

平成 23 年 5 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年度～2010 年度

課題番号：21790991

研究課題名（和文）

全身性エリテマトーデスのゲノムワイド連鎖解析と疾患遺伝子の同定

研究課題名（英文）

Genome-wide search for a candidate gene in systemic lupus erythematosus

研究代表者

北村 明子（KITAMURA AKIKO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10448318

## 研究成果の概要（和文）：

全身性エリテマトーデス(SLE)の発症には多因子が関与しているため、従来のゲノム関連解析で遺伝要因を解明することは困難であった。本研究では、メンデル遺伝形式で発症する SLE 家族症例を対象に、ポジショナルクローニング法を適用し、責任遺伝子を同定することを目的とした。本研究で集積した SLE 家族症例のうち、3 名の同胞が SLE を含む自己免疫疾患を発症した血族家系を対象にポジショナルクローニングを行い、二つの候補遺伝子座(FSLE-1:0.7Mb、FSLE-2;1.1Mb)を同定した。MLOD 値はそれぞれ 1.7、2.5 であった。FSLE-1 領域には遺伝子は含まれず、FSLE-2 領域には 40 個の遺伝子が存在していた。今後、FSLE-2 領域については Capture-resequencing を行う予定である。

## 研究成果の概要（英文）：

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multifactorial disease in which both genetic and environmental factors are involved. Genome wide association studies revealed many predisposing genes to common forms of SLE. However, those studies have failed to identify genes that strongly contribute to the pathogenesis of SLE. We found one consanguineous SLE family, which consists of 3 affected and 1 unaffected sibling. To identify the underlying gene, we performed a homozygosity mapping and revealed two homozygous regions (FSLE-1, FSLE-2) that spanned 0.7 Mb and 1.1 Mb, respectively. MLOD score was 1.7 and 2.5, respectively. The FSLE-1 did not contain any gene, but the FSLE-2 region contained 40 known and predicted genes. We plan to perform the capture-resequencing analysis of the FSLE-2 region.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：全身性エリテマトーデス、ポジショナルクローニング

### 1. 研究開始当初の背景

全身性エリテマトーデス(SLE)は、しばしば家族集積性を示し、複数の遺伝要因と環境要因が関与して発症する多因子疾患と考えられている。現在まで、多因子疾患の発症に関連する遺伝子群の同定を目的として大規模な全ゲノム関連解析が精力的に行われてきたが、この手法を用いて疾患発症を規定する決定的な遺伝要因を解明することは非常に困難であった。SLE に関しても例外ではなく、これまでの関連解析によって MHC, CTLA-4, FCRL3 など免疫機能分子の遺伝子多型が疾患感受性に関与していることが解明されてきた。しかし、それらの疾患発症への効果は弱く、SLE 発症に関与する遺伝要因の全貌は未解明のままである。

一方、メンデル遺伝様式で発症する単一遺伝子疾患の効果的なマッピング手法としては、家族症例を対象とするポジショナルクローニング法や血族家系を対象とするホモ接合体マッピング法が確立されている。腎臓病学領域では、これらの手法を用いて、フィンランド型先天性ネフローゼ（ネフリン）、家族性ステロイド抵抗性ネフローゼ（ポドシン）の疾患遺伝子が同定され、ネフローゼの分子病態解明に大きく貢献してきた。しかしながら、SLE に関しては本手法を駆使して原因遺伝子を同定する試みは成功していない。その原因の一つとして、解析に適する症例が選別されていないことが挙げられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、メンデル遺伝様式で発症する遺伝要因の濃厚な SLE 家族症例を対象に、ポジショナルクローニング法やホモ接合体マッピング法を適用し、表現型に大きく影響する疾患遺伝子を同定することを目的とする。

この研究の成功により、SLE の病態解明に重要な新知見をもたらせるのみならず、腎炎発症機構について新たな概念を創出できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

