

ても同じシステム内で同時に把握できるほうが管理しやすいことも明らかとなった。そこで、分担研究者：堀尾に現行システムの問題点についての要望を提出し、新システムの設計に協力した。

2. 風疹とトキソプラズマについて、妊娠初期の妊婦約300名の抗体保有状況を検討した。風疹HI抗体については7.4%が抗体陰性で、そのうち大半が中学生でワクチン接種を受けているはずの年齢層であった。トキソプラズマ抗体の保有率は9.6%と低値であったが、その大半がペット飼育歴がなく、食物による感染ルートが多いことが予想された。風疹ウイルスとトキソプラズマの胎内感染が疑われた症例については、同意を得て、絨毛、羊水、胎児血を採取してPCR法により胎児診断を行い、経過を観察して出生児の追跡調査を行った。風疹については、以前からの胎児診断例も含めて計99例について胎児感染が成立する母親のリスク因子を検討したところ、発疹の出現と患者との接触がリスク因子であり、いずれのリスクも存在しない場合、抗体価に問題があっても95%以上の胎児が正常であることが明らかとなった。一方、トキソプラズマ抗体が陽性で特異的IgM抗体も検出された妊婦4例には、希望により同意を得て、アセチルスピラマイシンの投与を行った。羊水からトキソプラズマが検出された症例はなく、全例が分娩に至ったが胎内感染は認められず、現在まで児の発育経過は順調である。

D. 考察

1. 検体バンクでの検体の保存、管理は順調である。しかし、検体を送付する際の諸手続きが非常に煩雑であり、各種マニュアルは準備したものの、症例登録・検体送付が滞る場合がしばしばあった。また、現在のシステムでは解析されたデータが患者の主治医に還元されにくいいため、現行システムはそのまま継続しつつ、新システムの導入を行う

こととなった。また新システムは臨床的に稼働していないが、旧システムで明示された問題点はほぼ解決されており、十分な登録トレーニング期間を経て全面的な新システムへの切り替えを行う予定である。

2. 風疹ウイルスとトキソプラズマの胎内感染については胎児診断方法はほぼ確立した。風疹については、妊娠初期の間診（発疹と風疹患者との接触の有無）がスクリーニングに有用なこと、トキソプラズマについては薬剤による胎内治療が期待できることが明らかとなった。

E. 結論

1. 次年度は新システムの運用を推進し、その研究成果を生殖・周産期医療の現場へ還元することをめざす。
2. 風疹ウイルス、トキソプラズマなどの胎内感染による先天異常の発症機序の解明は継続課題とする。

F. 研究発表

1. 論文発表

種村光代：風疹ウイルスの母子感染に関する最近の話題、現代医学 47(2) 197-204、1999

2. 学会発表

1) 種村光代：風疹ウイルスの母子感染 第18回日本周産期学会学術集会、2000

2) 種村光代、家族性遺伝性疾患解析のためのネットワークの構築に関する研究グループ：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 第52回日本産科婦人科学会学術講演会、2000

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

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

分担研究報告書

脳神経系遺伝性疾患の連鎖解析と遺伝子解析に関する研究

分担研究者 戸田 達史 東京大学医科学研究所

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィーの脳病変は glia limitans-基底膜の破綻を伴い、神経細胞がovermigrationしたためといわれている。今回我々は脳病変への関与を検討するために F CMD 遺伝子の特に脳における発現をノーザンプロット、RT-PCR、in situ hybridizationにより解析したところ、発生過程からCajal-Rezius細胞を含む遊走に関与する神経細胞に発現が認められ、成人まで継続していた。すなわち本来基底膜と接していないニューロンで発現が見られており、フクチン蛋白質が神経細胞の遊走自体に関与する可能性がある。また患者において、病変部、正常部の発現レベルに差が見られ、F CMD 遺伝子変異によるmRNAの不安定性が、発生のある段階で細胞ごとにmRNA量の差を生じ、病変部正常部を区別する可能性が考えられた。

A. 研究目的

緒言

福山型先天性筋ジストロフィー(FCMD)は、重症の筋ジストロフィー病変とともに、小多脳回を基本とする高度の脳奇形が共存する点を特徴とする常染色体劣性遺伝疾患である。原因遺伝子はポジショナルクローニング法により同定され1998年に発表された。この遺伝子産物フクチンは、既知の遺伝子、蛋白とホモロジーを示さない機能未知の新規蛋白であり、アミノ酸配列などから、細胞外蛋白と考えられている。出生前診断による胎児剖検例脳病変の解析で、glia limitans-基底膜の破綻を伴い、神経細胞がovermigrationした結果、層構築の障害が報告されている。今回我々は脳病変への関与を検討するために F CMD 遺伝子の特に脳における発現を、ノーザンプロット、RT-PCR、in situ hybridizationにより解析した。

B. 研究方法・研究結果

ノーザン解析において、胎児組織、成人脳各部位で、同程度 F CMD 遺伝子の発現が確認された。

RT-PCRでも胎児各時期、小児、成人脳組織で発現に大きな差は認められず、コントロール胎児と F CMD 胎児、コントロール成人と F CMD 患者の比較では、患者において発現の著明な低下が認められた。細胞株の比較では、グリア系の性質を示すglioblastomaに比較して、神経細胞の性質を持つ neuroblastoma、hNT neuronで有意な発現が見られた。

次に、In situ hybridizationにより発現を解析した。プローブは、ジゴキシゲニンで標識したRNAプローブを使用し、アルカリフォスファターゼにより発色しプローブの可視化を行った。

In situ hybridizationでは、胎児脳で神経前駆細胞を含む発生過程の全ての神経細胞とCajal-Rezius細胞に発現が見られた。成人脳でも、大脳皮質神経細胞に発現が継続して認められた。また海馬錐体細胞、歯状回神経細胞、小脳のプルキンエ細胞、顆粒細胞にも発現が認められた。glia limitans-基底膜複合体には発現を認めず、分子層、白質のグリア細胞にも発現を認めなかった。

F CMD 胎児脳では、正常部では弱く発現する細胞を比較的連続的に認め、病変部では著明に発現が低下していた。F CMD 成人患者では、全体として発現は低下しているが、正常部では比較的よく発現しており、病変部では著明に発現が低下する細胞群と弱く発現する細胞群が混在していた。

