピングから、新規アレルを同定し、MHCハプロタイプを推定した。また次世代シーケンサーを用いたMHCタイピング法を開発し、1,222頭のカニクイザルを用いて比較的頻度の高いMHCアレルを有するMHCホモ接合体ならびにMHCヘテロ接合体を検索した結果、5頭のMHCホモ接合体ならびに43頭のMHCヘテロ接合体を特定した。さらに上記以外のMHCホモ接合体を検索した結果、計23頭のMHCホモ接合体を特定した。したがって本研究課題では、MHC多型の特徴付けとともにその選抜個体を生物医学研究に提供しうる環境基盤を構築した。

研究成果の概要（英文）：We developed a genotyping methods on *Macaca fascicularis* (Mafa) class I and class II genes by Sanger and next generation sequencing. Using the methods we discovered new MHC alleles, and estimated MHC haplotypes in Filipino population from genotyping of the 200 animals. Moreover, we characterized five homozygous and 43 heterozygous animals that have the most frequent MHC haplotype and 23 homozygous animals that have the other MHC haplotypes from a large scale screening of 1222 animals. In summary, we characterized the *Macaca fascicularis* MHC polymorphisms and constructed research base for medical research in this research.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 5,600,000 | 1,680,000 | 7,280,000 |
| 2010年度 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |
| 2011年度 | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,200,000 | 3,960,000 | 17,160,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：遺伝育種

1. 研究開始当初の背景

カニクイザルはヒトに最も近縁な実験動物の1種として、国内外問わず、創薬、移植研究、薬物代謝試験、毒性試験などの医学的研究に頻繁に利用されている。このように国内外ともにカニクイザルは高い資質や需要

を有することが知られているにも拘わらず、その遺伝的背景が一切触れられないまま上記の研究に提供されている現状がある。今後、特定の遺伝子あるいはゲノム領域の多型情報を考慮したカニクイザル作製の必要性に迫られることは必至であり、この問題を打破

するためには、早急にその遺伝的背景を明確にしなくてはならない。

遺伝的背景の中でも数多くの疾患感受性を規定する主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 遺伝子における多型情報 (MHC多型) 基盤整備のニーズは国内外ともに高く、かつ緊急性を要する。例えば、再生医療分野におけるiPS細胞やES細胞の機能や臨床研究への安全性を評価するためには、移植の成否を規定するMHC多型を均一化したホモ接合体サル群の作製が必要である。一方、リウマチや糖尿病などのヒトMHC関連疾患モデルサルを作製するためには、MHC多型に富むサル群から疾患感受性サルを選別し系統化することが必要である。このような医科学研究の主導権を握るためには、カニクイザルMHC遺伝子の多型解析、DNAタイピング法の開発ならびにヒトとの免疫学的類似性の明確化などの遺伝子情報の基盤整備が不可欠である。ところがそのMHC多型情報は国内外とも未だ圧倒的に不足していると言わざるを得ない状態であり、ヒトMHC遺伝子との機能の類似性に関する報告もほとんど認められない。

そこで本研究課題では上記の問題点を解決し、従来培ってきた技術や知見をさらに展開させるために、“医学的研究推進を目指したカニクイザルMHC多型情報基盤の整備”という本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

(1) MHC 遺伝子の多型解析

MHC 遺伝子の多型情報を得るために、ベトナム、インドネシア、フィリピン由来の非血縁個体、計約 200 頭のカニクイザルを用いて、MHC クラス I 遺伝子 (*Mafa-A*, *-B*)、クラス II 遺伝子 (*Mafa-DRA*, *-DRB*, *-DQA1*, *-DQB1*, *-DPA1*, *-DPB1*) の多型解析を実施し、これらの塩基配列データを産出する。

(2) MHC 遺伝子の集団遺伝学的解析

得られた塩基配列データより、アレル頻度、アレルの分布およびそれら多型に基づくハプロタイプの推定を実行し、自然選択あるいは遺伝的浮動の影響を考察する。また、アカゲザルやヒトの配列を含めた系統樹解析や中立性検定により、カニクイザルとヒトの間のMHC 遺伝子に見られる選択圧の相違を明確にする。

