

本研究は全ゲノムを対象とした大規模スクリーニングによる脳動脈瘤の感受性遺伝子の同定を目的とする。脳動脈瘤のような多因子疾患の原因遺伝子を追求する方法として、罹患同胞対を用いた連鎖解析法が有効である。ゲノム全域におよぶ連鎖解析により責任候補領域を狭め、候補遺伝子解析を行い感受性遺伝子の同定を試みる。

2. 研究方法

1) 罹患同胞対の臨床データと DNA サンプルの収集：東京女子医大、関連病院、および全国の約 1,100 の脳神経外科学会認定施設に協力を依頼し、脳動脈瘤破裂によるくも膜下出血を起こした、または未破裂の脳動脈瘤を有する同胞症例の臨床データおよび DNA サンプルの収集を行う。DNA サンプルは対象者の末梢血から抽出する。

2) 連鎖解析、遺伝子座同定：ゲノムワイドの連鎖解析のために、ゲノム全域を網羅する 400 個のマイクロサテライトマーカーを利用したリンケージマッピングセット(蛍光標識プライマー：PERKIN ELMER 社)を用い、自動化多重 PCR 法でタイピングして連鎖解析を行う。これにより約 10 センチモルガンの精度で染色体上に遺伝子座を局限できる。タイピング作業は自動解析装置 (ABI PRISM 377) を利用し、ジェノタイププログラムにて大量試料の迅速処理を計る。連鎖解析はノンパラメトリック法である SIBPAL プログラムおよび GENE HUNTER プログラムの 2 つを用いより

確実な連鎖を得る。ゲノム全域の 1 次スクリーニングにより連鎖を認めた領域について、近傍遺伝子マーカー (カスタム蛍光標識プライマー) を用いてより詳細な 2 次スクリーニングを行い、責任遺伝子座を 2 センチモルガン程度に局限する。

3. 候補遺伝子検索：局限された遺伝子座についてヒトゲノムデータベースサーチを行い候補遺伝子を選別する。有力な候補遺伝子が見つければ順次 SSCP 法、直接シーケンス法による変異スクリーニングを行い、遺伝子変異の同定も試みる。

3. 研究経過

1) 日本人における各マーカーの遺伝子頻度：今回使用しているリンケージマッピングセットのマーカーの遺伝子頻度はコーカシアンでは明らかになっているが、日本人のそれは不明である。そこでまず、一般日本人のコントロールサンプルを用いて各マーカーの遺伝子頻度を調べた。

2) 罹患同胞対：2 罹患同胞症例 68 組、3 罹患同胞症例 4 組の DNA サンプルが収集され、合計 80 組の罹患同胞対について解析を行っている。

3) 連鎖解析：現在、第 19、20、21、22 および X 染色体について解析が終了し、第 21 染色体 (D21S263)、第 22 染色体 (D22S274) に SIBPAL プログラムで連鎖を認めた。更にゲノム全長に亘るスクリーニングを行っている。

第 19 回遺伝医学研究会

日時 1999 年 7 月 2 日 (金) 18:00~20:00

会場 第 2 臨床講堂

開会挨拶

(第二生理学) 宮崎俊一

講演 1

座長 (第二生理学) 宮崎俊一

モデル生物を使ったゲノムシーケンス決定後の分子遺伝学

(第二生理学) 三谷昌平

講演 2

座長 (第二病院小児科) 杉原茂孝

T 細胞認識ヒト癌抗原の単離と免疫・遺伝子治療への応用

(慶應義塾大学医学部先端医科学研究所細胞情報研究部門) 河上 裕

閉会挨拶

(腎臓小児科) 伊藤克己

モデル生物を使ったゲノムシーケンス決定後の分子
遺伝学

¹ 東京女子医大・医・第二生理,

² 科学技術振興事業団さきがけ研究 21,

³ 現：日赤医療センター内科)

三谷昌平^{1,2}・安藤恵子¹・米積亜紀^{1,3}・
町山悦子¹・阪本照美^{1,2}・野口幸子¹

今日のゲノムサイエンスの流れは、ゲノムの物理地図作成や塩基配列決定の技術の進歩に伴い、いろいろな生物で全ゲノム塩基配列決定と可能な限り多数のESTのクローン化および塩基配列決定、さらには発現パターンの記載へと着実に進展している。既に原核生物の代表的なものおよび酵母などで成果が出ていたが、昨年末について多細胞生物としては初めて線虫 *C. elegans* の全ゲノム塩基配列決定が終了した。また、ヒトについても終了が目前に迫っている。このような塩基配列情報は、インターネットを介して全世界的に共有されつつある。次の重要目標の1つとしては、構造の決定された遺伝子各々の機能を記載し、例えば疾患遺伝子の同定や変異遺伝子が個体の異常に至るメカニズムを理解する際の情報を提供することにある。この目的のために、我々はゲノム塩基配列が既知であるモデル生物、線虫 *C. elegans* を用いて近い将来ヒト分子遺伝学に貢献できるような遺伝子機能解析技術を開発しているので紹介する。

