

長研182

(別紙様式第3号)

## 論 文 要 旨

### 論文題目

Identification of nonsynonymous polymorphisms in the superantigen-coding region of *IDDMK<sub>1,2</sub>22* and a pilot study on the association between *IDDMK<sub>1,2</sub>22* and type 1 diabetes

(*IDDMK<sub>1,2</sub>22* のスーパー抗原コード領域の多型の同定と、*IDDMK<sub>1,2</sub>22* と1型糖尿病の相関研究)

氏名 金城 祥乃



【目的】 急性発症で亡くなった糖尿病患者膵臓培養上清から単離されたヒト内在性レトロウイルス IDDMK<sub>1,2</sub>22 (Conrad et al. 1997) の、1型糖尿病の病因との関連を遺伝学的に検証する。

【方法】 急性発症した小児糖尿病患者 74 人について、IDDMK<sub>1,2</sub>22 スーパー抗原 (SAg) コード領域の変異を検索した。変異検索はすべて、SAg コード領域のシーケンシング解析により行った。同様に、健常人 54 人について解析し、変異アリの出現頻度を比較した。両群におけるアリル頻度の差は、 $\chi^2$  検定と Fisher's exact probability test によって検定した。IDDMK<sub>1,2</sub>22 SAg コード領域は、その上流と 3' LTR 下流に設定した 2 セットのプライマーを用いて、nested PCR によって増幅した。得られた 2.9 kb の増幅産物を Xba I で切断し、SAg コード領域を含む 610 bp の DNA 断片をクローニングした。これらのクローンから 10~15 コロニーを選んで一緒に培養し、plasmid DNA を抽出してシー




クエンシングを行った。プロテアーゼとフェノールを用いた標準的な方法または QIAmp Blood Kit によって末梢血から DNA を抽出した。

【結果】

1. SAg コード領域の翻訳開始 codon の A を 1 として、290 と 461 番目の二カ所に A から G への塩基置換（多型）を見出した。290 番の塩基置換は Tyr から Cys、461 番目は stop codon から Trp へのアミノ酸置換を伴う。
2. どちらの多型についても、患者群において G アリルの出現頻度が高い傾向にあったが、その差は有意でなかった [290G では、患者 7% (11/148)、コントロール 4% (4/108) ; 461G では、患者 29% (43/148)、コントロール 20% (22/108)]。
3. 患者を発症年齢で分けたとき、5 歳未満の早期発症群 (n=24) で 461G の有意の差が得られた [患者 38% (18/48)、コントロール 20% (44/108)、p=0.03]。

4. 遺伝子型から推察されるハプロタイプの、一般集団における出現頻度に、欧米人と日本人で著しい相異が見られたが、両集団に一致して、290G-461A のハプロタイプが欠如していた。

【結論】 IDDMK<sub>1,2</sub>22 SAg コード領域の二カ所にアミノ酸置換を伴う DNA 多型を見出した。これらの多型を用いた IDDMK<sub>1,2</sub>22 と 1 型糖尿病の関連研究で、早期発症群における 461G の有意の増加が見られた。これは IDDMK<sub>1,2</sub>22 と 1 型糖尿病（特に、早期発症群）の関連を示唆する。In vitro の実験で、IDDMK<sub>1,2</sub>22 の発現がインターフェロン $\alpha$ によって亢進することが知られており、解析数を増やしてこの関連研究の結果を確認することは、1 型糖尿病のみならず自己免疫疾患の発症病態解明の上で重要と思われる。欧米人及び日本人集団に共通して特定のハプロタイプが欠如していることは、IDDMK<sub>1,2</sub>22 と連鎖不平衡にある遺伝子が選択圧を受けていることを示唆するものかもしれない。

