

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
（分担）研究報告

家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワーク構築に関する研究

（分担）研究者 大橋 博文 埼玉県立小児医療センター内科医長

研究要旨：埼玉県立小児医療センターにて保存しているBリンパ芽球様細胞株で、1996年以降に共同研究の依頼により再解凍した検体の再増殖成功率を集計検討した。解凍総数が279件中、再増殖成功は211件(75.6%)だった。バンクの有効運用のため、個人につき多数検体の保存や、可能な限り初代培養時に研究者への細胞供与やDNA、RNAの抽出等を完了しておくことなどの対応が必要と考えた。

A. 研究目的

遺伝性疾患の解析を研究協力の下に推進するためにはBリンパ芽球様細胞株の検体バンクの果たす役割は重要である。患者血液細胞から細胞株を樹立して液体窒素に凍結保存し、必要が発生した時点で、解凍再増殖させて研究者に供与する。しかし、細胞株が樹立されても凍結・保存・解凍という過程を経ることによって細胞のviabilityが低下し再増殖しない可能性がある。保存細胞の解凍後の再増殖率の検討を行い、今後の本研究班での検体バンクの有効運用のための基礎データとする。

B. 研究方法

埼玉県立小児医療センターにて保存しているBリンパ芽球様細胞株で、1996年12月以降に共同研究の依頼により再解凍した検体の再増殖成功率を集計検討した。再増殖成功は、細胞の指数関数的増殖が見られた時点とし、最大2ヶ月待つて再増殖がみられない場合に失敗と判定した。

C. 研究結果

解凍再増殖成功率を表1に示した。解凍総数が279件で、そのうち再増殖に成功したのは211件であり、再培養成功率は75.6%であった。なお、この細胞バンクを通じた最近の共同研究成果を研究発表に掲げた。

D. 考察

保存期間が長かった1988、1989の両年は解凍件数は少なく評価は困難だが成功率は低い。ただ、1991年以降は特に保存期間と再増殖成功率との間に明らかな関連はないと思われた。全体として再増殖率が7割台にとどまっていることは重大である。今後バンクの有効運用のために、個人につき多数検体（4-5検体）の保存や、可能な限り初代培養時に研究者への細胞供与やDNA、RNAの抽出等を完了しておくことなどの対応をとるべきと考える。

E. 結論

当施設の細胞バンクにおける解凍再増殖成功率は75.6%（211/279）であった。バンクの有効活用のために、慎重な保存・運用システムを構築していきたい。

表1. 解凍再増殖成功率

樹立年度	解凍数	再増殖成功数	成功率 (%)
1988	3	0	0
1989	5	1	20
1990	—	—	—
1991	4	4	100
1992	12	8	66.7
1993	21	14	66.7
1994	44	22	50
1995	69	57	82.6
1996	72	66	91.7
1997	38	29	76.3
1998	11	10	90.9
計	279	211	75.6

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikegawa S, Nishimura G, Nagai T, Hasegawa T, Ohashi H, Nakamura Y: Mutation of the type X collagen gene (COL10A1) causes spondylometaphyseal dysplasia. *Am J Hum Genet* 63:1659-1662, 1998
- 2) Ogata T, Wakui K, Muroya K, Ohashi H, Brown DM, Ishii M, Fukushima Y: microphthalmia with linear skin defects syndrome in a mosaic female infant with monosomy for the Xp22 region: molecular analysis of the Xp22 breakpoint and the X-inactivation pattern. *Hum Genet* 103:51-56, 1998
- 3) Schwienbacher C, Sabbioni S, Campi M, Veronese A, Bernardi G, Minegatti A, Hatada I, Mukai T, Ohashi H, Barbantibrodano G, Croce DM, Negrini M: transcriptional map of 170-kb region at chromosome 11p15.5: identification and mutational analysis of the BWR1A gene reveals the presence of mutations in tumor samples. *Proc Natl Sci USA*: 95: 3873-3878, 1998

