氏　　　　　名	松　井　克　之
学 位 の 種 類	博　士　（医　学）
学 位 記 番 号	博　士（論）第３７５号
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学位授与年月日	平成２２年　9月　8日
学 位 論 文 題 目	Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of UGT1A1as a cause of Gilbert syndrome （UGT1A1 転写調節領域の遺伝子多型が転写調節に与える複合効果がGilbert 症候群の原因となる。）
審　査　委　員	主査　教授　　三ッ浪　健　一
	副査　教授　　岡　田　裕　作
	副査　教授　　江　口　　豊

別紙様式3

論 文 内 容 要 旨

※整理番号	379	(ふりがな) 氏 名	(まつい かつゆき) 松井 克之
学位論文題目	Combined effect of regulatory polymorphisms on transcription of *UGT1A1* as a cause of Gilbert syndrome (UGT1A1 転写調節領域の遺伝子多型が転写調節に与える複合効果がGilbert 症候群の原因となる。)		

目的

Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase (以下 UGT1A1)はビリルビンや薬剤などのグルクロン酸抱合を行う酵素であり、Gilbert 症候群はこの遺伝子の遺伝子多型や変異が原因として生じる軽症型の遺伝性非抱合型高ビリルビン血症である。最も頻度の高い先天性代謝異常のひとつと考えられており、人口の 3-10%を占める。Gilbert 症候群は薬剤の副作用を示す患者が存在し、本酵素の活性低下の仕組みの解明は重要である。

Gibert 症候群で認められる主な UGT1A1 の遺伝子多型としては第 1 エクソンに存在する p.G71R、プロモーター領域の TATA box に存在する A(TA)7TAA 変異、さらに phenobarbital responsive enhancer module (以下 gtPBREM) と呼ばれるエンハンサー上に存在する c.-3275T>G 変異がある。UGT1A1 遺伝子の TATA box は本来、TA が 6 回繰り返しそれに TAA が続くという形であるが、A(TA)7TAA 変異ではその TA の繰り返しが 7 回に増えており、この変異のホモ接合体の大半は Gilbert 症候群を発症する。そして A(TA)7TAA 変異が転写活性を 1/3 に下げるという *in vitro* 発現実験の結果が最初に報告されたことから、A(TA)7TAA 変異は Gilbert 症候群の原因とされてきた。しかしその後の *in vitro* の発現実験の報告では、A(TA)7TAA 変異は転写活性をほとんど下げないといったものから 50%程度に下げるといったものまで結果は様々であった。生体肝を用いた実験でも、A(TA)7TAA 変異をもつ場合の酵素活性は約 50%であると報告された。このように A(TA)7TAA 変異の役割は十分解明されているとは言い難い状況であった。

一方、c.-3275T>G 変異はエンハンサー上に存在しており、この変異により転写活性が約 60%に低下すると報告されている。過去の研究ではプロモーター領域とエンハンサー領域を別々に調べているため、遺伝子変異による相互的な影響はまだ解明されていない。また近年、われわれは A(TA)7TAA 変異がホモ接合体の Gilbert 症候群の患者では c.-3275T>G 変異もホモ接合体であることを明らかにした。このことから、これらの変異が組み合わさることが Gilbert 症候群の発症原因ではないかと考えた。

(備考)1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

本研究では UGT1A1 遺伝子の上流領域における遺伝子多型を調べ、そのハプロタイプを明らかにし、gtPBREM と TATA box の両方を含む約 4000 塩基対の上流領域をクローニングして、遺伝子多型が転写活性に及ぼす個別、およびそれぞれの変異が連鎖した場合の転写活性への影響を解析することを目的とした。

方法
患者・コントロール計７５人において UGT1A1 の転写調節領域を 4 領域に分け PCR を行い、その後、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を調べた。本解析は本学倫理委員会の承認を受けている。ハプロタイプを解析し、その結果に基づき野生型と典型的な Gilbert 症候群の転写調節領域をクローニングした。実験・解析での便宜上、変異を c.-3275T>G 変異、A(TA7)TAA 変異、それ以外の 10 個の連鎖する変異群の 3 つのグループに分け、それぞれの組み合わせを変化させた合計 8 種類の発現ベクターを作成した。
　また gtPBREM のエンハンサー活性を高める転写因子として constitutive androstane receptor (CAR)が知られている。CAR 存在下で変異が転写活性に与える影響を評価するため CAR 発現ベクターも作成した。これらの発現ベクターをヒト肝癌細胞の cell line である HepG2 細胞に transfection し、dual luciferase assay により転写活性を測定した。解析には重回帰分析を用いた。