C. 考察

神経細胞の遊走に関して、神経前駆細胞は脳室壁に沿ってventricular zoneに存在する。最初に分化する神経細胞はCajal-Rezius細胞で、最表層のmarginal layerに遊走する。神経細胞に分化した順番にintermediate layerを経由して接線方向に脳表側へ移動していき、胎生9週頃よりcortical plateが形成される。cortical plateに到達した神経細胞は、Cajal-Rezius細胞が分泌するリーリンや、その他の脳表側の因子により遊走を終えpositioningを決定し、早期に分化した神経細胞ほど深部に位置しinside-outの配列と言われている。

F CMD 胎児、成人の病理所見の検討により、病変部ではglia limitans-基底膜に破れがあり、この破れが病変の遠因であり、フクチンはアストロサイトが主な役割を担う基底膜に関与すると考え易いが、今回のデータは発生過程からCajal-Rezius細胞を含む遊走に関与する神経細胞に発現が認められ、成人まで継続していた。

すなわち本来基底膜と接していないニューロンで発現が見られており、フクチン蛋白質が神経細胞の遊走自体に関与する可能性や、フクチン蛋白質（細胞外蛋白質？）がニューロンで産生され分泌され基底膜の形成に関与する可能性もある。

またFCMD患者において、病変部、正常部の発現レベルに差が見られたことは、FCMD遺伝子変異によるmRNAの不安定性が、発生のある段階で細胞ごとにmRNA量の差を生じ、病変部正常部を区別する可能性も考えられる。

D. 研究発表

Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Toda T. Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* 8:2303-2309, 1999

Toda T, Kobayashi K. Fukuyama-type congenital muscular dystrophy: the first human disease to be caused by an ancient retrotransposal integration. *J Mol Med* 77:816-823, 1999

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

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

分担研究者 羽田 明 旭川医科大学 公衆衛生学講座 教授

研究要旨

無脳症の原因遺伝子を明らかにするために、本研究班において収集された無脳症5症例とその3症例の両親から得たDNAを解析した。これまでの無脳症の染色体異常症例の報告から、13q13.2-qterの染色体領域をターゲットとした。これまでのところ、同領域にマップされる市販の12マーカーでは、遺伝子欠失などは見いだせなかった。また、無脳症との関連が報告されている、MTHFR (Methylenetetrahydrofolate reductase) 遺伝子多型(667C→T: Ala→Val)の解析もおこなった。5症例の解析ではCCが2症例、CTが3症例であった。報告ではTTあるいはCTが多いとされているが、今回の解析では一定の傾向は不明である。今後、症例を増やして検討する。

A. 研究目的

研究目的は以下の2項目である。

- ① わが国の無脳症におけるMTHFR遺伝子多型の関与を検討する。
- ② 無脳症の原因遺伝子を同定する。

①に関して。

欧米での研究では、妊娠前からの葉酸内服によって神経管欠損症(NTD；無脳症、脳瘤、二分脊椎の総称)が有意に減少することなどから、NTDと葉酸との関連が指摘されている。葉酸の代謝に関連する酵素のひとつにMTHFRがあるが、この酵素の多型667C→T(アラニン→バリン)においてTTのホモでは酵素が不安定で

MTHFR活性も低いことが知られている。また、NTDの患者および両親ではTTの頻度が対照群に比し、高いとの報告がある。日本人における関連を検討する。

②に関して。

これまで脳の発生に関する疾患の原因遺伝子が明らかになった例として、無脳回症(lissencephaly)におけるLIS1遺伝子および水頭症におけるL1CAM遺伝子がある。これらはMiller-Dieker症候群およびX連鎖性水頭症患者の染色体異常症例を手がかりとして発見された。無脳症における染色体異常として、13番染色体転座例(46,XY,der(13)t(13;22)(q31.2;

q13.3)), 13 番環状染色体例, 2 番短腕のトリソミー, X 染色体異常がある. このうち, 無脳回症の例と同様, 遺伝子欠失が原因であるとする, トリソミーはインプリンティングなど別の機序を考える必要がある. 一方, 13 番染色体異常例において, 欠失が共通である部分は 13q31.2-qter であり, 無脳症の原因遺伝子が存在する可能性がある. そこで, 収集した症例において, この領域の欠失の有無について検討する.

B. 研究方法

症例の DNA は胎児組織, 絨毛, あるいは胎児血より抽出した. 両親の DNA は全血より抽出する. これらの DNA を鋳型として, PCR 法によるタイピングをおこなった.

① 症例

無脳症 5 例を解析した. 3 例に関しては父母の DNA も得ることができたので, 同時に解析した.

② MTHFR 遺伝子タイピング

解析に使用した PCR プライマーは, 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGG-A-3', 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGT-G-3'である. PCR 産物(198 bp)を *Hinf*I 切断する事により, タイピングをおこなった. C→T 多型の存在により *Hinf*I 切断部位ができるため, 198 bp→175 bp となる. 遺伝子型は CC, CT, TT の 3 種類である.

③ 遺伝子欠失の有無を調べる.

ヒト 13 番染色体の 13q31.2-ter に相当する遺伝子領域におけるマイクロサテライト DNA 多型を検出するためのプライ

マーセットを準備する. まず, Perkin-Elmer 社が販売している約 5 センチモルガンの間隔の蛍光標識プライマーセットを購入した. 購入したプライマーセットは以下の通りである.

D13S 265	HEX	93-131
D13S 156	HEX	280-300
D13S 1265	FAM	280-310
D13S 159	FAM	157-199
D13S 1322	FAM	90-110
D13S 1306	NED	204-220
D13S 285	HEX	93-119
D13S 170	HEX	146-173
D13S 158	FAM	121-139
D13S 173	FAM	237-257
D13S 1241	FAM	329-349
D13S 293	NED	97-105

両親および胎児の DNA を鋳型として遺伝子増幅し, Perkin-Elmer 社のシーケンサーで解析する. 両親に多型があれば, 胎児における遺伝子欠失が検出できる.

④ 倫理面への配慮

すべての症例に対して, 本研究班で独自に作成したインフォームドコンセントに従って説明をおこなった. 同意の得られた場合のみ, 検体を収集した. 名古屋市立大学医学部産婦人科に保管した検体の中から, 無脳症の検体のみを匿名化ののち, 送付された. 解析は旭川医科大学公衆衛生学講座でおこなった.