(3) DNA タイピング技術の開発

簡便に各 MHC 遺伝子の多型を検出するために、MHC 遺伝子のアレルを分けることの出来るDNA タイピングシステムを開発する。

(4) MHC ホモならびにヘテロ接合体の検索

1000 頭レベルのカニクイザルを用いて特定の

MHC アレルを有する MHC ホモ接合体ならびに MHC ヘテロ接合体を検索する。

3. 研究の方法

(1) 全RNAの抽出法

株式会社イナリサーチならびに滋賀医科大学動物生命科学研究センターより供与されたカニクイザル計1200頭の末梢血より、全RNAをTRIZol RNA抽出用溶液 (Invitrogen) を用いて抽出する。

(2) PCRプライマーの設計法

MHCクラスI遺伝子 (*Mafa-A*, *-B*)、クラスII遺伝子 (*Mafa-DRA*, *-DRB*, *-DQA1*, *-DQB1*, *-DPA1*, *-DPB1*) をそれぞれ増幅させるPCRプライマーには、IPD-MHCデータベースに登録されている塩基配列をもとに設計したPCRプライマーを用いる。なお全RNAを鋳型としたRT-PCR用のプライマーは全ての翻訳領域を含む5' 側ならびに3' 側の非翻訳領域に、またゲノムDNAを鋳型としたPCR用のプライマーはプロモーター領域にPrimer Expressソフトウェア (Applied Biosystems) の Cycle Sequencing Primer設計機能にてそれぞれ設計する。

(3) PCR増幅法ならびに塩基配列決定法

抽出した全RNAを鋳型としたRT-PCR増幅をおこなう。逆転写反応にはReverTra Ace (TOYOBO)、PCR反应用酵素には精度の高いTaqポリメラーゼ (AmpliTaq Gold) を使用する。PCR反応には現有のサーマルサイクラー (Thermal cycler GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) を用いる。その後、得られたPCR産物をPCR産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN) にて精製する。そのPCR産物のサブクローニングをおこなう (PGEM-T Easy vector with the TA cloning kit, Promega)。上記で得られたPCR産物の直接塩基配列決定ならびに必要なであれば1個体あたり48個のサブクローンの塩基配列決定をBigDye terminator kit (Applied Biosystems) プロトコールにしたがっておこなう。その後の塩基配列の解読には、現有のABI PRISM 3730, 3130 自動 DNA analyzerを用いる。

(4) 集団遺伝学的解析法

産出された塩基配列データを用いて、カニクイザルMHC遺伝子におけるアレル頻度やアレル分布およびそれら多型に基づくハプロタイプの推定をArlequinプログラムやPHASEプログラムを用いて産地ごと (ベトナム、インドネシア、フィリピン) に実行、比較し、自然選択あるいは遺伝的浮動の影響を考察する。また、アカゲザルやヒトの配列を含めた系統樹解析ならびに同義置換と非同義置換の比率を算出し、カニクイザル、アカゲザ

ル、ヒトの間のMHC遺伝子の相違を明確にする。さらには、カニクイザルMHC領域のハプロタイプ地図を作成し、この領域の多様性の度合いを明確にする。なお、アレルの決定、塩基配列ならびアミノ酸配列の基本的な解析はGENETYXソフトウェア (SDC, Japan) ならびにSequencharソフトウェア (Hitachi, Japan) を使用する。また塩基配列のアライメントにはClustalWシークエンスアライメントプログラム、系統樹作成ならびに同義置換と非同義置換の比率の計算には、Molecular Evolution Genetics Analysis (MEGA4.1) をそれぞれ用いる。

(5) DNA タイピング技術の開発法

各 MHC 遺伝子の多型を検出するために、ロシュ社の次世代シーケンサーGS Junior のアンプリコンシーケンシングにより簡便に安価で早い DNA タイピングシステムを開発する。すなわち、各 MHC 遺伝子の塩基配列の共通性の高い領域にプライマー (MHC 配列の 5' 側に次世代シーケンシング用のアダプターとバーコード配列を付加させたもの) を設計し、これらを用いて cDNA を鋳型として PCR 増幅させ、その産物の次世代シーケンシングにより塩基配列データを得る。その塩基配列データを用いて各 MHC アレルを一度に判定するタイピング法を開発する。

4. 研究成果

(1) カニクイザル 3 集団における MHC クラス I 遺伝子 (Mafa-A) の多型性の比較:

