

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 The development of new technologies for analysis of gene variations using polymerase chain reaction-preferential homoduplex formation assay and its application to association studies
(PCR-PHFA 法を応用した新しい遺伝子変異解析技術の確立と関連分析への応用)

氏 名 松 下 正 毅

1塩基変異多型(SNP)タイピングなどの遺伝子診断によって、疾患感受性や薬の効き目のような個人における生理的な違いを遺伝子配列の違いとして説明することができると期待される。ハイブリダイゼーションや電気泳動を用いて遺伝子配列を解析する多くの方法が開発され、遺伝子変異を発見し検査するために利用されている。しかし、これらの方法は多くの解決すべき課題を持っている。一般に、これらの方法で解析を行うためにはターゲットごとに操作条件の最適化が必要である。

polymerase chain reaction -preferential homoduplex formation assay (PCR-PHFA)法は二種類の標識(ビオチンとジニトロフェニル基)を持つ増幅物と持たない増幅物との競合ハイブリダイゼーションによる鎖置換を原理とした遺伝子配列の検出法である。熱変性の後、徐々に温度を下げていく温度勾配下でのハイブリダイゼーションでは、ミスマッチをもつ二本鎖(heteroduplex)よりも完全に相補的な二本鎖(homoduplex)が優先的に形成される。したがって、このようは条件下で、完全に同一な配列をもつ標識増幅物と大過剰量の非標識増幅物とを用いてハイブリダイゼーションを行うとそれぞれの増幅物間での鎖置換が起こる。一方、1塩基でも

配列が異なる場合では、配列が同じもの同士での二本鎖の再構成が優先的に起こるため、このような鎖置換が起こらない。判定は二種類の標識をもつ増幅物のストレプトアビジン固相マイクロタイタープレートを用いた発色による検出で行う。すなわち、検体が標準配列と異なる配列を持つ場合には鎖置換が起こらず、二種類の標識をもつ増幅物が再構成され、抗 DNP 抗体標識酵素による発色により配列の違いを検出することができる。本研究では、PCR-PHFA 法を応用した遺伝子変異のスクリーニングおよび遺伝子タイピングの検討を行った。

遺伝子多型がすでに報告されている CTLA4 遺伝子エクソン 1 領域を標的配列として PCR-PHFA 法をもちいた遺伝子変異のスクリーニング系を構築した。スクリーニング系では、標準配列由来の非標識増幅産物を競合物質として、検体由来の標識増幅産物を固相化ストレプトアビジンを用いて検出した。49G アリルを標準配列としてリウマチ性疾患患者 96 例および健常対照群 96 例を対象に変異スクリーニングを行ったところ、49G アリルとは異なる配列をもつ検体を検出することができた。これらの検体の配列を確認したところ、すべて 49A アリルであった。同様の方法でエクソン 2、3 および 4 についても変異スクリーニングを行ったが、新たな変異は確認されなかった。次に CD80 および CD86 遺伝子の翻訳領域を標的配列として遺伝子変異のスクリーニング系を構築した。スクリーニング条件の最適化を行った結果、ハイブリダイゼーション時における温度と反応溶液組成は CTLA4 遺伝子と同一条件となった。各エクソンについて関節リウマチ(RA)患者群 101 例、全身性エリテマトーデス(SLE)患者群 57 例、および健常対照群 168 例を対象に変異スクリーニングを行った結果、CD80 遺伝子エクソン 3、4 および 5、CD86 遺伝子エクソン 8 の領域において変異を確認した。塩基配列を確認したところ、すべて新規の SNP であり、特に CD80 遺伝子エクソン 4 および CD86 遺伝子エクソン 8 で見出された変異はアミノ酸の置換を伴うものであった。遺伝子型頻度、アリル頻度およびアリル陽性率を患者群と健常対照群とで比較を行ったが有意な差異は認められなかった。

次に PCR-PHFA 法を応用した CTLA4 遺伝子 49G/A 多型のタイピング法の構築を行った。アリルタイピングを行う場合、それぞれのアリルの配列をもつ標識増幅物と検体由来の非標識増幅物とで温度勾配下でのハイブリダイゼーションを行う。検体が標準配列として用いたアリルと同一アリルを持つ場合にはプレートによる発色が見られない。この方法を用い RA 患者群 461 例、SLE 患者群 71 例および健常対照群 247 例の CTLA4 遺伝子 49G/A 多型のタイピングを行った。健常対照群と比較して RA 患者群および SLE 患者群で 49G/G 遺伝子型の増加が認められたが統計学的有意差には至らなかった。RA 患者において DRB1*0405 を持つ場合と持たない場合とで健常対照群と比較したところ、DRB1*0405 陽性者において 49G アリル陽性率の有意な増

加が観察された(77% vs. 87%, $p = 0.044$, odds ratio = 2.04)。

PCR-PHFA 法によるタイピングは標準配列との比較により判定を行うため、近い領域に存在する複数箇所の SNP をハプロタイプとして判定することができる。これを利用して TNFA 遺伝子 5'領域のタイピング系を構築した。日本人健常者 107 例を対象として、TNFA 遺伝子 5'領域に存在する多型、-1031T/C、-863C/A、-857C/T を PCR-SSCP 法でタイピングを行った結果、4 種類のハプロタイプとして存在すると予想された。そこで、これら 4 種類のハプロタイプを想定し、同じ 107 例を対象として 4 種類の標識増幅物を用いたハプロタイピングを行った結果、各多型部位の遺伝子型の組合せから推定されるハプロタイプとすべて一致した。さらに 164 例を追加し、日本人健常者 271 例のハプロタイピングを行い、それらの結果と HLA タイピングの結果を用いて日本人集団における MHC 領域遺伝子のハプロタイプ推定を行った。有意な連鎖不平衡が見られたのは TNFA-U01(TCC)と HLA-A*3303、B*5201、B*4403、B*4601、B*0702、DRB1*1502、DRB1*0101、および DRB1*1302、TNFA-U02(TCT)と HLA-B*5401、B*3501、DRB1*0405 および DRB1*0407、TNFA-U03(CAC)と HLA-B*4006、B*4002、DRB1*0803、DRB1*0802、DRB1*0403 および DRB1*0901、TNFA-U04(CCC)と HLA-B*4801 であった。4 遺伝子座で推定されたハプロタイプから、A*3303-B*4403-TNFA-U01-DRB1*1302、A*2402-B*5201-TNFA-U01-DRB1*1502 および HLA-A*2402-B*5401-TNFA-U02-DRB1*0405 が日本人集団における主要なハプロタイプであると考えられた。

PCR-PHFA 法は標的配列ごとの反応条件の最適化を必要とせず、短時間でスクリーニング系の構築が可能であった。条件設定のための経験や熟練が不要であり、また、必要な機器はサーマルサイクラーとプレートリーダーだけであるため、PCR-PHFA は多くの実験室で実施が可能である非常に汎用性の高い方法である。また、電気泳動を用いた方法と比較して、PHFA では数値によって検出を行うので客観的な判定ができることも汎用性の面では有意であると思われる。