C. 研究結果

① MTHFR 遺伝子多型

5 症例の解析では CC が 2 症例, CT が 3 症例であった. 3 症例では父母の検体が

得られたが、両親 6 人の内訳は CC 4 例、CT 1 例、TT 1 例であった。

② 遺伝子欠失の検索

症例および両親の DNA を用いて、12 種類のプライマーセットで解析したが、今のところ、欠失は明らかとなっていない。

D. 考察

① MTHFR 遺伝子多型に関して

今回の 5 症例の解析では、特に TT あるいは CT が多い傾向はみられなかった。今後、症例を増やして解析する必要がある。葉酸代謝が NTD 発症に関与しているとの仮説の証明として、MTHFR 遺伝子多型が NTD 発生と関連しているとの報告がある (Ou CY et al. Am J Med Genet, 1996)。同報告によると関連は二分脊椎に主に観察されるとしている。以後の報告で MTHFR 遺伝子多型と関連があるとしたのはカナダの二分脊椎患児を対象とした報告 (Christensen B et al. Am J Med Genet, 1999) のみであり、トルコ、中国、アメリカ合衆国など NTD 全体を対象とした研究では有意な関連を検出していない。これは、葉酸代謝が発症に関与しているのは二分脊椎のみであるとの仮説で説明できるかも知れない。今回の 5 症例は、すべて純粋な無脳症であり、この仮説を支持する所見かもしれない。

② 13q31.2-ter 領域の遺伝子欠失

今回、検出に使用した 12 種類のプライマーは 13q31.2-ter 領域を、約 5 センチモルガンの間隔でカバーするものである。無脳症がある特定の遺伝子の欠失あるいは変異が原因であるとすれば、今回の方

法で検出される可能性は低い。今後の方針として、同領域のインターネットで公表されているマイクロサテライト DNA 情報を基に、蛍光標識した合成オリゴヌクレオチドを作成し、同様の方法で欠失を探ることが考えられるだろう。また、この領域の遺伝子で全前脳症 (holoprosencephaly) の原因遺伝子の一部として ZIC2 遺伝子が知られている。この遺伝子が、無脳症の原因遺伝子である可能性も考えられるので、今後、解析をしていきたい。

E. 結論

無脳症の遺伝的原因を研究するため、MTHFR 遺伝子の解析と 13q31.2-ter 領域に焦点をあてて、遺伝子欠失の探索をおこなった。しかし、今までの解析では遺伝的要因の存在を示唆する所見は得られていない。最近、今回解析した 1 症例の両親の DNA を得ることができた。また、ネットワークを通して、新たな 2 症例とその両親、二部脊椎の 1 症例を得た。今後も検体の分配を期待できると思われる。今後の計画として①症例数を増やすこと、②候補領域の新たなマイクロサテライトマーカーで解析し、欠失の有無を探し、③ZIC 遺伝子の変異を探し、などの方法で、原因遺伝子の同定を試みたい。

F. 研究発表

このテーマに関しては、論文、学会などでの発表はおこなっていない。

厚生省科学研究費補助金（ヒトゲノム遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

表皮水疱症・筋ジストロフィー症候群における遺伝型・表現型の
相関関係の解明に関する研究

分担研究者： 清水 宏 北海道大学医学部 皮膚科 教授

研究趣旨 表皮水疱症・筋ジストロフィー症候群 (epidermolysis bullosa-mucular — dystrophy syndrome: EB-MD)は、臨床症状の重症度、プレクチンの変異様式の両面で多様性をしめす疾患群である。しかし、プレクチンの両方の対立遺伝子に早期停止コドン変異が存在し、プレクチンが全く発現しない患者ではより強い臨床症状を呈し、プレクチン遺伝子の9塩基の欠失変異の結果、3アミノ酸短いもののプレクチンタンパクが産生される遺伝子変異を有する患者では明らかに臨床症状が軽いことが明らかになった。すなわち EB-MD においては遺伝型、臨床型に明らかな相関関係が存在することが推定された。

A. 研究目的

従来の臨床研究により、単純型表皮水疱症の一部には進行性の筋ジストロフィーを合併する一群があることが知られていた。最近、研究代表者を含めた世界の数カ所の研究グループは、これらの患者皮膚基底膜においてヘミデスモゾーム接着板の構成成分であるプレクチン分子の発現が特異的に欠損していることを報告した。さらに、表皮水疱症と筋ジストロフィー症は単なる偶然な合併ではなく、プレクチン分子をコードする遺伝子の変異により発症することが明らかになり、現在本症は表皮水疱症・筋ジストロフィー症候群 (epidermolysis bullosa-mucular — dystrophy syndrome: EB-MD)と呼称されている。このように EB-MD の一部の患者において、いくつかのプレクチン遺伝子変異が発見されたが、変異部位や様式は多様であり、遺伝子変異パターン (genotype) と EB-MD の臨床症状、重症度、予後(phenotype)との関連は未だ不明である。もし EB-MD における genotype/phenotype の相関関係が明らかになれば、プレクチン分子の欠損による表皮水疱症の発症のみならず、筋ジストロフィー発症のメカニズムが解明され、さらにプレクチン分子の役割、発症病理をより明らかにすることができる。

今回の研究目的は、皮膚、筋肉という2臓器にわたる床状を呈し、また非常に多様性のある EB-MD におけるプレクチン遺伝子の変異様式(genotype)と疾患としての表現型(phenotype)の関連(genotype/phenotype correlation)を明らかにし、プレ

クチン分子の役割、さらに表皮水疱症、筋ジストロフィーの発症機序を解明することである。

B. 研究方法

1) 患者の集積、ならびに臨床表現形の解析

今回の研究班で EB-MD の家系を日本全国からさらに集積する。これまで研究者清水らがすでに集積している症例を加えて、可能な限り多数の EB-MD 家系を今回の研究に加える。インフォームドコンセントに基づき、研究協力に同意がえられた患者のみを今回の研究対象とする。

2) 微細構造変化の観察

患者から皮膚生検、ならびに筋組織生検を行ない、透過電子顕微鏡により皮膚表皮、基底膜、ならびに筋組織の微細構造上の変化を観察する。とくにプレクチンが存在するヘミデスモゾームの接着板の状態ヘミデスモゾームの数、成熟度、keratin filament との結合状態などを詳細に解析する。筋肉においてはプレクチンが存在するサルコレンマに注目して微細構造の変化を観察する。表皮水疱症と筋ジストロフィーの臨床症状の重症度と、微細構造変化の程度との相関関係を比較検討する。