① カニクイザル 3 集団における多形性

83 個体のカニクイザル(ベトナム:28 個体、インドネシア:27 個体、フィリピン:28 個体)についてMafa-Aのエクソン1~7領域のRT-PCRをおこなった結果、83種類のMafa-Aアレル(ベトナム:36アレル、インドネシア:34アレル、フィリピン:16アレル)を同定した。それらのうち、17種類は既報のMafa-Aや他のマカク属のアレルと一致し、残りの66種類は新規アレルであった。とりわけ、3集団における高頻度アレルはアカゲザルなどの他マカク由来アレルと一致したことからMafa-A遺伝子はカニクイザルが種分岐前に生成され、これらのアレルが保持される一方、新しいアレルが環境変化とともに生成されてきたと考えられた。

② 塩基多様性プロファイリング

エクソン 2~5 において各集団における 100 bp ごとの塩基多様性をプロットした (図 1)。この結果、3 集団ともに類似した多様性プロットを示し、塩基多様性の平均値は 5.25% であった。エクソンごとに塩基多様性の平均値を算出した場合、エクソン 4 と 5 は 2% であったの

に対し、エクソンと 3 の 3' 末端 (b と c) は 14~16%、8~10% の高い多様性をそれぞれ示した。

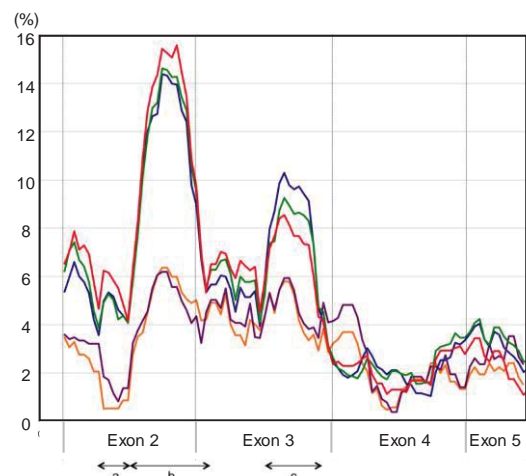


図 1、Mafa-A1 における塩基多様性プロファイル

青線、緑線、赤線、紫線および黄線はベトナム産、インドネシア産、フィリピン産、オーストラリア人および日本人をそれぞれ示す。a はヒトとカニクイザルの間で顕著な差異が観察された領域、b と c はペプチド結合領域をそれぞれ示す。

対照的に、HLA-A の塩基多様性の平均は約 3.2% であり、エクソンと 3 の 3' 末端側は 6% の比較的高い多様性を示し、エクソン 4 は 1~2% であった。さらにカニクイザルとヒトとの比較から、カニクイザルはヒトよりも比較的高い塩基多様性を示し、特に "a" では約 5 倍、"b" で 2.5 倍、"c" で 1.5 倍高い値をそれぞれ示した。これは、ヒトとカニクイザルの起源に起因すると考えられた。

③ 中立性検定

エクソン 2~5 において、カニクイザル 3 集団における Tajima's D の中立性検定を行った (図 2)。

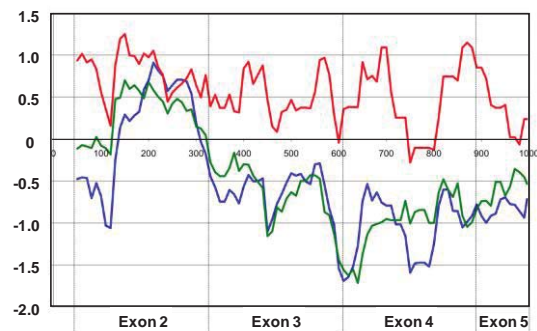


図 2、Mafa-A1 における中立性検定
青線、緑線および赤線はベトナム産、インド

ネシア産およびフィリピン産をそれぞれ示す。

各集団における全体の平均は、ベトナムで-0.43、インドネシア-0.38、フィリピン 0.72であった。エクソン 2 では 3 集団共にポジティブに働いており、正の淘汰圧を受けていることが示唆された。エクソン 3~5 においては、ベトナムとインドネシアは純化選択によりアミノ酸を保存しようとする傾向がみられ、フィリピンでは最近のボトルネックによって集団が減少したことにより起因すると考えられた。

④ 分子系統樹解析

決定されたアレルのほとんどが各集団特有のものであったが、83 個の Mafa-A1 アレルにモーリシャス集団を合わせて、neighbor-net Tree により系統樹解析を行った結果、各集団が一様に混合した 4 つのクラスター (A~D) を形成した(図 2)。

