

審査の結果の要旨

氏名 土井研人

進行性腎障害の予後は、原疾患に関わらず蛋白尿や尿細管間質の線維化といった共通因子によって規定されており、腎障害進展には何らかの common pathway が存在すると想定されている。common pathway には、複数の遺伝的要因および環境的要因が複雑に関与しているものと考えられ、本研究では進行性腎障害における遺伝的要因を同定すべく、第一に single strand conformation polymorphism (SSCP)解析によるハイスループット single nucleotide polymorphism (SNP)タイピングシステムを確立し、ついでこのシステムを用いて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、ケース・コントロール関連研究を行った。

1. 蛍光ラベルされたプライマーを用いて PCR 反応を行い、自動化シーケンサーを用いて、キャピラリー電気泳動による SSCP 解析を行った。タイピング結果は直接シーケンス法による結果と100%一致していた。また、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 SNP についても、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、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。

2. 136 検体分のゲノム DNA を等量ずつ混合し作成した pooled DNA サンプルを用いて 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ところ、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。

3. 上記タイピングシステムを用いて、進行性腎障害におけるケース・コントロール関連解析を行なった。候補遺伝子として VEGF 遺伝子を選択し、プロモーター、5' 非翻訳領域(UTR), 3' UTR に存在する8 SNP についてタイピングを行った。その結果、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り($P = 0.0090$)、同ハプロタイプを規定している2つの SNP、936C/T および 1451C/T 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($P = 0.0026$)。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($P = 0.00020$)、女性群においては有意差が認められなかった。

4. ケース・コントロール関連解析にて有意な関連を示した 936CC-1451CC は、同様に男性において血漿 VEGF 濃度と有意な関連を示し($P = 0.038$)、単離した末梢単核球における mRNA の安定性とも有意な関連を示した。

以上、本論文はキャピラリー電気泳動を用いた SSCP 解析による SNP タイピングシステムを確立し、次いで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、有意な関連を示した SNP が遺伝子の機能に影響していることを証明した。本研究は VEGF レベルの上昇をもたらす遺伝子多型が進行性腎障害の危険因子であることを指摘しており、増加し続ける末期腎不全患者数を抑止する画期的な治療の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。