

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

総括研究報告書

遺伝性形成不全症の責任遺伝子における
変異の解析と情報ネットワークの構築

主任研究者

山 田 正 夫

国立小児病院小児医療研究センター
先天異常研究部長

遺伝性形成不全症の責任遺伝子における変異の解析と情報ネットワークの構築

主任研究者 山田 正夫 国立小児病院小児医療研究センター 先天異常研究部長

研究要旨

主として小児に見られる各種の形成不全症について、責任遺伝子を探求し、変異と病態との対応付けを図ることを目的とした。広範な眼形成異常症における Pax6 変異を検索し、無虹彩症に加え、Peter 奇形、白内障、黄斑低形成症患者にも PAX6 変異、特にミスセンス変異を見出した。変異により支配下遺伝子の転写制御が異なるため、様々な病態を呈すると考えられ、変異蛋白質の機能解析を進めた。広範な先天性腎不全症における WT1 変異を検索し、Denys-Drash 症候群に加えて、Frasier 症候群でも変異を見出した。肝内胆管形成不全を伴う Alagille 症候群で Jagged1 遺伝子の変異を同定した。本研究で目指した関連疾患検索による戦略の有効性が示された。

A. 研究目的

先天異常は軽度のものを含めると全出生の 5-6%を占め、また我が国の乳幼児死亡率は世界で最も低い水準にあるが、その中では先天異常が 35%を占め第 1 位である。先天異常の多くに遺伝要因の関与が示唆されている。各種の器官・組織形成異常症では生化学的要因が明らかでなく、従来の方法論では病理と病態の解明はほとんど不可能であり、治療法も対処的なものに過ぎない。責任遺伝子と変異が同定されれば、診断に有用であることは明確であり、病理と病態解明の手がかりにできる方法論の有効性は確立している。一方、現状で治療法の無い疾患を診断することの倫理的問題は十分に考慮されなくてはならないが、これらの疾患群では、従来の病態に基づく診断が曖昧であったり、疾患区分を誤っている例も多く、遺伝子に基づいた確固たる診断が病理と病態研究の出発となる事実も重要である。

B. 研究方法

広範な眼形成異常症患者における Pax6 変異と、広範な先天性腎不全症患者における WT1 変異を検索し、同定した変異をもつ PAX6 および WT1 の転写調節機能を解析した。Alagille 症候群の責任遺伝子を追求し、変異を解析した。

C. 研究結果ならびに考察

各種の眼形成異常症患者のゲノム DNA について Pax6 変異を探索し、多数の変異、特にミスセンス変異を見出した。世界中の結果を集大成した mutation database には 98 年末現在 118 種類の PAX6 変異が登録されており、ほとんどが翻訳中断による無虹彩症である。それに対してミスセンス変異は PAX6 の機能、すなわち眼形成過程の解明に極めて大きな情報を与えるが、わずかに 11 例であり、その内 7 例が当研究室の結果である。これら

には、眼の外部と内部の異常を伴う無虹彩症、眼の外部のみの異常である Peter 奇形と白内障、内部の異常である黄斑低形成症が含まれ、一方、変異の位置として、PAX 遺伝子群を通じて世界で始めて選択的スプライス部位に変異を見出し、また C 末端のアミノ酸変異を同定し、主として変異の位置によって異なる病態を示すことが明らかとなった。PAX 遺伝子群は paired domain 部位を介して DNA に結合し、転写調節因子として機能し、支配下遺伝子を制御すると考えられている。試験管内反応によって変異蛋白質の転写調節作用を解析し、また支配下遺伝子を探索することにより、異なる病態の発生機序を解析している。

PAX6 遺伝子のショウジョウバエの Eyes absent (eya) は眼の形成に関与する遺伝子であるが、そのヒトホモログ EYA1 は、難聴、外耳の奇形、腎不全を伴う Branchio-Oto-Renal 症候群の責任遺伝子として、1997 年に欧米の研究者によって単離された。この疾患患者の眼は正常で、変異のほとんどは翻訳中断である。各種の眼形成異常症患者を検索した結果、白内障の 3 家系で EYA1 のミスセンス変異を見出し、同遺伝子はヒトでも眼形成に関与することを初めて明らかとした。