フィリピン集団同様に多様性に乏しいモーリシャス集団はクラスター A と C のみに観察されたが、フィリピン集団は、A~D の全てのクラスターにも含まれ、ベトナム集団やインドネシア集団と同様の多様性を保持していることが示唆された。またクラスター C を除く他クラスターでは、他のマカク属との種を超えた多型が見られ、MHC 遺伝子はカヌキザルが他のマカク属と分岐する 200 万年前から既に保持していたことが示唆された。したがって、フィリピン産は多型性に乏しいが、アレル間における多様性は他集団と同様に保持していることから MHC 型を均質化させたサルを用いる生物医学研究に適すると考えられた。

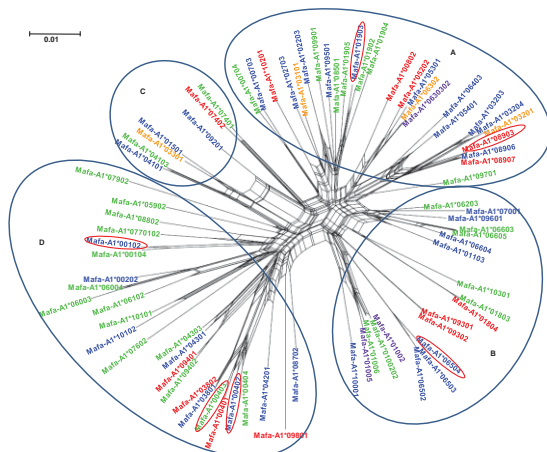


図 3、Mafa-A1 アレルにおける系統関係

(2) MHC クラス II 遺伝子の多型性

研究成果 (1) の成果を踏まえてフィリピン産 112 個体における MHC クラス II 遺伝子の

多型解析をおこなった結果、13 種類、13 種類、9 種類、10 種類、8 種類および 8 種類の Mafa-DRA, -DRB, -DQA1, -DQB1, -DPA1 および -DPB1 アレルがそれぞれ同定され、それらのうち、18 種類は新規アレルであった。各 MHC 遺伝子において、最も頻度の高いアレルは DRA*01:03:03 (アレル頻度: 34.4%)、DRB1*10:07 (36.8%)、DQA1*01:07 (37.5%)、DQB1*06:08 (37.5%)、DPA1*02:05 (36.5%) および DPB1*16 (33.9%) であった。これらアレルの組み合わせから 42 種類の MHC クラス II ハプロタイプが推定され、とりわけ DRA*01:03:03 - DRB1*10:07 - DQB1*06:08 ハプロタイプ頻度は 32.6% であり、他のハプロタイプ頻度よりも圧倒的に高い値を示した。

(3) MHC クラス I 遺伝子の多型性

フィリピン産 112 個体における MHC クラス I 遺伝子の多型解析をおこなった結果、13 種類の Mafa-A1 アレルが同定され、それらのうち、1 種類は新規アレルであった。また 3 種類のアレル、すなわち A1*089:03 (アレル頻度: 20.5%)、A1*089:02 (17.4%) および A1*052:02 (17.0%) は、10%以上の高いアレル頻度を有した。一方、次世代シーケンサーを用いて Mafa-B 遺伝子の多型解析をおこなった結果、44 種類の Mafa-B アレルが同定され、それらのうち、17 種類は新規アレルであった。また、これらアレルの組み合わせから 13 種類の Mafa-B ハプロタイプが推定され、とりわけ B*049:01:01-B*065:02-B*065:02 の頻度は 23.6% であり、他のハプロタイプ頻度よりも高い値を示した。

(4) MHC ホモ接合体およびヘテロ接合体個体の特定

研究成果 (2) ならびに (3) から、MHC クラス II 遺伝子を DRA*01:03:03, DRB1*10:07, DQB1*06:08 ハプロタイプを有し、MHC クラス I 遺伝子を B1 ハプロタイプならびに A1*089:03, A1*089:02, A1*052:02 のいずれかを有する個体は高い頻度でフィリピン集団に存在することを明らかにした。

そこで 1,222 頭のカヌキザルを用いて、MHC 全遺伝子 (Mafa-A1, -B, -DRA, -DRB1, -DQA1, -DQB1, -DPA1, -DPB1) における MHC ホモ接合体ならびに MHC ヘテロ接合体を検索した結果、5 頭の HT1 (A1*052:02, B*049:01:01 - B*065:02, DRA*01:03:03, DRB1*10:07, DQA1*01:07, DQB1*06:08, DPA1*02:05, DPB1*16) ホモ接合体ならびに 43 頭の HT2 (A1*089:03, B*49:01:01 - B*065:02, DRA*01:03:03, DRB1*10:07, DQA1*01:07, DQB1*06:08,