結果
遺伝子解析
14 種類の遺伝子多型および変異からなる 9 種類のハプロタイプと１４種類のディプロタイプを同定した。A(TA)7TAA 変異をもつアレルには c.-3275T>G 変異を含め 9～12 個の変異が連鎖していることがわかった。

転写活性
CAR を共発現させない状態では A(TA)7TAA 変異の転写活性は野生型の 94%であり、有意な減少ではなかった（p=0.14）。一方、c.-3275T>G 変異と 10 個の連鎖変異群の転写活性はそれぞれ 69%（p<0.001）と 88%（p=0.001）であり、有意な減少を示した。典型的な Gilbert 症候群の転写調節領域では、その転写活性は野生型の 56%であった。
CAR を共発現させた状態では A(TA)7TAA 変異の転写活性は野生型の 83%（p<0.001）、c.-3275T>G 変異では 85%（p<0.001）であったが、10 個の連鎖変異群の転写活性はそれぞれ 100%と転写活性の変化を認めなかった。典型的な Gilbert 症候群の転写調節領域では、その転写活性は野生型の 68%であった。また野生型の転写調節領域による転写活性は CAR で 4.27 倍に高まった（p<0.001）。

考察

CAR を共発現させた場合もさせなかった場合も A(TA)7TAA 変異だけでは十分な転写活性の低下を認めないことが判明した。いずれの場合も他の変異による転写活性低下が加わり、全体として初めて 56～68%の転写活性となった。通常状態では CAR はほとんど核内に存在しないことが報告されており、CAR を共発現させない場合の方が生体に近い状態を再現していると考えられる。CAR を共発現させない場合、典型的な Gilbert 症候群の転写調節領域では 56%に転写活性が低下したが、これはこれまでの生体肝を用いた実験の結果とほぼ一致する。また、この場合は c.-3275T>G 変異が最も強い影響を持っていた。

結論

Gilbert 症候群の主たる発症原因と従来考えられていた A(TA) 7TAA 変異のみでは転写活性の低下は不十分であり、c.-3275T>G 変異やその他の変異の影響が組み合わさることで初めて Gilbert 症候群が発症するものと考えられた。

別紙様式８（課程・論文博士共用）

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	379	氏名	松井　克之
論文審査委員			

（学位論文審査の結果の要旨）

体質性黄疸のジルベール症候群はUGT1A1遺伝子が原因で生じることが知られており、欧米では転写調節領域に存在するTATA boxの変異であるA(TA)7TAA変異が主たる原因と考えられてきた。この変異に加えて、エンハンサーであるgtPBREMに存在するc.-3275T>G変異を始めとした転写調節領域に存在する複数の変異が複合的に作用することが同症候群の発症に必要である可能性が考えられたため、転写調節領域に存在する変異をPCR法で同定し、ハプロタイプを解析した上で野生型や患者型、さらには変異組み替え型のUGT1A1転写調節領域を持つ発現ベクターを作成し、ルシフェラーゼアッセイで転写活性を測定した。測定結果について重回帰分析を行い、複数の変異が加わった際の影響をも解析して、以下の点を明らかにした。

1)UGT1A1遺伝子の転写調節領域に9種類のハプロタイプが存在し、いくつもの変異がリンクしていること。
2)ジルベール症候群の主たる発症原因と従来考えられていたA(TA)7TAA変異のみでは転写活性の低下は不十分であること。
3)A(TA)7TAA変異以外にもc.-3275T>G変異やその他の変異の影響が組み合わさることがジルベール症候群の発症に必要なこと。

本論文はUGT1A1遺伝子の転写調節機構とジルベール症候群の発症メカニズムについて新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文に関連した試問を受け、博士（医学）の学位論文に値するものと認められた。

（総字数629字）

（平成２２年８月３０日）