3) 共焦点レーザー顕微鏡による解析

皮膚生検、筋生検組織の一部を急速凍結し、生標本を作成する。プレクチンならびにそれ以外のヘミデスモゾーム、基底膜関連抗原に対する抗体を用いて免疫染色し、それぞれの蛋白レベルでの発現量、

分布状態を共焦点レーザー顕微鏡で詳細に検討する。免疫組織化学に用いるモノクローナル抗体としては、プレクチン、ならびにプレクチンの splicing products と想定されている HD1、さらにヘミデスモソーム構成成分である $\alpha 6$ integrin, $\beta 4$ integrin, BPAG1, BPAG2、さらにラミニン5、V I I型コラーゲンに対するものを用いる。これにより患者表皮基底膜、筋組織サルコレンマにおけるプレクチンならびに関連分子の発現状態、分布状態にいかなる異常が存在するのかを症例ごとに明らかにする。同時に微細構造の変化と、蛋白レベルでの変化の関連も合わせて検討する。

4) 免疫電顕による解析

プレクチン分子、ならびに共焦点レーザー顕微鏡による観察で異常が確認された基底膜関連蛋白に関しては、免疫電顕により微細構造レベルでの発現分布状態を解析する。具体的には皮膚生検、筋生検組織の一部を急速凍結、凍結置換、Lowicryl K11M 包埋し、いわゆる超低温 post-embedding 免疫電顕法で目的とする分子の微細構造レベルでの発現分布状態の差を解析する。標識抗体である金コロイド粒子の数、細胞膜からの距離を定量的に解析し、分子レベルでの発現状態の異常を定量的に明らかにする。

5) プレクチン遺伝子変異の同定

患者ならびに家族から採血し、genomic DNA を抽出する。genomic DNA を鋳型として、PCR にてプレクチン遺伝子のすべての exon ならびに exon-intron 境界部分を増幅する。Heteroduplex 法により、遺伝子変異を含んでいる exon を推定し、その部分の genomic DNA 塩基配列を自動シーケンサーにて解析する。遺伝子変異が見い出されたものについては、enzyme digestion 法あるいは allele specific oligonucleotide hybridization 法により、遺伝子変異を確認する。

なお、プレクチン遺伝子の exon 32, 33 領域は特異的に巨大であり、GC 塩基が非常に豊富であることが判明している。従って、もし exon 32, 33 領域に遺伝子変異が存在した場合、上記の通常の PCR, Heteroduplex, Direct sequencing では変異を確実に同定することは困難である。このようなケースにおいては、Protein truncation test という新しい手法を併用して、全症例におけるプレクチン遺伝子変異の確実な同定をめざす。

6) 遺伝型・表現型の相関関係 (genotype/phenotype correlation) の解明

上記のすべての結果を総括的に解析して、EB-MD における遺伝型・表現型の相関関係 (genotype/phenotype correlation) を明らかにする。すなわち、各症例におけるプレクチン遺伝子変異 (遺伝型) と mRNA の発現様式、皮膚ならびに筋組織に

おける表現型 (臨床症状、発症年齢、重症度、予後、組織における微細構造変化、蛋白発現状態の変化、免疫電顕レベルでのプレクチン分子の微細局在様式の変化、培養細胞レベルでの in vitro での変化) との関連を総括的に解析し、本疾患の遺伝型・表現型の相関関係を明らかとする。

C. 研究結果

今回は4家系の EB-MD について、遺伝型、表現型の相関関係をしらべることができた。遺伝子変異検索において、3家系の患者においては、プレクチンの両方の対立遺伝子に早期停止コドン変異が同定された。これらの患者においては、とくに筋症状が重症で、遅くとも10代で筋ジストロフィーが発症し、すべての患者が30歳までに車椅子の生活となっていた。

一方、一家系はプレクチン遺伝子の9塩基の欠失変異のホモ接合体であり、その結果正常より3アミノ酸短いプレクチンタンパクが産生されることが判明した。また本患者は筋症状が他の3家系より軽微で、40歳代になっても歩くなどの日常生活の自給が可能であった。

D. 考察考察ならびに結論

EB-MD は臨床症状の重症度、プレクチンの変異様式の両面で多様性をしめす疾患群である。しかし、プレクチンの両方の対立遺伝子に早期停止コドン変異が存在し、プレクチンが全く発現しない患者ではより強い臨床症状を呈し、プレクチン遺伝子の9塩基の欠失変異の結果、3アミノ酸短いもののプレクチンタンパクが産生される遺伝子変異を有する患者では明らかに臨床症状が軽いことが判明した。すなわち EB-MD においては遺伝型、臨床型に明らか相関関係が存在することが推定された。

1 原著論文 (英語)

1. Shimizu H, Masunaga T, Kurihara Y, Owaribe K, Wiche G, Pulkkinen L, Uitto J, Nishikawa T: Expression of plectin and HD1 epitopes in patient with epidermolysis bullosa simplex associated with muscular dystrophy. Arch Dermatol Res 291:531-537, 1999.

2. Shimizu H, Hammami-Hauasli N, Hatta N, Nishikawa T, Bruckner-Tuderman L:

Compound heterozygosity for silent and dominant glycine substitution mutations in COL7A1 leads to a marked transient intracytoplasmic retention of procollagen VII and moderately severe dystrophic epidermolysis bullosa phenotype.

J Invest Dermatol 113:419-421, 1999.

3. Hashigucci K, Yokoyama M, Niizeki H, Yamasaki Y, Akiyama K, Tojo T, Urushibara T, Yamazaki Y, Shimizu H, Nishikawa T:

Polymorphism in the tumor necrosis factor B gene is associated with palmoplantar pustulosis.

Tissue Antigens 54:288-290, 1999.

4. Akiyama M, Smith LT, Yoneda K, Holbrook KA, Hohl D, Shimizu H:

Periderm cells form cornified cell envelope in their regression process during human epidermal development.

J Invest Dermatol 112:903-909, 1999.

5. Akiyama M, Suzumori K, Shimizu H:

Prenatal diagnosis of Harlequin ichthyosis by the examination of keratinized hair canals and amniotic fluid cells at 19 weeks' estimated gestational age.