DPA1*02:05, DPB1*16)ヘテロ接合体を特定した。さらに上記以外のMHCホモ接合体を検索した結果、計23頭のMHCホモ接合体を特定した。計28頭のMHCホモ接合体を特定した(図4)。

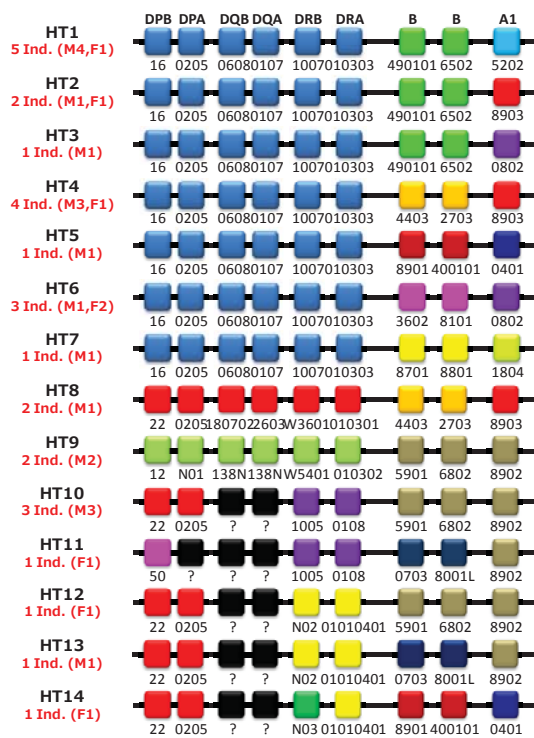


図4、特定されたMHCホモ接合体が有するMHCハプロタイプ構造

この過程で特定された2個体のHT1ホモ接合体は免疫学的手法であるリンパ球混合反応により、リンパ球の幼若化が起きなかったことから、遺伝学的のみならず免疫学的観点からも、これら2個体はMHCホモ接合サルであると特定された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. de Groot NG, Otting N, Robinson J, Blancher A, Lafont BA, Marsh SGE, O' Connor DH, Shiina T, Walter L, Watkins DI, Bontrop RE. Nomenclature report on the major histocompatibility complexes, genes, and alleles of non-human primate species. *Immunogenetics*, In press. (査読有)
2. Blancher A, Aarnink A, Tanaka K, Ota M, Inoko H, Yamanaka H, Nakagawa H, Apoil PA, Shiina T. Study of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) *MhcDRB* polymorphism in four populations. *Immunogenetics*, In press. (査読有)

3. Arikata M, Itoh Y, Okamatsu M, Maeda T, Shiina T, Tanaka K, Suzuki S, Nakayama M, Sakoda Y, Ishigaki H, Takada A, Ishida H, Soda K, Pham VL, Tsuchiya H, Nakamura S, Torii R, Shimizu T, Inoko H, Ohkubo I, Kida H, Ogasawara K. Memory Immune Responses Against Pandemic 1 (H1N1) 2009 Influenza Virus Induced by a Whole Particle Vaccine in Cynomolgus Monkeys Carrying Mafa-A1*052:02. *PLoS ONE* 7: e37220, 2012. (査読有)
4. Suzuki S, Hosomichi K, Otabe K, Sakamoto K, Kurata M, Nomura M, Yamanaka H, Nakagawa H, Ota M, Inoko H, Inoue I, Shiina T. Establishment of exome sequencing of cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *DNA Polymorphism* 19: 230-234, 2011. (査読無)
5. Ota M, Tanaka T, Katsuyama Y, Kita Y, Otabe K, Sakamoto K, Kurata M, Nomura M, Yamanaka H, Nakagawa H, Asamura H, Inoko H, Shiina T. Analysis of MHC class II gene polymorphisms (*Mafa-DR-DQ* genes) in Cynomolgus Macaques (*Macaca fascicularis*) originated from Philippine islands. *DNA Polymorphism* 19: 47-49, 2011. (査読無)
6. Aarnink A, Estrade L, Apoil PA, Kita YF, Saitou N, Shiina T, Blancher A. Study of Cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) DRA polymorphism in four populations. *Immunogenetics* 62: 123-136, 2010. (査読有)
7. Shiina T, Tanaka K, Katsuyama Y, Otabe K, Sakamoto K, Kuratani M, Nomura M, Yamanaka H, Nakagawa H, Inoko H, Ota M. Mitochondrial DNA diversity among three subpopulations of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) originating from the Indochinese region. *Exp. Anim.* 59: 567-578, 2010. (査読有)
8. Kita YF, Hosomichi K, Kohara S, Itoh Y, Ogasawara K, Tsuchiya H, Torii R, Inoko H, Blancher A, Kulski JK, Shiina T. MHC class I A loci polymorphism and diversity in three Southeast Asian populations of cynomolgus macaque. *Immunogenetics* 61: 635-648, 2009. (査読有)