平成 10 年度厚生科学研究費 (ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)
分担研究報告書

家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワーク構築に関する研究

分担研究者 田中 一 信楽園病院 神経内科 医長

本邦に特徴的と考えられる EOAHA の責任遺伝子同定に向け、解析体制が整い、比較的短期日に連鎖解析の成果を得ることが可能となった。遺伝性脊髄小脳変性症を中心とした、DNA 診断を常時行える体制を整えることができ、実際に幾つかの症例について DNA 診断を行い、家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワークの構築に寄与することができた。

A. 研究目的

1. 単一遺伝子病として、EOAHA 責任遺伝子単離に向け連鎖解析に必要な症例の集積ならびに臨床遺伝学的情報の収集—Early onset ataxia with hypoalbuminemia (EOAHA)は低アルブミン血症・高コレステロール血症を伴い、小脳・脊髄・末梢神経を病変の主座とし、臨床的にフリードライヒ失調症に類似する脊髄小脳変性症の一型と定義され、これまで本邦で 10 数例の症例が見いだされているが、臨床症状・画像所見・検査成績などからフリードライヒ失調症とは一線を画す疾患と考えられる。またこれまでの研究で Friedreich 失調症遺伝子座には連鎖しないことを我々は明らかにしている。元来本邦におけるフリードライヒ失調症は欧米のそれと比較して、小脳萎縮が目立ち小脳失調が顕著であり、心臓病・糖尿病などの内科合併症が少ない、など臨床的異質性が注目されていた。EOAHA は本邦に特徴的なフリードライヒ失調症に、さらに低アルブミン血症を伴う疾患であり、臨床遺伝的な観察からこの疾患は常染色体劣性遺伝形式を取る単一遺伝子異常に基づくと考えられ、連鎖解析を含むポジショナルクローニングによる責任遺伝子同定が十分に可能と考える。

2. 単一遺伝子病と考えられ、既知の遺伝子異

常を認めない遺伝性神経変性疾患の症例の集積ならびに臨床遺伝学的情報の収集、家族性痙攣対麻痺など遺伝性脊髄小脳変性症を中心に症例を集積する。

3. 多因子遺伝子病としての脳血管障害の危険因子を同定すべく、罹患同胞対法や候補遺伝子を用いた連鎖分析 (association study) に必要な症例の集積ならびに臨床遺伝学的情報の収集。糖尿病や本態性高血圧症の様に、脳血管障害の遺伝的負因を考慮し、多因子遺伝子病としての脳血管障害を罹患同胞対法や候補遺伝子を用いた連鎖分析 (association study) の手法を用いて解析する。家族性脳血管障害としては脳出血・脳梗塞・Binswanger 病・脳動脈瘤・モヤモヤ病などの症例を集積する。

B. 研究方法

1. 新潟大学脳研究所神経内科との協力の下、従来より全国的規模で EOAHA の症例の集積がなされており、既に EOAHA の 10 家系 (患者 21 名) が集められ、臨床的・病理学的検討がなされつつある。更に全国的規模で患者・家系の集積に努める一方、臨床的な観察を十分に行い、臨床遺伝学的データの把握に努める。患者・家族の末梢血リンパ球よりゲノム DNA を抽出する

と共に、患者においては EB ウィルスによる株化を行い DNA バンクを作成する。

2. 遺伝性神経変性疾患の中でも特に遺伝性脊髄小脳変性症は新潟大学脳研究所神経内科を初め、本邦の研究者の成果により多くの疾患においてその責任遺伝子が既に単離されている。しかしその一方、このような既知の遺伝子異常を認めない遺伝性脊髄小脳変性症の症例が存在することも事実である。臨床的な観察を十分に行い、臨床遺伝学的データの把握に努めながらこのような症例の蓄積を図り、DNA バンクを作成することで、ポジショナルクローニングのリソースとする。