Prenat Diagn 19:167-171, 1999.

6. Oyama M, Shimizu H, Ohata Y, Tajima S, Nishikawa T:

Dyschromatosis symmetrica hereditaria (reticulate acropigmentation of Dohi): report of a Japanese family with the condition and a literature review of 185 cases.

Br J Dermatol 140:491-496, 1999.

7. Okumura M, Uematsu J, Hirako Y, Nishizawa Y, Shimizu H, Kido N, Owaribe K:

Identification of the hemidesmosomal 500 kDa protein (HD1) as plectin.

J Biochem 126:1144-1150, 1999.

8. Tamai K, Murai T, Mayama M, Kon A, Nomura K, Sawamura D, Hanada K, Hashimoto I, Shimizu H, Masunaga T, Nishikawa T, Mitsuhashi Y, Ishida-Yamamoto A, Ikeda S, Ogawa H, McGrath JA, Pulkkinen L, Uitto J:

Recurrent COL7A1 mutations in Japanese patients with dystrophic epidermolysis bullosa: positional effects of premature termination codon mutations on

clinical severity.

J Invest Dermatol 112:991-993, 1999.

9. Inada M, Shimizu H, Yamada S, Sasaki Y, Nishikawa T:

Three cases of Darier's disease in a family showing marked heterogeneous clinical severity.

Dermatology 198:167-170, 1999.

10. Shimizu H, Takizawa Y, Pulkkinen L, Murata S, Kawai M, Hachisuka H, Uono M, Uitto J, Nishikawa T:

Epidermolysis bullosa simplex associated with muscular dystrophy: Phenotype-genotype correlation and review of the literature.

J Am Acad Dermatol 41:950-956, 1999.

11. Takizawa Y, Shimizu H, Rouan F, Kawai M, Uono M, Pulkkinen L, Nishikawa T, Uitto J:

Four novel plectin gene mutations in Japanese patients with epidermolysis bullosa with muscular dystrophy disclosed by heteroduplex scanning and protein truncation test.

J Invest Dermatol 112:109-112, 1999.

12. Shimizu H, Suzumori K:

Prenatal diagnosis as a test for genodermatoses: its past, present and future.

J Dermatol Sci 19:1-8, 1999.

13. Akiyama M, Amagai M, Smith LT, Hashimoto K, Shimizu H, Nishikawa T:

Epimorphin expression during human fetal hair follicle development.

Br J Dermatol 1999 (in press).

14. Ishii K, Amagai M, Ohata Y, Shimizu H, Hashimoto T, Oya K, Nishikawa T:

Development of pemphigus vulgaris in a patient with pemphigus foliaceus: Confirmation of anti-demoglein antibody profile shift by ELISA.

J Am Acad Dermatol 1999 (in press).

15. Ajithkumar DD, George S, Chandi SM, Thomas PP, Kawahara Y, Amagai M, Shimizu H:

Epidermolysis bullosa acquisita with IgM nephropathy.

Clin Exp Dermatol 1999 (in press).

16. Masunaga T, Shimizu H, Takizawa Y, Uitto J, Nishikawa T:

Combination of novel premature termination codon and glycine substitution mutations in COL7A1 leads to moderately severe recessive dystrophic epidermolysis bullosa.

J Invest Dermatol 114:204-205, 2000.

17. Akiyama M, Smith LT, Shimizu H:

Expression of transglutaminase activity in developing human epidermis.

Br J Dermatol 142:1-4, 2000.

18. Takizawa Y, Akiyama M, Nagashima M, Shimizu H:

A Novel Asparagin --> Asparaginic Acid Mutation in the Rod 1A Domain in Keratin 2e in a Japanese Family with Ichthyosis Bullosa of Siemens.

J Invest Dermatol 114:193-195, 2000.

19. Fine J-D, Eady RAJ, Bauer EA, Briggaman RA, Bruckner-Tuderman L, Christiano A, Heagerty A, Hintner H, Jonkman M, McGrath J, McGuire J, Moshell A, Shimizu H, Tadini G, Uitto J:

Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the second international consensus meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa.

J Am Acad Dermatol 2000 (in press).

20. Sasaki Y, Shimizu H, Akiyama M, Hiraoka Y, Takizawa Y, Yamada S, Morishima Y, Yamanishi K, Aiso S, Nishikawa T:

A recurrent keratin 14 mutation in Dowling-Meara epidermolysis bullosa simplex.

Br J Dermatol 2000 (in press).

21. Inoue M, Tamai K, Shimizu H, Owaribe K, Nakama T, Hashimoto T, McGrath JA:

A homozygous missense mutation in the cytoplasmic tail of b4 integrin, G931D, disrupts hemidesmosome assembly and underlies non-Herlitz junctional epidermolysis bullosa without pyloric atresia.

J Invest Dermatol 2000 (in press).

22. Akiyama M, Smith LT, Shimizu H:

Changing patterns of localization of putative stem cells in developing human hair follicles.

J Invest Dermatol 2000 (in press).

23. Hut PHL, Vlies PVD, Jonkman MF, Verlind E, Shimizu H, Buys CHCM, Scheffer H:

Exempting homologous pseudogene sequences from PCR amplification allows genomic keratin 14 hotspot mutation analysis.

J Invest Dermatol 2000 (in press).

24. Shimizu S, Chen K, Pratchyapruit W, Shimizu H:

Pao ferro-induced bullous erythema multiforme.

Dermatology 2000 (in press).

