

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19295

研究課題名(和文) 疾患・薬物代謝関連遺伝子多型における法医学的試料からの研究

研究課題名(英文) A study of disease- and drug metabolism-associated polymorphisms using forensic specimen

研究代表者

木村 かつり (Kimura-Kataoka, Kaori)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：80574011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：法医学的試料から疾患・薬物代謝関連遺伝子多型を同定することを最終的な目的として、解剖症例、多民族集団について遺伝子多型検査を行った。

DNASE1、DN1L1、DN1L2、DN1L3、DNASE2それぞれの非同義置換型SNPを分析し、遺伝的多様性がみられるSNPを確認した。また、アミノ酸置換型酵素活性を測定し、酵素活性消失・低下を示す座位を特定した。さらにPolyPhen-2を用いてアミノ酸置換による酵素活性への影響を調査し、PolyPhen-2は機能消失の推定に有効であることが明らかとなった。

HMG2、GHR内SNPは心重量、体表面積等の身体的特徴に相関関係が認められた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify polymorphisms associated with diseases and drug metabolism from forensic specimen.

Among 61 non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNP) in DNASE1, only Q244R was polymorphic.

Among 21 SNPs in DN1L1, V122I indicated genetic polymorphism in Caucasians. All of the 64 SNPs in DN1L2 were monomorphic. Among 40 SNPs in DN1L3, R206C and W215G were polymorphic among Caucasians.

Among 31 SNPs in DNASE2, only V206I was polymorphic among Koreans. We have concluded PolyPhen-2 is effective in prediction of enzyme function abolishment by amino acid substitutions using PolyPhen-2.

2 SNPs in HMG2 illustrated significant associations with height, right kidney weight and brain weight in Caucasians and Japanese. SNP in GHR was found to be associated with heart weight, left cardiac weight, cardiac hypertrophic coefficient, body surface area, right lung weight and kidney weights.

研究分野：法医学

キーワード：遺伝子多型 疾患感受性 法医学的試料

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在のところ、法医学的試料から遺伝子多型を用いて個人識別を行うことが常道であったが、遺伝子多型を判定することにより法医解剖に付されたご遺体の死亡との因果関係への寄与を精査していく研究は皆無であった。司法解剖が増加し死因究明に力点が置かれる中、該当者の疾病や環境適応性を推定しうる遺伝子(疾患感受性遺伝子・中毒物質代謝関連遺伝子)を死因精査に用いる本研究は極めてユニークであり、死因精査における新たな飛躍をもたらす試みである。

(2) 我々は DNase I 多型と各種疾患との間の相関について網羅的な検索を行い、DNASE1\*2 対立遺伝子は胃がん、大腸がん、心筋梗塞罹患と有意な相関があることや免疫不全症との関連を見出した(Kimura-Kataoka K et al DNA Cell Bio 33: 492-502, 2014)。また DNase II 遺伝子多型が免疫疾患に関与することを解明した(Kimura-Kataoka K et al Leg Med 15: 157-160, 2013; Kimura-Kataoka K et al Electrophoresis 34: 3361-3369, 2013)。さらにヒ素代謝量と AS3MT 遺伝子多型に有意な相関を認めた(Fujihara J, Takeshita H et al Int J Mol Sci 12: 2351-2382, 2011)。最近では日本人における身長の高低と相関する遺伝子多型も見出した(Takeshita H, Kimura-Kataoka K et al Electrophoresis 32: 1844-1851, 2011)。以上のような研究成果から、疾患や薬毒物代謝の民族・個人差に関する遺伝子マーカーを利用した病態解明および死因への関与に着想し法医学実務向上をめざす。

(3) これまでの研究成果を基盤とし、遺伝子マーカーを用いて法医学的試料から

の死因精査検索に適用できるものとする法医学的実用化を図る。

## 2. 研究の目的

各種疾患や薬毒物代謝に関与する遺伝子多型の研究は様々な生体試料から行われているが、法医学的試料を用いての網羅的スクリーニングは行われていないのが実情である。申請者らはこれまでに、法医学的試料から個人識別をはじめとする種々の情報を得る手法や試みを行ってきた。具体的には、多数の民族における疾患や薬毒物代謝に関わる遺伝子の多型解析を行い、個人差や民族差が遺伝子多型と有意に相関する現象を確認している。このような疾患・代謝における民族・個人差を規定する遺伝子マーカーを法医学的試料から見出し、疾患感受性遺伝子多型や中毒物質代謝遺伝子多型と死因との因果関係の解明を具体的な目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 法医解剖・検案事例の臓器、体液を採取し、DNA 抽出キットを用いてそれぞれの DNA を抽出した。