同様に、各種腎形成不全症について WT1 遺伝子の異常を解析した。WT1 遺伝子は胎児性腎腫瘍である Wilms 腫瘍の責任遺伝子として 1990 年に単離された癌抑制遺伝子である。いくつかの腫瘍遺伝子あるいは癌抑制遺伝子は奇形の責任遺伝子でもあることは良く知られており、実際 WT1 遺伝子も、腎不全・泌尿生殖器形成不全・ウィルムス腫瘍を特徴とする Denys-Drash 症候群の責任遺伝子として 1991 年に確立している。当研究室では日本人 Wilms 腫瘍や Denys-Drash 症候群患者で変異を同定し、1993 年以来報告してきたが、最近では典型的な Denys-Drash 症候群に限定せず、非典型例あるいは広範な腎不全患者の WT1 遺伝

子解析を進めてきた。これまでに 8 人の患者の体細胞で WT1 変異を検出してきて、内 3 例は典型的な Denys-Drash 症候群であり、既に報告し、また 2 例は Frasier 症候群として確定したが、残る 3 例について患者の病態を精査し、病態と変異スペクトラムの確立に努めている。試験管内反応によって機能の解析を進め、変異によって転写因子の機能の違いが症状を説明できるか検討している。

肝内胆管形成不全を伴う Alagille 症候群について、ポジショナル戦略法によって責任遺伝子を追求めてきたが、97 年 7 月に米国の 2 グループが Jagged1 を責任遺伝子として同定した。我々が収集した 13 家系について Jagged1 遺伝子に変異を同定した。Alagille 症候群患者は同一家系で同一変異を持っていても、重篤度が極めて異なることが知られている。修飾因子の存在を追及している。

該当する疾患の種類は多いが症例数は少ないので、国内の関連機関と提携して解析を勧めるとともに、これらの疾患と遺伝子情報のデータベースを構築し、国際的な Human Mutation Database に寄与し、あるいは臨床医師や一般向けの情報ネットワークを構築することを進めている。

これらの研究実施にあたり、以下の研究協力者の協力を得た。

東範行	国立小児病院眼科医長 眼科疾患の臨床
香坂降夫	国立小児病院小児科（腎消化器） 腎および消化器疾患の臨床
田中敏章	国立小児病院小児医療研究センター 内分泌代謝研究部長 成長障害および内分泌関連疾患
高野貴子	帝京大学医学部衛生学公衆衛生学 FISH による解析
沼部博直	東京医科大学総合情報部 情報システム室長 疾患関連データベース

D. 結論

発生分化時に作動する転写調節因子では、変異により様々な病態を示す形成不全症を示すことが明らかとなった。形成不全症患者の変異解析によって、組織や器官の形成過程がすこしづつ明らかとなり、こうした遺伝子研究から病態と病理を一層明らかとし、将来の予防・治療法の開発に結びつけたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

Azuma N, Hotta Y, Tanaka H, Yamada M. Missense mutations in the PAX6 gene in aniridia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2524-2528, 1998.

Azuma N, Yamada M. Missense mutation at the C terminus of the PAX6 gene in ocular anterior

segment anomalies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:828-830, 1998.

Li XK, Okuyama T, Tamura A, Enosawa S, Kaneda Y, Takahara S, Funashima N, Yamada M, Amemiya H, Suzuki S. Prolonged survival of rat liver allografts transfected with Fas ligand-expressing plasmid. *Transplantation* 66:1416-1423, 1998.

Miyashita T, Nagao K, Krajewski S, Salvesen GS, Reed JC, Inoue T, Yamada M. Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ* 5:1034-1041, 1998.

Miyashita T, Nagao K, Ohmi K, Yanagisawa H, Okamura-Oho Y, Yamada M. Intracellular aggregate formation of dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein with the extended polyglutamine. *Biochem Biophys Res Commun* 249:96-102, 1998.

Okuyama T, Fujino M, Li XK, Funeshima N, Kosuga M, Saito I, Suzuki S, Yamada M. Efficient Fas-ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. *Gene Ther* 5:1047-1053, 1998.