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）
分担研究報告書

家族性遺伝性疾患のBリンパ芽球様細胞株の樹立、及び各種疾患の発生メカニズム
に関する研究

分担研究者 孫田信一 愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所 遺伝学部長

研究要旨 我々は主に各疾患の患児（者）およびその家系由来のBリンパ芽球様細胞株の樹立を担当し、株化細胞の保存を進めた。また、搬送された検体から効率的に細胞株化する方法を検討し、搬送された検体から効率的な細胞株化を図った。今年度は遺伝性疾患等の30家系の検体から細胞株を樹立した。また、保存細胞の品質管理のための基礎的調査を実施した。細胞の長期保存にとって品質管理は重要である。さらに、収集した家族性遺伝性疾患等の症例について染色体を解析し、各種の染色体異常に関して発生メカニズムを明らかにした。

研究協力者 小野教夫
愛知県心身障害者コロニー発達
障害研究所遺伝学部 研究員
川本隆之
同遺伝学部 研究助手

A. 研究目的

家族性遺伝性疾患の患児（者）およびその家系由来の細胞及びDNAの保存は、原因遺伝子の解析や病態発現の解明にとって極めて有用であり、保存された検体に関する情報を集積して研究者に随時提供していくことは重要である。しかし、このようなネットワークは国内ではまだ十分に確立されていない。したがって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目的とした研究は意義がある。本研究班の中で、我々は種々の家族性遺伝性疾患のBリンパ芽球様細胞株化とその保存を実施してきた。また、遺伝子解析にとって貴重な研究材料となる臨床症状を伴う均衡型染色体構造異常症例に関する情報・検体の集積を試みている。さらに、家族性染色体異常症および遺伝性疾患については染色体解析を行い、DNA多型マーカー等を用いて連鎖解析による責任遺伝子座位の検索を目指して研究を進めた。

B. 研究方法

以下の計画、方法に沿って研究を実施した。
1) 家族性遺伝性疾患の情報収集・情報交換、

および検体集積のためのネットワーク構築をめざして、他の研究者と共同でこれらに関する諸問題を検討した。

2) 家族性遺伝性疾患の患児（者）およびその家系由来のBリンパ芽球様細胞の株化とその保存のための施設として受け入れ体制を整えた。各種遺伝性疾患および家族性染色体異常症の家系から得られる検体に関して、効率的な培養細胞株樹立法を確立し、検体の保存を進めた。

3) 集積した各遺伝性疾患家系に由来する細胞株の品質を管理し、解析研究に向けて各研究者へこれらに関する情報提供を行なう。

4) 染色体構造異常の症例に関して発生メカニズムの解析を行う。患児および両親由来の末梢血DNAを用いて、各構造異常関わる染色体各部について、マイクロサテライト多型によりその由来を分析する。各染色体の起源については、患児の細胞とマウス変異細胞株との雑種細胞を作製して個々の染色体だけを有するクローンを分離して解析する。

5) マイクロサテライト多型などを用いて、責任遺伝子が未知の遺伝性疾患家系の連鎖解析を試みる。また、原因や発症メカニズムの不明な遺伝性疾患（例：遺伝子変異の認められないRett症候群など）について片親性ダイソミーの関与などを解析する。

C. 研究結果

1) Bリンパ芽球様細胞株の樹立と保存
本研究班のネットワークをとおして集まった

検体から、特にBリンパ芽球様細胞株の樹立とその保存を担当した。本研究班で昨年度作成された検体収集・保存のマニュアルに沿って実施した。検体の採取方法や輸送方法には特に大きな問題はなかったが、特に産科領域における検体には事前の予測や計画的な採取の困難なものが多く、細胞保存の担当施設へ事前の通知がなく搬送されるケースがあった。株化に適する検体の保存期間は限られるので、保存日数が長くなるに従って株化の成功率は低下した。これまで主任・分担研究者から送付された家族性遺伝性疾患、染色体異常、及び流産等の患児（者）由来の30検体とその両親、同胞などの検体について、細胞株化を実施した。

2) 保存細胞の品質管理

長期保存のストックのいずれでも90%以上で細胞の増殖が認められ、保存期間と増殖率には必ずしも相関がなかった。これまでの調査で保存直前の培養状態を良好に維持することが保存後の増殖率に高くすることが判明した。検体独自の特性を失わない状態で保存するためには細胞株化の迅速化と品質管理は特に重要である。

3) 染色体異常の発生メカニズム解析

収集された染色体異常症例の中に、異常の起源やメカニズムが不明のものが含まれている。また、臨床像から染色体異常が疑われるが異常の見つからないものが存在する。これらの症例について、FISH法やマイクロサテライト多型解析を用いて各染色体の起源を精査し、発生メカニズムを検討した。

a) 染色体異常を示さない先天異常症例の染色体解析：特異な臨床症状から染色体異常の疑われる症例の中には、染色体に何ら異常の見つからないケースも多い。これらには、通常のパンドレベルでは検出できない極めて微細な欠失などを伴うもの、染色体の不活性化の異常を伴うものなどが含まれている可能性がある。臨床症状から関与する染色体領域が推測できる症例について部位に存在するマイクロサテライトの多型性を解析した。その結果、1例に染色体16の部分の片親性ダイソミーが認められた。このような異常が他にも存在する可能性があるため、調査を継続している。

b) de novoの染色体構造異常の起源と発生メカニズム：染色体異常のうち、de novoの構造異常を有する患児（者）、およびその両親の

末梢血由来の細胞からDNAを抽出し、それを用いて構造異常染色体の各領域にあるマイクロサテライトの多型を多くのプライマーを用いて解析し、染色体起源と発生メカニズムを検討した。これらの異常には染色体6と9の相互転座症例、染色体14と21、および13と21のロバートソン型転座症例（ダウン症候群）、染色体13どうしのロバートソン型転座症例（13トリソミー）などが含まれる。これらについて、構造異常染色体またはそれに関わる正常染色体をそれぞれ1個有する雑種細胞クローンを作製し、各構造異常の起源を調査した。本年度新たに解析した10例中の2例では、その構造異常染色体は母親と父親の両方の染色体起源であった。すなわち、第一体細胞分裂などにおいて雄核および雌核由来の染色体間で組み換えが生じて成立した異常であることが明らかになった。

4) 連鎖解析および異常メカニズム解析

Rett症候群家系の連鎖解析を実施してX染色体長腕にの責任遺伝子領域が推測されたが、最近MECP2遺伝子の変異によることが明らかにされた。そこで我々は遺伝子変異の認められない6家系由来のDNAを用いてMECP2遺伝子を含む領域およびXq端部のマイクロサテライト多型を解析したが、いずれにも染色体微小部分の欠失あるいは片親性ダイソミーを示唆する結果は得られていない。X染色体及び常染色体の他の領域のマイクロサテライトについて多型解析をさらに継続している。原因遺伝子が未知の他の遺伝性疾患家系についても連鎖解析によりその遺伝子座位の探索を目指した。