(2) 抽出した DNA を用いて、種々の遺伝子多型(DNASE1、DN1L1、DN1L2、DN1L3、DNASE2、HMGA2、LHX3-QS0C2、IFG1、GHR 等)の解析を行った。同時に、14 集団(アジア人:日本人を含む 8 集団、コーカシア人:3 集団、アフリカ人:3 集団)における集団調査も行った。

(3) それぞれの SNP に相当するアミノ酸置換型 DNase I、DNase1L1、DNase1L2、DNase1L3、DNase II を作成し酵素活性を測定した。さらに、SNP によって惹起されるアミノ酸置換のタンパク機能への影響を予測する PolyPhen-2 を用いてアミノ酸置換による酵素活性への影響を調査

した。

(4) HMGA2 および GHR については、遺伝子マーカーと解剖例における各臓器重量や大きさ等との相関関係も精査した。

#### 4. 研究成果

法医学的試料から疾患・薬毒物代謝関連遺伝子多型を同定することを最終的な目的として、解剖症例に加え多民族集団について遺伝子多型検査を行った。

(1) DNase I では非同義置換型 61 SNP で Q244R のみが多様性を示した。このアミノ酸置換型酵素活性は低下しており、Q244R が SLE 発症に関与している可能性が考えられた。

(2) DNase1L1 では非同義置換型 21SNP で、V122I でコカア人にもみ遺伝学的多様性が認められた。それぞれの SNP に相当するアミノ酸置換型 DNase 1L1 の酵素活性を測定したところ、2 座位で酵素活性が消失し、4 座位で酵素活性の低下が認められた。酵素活性消失または低下が Pompe 病や Barth 症候群発症・病態に直接関与しているかは明らかでないが、DNase 1L1 酵素活性消失・低下を惹起するこれら SNPs は細胞表面のバリア機能の破綻、さらには悪性形質転換を引き起こすリスクファクターであると推測された。

(3) DNase1L2 では非同義置換型 64SNP に多様性はなかった。アミノ酸置換型 DNase 1L2 の酵素活性測定値比較では 31 座位で酵素活性消失、20 座位で酵素活性低下が認められた。これら活性喪失を惹起する座位の SNP は不全角化病変の遺伝的なりスクワクターになり得るものと考えられた。

(4) DNase1L3 では非同義置換型 40SNP で、R206C、W215G でコカア人にもみ遺伝学的多様性がみられた。アミノ酸置換型 DNase 1L3 の酵素活性測定値比較では 6 座位で酵素活性が消失、7 座位で酵素活性の低下がみられた。活性低下を引き起こすこれら SNP の minor-allele を有する個体は抗核抗体の産生を亢進させる傾向にあるものと考えられた。

(5) DNase II では非同義置換型 31SNP で、V206I で韓国人にもみ遺伝学的多様性がみられた。日本人において遺伝子型と血清 DNase II 活性を調査した結果、主要な -1951G、-1066G、-390A、+2630T および +6235G allele を有する対象群は、-1951A、-1066C、-390C、+2630C および +6235C を有する対象群より低い酵素活性を示すことが判明した。特に、上流域に存在する SNP 3 座位では、酵素活性に対する効果がより大きいことが示された。上流域のハプロタイプ GGA は低酵素活性型、また ACC は高酵素活性型に相当すると考えられる。上流域 SNP 3 座位のプロモーター活性への影響を調査したところ、日本人において優位に認められたハプロタイプ GGA は最も低いプロモーター活性を示し、ACC は最も高いプロモーター活性を示した(図 1)。この結果

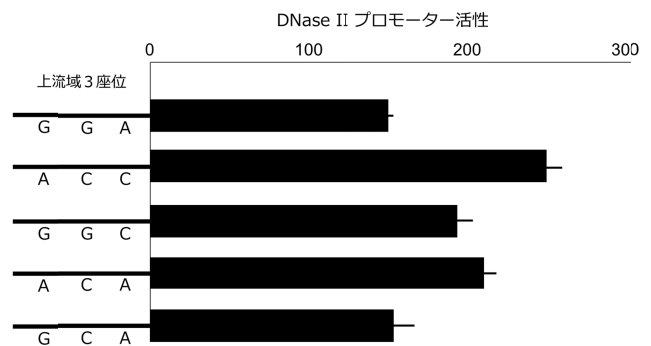


図 1 DNase II 上流域におけるプロモーター活性

は、血清 DNase II 酵素活性レベルと一致しており、RA 関連 SNP が関与する DNase II プロモーター活性が有意に血清酵素活

性に影響していることが明らかとなった。  
アミノ酸置換型 DNase II の酵素活性を比較したところ、7 座位で酵素活性が消失し、14 座位で酵素活性が低下していた。