Okuyama T, Kosuga M, Takahashi S, Sasaki K, Yamada M. Hepatocyte-specific gene expression by a recombinant adeno-associated virus vector carrying apolipoprotein E enhancer and α_1 -antitrypsin promoter. *Gene Ther Mol Biol* 3:67-74, 1998.

Okuyama T, Li XK, Funeshima N, Fujino M, Sasaki K, Kita Y, Kosuga M, Takahashi M, Saito H, Suzuki S, Yamada M. Fas-mediated apoptosis is involved in the elimination of gene-transduced hepatocytes with E1/E3-deleted adenoviral vectors. *J Gastroenterol Hepatol* 13 Suppl:S113-118, 1998.

Sakai K, Yamada M, Horiba N, Wakui M, Demura H, Suda T. The genomic organization of the human corticotropin-releasing factor type-1 receptor. *Gene* 219:125-130, 1998.

Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, Miyashita T, Yamada M, Reed JC. Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res* 58:3116-3131, 1998.

Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J, Kobayashi N, Yamada M. Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families. *Hum Mol Genet* 7:1363-1369, 1998.

2. 学会発表

Miyashita T, Nagao K, Ohmi K, Okamura-Oho Y, Yamada M. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) protein is cleaved during apoptosis. American Association for Cancer Research Special Conference, Molecular Mechanisms of Apoptosis

Regulation, Palm Springs, January 9-13, 1998.

奥山虎之、李 小康、田村明彦、藤野真之、舟島直子、金田安史、山田正夫、鈴木盛一. Fas リガンド遺伝子導入による移植免疫の制御. 学際シンポジウム「臓器移植と遺伝子治療」、東京、5月28-29日、1998.

藤野真之、奥山虎之、李 小康、舟島直子、絵野沢伸、山田正夫、雨宮 浩、鈴木盛一. Cre/loxP 発現制御系アデノウイルスベクターによる Fas リガンド遺伝子の発現. 第 5 回日本臓器保存生物医学学会総会、東京、5月28-29日、1998.

奥山虎之、李 小康、杉岡 篤、森田美和、藤野真之、舟島直子、絵野沢伸、小須賀基通、海老沼浩利、山田正夫、鈴木盛一. Fas リガンド誘発性肝炎の発症メカニズムに関する検討. 第 5 回肝細胞研究会、つくば、6月5-6日、1998.

小須賀基通、奥山虎之、小祝 修、李 小康、絵野沢伸、鈴木盛一、松尾宣武、Roy Chowdhury J、山田正夫. 温度感受性不死化肝細胞を用いた遺伝子治療法の開発. 第 5 回肝細胞研究会、つくば、6月5-6日、1998.

藤井克則、高梨潤一、長尾芳朗、山田正夫. 歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)遺伝子の構造と機能. 第 150 回日本小児科学会千葉地方会、第 973 回千葉医学会分科会、千葉、6月20日、1998.

Okuyama T, Li XK, Tamura A, Fujino M, Funeshima N, Kosuga M, Kaneda Y, Suzuki S, Yamada M. Fas ligand expression in allograft liver by gene transfer with HVJ-liposome or adenoviral vectors allowed prolonged survival of the recipient rats. The 4th Annual Meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, Tokyo, July 4-5, 1998.

Fujino M, Okuyama T, Li XK, Funeshima N, Enosawa S, Kosuga M, Suzuki S, Yamada M. Efficient Fas ligand gene expression in rodent liver after intravenous injection of a recombinant adenovirus by the use of a Cre-mediated switching system. The 4th annual meeting of the Japanese Society of Gene Therapy, Tokyo, July 4-5, 1998.

山田正夫. 産物蓄積説と翻訳過程説: CAG リピート伸長病における神経細胞死をめぐって(招待講演). 神経細胞死浜名湖ワークショップ、浜名湖、7月7-8日、1998.

Li XK, Tamura A, Okuyama T, Fujino M, Funeshima N, Kita Y, Enosawa S, Kaneda Y, Yamada M, Amemiya H, Suzuki S. The preventive effect of Fas ligand expression on rat allogeneic liver transplantation. The Transplantation Society 17th World Congress, Montreal, July 12-17, 1998.