D. 考察

各種の家族性遺伝性疾患に由来する細胞やDNAの系統的な集積は、各疾患の病因及び病態発現のメカニズム研究にとって極めて有用である。特に、遺伝性疾患の中には極めて頻度の低いものがあり、広いネットワークをとおしてそれらの検体を集積し、研究に効果的に提供されるための「検体の集積・分配システム」の確立が重要である。この中で、我々が担当している各疾患由来のBリンパ芽球様細胞の株化と保存は永続的な細胞増殖を可能にするものであり、将来の研究に有用な研究材料を提供する。過去にも各研究班などでネットワーク構築が試みられてきたが、その構成範囲、活用期間、ネット

ワーク間の情報交換と情報公開など、多くの問題点が指摘される。本研究班では「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」を目指して、今年度も種々の問題点について検討してきた。我々が担当する細胞保存と染色体解析に関する点でみると、今年度は採取された検体が高施設に送付された情報がネットワークをとおして各研究者にも瞬時に伝わるようにメールシステムの改善が図られた。また、患者情報に解析結果を記載するファイルが新たに作成され、解析結果が担当者ばかりでなくネットワーク上の他の研究者も速やかに情報を得ることが可能になったことは大きく改良された点である。このネットワークは網羅する範囲と継続期間が重要であり、研究班終了後も諸機関からの支援を得てネットワークの維持を図る必要がある。

我々は当施設及び東海地区の医療機関に受診した各種の遺伝性疾患、各染色体異常症などの家系を中心に、患児（者）および家族の協力を得て20年前から細胞保存を実施し、保存細胞の研究への提供と共同研究を実施してきた。本研究班では、これらの技術と経験を活かして、さらに効率的な細胞保存システムの改良とネットワーク構築に向けて積極的に参加してきた。今年度も各分担研究者から送付された検体から細胞の株化と保存を進めてきた。

一方、ネットワークで集積された検体から具体的な研究成果を上げていくことが求められる。我々は他の研究者と共同で異常染色体の発生メカニズムについて解析してきた。また、集積された原因不明の遺伝性疾患家系由来の細胞を用いて連鎖解析から遺伝子解析への進展を図っているが、この点ではこれまで集積された検体数はまだ十分ではない。広範囲の検体収集を図るとともに、特定疾患をより重点的に集積することも必要である。次期の研究班ではさらに多くの研究解析グループを加えたネットワークの構築が必要になる。

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目指した本研究班の中で、我々は主に遺伝性疾患のBリンパ芽球様細胞株の樹立とその保存を担当した。搬送された検体から効率的に細胞株化する方法を

検討し、遺伝性疾患等の検体から細胞株の樹立と保存を図った。収集した家族性遺伝性疾患等の症例について染色体解析を実施し、異常の発生メカニズムを明らかにした。家族性遺伝性疾患の情報・検体の集積分配ネットワークの構築は今後の研究にとって極めて重要である。

F. 謝辞

マイクロサテライト多型解析のための多数のプライマーを分与いただいた東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター・中村祐輔教授に深謝申し上げる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hirano, S., Ono, T., Yan, Q., Wang, X., Sonta, S., Suzuki, A.T.: Protocadherin 2C: a new member of the protocadherin 2 subfamily expressed in a redundant manner with OL-protocadherin in the developing brain. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 260: 641-645, 1999.
- 2) Tetsuka, T., Uranishi, H., Imai, H., Ono, T., Sonta, S., Takahashi, N., Asamitsu, K., Okamoto, T.: Inhibition of nuclear factor kappa B-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split, a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. *J. Biol. Chem.* 275: 4383-4390, 2000.

2. 学会発表

- 1) 近藤裕子、生田克夫、鈴木 薫、孫田信一：マイクロサテライト多型による皮膚様嚢腫の細胞起源に関する研究。日本産婦人科学会（東京）1999. 4. 3.
- 2) 孫田信一、川本隆之、小野教夫、近藤裕子、月野隆一、大橋博文：マイクロサテライト多型を用いたヒト染色体異常の起源解析。日本先天異常学会（鹿児島）1999. 7. 15.
- 3) 孫田信一、川本隆之、小野教夫：相互転座ヘテロ接合体から発生する正常核型と均衡型転座の偏りに関する検討 日本人類遺伝学会（仙台）1999.11.17

H. 知的所有権の取得状況

該当事項なし

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム遺伝子治療研究事業)
分担報告書

先天性高アンモニア血症家系の調査に関する研究(その2)
分担研究者 遠藤 文夫 (熊本大学医学部 教授)

研究要旨 高アンモニア血症を生じる遺伝性代謝疾患のなかで、とくに先天性尿素サイクル異常症の家系の遺伝解析の中で、リジン尿性蛋白不耐症(リジン尿症)の遺伝子解析を行った。リジン尿症では、その責任遺伝子 SLC7A7 の変異を我が国の症例では初めて見出した。この変異はスプライス異常で第3イントロンの最初の塩基が G から A へ変異しているアレルと、イントロン6の最初の G が T へ変異しているアレルのヘテロ接合体であった。しかし、類似した臨床症状を示しながらこの遺伝子に変異を持たない症例も見出され、リジン尿症のなかに少なくとも2つの亜型が存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

リジン尿症は稀な常染色体性劣性遺伝性疾患で、乳幼児期から中等度の高アンモニア血症を示し、中枢神経障害を併発する。昨年度の研究では、この疾患の症例の解析と病態の解析を行い、責任遺伝子の単離を目指す方向での研究を進めた。その後、本疾患の責任遺伝子が単離されたので、我が国の患者の中で遺伝子解析の協力が得られた2家系での遺伝子解析を試みた。その結果1家系で2種の突然変異を見出した。また本研究ではリジン尿症の症例の病態解析を行い、重要な所見を得た。

B. 研究方法

リジン尿症については熊本、沖縄で発生した2症例について検討を行った。昨年までの検討で、リジン尿症患者ではアルギニンの静脈内投与に対する反応が異なることを見出していた。これらの結果から、リジン尿症には2種の病型が内在する可能性が示唆された。すなわち、アルギニンの静脈内投与によって高アンモニア血症が改善するタイプと、アルギニンの静脈内投与によって血中アンモニアが上昇するタイプに分けられる可能性を見出した。今年度の研究で遺伝子解析を行なったうち、8才の男児例(症例1)ではアルギニン静脈内投与に対して血中アンモニアは低下するタイプで、

