

氏 名（本籍）	小 原 夕 紀（千 葉 県）
学 位 の 種 類	博士（獣医学）
学 位 記 番 号	獣医博甲第85号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学 位 論 文 題 目	ヒトアトピー性皮膚炎モデルマウスにおける 原因遺伝子解明のための多因子遺伝解析
審 査 委 員	主査 東京農工大学 教授 神 田 尚 俊 副査 帯広畜産大学 教授 山 田 純 三 副査 岩 手 大 学 教 授 谷 口 和 之 副査 東京農工大学 教 授 松 田 浩 珍 副査 岐 阜 大 学 教 授 鈴 木 義 孝

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究では、ヒトアトピー性皮膚炎モデルマウスNC/Nga (NC)に自然発症する皮膚炎について、その病態の遺伝様式および関連する遺伝子の染色体上の位置（遺伝子座）を、戻し交配分離個体系を用いた連鎖解析によって調べた。その結果、皮膚炎発症に関わる主要遺伝子が第9染色体にあることを明らかにした。

遺伝様式の検討

NCマウスは、1957年に名古屋大学・近藤恭司らによって樹立された近交系マウスである。このマウスは、微生物の制御を行わないコンベンショナル飼育環境下で耳介、顔面、頸部に掻痒行動を伴う慢性皮膚炎を発症する。また、血清中の総IgE量も高値を示すことから、ヒトアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして注目されてきた。そこで、これらの症状を遺伝学的に解析するため、日本産野生マウス由来近交系MSM/Ms (MSM)マウスと交配して、皮膚炎および高IgE血症の発症を検証した。その結果、NCマウスの皮膚炎の発症に個体差が生じたことから、皮膚炎は環境要因の影響を強く受ける多因子形質であることが示唆された。また、作製した595頭の戻し交配分離個体系、[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスでの皮膚炎の分離比がおよそ1:1となったことから、この皮膚炎の主要遺伝子は劣性形質であると考えられた。また、[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスの皮膚炎発症には雌雄差が認められ、さらに、強い皮膚炎を呈した[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスの中に、総IgE量の低いもの、また逆に全く皮膚炎を発症していないにも関わらず、総IgE量の高い個体が得られた。従って、皮膚炎と高IgE血症はいずれも多因子疾患であるが、それぞれの原

因遺伝子群は全く同一ではなく、少なくともその一部は異なる原因遺伝子群によって発症する疾患であることが明らかになった。

皮膚炎の連鎖解析

多因子連鎖解析の方法に従って、[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスのうち247頭を無作為抽出し、PCR-SSLP (PCR-Simple sequence length polymorphism) 法によるマイクロサテライトマーカの遺伝子タイピングを223遺伝子座について行い、連鎖解析をしたところ、統計学的に有意水準に達した遺伝子座を確認することはできなかった。これは、環境要因による皮膚炎発症に個体差があり、皮膚炎発症に関与する遺伝子を持っているにもかかわらず、皮膚炎を発症しなかった個体がいたためと考えられた。そこで、同じように環境要因の影響を強く受ける糖尿病の遺伝解析で用いられている連鎖非平衡法を用い連鎖解析を行った。重症皮膚炎を発症した93頭の[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスを用いて上記の遺伝子タイピングおよび連鎖解析を行ったところ、第9染色体、33～34cMに統計学的な有意水準を満たす染色体領域を同定することができた。

有意水準領域の遺伝子解析

この統計学的に有意水準を満たした主要遺伝子(*derm1*)の候補領域とその近傍には、これまで免疫反応に関連する*Thy1*、*Cd3d*、*Cd3e*、*Cd3g*、*Il10ra*、*Il18*、*Csk*の7遺伝子の存在が明らかにされている。そこで、これらの遺伝子の塩基配列をNC、MSMマウス間で比較した。その結果、*Cd3d*、*Cd3e*遺伝子のcDNA配列、およびアミノ酸配列に違いがあることが分かった。さらにCD3ε、TCRβ、VβTCR抗体を用いて脾臓、胸腺リンパ球のフローサイトメトリーを行い、NCとMSMマウスのT細胞におけるこれらの遺伝子の発現を検証した。その結果、CD3εとTCRβの発現は系統間で差異が観察されなかったが、NCマウスではVβ5TCR、Vβ8TCR、Vβ11TCRの発現が認められず、NCマウスにおけるこれらの遺伝子の欠損が示唆された。

以上、本研究では、NCマウスに自然発症する皮膚炎について、戻し交配分離個体系を作製し、皮膚炎が複数の遺伝子の関与する劣性形質であることが分かった。またNCマウスでは高IgE血症を同時発症したが、重症皮膚炎の[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスの中に高IgE血症を発症していない個体が認められたことから、皮膚炎と高IgE血症の原因遺伝子群の少なくとも一部は異なる遺伝子によって支配されていることが明らかになった。さらに、[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスの連鎖解析から、NCマウス皮膚炎の主要遺伝子の染色体領域が第9染色体にあることが明らかになった。これらの結果から、ヒトマウスのシンテニー地図に基づき、ヒトアトピー性皮膚炎の原因遺伝子の一つは、第15染色体上にあると示唆された。

申請者はヒトアトピー性皮膚炎モデルマウス、NCマウスにおける皮膚炎の原因遺伝子を明らかにする目的で以下の(1)～(3)について調べ、発症に関わる主要遺伝子がマウス第9番染色体にあることを明らかにした。