3. 本施設は、月間 2000 人弱の神経内科外来患者が来院し、この中で脳血管障害が多数を占めている。このような多数の外来患者および入院患者の中から、家族性の脳血管障害症例に対し、臨床的な観察を十分に行い、臨床遺伝学的データの把握に努めながら、症例の蓄積を図り、DNA バンクを作成する。

全ての症例集積、DNA 抽出に当たっては、特定の時間・場所を確保し、プライバシーの漏洩を厳格に防ぐ。当然のことながら今後新たに採血するクライアントに対しては、十二分な説明の後、書面によるインフォームド・コンセントをお願いする。また全ての検体は匿名化し、データ管理に細心の注意を払う。

C. 研究成果

本邦に特徴的と考えられる EOAHA の責任遺伝子同定に向け、解析体制が整い、比較的短期日に連鎖解析の成果を得ることが可能となった。

遺伝性脊髄小脳変性症を中心とした、DNA 診断を常時行える体制を整えることができ、実際に幾つかの症例について DNA 診断を行った。

D. 考察

EOAHA 責任遺伝子が明らかになった際は、欧米のフリードライヒ失調症との遺伝的異質性に

ついてさらに研究が進むものとする。また脊髄小脳変性症は代表的な難病疾患であるが、責任遺伝子が未知の症例も多く、これらの症例の責任遺伝子同定に寄与できる。そして脳血管障害は、今後ますます拍車がかかる高齢化社会を目前にして、本邦における死因の第 2 位を占める重要な疾患である。このような疾患を多因子遺伝子病として捉え、遺伝的負因を明らかにすべく、症例集積を図り今後のリソースとすることは予防医学的見地からも極めて有意義なこととする。

E. 結論

家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体の集積分配ネットワークの構築を行った。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究者名簿

研究者名	所属 部署	住所	TEL	FAX
主任研究者 鈴森 薫	名古屋市立大学医学部 (産科婦人科)	〒 467-0001 愛知県名古屋市長 瑞穂区瑞穂町字川澄1	052-851-5511	052-842-2269
分担研究者 千葉喜英	国立循環器病センター (周産期科)	〒 565-8565 大阪府吹田市 藤白台5-7-1	06-833-5012	06-872-7486
分担研究者 名取 道也	国立大蔵病院 (臨床研究部)	〒 157-8535 東京都世田谷区 大蔵2-10-1	03-3416-0181	03-5494-7470
分担研究者 堀尾 裕幸	国立循環器病センター (研究所疫学部)	〒 565-8565 大阪府吹田市 藤白台5-7-1	06-833-5012	06-872-7486
分担研究者 石川 睦男	旭川医科大学 (産婦人科)	〒 078-8510 北海道旭川市 西神楽4-5-3-11	0166-68-2562	0166-68-2569
分担研究者 佐藤 昌司	九州大学医学部附属病院 (周産母子センター)	〒 812-8582 福岡県福岡市東区 馬出3-1-1	092-642-5394	092-642-5414
分担研究者 下山 豊	国立大蔵病院 (臨床研究部)	〒 157-8535 東京都世田谷区 大蔵2-10-1	03-3416-0181	03-3416-2222
分担研究者 由谷 親夫	国立循環器病センター 臨床検査部病理	〒 565-8565 大阪府吹田市 藤白台5-7-1	06-833-5012	06-872-8100
分担研究者 種村 光代	名古屋市立大学医学部 (産科婦人科)	〒 467-0001 愛知県名古屋市長 瑞穂区瑞穂町字川澄1	052-851-5511	052-842-2269
分担研究者 戸田 達史	東京大学医科学研究所 (ヒトゲノム解析センター)	〒 108-8639 東京都港区 白金台4-6-1	03-5449-5237	03-5449-5406
分担研究者 羽田 明	旭川医科大学 (公衆衛生学)	〒 078-8510 旭川市 西神楽4線5号3-11	0166-68-2410	0166-68-2419
分担研究者 清水 宏	慶應義塾大学医学部 (皮膚科)	〒 160-8582 東京都新宿区 信濃町35	03-3353-1211	03-3351-6880
分担研究者 孫田 信一	愛知県心身障害者団 (遺伝学部)	〒 480-0392 愛知県春日井市 神屋町713-8	0568-88-0811	0568-88-0829
分担研究者 遠藤 文夫	熊本大学医学部 (小児科)	〒 860-8556 熊本県熊本市 本荘1-1-1	096-373-5191	096-366-3471
分担研究者 大橋 博文	埼玉県立小児医療センター (遺伝科)	〒 339-8551 埼玉県岩槻市 馬込2100	048-758-1811	048-758-1818

