

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 松 下 正 毅

本研究は簡便に遺伝子変異を解析する方法を確立するために、polymerase chain reaction -preferential homoduplex formation assay (PCR-PHFA)法を応用した遺伝子の変異スクリーニング法および遺伝子タイピング法を構築し、疾患感受性遺伝子検索のための関連分析への応用を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 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結果、既知の変異をすべて検出することができた。これらの結果は別法で解析した結果とすべて一致しており、この方法を用いて未知の遺伝子変異をスクリーニングすることが可能である事が示された。また、CTLA4 遺伝子の他のエクソンについても変異スクリーニングを行い、その他の領域には変異がない事が示された。
2. 免疫系シグナル伝達において重要な役割を果たしている、CD28、CD80 および CD86 遺伝子について PCR-PHFA 法を用いた変異スクリーニング系を構築した。この方法を用いて各遺伝子の変異をスクリーニングした結果、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、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ることが示された。
3. PCR-PHFA 法を用いた TNFA 遺伝子 5'非翻訳領域のタイピング法を構築し、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。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。

4. CTLA4 遺伝子 49G/A 多型と新規に見出した変異について PCR-PHFA 法を用いた遺伝子タイピング法の構築を行った。慢性関節リウマチ患者群、全身性エリテマトーデス患者群および健常対照群のアリルタイピングを行い、疾患との関連を検討した結果、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)。新規に見出した変異と疾患との関連はないことが示された。

以上、本論文は PCR-PHFA 法を応用した遺伝子解析法を確立し、免疫系シグナル伝達に関与する遺伝子の変異解析から、新規の変異を同定した。これらの変異とリウマチ性疾患との関連は見出されなかったが、PCR-PHFA 法が簡便に遺伝子変異を解析できることを示した。また、PCR-PHFA 法は複数箇所の変異部位をハプロタイプとしてタイピングすることが可能であることも示した。本研究はこれまでは条件検討に多大な労力が必要であった電気泳動を用いた遺伝子変異解析法に代わって、簡便に解析可能な方法論の確立に重要な貢献をなすと考え、学位の授与に値するものと考えられる。