(計画・方法 1) 血族家系に発症した SLE のホモ接合体マッピング

両親が近親婚の 4 名の同胞のうち 3 名が自己免疫疾患 (SLE など) と精神疾患を発症した極めて稀な血族家系 (図 1) を対象に、ホモ接合体マッピングを行い、疾患遺伝子の同定を行う。罹患同胞らは、SLE、自己免疫性甲状腺疾患、シェーグレン症候群、深在性エリテマトーデスなど同胞間でも異なる表現型を呈しており、この家系の疾患遺伝子を同定することによって、多様な自己免疫疾患全体に共通する遺伝要因の理解が進むものと期待される。

①SNP タイピング；劣性遺伝で SLE を発症した血族家系(図 1)について、全ゲノム領域を網羅する高密度 SNP マッピングアレイ (約 30 万個の SNP) を用いて、SNP 遺伝子型タイピングを行う。

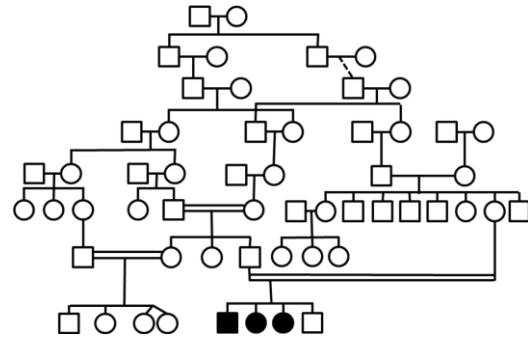


図 1) 同胞 4 名のうち 3 名が、自己免疫性疾患を発症した血族家系

②候補領域の検出；SNP タイピングデータを用いて、連鎖解析及びホモ接合体マッピングを行う。罹患者が共有し、非罹患者が共有していない、連続ホモ接合体領域を候補領域として検出する。Merlin program を用いて、LOD 値を算出し、統計学的に連鎖の妥当性を検証する。

③候補遺伝子の同定；ヒトゲノム情報のデータベース (NCBI, Ensemble, UCSC) を用いて、候補領域内に存在する候補遺伝子を選別する。

④候補遺伝子の変異の確認；直接シーケンス法を用いて、候補遺伝子の変異の確認を行う。

(計画・方法 2) 家族集積性を示す SLE のポジショナルクローニング

家族集積性を示す SLE の家系を収集し、全ゲノム解析を行い、遺伝的要因をできうるかぎり明瞭化する。

①家系の調査及び検体収集；家族集積性を示す SLE の家系を調査し、検体を採取する。検出感度を高めるために、遺伝要因の効果が大きく、浸透率が高く、メンデル遺伝を呈する家系を選択する。i) 家族歴があり、ii) 若年発症し、iii) 重症の表現型をとり、iv) 罹患頻度の低い方の性の発症者などを指標とする。また、遺伝的異質性を少なくするために、v) 血縁関係や地理的疎隔化が存在する家系、あるいは vi) 診断的表現型以外の特徴的な臨床症状を共有する家系など、遺伝的に均質で創始者効果が期待できる集団を用いる。vii) 染色体微小構造異常 (転座や微小領域の欠失/重複) の合併も、疾患遺伝子同定への突破口になりうる。

②全ゲノム解析；全ゲノム領域の SNP マーカ

一による連鎖解析を行い、候補領域を検出する。

1. 家系内で劣性遺伝様式に合致する領域を検出する。
2. 家系間でハプロタイプを比較し、罹患者の染色体組み換えの位置を比較し、候補領域を狭小化する。
3. Merlin program を用いて LOD 値を算出し、統計学的に連鎖の妥当性を検証する。

③候補遺伝子の同定；ヒトゲノム情報のデータベースを用いて、候補領域内に存在する候補遺伝子を選別する。

④候補遺伝子の変異の確認；直接シーケンス法を用いて、候補遺伝子の変異の確認を行う。

#### 4. 研究成果

(結果 1) 血族家系に発症した SLE のホモ接合体マッピング

SNP によるホモ接合体マッピングの結果、二つの候補遺伝子座 (FSLE-1 : 0.7Mb, FSLE-2 ; 1.1Mb) を同定した。両遺伝子座ともにハプロタイプ解析は劣性遺伝様式に合致し、maximum LOD 値はそれぞれ 1.7、2.5 であった。