(1) NCマウスにおける皮膚炎遺伝様式の解析

NCマウスは、微生物の制御を行なわないコンベンショナル飼育環境下で、耳介、顔面、頸部に掻痒行動を伴う慢性皮膚炎を発症する。また、血清中の総IgE量も高値を示すことから、ヒトアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして注目されてきた。そこで、これらの症状を遺伝学的に解析するため、日本産野生マウス由来の近交系 MSM/Ms (MSM) マウスと交配して、皮膚炎および高IgE血症の発症を調べた。その結果、NCマウスの皮膚炎の発症に個体差が生じたことから、皮膚炎は環境要因の影響を強く受ける多因子形質であることが明らかとなった。また、作製した595頭の戻し交配分離個体系、[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスでの皮膚炎の分離比がおおよそ1:1となったことから、この皮膚炎の主要遺伝子は劣性形質であると考えられた。また、[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスの皮膚炎発症には雌雄差が認められ、さらに、強い皮膚炎を呈した[(NC×MSM)F₁×NC]N₂マウスの中に、総IgE量の低いもの、また逆に、全く皮膚炎を発症していないにも関わらず、総IgE量の高い個体が得られた。従って、皮膚炎と高IgE血症はいずれも多因子疾患であるが、それぞれの原因遺伝子群は全く同一ではなく、少なくともその一部は異なる遺伝子群によって発症する疾患であることが明らかになった。

(2) 多因子連鎖解析による皮膚炎原因遺伝子の解析

多因子連鎖解析の方法に従って、[(NC×MSM)F₁×NC] N₂マウスのうち247頭を無作為抽出し、PCR-SSLP (simple sequence length polymorphism) 法によるマイクロサテライトマーカの遺伝子タイピングを223遺伝子座について行い、連鎖解析をした結果、統計学的に有意水準に達した遺伝子座を確認することはできなかった。これは、環境要因による皮膚炎発症に個体差があり、皮膚炎発症に関与する遺伝子を持つにもかかわらず、皮膚炎を発症しなかった個体がいたためと考えられた。そこで、同じように環境要因の影響を強く受ける糖尿病の遺伝解析で用いられる連鎖非平衡法を用い連鎖解析を行った。重症皮膚炎を発症した93頭の[(NC×MSM)F₁×NC] N₂マウスを用いて上記の遺伝子タイピングおよび連鎖解析を行った結果、第9染色体の33～34 cMの領域に、統計学的な有意水準を満たす染色体領域を同定することができた。

(3) 有意水準領域に存在する免疫関連遺伝子の解析

この統計学的に有意水準を満たした皮膚炎発症主要遺伝子 (*derm1*) の候補領域とその近傍には、これまでに免疫反応に関連する *Thy1*, *Cd3d*, *Cd3e*, *Cd3g*, *Il10ra*, *Il18*, *Csk* の7個の遺伝子の存在が明らかにされている。そこで、これらの遺伝子の塩基配列をNCマウスとMSMマウス間で比較した。その結果、*Cd3d*, *Cd3e* 遺伝子の cDNA 配列、およびアミノ酸配列に違いがあることが分かった。さらに CD3ε, TCRβ, VβTCR の抗体を用いて

脾臓、胸腺リンパ球のフローサイトメトリーを行い、NCとMSMマウスのT細胞における遺伝子発現を調べた。その結果、CD3 ϵ とTCR β の発現は系統間で差異がなかったが、NCマウスではV β 5TCR、V β 8TCR、V β 11TCRの発現が認められず、NCマウスではこれらの遺伝子の欠損の可能性が示唆された。

以上、本研究では、NCマウスに自然発症する皮膚炎について、戻し交配分離個体系を作製し、皮膚炎が複数の遺伝子の関与する劣性形質であることを明らかにした。またNCマウスでは高IgE血症を同時発症したが、重症皮膚炎の[(NC \times MSM)F $_1$ \times NC] N $_2$ マウスの中には発症していない個体が認められたことから、皮膚炎と高IgE血症の原因遺伝子群の少なくとも一部は異なることが示唆された。さらに[(NC \times MSM)F $_1$ \times NC] N $_2$ マウスの連鎖解析から、皮膚炎の主要遺伝子の染色体領域が第9染色体にあること、またこのことからヒトアトピー性皮膚炎の原因遺伝子の一部はヒト第15染色体上にあると示唆された。

以上の内容について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文名

1. Kohara Y., Tanabe K., Matsuoka K., Kanda N., Matsuda H., Karasuyama H. and Yonekawa H. : A Major Determinant QTL Responsible for Atopic Dermatis-like Skin Lesions in NC/Nga Mice is Located on Chromosome 9. Immunogenetics (in press)

既発表論文

1. Yasuhara Maeda Y., Takahama S., Kohara Y. and Yonekawa H. : Two Genes Controlling Acute Phase Responses by the Antitumor Polysaccharaide, Lentinan. Immunogenetics 43, 215-219, 1996
2. Yasuhara Maeda Y., Takahama S., Kohara Y. and Yonekawa H. : Polygenic Control of the Expression of Biological Activities of an Antitumor Polysaccharaide, Lentinan. International Journal of Immunopharmacology 19, 469-472, 1997