

## 論文の内容の要旨

論文題目 A Genetic Study in End-stage Renal Disease

進行性腎障害における遺伝学的検討

指導教官 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科平成 13 年 4 月入学

医学博士課程内科学専攻

土井研人

### 【背景】

1990 年に開始されたヒトゲノム計画は目覚ましいスピードで進行し、2003 年にはヒトゲノム全配列の解読が終了した。今後は解読された配列情報から生体における遺伝子の機能・役割についての詳細な検討や疾患と遺伝子の関連についてさらなる研究が要求される。

高血圧症、糖尿病、アレルギーなどの common disease は、多因子疾患 (multifactorial disease) に分類され、これらの疾患においては複数の環境要因と遺伝要因がそれぞれ少しずつ発症に寄与し、それらの組み合わせによって発症にいたるものと理解されている。また、遺伝要因を構成する遺伝子については、発症に直結するわけではなく、発症の危険率が上昇することを意味することから、感受性遺伝子と呼ばれる。近年、これらの感受性遺伝子を同定するゲノム研究が盛んに行われているが、単一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を遺伝子多型マーカーとして用いたケース・コントロール関連研究が最も検出力が高い。さらに、SNP は対立遺伝子が 2 個に限られて比較的判定が容易であることから高速・大量の SNP タイピング技術が実現可能である。

本研究では第一に自動化シーケンサーと新たに開発された非変性ポリマーを用いてキャピラリー電気泳動による single strand conformation polymorphism (SSCP) 解析によるハイスループット SNP タイピングシステムを確立した。次に同システムを用いて、進行性腎障害における疾患感受性遺伝子を同定すべくケース・コントロール関連研究を行った。進行性腎障害の予後は、慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症といった原疾患によらず、蛋白尿や尿細管間質病変の程度によって規定されていることが知られており、何らかの共通因子の存在が考えられている。本研究では候補遺伝子アプローチにより vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子において、遺伝子の発現調節に重要であり、しかも SNP が多数存在するプロモーター領域、5' および 3' 側非翻訳領域 (untranslated region; UTR) を中心に解析を行った。VEGF は血管新生において重要な役割を果たす増殖因子であり、糸球体および尿細管間質における傍血管系という進行性腎障害の予後を規定する上で重要な微小血管系においても重要な役割を果たしていることが示されている。

## 【方法と結果】

### キャピラリー電気泳動による SSCP 解析 (capillary electrophoresis-SSCP, CE-SSCP)

蛍光ラベルされたプライマーを用いて PCR 反応を行い、得られた産物を熱変性にて 1 本鎖とした後、自動化シーケンサー (ABI 3100, Applied Biosystems) および SSCP 解析のために開発された Conformation Analysis Polymer (Applied Biosystems) を用いて、キャピラリー電気泳動を行った。136 検体を用いて 14 SNP のタイピングを CE-SSCP 解析および直接シーケンス法の両者で行い、その結果を比較したところ 100% 一致していた。また、LDLR1413G/A 多型はこれまでのアクリルアミドゲル電気泳動による SSCP では解析が難しいと報告されていたが、キャピラリー電気泳動ではタイピング可能であり、本システムの優位性が示された。さらに、4 つの異なる蛍光プライマーを組み合わせることによって、一度のキャピラリー電気泳動にて最大 5 SNP のタイピングを行うことに成功した。キャピラリー電気泳動は 30 分で終了可能であり、本システムでは 1 日 3,000 タイピング以上のスループットで正確な SNP タイピングが実現できることが示された。CE-SSCP を用いた SNP タイピングでこのようなハイスループットを実現したのは、本研究が初めてである。

### 定量的 SSCP 解析

136 検体分のゲノム DNA を等量ずつ混合し、pooled DNA サンプルを作成した。pooled DNA サンプルを用いて CE-SSCP 解析を行い、二つのアレルのピークの相対比から 136 検体におけるアレル頻度を推定し、個別タイピングで得られたアレル頻度と比較した。また、VEGF 936C/T 多型においては、CC および TT のホモ接合体を様々な割合で混合した mixed DNA サンプルを作成し、同様に CE-SSCP による混合比の推定値と実際の混合比を比較した。136 検体を等量混合した pooled DNA サンプルを用いた解析で推定された集団内のアレル頻度は、個別タイピングで得られた実際のアレル頻度と高い関連を示した。同様に mixed DNA サンプルを用いた検討においても定量的 SSCP 解析は高い関連を示した。本手法を用いて VEGF 936C/T における mRNA 安定性の検討を行った。

