

生活習慣病の地域特異性に対する分子遺伝学的解析

地域医療学センター 人類遺伝学部門
熊田 真樹

生活習慣病の疾患遺伝子の研究で用いられる相関解析の手法は連鎖不平衡の概念を基に成立しているが、その状態は人種や集団の人口統計学的な背景によって異なることが報告されている。日本人は比較的均一な遺伝的背景を持つと考えられているが、大都会と、離島・山間部などのように、人口動態が大きく異なる集団の間で連鎖不平衡状態に差異が存在するか否かについて比較検討された報告は少ない。本研究では、日本人を対象に規模や人口動態の大きく異なる集団間の遺伝学的背景の違いを明らかにすることを目的として、第17番染色体長腕の約5Mbにわたる領域のSNPタイピングを行い、領域内のハプロタイプブロックの概要を明らかにし、集団間で比較解析した。また、それぞれの集団で生活習慣病の疾患候補遺伝子についての相関解析を行い、生活習慣病に対する疾患遺伝子の寄与について検討した。

<方法> 本学附属病院および周辺の関東地方の医療機関および検診施設 (pop 1) と、従来から人口の移動が極端に少ない九州地方の離島 (pop 2) から、それぞれインフォームド・コンセントを取得した後、血液サンプルの提供を受けた。第17番染色体35-40Mbの5Mbの範囲に網羅的に88個のSNPを、また本態性高血圧症および高脂血症に関する8個の候補遺伝子 (本態性高血圧症: AGT, AT1, ET1, GNB 3, TNFRSF1B, ADD1; 高脂血症: PPARA, LPL) 内のSNPをそれぞれ選び、Taqman probe法を用いてタイピングを行った。結果は、アリル頻度の集計、連鎖不平衡解析および本態性高血圧症と高脂血症に対する相関解析を行った。

<結果> pairwise D'から予測されるハプロタイプブロックの構造は、両集団とも概ね同様であったが、pop1に比べpop2では全体に広い範囲で高い連鎖不平衡状態が保たれていた。ブロック毎に推定したハプロタイプの頻度分布か

ら求めた集団間の遺伝的距離 (Fst) は、1個を除いた全てのハプロタイプブロックにおいて有意差が認められた。また領域内の88個のSNPのうち37個にアリル頻度の有意差を認めた。これらは領域内にランダムに存在し、連鎖不平衡ブロックとの明らかな関連を認められなかった。生活習慣病疾患候補遺伝子に対する相関解析の結果、本態性高血圧症については、pop 1においてAT 1 遺伝子内のSNPと、pop 2においてTNFRSF 1 BとADD 1 遺伝子内のものがP<0.05で疾患との相関を認め、両集団どちらにおいても相関を認める物はなかった。高脂血症に関する遺伝子については疾患との相関を認めなかった。

<考察> 本研究の結果から、比較的均一な遺伝的背景を持つ日本人集団においても、異なる連鎖不平衡状態を持つ分集団が存在し得ることが示唆された。このような集団を混合することによって生じる階層化は相関解析における偽陽性の原因となる可能性があり、多施設、多地域で採取されたサンプルを合わせて研究を行う場合は充分注意する必要があると考えられた。一方で、pop 2のように広範囲にわたって高い連鎖不平衡状態が保たれている集団は、少ないSNPの数で効率的に連鎖不平衡マッピングを行うことが可能であり、また集団における多因子遺伝疾患の発症に特定の遺伝子の寄与が大きい可能性も推測される等、生活習慣病の疾患遺伝子探索において有利な条件を持つと考えられる。今回の結果を基にしたフォローアップ研究を行うことによって、大規模相関解析で明らかにすることが困難な、疾患と遺伝子多型との関係を明らかに出来る可能性があると考えられた。

AAV-mediated interleukin(IL)-10 gene transfer prevents heart failure in Dahl salt-sensitive rats

Yoshikazu Maeda, Mutsuko Sarukawa,
Toru Yoshioka, Takayuki Ito,
Kazuyuki Shimada

Background Proinflammatory cytokines play an important role in the development and progression of heart failure. Interleukin (IL)-10 has immunomodulatory effects on cardiovascular tissues including the inhibition of pro-inflammatory cytokine production. In this study, we determined whether IL-10 gene transfer could prevent the development and progression of heart failure.