第一に、線虫における逆遺伝子学の方法論とその応用に取り組んでいる。我々は、trimethylpsoralen と紫外線を用いた遺伝子破壊法を完成させ、従来法に比べて2桁の効率改善を実現した。この方法は、現在 The *C. elegans* Gene Knockout Consortium として世界レベルでの共同研究に用いられようとしている。線虫の既知の遺伝子の主要なもの(全遺伝子で約 19,000 あると言われる)についての欠失変異体を揃え、世界の線虫研究者に配布する。各々の遺伝子の機能が分子・細胞レベルで明らかになり、データベース化されて行くと期待される。

第二に、ゲノム塩基配列や EST の情報を用いて大量の生物学的な情報を得る方法を開発することにある。ディファレンシャルディスプレイ法や DNA チップ法などが注目されているように、細胞の分化状態を反映する分子群の同定を行うことが必要とされる。多細胞系での解析においては、遺伝子発現が多面的であったり重複していたりすることにより、単純な発現パターンの変化ではとらえ難いものが多い。我々は、生体内での分子間相互作用を用いて遺伝子カスケードを理解する手法を開発している。代表的アプリケーションとして、転写制御因子の標的遺伝子群の同定を行っている。線虫の多彩なニューロンの種々の発生段階で作用

していると考えられる転写制御因子 *unc-86* 変異体を親株として UNC-86/GFP 融合蛋白質をトランスジェニック遺伝子として導入して表現型を野生型に回復し、GFP をエピトープタグとして会合分子を回収・同定する方法である。ニューロンの分化に重要な分子群を大量のゲノム/EST 塩基配列から選別するのに有効であると考えられる。

T 細胞認識ヒト癌抗原の同定と免疫・遺伝子治療への応用

(慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所

細胞情報研究部門)

河上 裕

我々は癌細胞に対する免疫応答を解明し、免疫療法の可能性を追求するために、免疫療法に比較的良好に反応するヒトメラノーマを第一のモデルとして研究を進めている。メラノーマでは、生体内での腫瘍拒絶に T 細胞が重要な役割を果たす。メラノーマ反応性 T 細胞は *in vitro* で癌細胞上の HLA に提示されるペプチドを認識して癌細胞を傷害し、各種サイトカインを分泌し炎症反応を惹起する。この T 細胞が認識する抗原分子を同定すれば、ヒト自己癌に対する免疫応答機構を分子レベルで解明できるとともに、より効果的な免疫療法の開発が可能となるかもしれない。そこでメラノーマ反応性 T 細胞をスクリーニングに用いた cDNA 発現クローニング法により、メラノーマ抗原として、メラノソーム蛋白 (MART-1, gp 100, tyrosinase など)、Cancer-Testis 抗原 (NY-ESO-1 など)、突然変異をもつ β -catenin などを単離した。MART-1 と gp100 抗原には高免疫原性共通抗原エピトープが同定され、これで患者リンパ球を刺激することにより、効率よく癌反応性 T 細胞を誘導することができる。

メラノーマエピトープは抗原提示細胞上での発現密度が低いために低免疫原性であると考えられ、免疫原性を高めるために、高蛋白発現を可能にするウイルスベクターの使用や、抗原ペプチドのアミノ酸を代えて作製した高 HLA-結合性ペプチドの使用や、ペプチド感作や遺伝子導入により癌抗原を発現させた樹状細胞の使用が考えられた。米国国立癌研究所外科では *in vitro* でペプチド刺激により誘導した T 細胞を用いた養子免疫療法や、癌抗原ペプチドや、癌抗原遺伝子組換えウイルスやプラスミドの投与、また癌抗原感作樹状細胞を用いた能動免疫療法の第一相臨床試験を施行しており、一部の患者には腫瘍退縮が認められた。特に HLA-A2 結合親和性を高めた改変 gp100-209 (210M) ペプチドをアジュバントと IL2 とともに投与する臨床