(6) PolyPhen-2 を用いてアミノ酸置換による酵素活性への影響を調査し、PolyPhen-2 は機能消失の推定に有効であることが明らかとなった。

(7) HMGA2、LHX3-QSOX2、IGF1 遺伝子内 6SNP の頻度分布調査を行ったところ、HMGA2 内 3SNP ではアジア人とアフリカ人はコーカリア人と異なる分布、LHX3-QSOX2 内 SNP ではアジア人とコーカリア人はアフリカ人と異なる分布を示した。IGF1 内 2SNP の 1 座位では全民族で有意アレルが一致し、1 座位ではコーカリア人とアフリカ人はアジア人と異なる分布を示した。

(8) HMGA2 内 2SNP ではコーカリア人と日本人において身長、右腎重量、脳重量との有意な関連がみられた。GHR の exon3 内 SNP で、遺伝子型と身体的特徴の相関関係を調査した結果、心重量、左心室重量、心肥大指数、体表面積、右肺重量および左右腎重量に相関関係が認められた。

今後これらの座位について、法医学的試料を用い疾患・薬毒物代謝関連遺伝子多型と死因との因果関係を引き続き解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Ueki M, Takeshita H, Utsunomiya N, Chino T, Oyama N, Hasegawa M, Kimura-Kataoka K, Fujihara J, Iida R, Yasuda T. Survey of single-nucleotide polymorphisms in the gene encoding human deoxyribonuclease I-like 2

producing loss of function potentially implicated in the pathogenesis of parakeratosis. PLoS One 12, 2017, 30175083.

Ueki M, Takeshita H, Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Iida R, Yasuda T. Simple screening method for copy number variations associated with physical features. Leg Med 25, 2017, 71-74.

Fujihara J, Kimura-Kataoka K, Yasuda T, Sano R, Kominato Y, Takeshita H. Association of a single-nucleotide polymorphism (rs6180) in GHR gene with plural tissue weight. J Genet 95, 2016, 189-192.

Fujihara J, Ueki M, Kimura-Kataoka K, Iida R, Takeshita H, Yasuda T. Functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding the human deoxyribonuclease (DNase) family potentially relevant to autoimmunity. Immunol Invest 45, 2016, 406-419.

〔学会発表〕(計 5 件)

竹下治男、藤原純子、木村かおり、山田和夫、安田年博. 国内外の多集団における Interleukin 8 遺伝子 (CXCL8) 内 -251A/T 多型解析においてみられた地理的勾配および喫煙率との相関. 第 34 回日本法医学会学術中四国地方集会. 2017. 愛媛.

木村かおり、藤原純子、山田和夫、安田年博、竹下治男. 塩基除去修復 (BER) 経路に関わる DNA polymerase (POLB) 遺

伝子多型の世界分布.DNA 多型学会 第  
26 回学術集会.2017.東京.

安田年博、飯田礼子、植木美鈴、竹下治  
男、藤原純子、木村かおり、山田和夫、  
河合康幸.自己免疫疾患に関するヒト  
DNase family 遺伝子の functional SNPs.  
第 101 次日本法医学会学術全国集  
会.2017.岐阜.

山田和夫、藤原純子、木村かおり、松本  
健一、安田年博、竹下治男.質量分析を  
用いたストレスマーカーの一斉定量法  
の開発とその法医解剖への応用へ向け  
て.第 33 回日本法医学会学術中四国地  
方集会.2016.広島.

木村かおり、藤原純子、安田年博、倉田  
さつき、小湊慶彦.佐野利恵、山田和夫、  
竹下治男.日本国内および世界人口にお  
けるインターロイキン 8 内-251A/T 多型  
解析.DNA 多型学会 第 25 回学術集  
会.2016.千葉.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

木村 かおり (KIMURA-KATAOKA, Kaori)

島根大学・医学部・助教

研究者番号 : 8 0 5 7 4 0 1 1

### (2)研究協力者

竹下 治男 (TAKESHITA, Haruo)

藤原 純子 (FUJIHARA, Junko)

安田 年博 (YASUDA, Toshihiro)