報告番号	* 課程博 論文博	第 号	氏名	金城 祥乃
		平成 13 年 11 月 26 日		
論文審査委員	主査教授	成島 研二		
	副査教授	田中 龍夫		
	副査教授	斎藤 亨		
(論文題目)				
Identification of nonsynonymous polymorphisms in the superantigen-coding region of <i>IDDMK<sub>1,2</sub>22</i> and a pilot study on the association between <i>IDDMK<sub>1,2</sub>22</i> and type 1 diabetes				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して、研究に至る背景と目的、論文の内容、研究の成果とその意義について慎重に審査し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究に至る背景と目的				
1994年、1型糖尿病患者の膵臓には、Vβ7T細胞レセプターを発現しているT細胞が、多数浸潤していることが報告された。さらに、1997年には急性発症で亡くなった1型糖尿病患者膵臓培養上清から、ヒト内在性レトロウイルスIDDMK <sub>1,2</sub> 22が単離された。IDDMK <sub>1,2</sub> 22はenv領域にスーパー抗原コード領域をもち、それが糖尿病の発症に関与することが考えられた。その後、IDDMK <sub>1,2</sub> 22は1番染色体長腕に存在することが報告された。1998年、英国でのwide genome scanで、HLADR4をもつ1型糖尿病患者では、その領域にMaximam lot scoreが1.7の遺伝子座が存在し、感受性遺伝子がこの領域にある可能性が考えられた。1999年以降、IDDMK <sub>1,2</sub> 22の1型糖尿病への関与を疑問視する論文がだされるようになったが、遺伝学的検討は行われていなかった。そこで、我々はヒト内在性レトロウイルスIDDMK <sub>1,2</sub> 22の1型糖尿病への原因的関連性を遺伝学的に検証した。				
2. 研究内容				
急性発症した小児1型糖尿病患者74人について、IDDMK <sub>1,2</sub> 22のスーパー抗原(SAg)コード領域の変異を検索した。更に5才未満で発症した患者群を早期発症群とサブグループ化した。				

- 備考
- 1 用紙の規格は,A4とし縦にして左横書とすること。
  - 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。

変異検索はすべて、SAGコード領域のシーケンシング解析により行った。末梢血よりDNAを抽出し、IDDMK<sub>1,2</sub>22 SAGコード領域を挟むように、その上流と3' LTR下流に設定したプライマーを用いて、nested PCRを行った。得られたDNA fragmentはクローニングされ、これらのクローンから10～15コロニーを選んで一緒に培養し、シーケンシングを行った。同様に、糖尿病の既往をもたない健康人54人について解析し、変異アレルの出現頻度を比較した。両群におけるアレル頻度の差は、 $\chi^2$ 検定とFisher's exact probability testによって検定した。

シーケンス解析では、SAGコード領域のinitial methionine codonのAを1として、290と461番目の二カ所にAからGへの塩基置換(多型)を同定した。どちらの多型についても、コントロール群と比較し、全糖尿病患者群において、Gアレルの出現頻度が高い傾向にあったが、その差は有意でなかった(患者 vs. コントロール; 290G: 7% (11/148) vs. 4% (4/108)、461G: 29% (43/148) vs. 20% (22/108))。しかし、患者を発症年齢でサブグループ化した解析では、5歳未満の早期発症群(n=24)で461Gの有意の差が得られた(患者 vs. コントロール; 38% (18/48) vs. 20% (22/108)、p=0.03)。一般集団において、genotypeから推察されるhaplotypeの出現頻度が欧米人と日本人で著しく異なっていたが、両集団に共通して290G-461Aのhaplotypeが欠如していた。

### 3. 研究結果の意義と学術水準

IDDMK<sub>1,2</sub>22 SAGコード領域の二カ所にアミノ酸置換を伴うDNA多型を見出した。これらの多型を用いたIDDMK<sub>1,2</sub>22と1型糖尿病の関連研究で、早期発症群における461Gの有意の増加が見られた。これはIDDMK<sub>1,2</sub>22と1型糖尿病の早期発症群との関連を示唆する。欧米人及び日本人集団に共通して特定のhaplotypeが欠如していることは、IDDMK<sub>1,2</sub>22と連鎖不平衡にある遺伝子が選択圧を受けている可能性を示唆しており、今後解析数を増やしてこの関連研究の結果を確認し、近傍の遺伝子を含めた相関研究を行うことは、1型糖尿病のみならず自己免疫疾患の感受性遺伝子の同定や発症病態解明の上で重要と思われる。

以上により、本論文は学位授与に値すると判断した。

- 備考
- 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
  - 2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。
  - 3 \*印は記入しないこと。