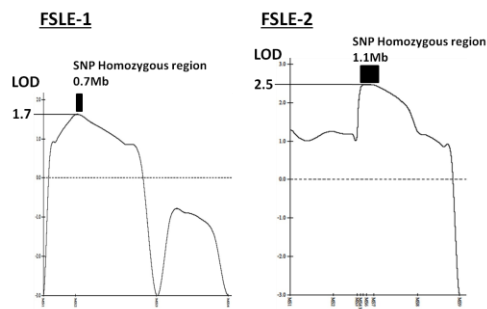


図 2) ホモ接合体マッピングにより、2つの候補領域(FSLE-1、FSLE-2 が同定された)

ヒトゲノム情報のデータベース (NCBI, Ensemble, UCSC) を用いて、候補領域内に存在する候補遺伝子を選別したところ、FSLE-1 領域には遺伝子は含まれず、FSLE-2 領域には 40 個の遺伝子が存在していた。それらの内訳は、転写因子 2 個、シグナル分子 5 個、酵素 2 個、細胞骨格関連の分子 3 個、その他 28 個であった。これらの遺伝子について、Sanger 法を用いて変異検索を遂行中である。さらに、FSLE-2 領域については Capture-resequencing を行う予定である。

(結果 2) 家族集積性を示す SLE のポジショナルクローニング

家族集積性を示す SLE 家系について、その家系調査を行った。一部の症例においては、ゲノム DNA の採取も終了し、すでに解析できる

状況にある。今後、さらに症例数を蓄積し、ゲノム解析を行う予定である。

#### 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 7 件)

全て査読有

1. Ishifune C, Maekawa Y, Nishida J, Kitamura A, Tanigaki K, Yagita H, Yasutomo K. Notch signaling regulates the development of a novel type of Th1-expressing dendritic cell in the thymus. *Eur J Immunol* 41: 1309-1320 (2011)
2. Alam MS, Maekawa Y, Kitamura A, Tanigaki K, Yoshimoto T, Kishihara K, Yasutomo K. Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:5943-5948 (2010)
3. Urushihara M, Takamatsu M, Shimizu M, Kondo S, Kinoshita Y, Suga K, Kitamura A, Matsuura S, Yoshizumi M, Tamaki T, Kawachi H, Kagami S. ERK5 activation enhances mesangial cell viability and collagen matrix accumulation in rat progressive glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F167-76 (2010)
4. Sugimoto K, Maekawa Y, Kitamura A, Nishida J, Koyanagi A, Yagita H, Kojima H, Chiba S, Shimada M, Yasutomo K. Notch2 signaling is required for potent anti-tumor immunity in vivo. *J Immunol* 184:4673-8 (2010)
5. Kijima M, Iwata A, Maekawa Y, Uehara H, Izumi K, Kitamura A, Yagita H, Chiba S, Shiota H, Yasutomo K. Jagged1 suppresses collagen-induced arthritis by indirectly providing a negative signal in CD8+ T cells. *J Immunol* 182:3566-3572 (2009)
6. Shono A, Tsukaguchi H, Kitamura A, Hiramoto R, Qin XS, Doi T, Iijima K. Predisposition to relapsing nephrotic syndrome by a nephrin mutation that interferes with assembly of functioning microdomains. *Hum Mol Genet* 18:2943-56 (2009)

[学会発表] (計 2 件)

1. 北村明子、安友康二 ホモ接合体マッピングによる家族性全身性エリテマトーデス

の疾患遺伝子探索, 第 54 回日本人類遺伝学会, 2009 年 9 月 26 日, グランドプリンスホテル高輪 (東京)

2. Akiko Kitamura, Koji Yasutomo; Identification of a candidate locus in familial systemic lupus erythematosus by homozygosity mapping, American Society of Human Genetics 2009 Annual Meeting, October 21, 2009, Hawaii Convention Center (USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 明子 (KITAMURA AKIKO)

(徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教)

研究者番号: 10448318