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 椎名 隆、カニクイザル MHC 多型情報基盤と生物医学研究への展開、シンポジウム I 「MHC からみた種内多様性と進化」、第 20 回日本組織適合性学会大会（2011 年 8 月 29 日、ツインメッセ静岡）
2. Shiina T, Suzuki S, Tanaka K, Yamanaka H, Nakagawa H, Ota M, Torii R, Ogasawara K, Inoko H, Blancher A. Elucidation of Genomic Structure and Diversity of the *Macaca Fascicularis* MHC, SMBE2011 (July 27, 2011, Kyoto University)
3. 鈴木進悟、小田部耕二、坂本憲吾、倉田昌明、野村護、山中久、中川博司、太田正穂、猪子英俊、椎名隆、次世代シーケンサーを用いたカニクイザルにおける薬物代謝関連遺伝子内 SNP 検出、第 58 回日本実験動物学会総会（2011 年 5 月 25 日、タワーホール船堀）
4. 鈴木進悟、細道一善、小田部耕二、坂本憲吾、倉田昌明、野村護、山中久、中川博司、太田正穂、猪子英俊、井ノ上逸朗、椎名隆、次世代シーケンサーを用いたカニクイザルにおける Exome 変異検出法の確立、第 33 回日本分子生物学会年会（2010 年 12 月 7 日、神戸国際会議場）
5. 鈴木進悟、細道一善、小田部耕二、坂本憲吾、倉田昌明、野村護、山中久、中川博司、太田正穂、猪子英俊、井ノ上逸朗、椎名隆、次世代シーケンサーを用いたカニクイザルにおける Exome 変異検出法の確立、日本 DNA 多型学会第 19 回学術集会（2010 年 11 月 18 日、三島市民文化会館・ゆうゆうホール）
6. 太田正穂、田中景子、勝山善彦、北夕紀、小田部耕二、坂本憲吾、倉田昌明、野村護、山中久、中川博司、浅村英樹、猪子英俊、椎名隆、生物医学研究推進のためのフィリピン産カニクイザル MHC 遺伝子の多型解析、第 19 回 DNA 多型学会（2010 年 11 月 18 日、三島市民文化会館・ゆうゆうホール）
7. 椎名隆、北夕紀、田中景子、河野あづみ、鈴木進悟、細道一善、勝山善彦、土屋英明、小田部耕二、坂本憲吾、倉田昌明、野村護、山中久、中川博司、伊藤靖、太田正穂、猪子英俊、鳥居隆三、小笠原一誠、MHC 全遺伝子ホモ接合体カニクイザルの特定、第 19 回日本組織適合性学会大会（2010 年 9 月 18 日、東京大学）
8. 北夕紀、田中景子、細道一善、小笠原一

誠、鳥居隆三、猪子英俊、椎名隆、カニクイザル 3 集団における MHC クラス I 遺伝子 (*Mafa-A*) の多型性の比較、第 18 回日本組織適合性学会（2009 年 9 月 26 日、名古屋国際会議場）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：カニクイザル MHC 全遺伝子ホモ接合体を作成するためのキット及び方法
発明者：小笠原 一誠、鳥居 隆三

椎名 隆

権利者：学校法人東海大学、国立大学法人滋賀医科大学

種類：特許

番号：PCT/JP2011/060233

出願年月日：2011 年 5 月 2 日

国内外の別：国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎名 隆 (SHIINA TAKASHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：00317744

(2) 研究分担者

安藤 麻子 (ANDO ASAKO)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：50106647

鳥居隆三 (TORII RYUZO)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：10378440

土屋 英明 (TSUCHIYA HIDEAKI)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・助教

研究者番号：10378440

伊藤 靖 (ITOH YASUSHI)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90324566

小笠原 一誠 (OGASAWARA KAZUMASA)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：20169163

細道 一善 (HOSOMICHI KAZUYOSHI)

国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系人類遺伝研究部門・助教

研究者番号：50420948

太田 正穂 (OTA MASAO)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：50115333