Methods and Results Human IL-10 or LacZ expressing adeno-associated virus (AAV) vectors (2×10^{11} genome copies/body) were injected into the anterior tibial muscle of 6 week-old Dahl salt sensitive rats. They were fed with a diet containing 8% NaCl for 12 weeks to induce hypertension and heart failure. The serum IL-10 concentration became significantly increased (86~398pg/ml) during a 12 week-period in IL-10-transduced rats. The blood pressure was not significantly different between IL-10-transduced rats and LacZ-transduced rats. The ejection fraction (EF) assessed by echocardiography was preserved in IL-10-transduced rats compared with LacZ-transduced rats (78.0 vs. 66.0%, respectively). Moreover, the plasma BNP level and survival rate were improved in IL-10-transduced rats compared with LacZ-transduced rats.

Conclusion AAV-mediated IL-10 gene transfer improves the left ventricular function and survival rate in a hypertensive heart failure model.

腸上皮化生の発生メカニズム, 特に転写因子 CDX1, CDX2の発現解析, 遺伝子異常の解明

内科学講座消化器内科学部門 江田 証

【背景】転写因子である CDX1/2が, 食道の腸上皮化生であり食道腺癌の発生母地として注目されている Barrett's epithelium において発現していることを, RT-PCR 法と免疫染色法にて

報告した。また特筆すべきことに, 逆流性食道炎の段階にて CDX2が発現していること, すなわち CDX2の発現は形態学的に腸の形質を呈する前の段階である逆流性食道炎にて発現しており, Barrett's epithelium 進展における trigger の可能性があることを報告してきた (Eda A, et al. Aberrant expression of CDX2 in Barrett's epithelium and inflammatory esophageal mucosa. *J. Gastroenterol* 38 : 14-22, 2003. Eda A, et al. Comparative Study of Homeobox Gene Expression, in the Inflammatory Esophageal Mucosa and Barrett's Esophagus. Digestive disease week, San Francisco, CA, May 19-22, 2002)。それに対し, CDX1は逆流性食道炎では発現しておらず, 胃の腸上皮化生, また Barrett's epithelium で発現しており, 腫瘍形成における関与が示唆されている。しかし, 代表的な胃癌細胞株では CDX1の発現が欠如している。胃癌細胞における, この CDX1の transcriptional silencing の分子メカニズムは解明されてはおらず, 多くの癌において, さまざまな遺伝子の silencing というものが, プロモーター領域のメチル化によって生じていることが報告されているため, 今回胃癌細胞株における, CDX1の promoter 領域のメチル化解析を行った。

【方法】胃癌細胞株における CDX1の全 exon を sequence したところ, mutation や homozygous deletion は認めなかった。胃癌細胞株における CDX1の発現の欠如が promoter 領域内に位置する CpG island のメチル化による可能性を考え, combined bisulfite restriction analysis (COBRA) と bisulfite sequencing を用いて, 6種類の胃癌細胞株 (MKN28, MKN45, MKN7, MKN74, AGS, KATO III) と 1種類の大腸癌細胞株 (SW480) の CDX1' CpG island のメチル化解析を行った。胃癌細胞株から DNA を抽出し, これに bisulfite modification を行った。COBRA の secondary PCR の増幅部位としては転写開始部位の -173~-19に 対応し, 3つの methylation-specific BstUI site を含む領域を選択し (図1), 特異的プライマーを設計して解析した (図2)。

【結果】COBRA の結果, MKN28, 74, 7, 45,