### 進行性腎障害におけるケース・コントロール関連解析

対象は健康診断を受診した健常人 502 人および末期腎不全にて血液透析を必要とする患者 499 人、患者における原疾患の内訳は、慢性糸球体腎炎 230 人、糖尿病性腎症 129 人、腎硬化症 62 人、多発性嚢胞腎 23 人、その他 55 人であった。

VEGF 遺伝子のプロモーター、5' UTR、3' UTR に存在する合計 8 SNP を選択し、CE-SSCP および直接シーケンス法にてタイピングを行った。その結果よりハプロタイプ構造を決定し、患者群と健常人群でのハプロタイプ頻度の比較を行ったところ、3' UTR におけるハプロタイプ 936T-1451T-1642G-1725G-2295T の頻度が患者群において有意に低いことが明らかになった ( $P = 0.0076$ )。同ハプロタイプはほぼ完全に連鎖不平衡の状態にある 2 つの SNP、936C/T および 1451C/T によって規定され (tag SNP)、この 2 SNP が疾患感受性を有しているものと考えられた。すなわち、936CC-1451CC という genotype は ESRD におけるハイリスクと考えられた ( $P = 0.0072$ , OR 1.43; 95% CI, 1.10-1.86)。対象を性別に解析すると、男性群ではさらに強い関連が認められたが ( $P = 0.00039$ )、女性群においては有意差が認められなかった。

## 機能的 SNP についての解析

健常人 46 人(男 23 人、女 23 人)から採取した血漿の VEGF 濃度を ELISA 法にて測定し、SNP との関連を調べたところ、ケース・コントロール関連解析の結果と同様に男性において 936C/T-1451C/T と血漿 VEGF 濃度は有意な関連を示した( $P = 0.038$ )。また、936C/T-1451C/T において、mRNA の安定性における SNP の影響を定量的 SSCP 解析によって検討した。936C/T ヘテロ接合体の健常人より末梢血単核球を抽出し、actinomycin D により転写を停止させ、2 時間後および 4 時間後に RNA を回収した。得られた RNA から、蛍光ラベルプライマーを用いた RT-PCR を行い、PCR 産物をタイピングと同様に 1 本鎖に変性させた後、定量的 CE-SSCP にて解析し、C アリルおよび T アリルを有する mRNA の相対的な安定性を検討した。actinomycin D 投与後 4 時間の時点で、C アリルを有する mRNA の相対量が増加しており、より安定であることが明らかとなった。この結果は、C アリルを有する個人の VEGF 血漿濃度が高いという前述の結果と一致していた。

## 【考察】

本研究で確立した CE-SSCP 解析は正確かつハイスループットな SNP タイピングを実現するのみならず、pooled DNA サンプルを用いた集団内でのアリル頻度の推定などの定量性にも優れていた。このタイピングシステムを用いて、進行性腎障害により末期腎不全に陥った患者において、VEGF を候補遺伝子としてケース・コントロール関連解析を行ったところ、男性において非常に強い関連を示すハプロタイプが 3'UTR 領域に同定され、さらにこのハプロタイプは VEGF 血漿濃度に有意な関連を示した。3'UTR は mRNA の安定性に関わるタンパクが結合する領域として知られているが、本研究においても 936C/T および 1451C/T 多型は mRNA の安定性に有意な影響を及ぼしていることが示された。これまで 936C/T および 1451C/T の SNP 部位に結合するタンパクは報告されておらず、未知の調節タンパクが存在する可能性が考えられる。これらの結果をまとめると、VEGF レベルの上昇をもたらすハプロタイプが進行性腎障害の危険因子であるといえる。VEGF の血管新生作用から腎疾患に対して VEGF は保護的に作用する可能性も指摘されていたが、遺伝子改変動物による検討では、過剰発現、ノックアウトマウスの両者に腎病変の進展が確認されており、VEGF レベルはある一定の範囲で保たれるべきであると報告されている。また、疾患との関連が性別によって影響を受けることについては、これまで女性のほうが進行性腎障害について抵抗性であるといった meta-analysis や動物実験が報告されており、性ホルモンによる VEGF の調節が進行性腎障害に関与している可能性が示唆されている。

## 【まとめ】

CE-SSCP 解析による SNP タイピングシステムを確立し、進行性腎障害における VEGF 遺伝子の関与をケース・コントロール関連解析にて証明し、関連を示した SNP が遺伝子の機能に影響していることを証明した。