Li XK, Okuyama T, Fujino M, Funeshima N, Tamura A, Enosawa S, Kita Y, Yamada M, Amemiya H, Suzuki S. On/off switching Fas ligand gene expression in liver by Cre/loxP adenovirus

vector system. The transplantation Society 17th World Congress, Montreal, July 12-17, 1998.

藤井克則、高梨潤一、宮下俊之、山田正夫. Gorlin 症候群における遺伝子解析および細胞生物学的検討. 第 8 回 Medical Genetics 研究会、東京、7月18-19日、1998.

小須賀基通、奥山虎之、小祝 修、田村明彦、李 小康、絵野沢伸、鈴木盛一、松尾宣武、Roy Chowdhury J、山田正夫. 温度感受性不死化肝細胞を用いた遺伝子治療法の開発. 日本人類遺伝学会第 43 回大会、甲府、10月14-16日、1998.

日本ウイルス腫瘍スタディグループ 岩川真由美、大川治夫、三杉和章、土田嘉昭、横森欣司、秦 順一、山田正夫、恒松由記子、金子安比古、大橋靖雄、樋之津史郎. 日本ウイルス腫瘍グループスタディ報告-1997年登録症例-. 第 14 回日本小児がん学会、札幌、10月19-20日、1998.

Okuyama T, Li XK, Tamura A, Fujino M, Funeshima N, Kosuga M, Takahashi S, Kaneda Y, Suzuki S, Yamada M. Fas ligand expression in allograft liver by gene transfer with HVJ-liposome or adenoviral vectors allowed prolonged survival for the recipient rats. 49th Annual meeting of American Association for the Study of Liver Diseases, Chicago, November 4-10, 1998.

小須賀基通、奥山虎之、小祝 修、田村明彦、李 小康、絵野沢伸、鈴木盛一、松尾宣武、Roy Chowdhury J、山田正夫. Crigler Najjar 症候群 I 型モデルラットに対する温度感受性不死化肝細胞を用いた遺伝子治療法の開発. 第 41 回日本先天代謝異常学会、東京、11月12-13日、1998.

鈴木盛一、李 小康、奥山虎之、田村明彦、藤野真之、北 雄介、絵野沢伸、山田正夫、雨宮 浩. 臓器移植における FasL 遺伝子導入とアポトーシス(シンポジウム、アポトーシスと疾患). 第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

於保祐子、宮下俊之、山田正夫. DPRLA 蛋白はインスリン/IGF-I シグナル伝達機構に関与する. 第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

宮下俊之、長尾和右、山田正夫. グルココルチコイドによるアポトーシスでみられるカスパーゼの限定分解. 第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

大葉龍太郎、禹 麻美、井上 正、山田正夫. CAG リピート伸長病における神経細胞死の分子機構: 連続単一アミノ酸鎖の強発現による、培養細胞および大腸菌の成育阻害. 第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

柳澤比呂子、宮下俊之、於保祐子、大見和宏、文東美紀、徳永勝士、山田正夫. DRPLA 蛋白と高い相同性を持ち、また RE リピートを持つ REREI

蛋白の機能. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

藤井克則、宮下俊之、高梨潤一、河野陽一、安元慎一郎、永江祥之介、山田正夫. Gorlin 症候群における遺伝子解析および細胞生物学的検討. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

禹 麻美、宮下俊之、松井 淳、於保祐子、井上正、山田正夫. 誘導可能なポリグルタミンの発現系の確立と細胞内凝集の解析. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

高橋 聡、奥山虎之、小須賀基通、佐々木恭子、李 小康、藤野真之、小祝 修、鈴木盛一、山田正夫. アデノウイルスベクターによるムコ多糖症VII型の遺伝子治療、特に発現蛋白の臓器組織分布についての検討. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.

小須賀基通、奥山虎之、高橋 聡、佐々木恭子、小祝 修、田村明彦、鈴木盛一、松尾宣武、山田正夫. 肝クッパー細胞の排除がアデノウイルスベクターによる肝細胞遺伝子治療に与える効果. 第21回日本分子生物学会年会、横浜、12月16-19日、1998.