研究者名	所属 部署	住所	TEL FAX
分担研究者 田中一	信楽園病院 (神経内科)	〒 950-2087 新潟県新潟市 西有明町1-27	025-267-1251 025-267-3199
研究協力者 神崎 徹	大阪大学医学部附属病院 分娩育児部	〒 565-0871 大阪府吹田市 山田丘2-15	06-879-3355 06-879-3359
研究協力者 宇津 正二	聖隷三方原病院 産婦人科	〒 433-8105 静岡県浜松市 三方原町3453	053-436-1251 053-437-3013
研究協力者 西島 光茂	西島産婦人科医院	〒 020-0066 岩手県盛岡市 上田1-19-5	019-624-5855 019-624-5835
研究協力者 川鱈 市郎	岐阜大学医学部 産科婦人科	〒 500-8076 岐阜県岐阜市 司町40	0582-67-2631 0582-65-9006
研究協力者 松田 義雄	鹿児島市立病院 産婦人科	〒 892-0850 鹿児島県鹿児島市 加治屋町20-17	099-224-2101 099-223-3190
研究協力者 久保 隆彦	高知医科大学 周産母子センター	〒 783-0043 高知県南国市 岡豊町小蓮	0888-66-5811 0888-20-2233
研究協力者 森崎隆幸	国立循環器病センター 研究所バイオサイエンス部	〒 565-8565 大阪府吹田市 藤白台5-7-1	06-833-5012 06-872-8090
研究協力者 米本昌平	三菱化学生命科学研究所 社会生命科学研究所	〒 194-8511 東京都町田市 南大谷11号	0427-24-6280 0427-24-6301
研究協力者 村越毅	聖隷浜松病院 周産母子センター・産科	〒 430-8558 静岡県浜松市 住吉2-12-12	053-474-2222 053-475-7596
研究協力者 川俣和弥	国立循環器病センター (周産科)	〒 565-8565 大阪府吹田市 藤白台5-7-1	06-833-5012 06-872-7486
研究協力者 池田善彦	国立循環器病センター 臨床検査部病理	〒 565-8565 大阪府吹田市 藤白台5-7-1	06-833-5012 06-872-8100
研究協力者 石郷岡哲郎	旭川医科大学 (産婦人科)	〒 078-8510 北海道旭川市 西神楽4-5-3-11	0166-68-2562 0166-68-2569
研究協力者 山下剛	旭川医科大学 (産婦人科)	〒 078-8510 北海道旭川市 西神楽4-5-3-11	0166-68-2562 0166-68-2569
研究協力者 碁石勝利	旭川医科大学 (産婦人科)	〒 078-8510 北海道旭川市 西神楽4-5-3-11	0166-68-2562 0166-68-2569

研究者名	所属 部署	住所	TEL	FAX
研究協力者 柳沼祐二	旭川医科大学 (産婦人科)	〒 078-8510 北海道旭川市 西神楽4-5-3-11	0166-68-2562	0166-68-2569
研究協力者 蒔田芳男	旭川医科大学 (小児科)	〒 078-8510 旭川市 西神楽4線5号3-11	0166-65-2111	
研究協力者 三浦裕一	熊本大学医学部 (小児科)	〒 860-8556 熊本県熊本市 本荘1-1-1	096-373-5191	096-366-3471