もう一例の13才男児例(症例2)はアルギニン投与によって血中アンモニアは上昇し、臨床症状は悪化するタイプである。遺伝子解析では、SLC7A7 遺伝子のエクソン1からエクソン10までの領域を11のプライマーセットで増幅し、エクソン及びその周辺の塩基配列を決定した。

C. 結果

症例1ではふたつのアレルでそれぞれ疾患発症の原因になっていると考えられる突然変異が見出された。アレル1ではイントロン3の最初の塩基が G から A へ変異していた。アレル2ではイントロン6の最初の塩基が G から T へ変異していた。これにより双方のアレルとも、スプライス異常を来たすものと考えられた。しかし、今回は mRNA の検討までは進んでいない。

一方、症例2ではこれまでのところ疾患の原因と考えられる変異は見出されていない。

D. 考察

高アンモニア血症をきたす疾患の中で、これまでわが国には比較的稀とされてきたリジン尿症について我が国の症例で初めて遺伝子解析を進め、突然変異を明らかにした。2例の患者を検討した結果、1例はスプライス異常の複合ヘテロ

接合体であることが判明した。この症例は比較的軽症で、治療の結果、知的レベルもほぼ正常に保たれている。スプライス異常は通常軽症の変異と考えられているが、この症例でもスプライス異常の存在が比較的良好な経過をもたらしている可能性が示唆できた。しかし、この患者における発症様式をさらに詳細に検討するには mRNA の検討を進める必要があると考える。

症例2では遺伝子変異が見出されなかったことは重要な所見かもしれない。リジン尿症は単一の疾患とこれまで考えられてきたが、昨年度の研究で、病態の解析の結果2種の亜形が存在を示唆する結果を得ている。今後はこれまでわが国で同定されている症例での亜形の検索を進め、責任遺伝子 SLC7A7 の解析を進め、臨床症状とこの遺伝子の変異との関連を明らかにしたい。

E. 結論

原因不明の代謝疾患のなかで、異質性に富んだリジン尿症の解析は今後の課題であり、症例の集積と家系の解析を続ける必要がある。またこのほかの遺伝性高アンモニア血症に関しても、さらに家系の集積と病態解析を重ね、最終的には遺伝子解析によって発症様式を明らかに、予後の改善に結びつけたい。

F. 研究発表

- 1) Yamaguchi Y., Aoki T., Arashima S., Ooura T., Takada G., Kitagawa T., Shigematsu Y., Shimada M., Kobayashi M., Itou M., Endo F.: Mass screening for Wilson's disease: Results and recommendations. *Pediatrics International* 41:405-408,1999
- 2) Uchino T., Matsuda I., Endo F.: The long-term prognosis of congenital portosystemic venous shunt. *Journal of Pediatrics*. 135:254-256, 1999
- 3) Ikeda S., Sera Y., Ohshiro H., Uchino S., Uchino T. and Endo F.: Surgical indication for patients with hyperammonemia. *J. Pediatric Surgery* 34: 1012-1015, 1999

- 4) Ikeda S., Sera Y., Yoshida M., Izaki T., Uchino S., Endo F., Ohmuraya M. and Beppu T.: Successful coil embolization in an infant with congenital intrahepatic portosystemic shunts. *J. Pediatric Surgery* 34: 1031-1032, 1999
- 5) Ikeda S., Sera Y., Yoshida M., Ohshiro H., Uchino S., Seguchi S. and Endo F.: Reversibility of hyperintense globus pallidus on T1-weighted MRI following surgery for a portosystemic shunt in an 8-year-old girl. *Pediatr. Radiol.* 29:449-450, 1999
- 6) Shimadzu M., Matsumoto H., Matsuura T., Kobayashi K., Komaki S., Kiwaki K., Hoshide R., Endo F., Saeki T., and Matsuda I.: Ten novel mutations of ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. *Human Mutation Suppl* 1:5-7, 1998
- 7) Mardy S., Miura Y., Endo F., Matsuda I., Sztriha L., Frossard P., Moosa A., Ismail E. A.R., Macaya A., Andria G., Toscano E., Gibson W., Graham G.E. and Indo Y.: Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 1570-1579, 1999

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは 雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊行書店名	執筆者名
J Am Soc Nephrol., 11: 291-300 : A mouse model of renal tubular injury of tyrosinemia type 1: Development of de Toni Fanconi syndrome and apoptosis of renal tubular cells in Fah/Hpd double mutant mice	2000		Sun M-S., Hattori S., Kubo S., Awata H., Matsuda I, Endo F.
Pediatrics International, 41:405-408.: Mass screening for Wilson's disease: results and recommendations.	1999		Yamaguchi Y. Aoki T. Arashima S. Ooura T. Takada G. Kitagawa T. Shigematsu Y. Shimada M. Kobayashi M. Itou M. Endo F.
Journal of Pediatrics, 135:254-256: The long-term prognosis of congenital portosystemic venous shunt.	1999		Uchino T. Matsuda I. Endo F.
Journal of Pediatric Surgery, 34:1031-1032. Successful coil embolization in an infant with congenital intrahepatic portosystemic shunts.	1999		Ikeda S., Sera Y., Yoshida M., Izaki T., Uchino S., Endo F., Ohmuraya M., Beppu T
Journal of Pediatric Surgery, 34:1012-1015: Surgical indications for patients with hyperammonemia.	1999		Ikeda S., Sera Y., Ohshiro H., Uchino S., Uchino T., Endo F.
Neuroscience Letters, 266:13-16, : Immunohistochemical determination of the Wilson Copper-transporting P-type ATPase in the brain tissues of the rat.	1999		Saito T., Okabe M., Hosokawa T., Kurasaki M., Hata A., Endo F., Nagano K., Matsuda I., Urakami K., Saito K.
Pediatric Radiology, 29:449-450: Reversibility of hyperintense globus pallidus on T 1-weighted MRI following surgery for a portosystemic shunt in an 8-year-old girl.	1999		Ikeda S., Sera Y., Yoshida M., Ohshiro H., Uchino S., Seguchi S., Endo F.
Human Mutation. Suppl, 1:S5-7: Novel mutations of the ornithine transcarbamylase (OTC) gene in OTC deficiency.	1998		Shimadzu M., Matsumoto H., Matsuura T., Kobayashi K., Komaki S., Kiwaki K., Hoshide R., Endo F., Saheki T., Matsuda I.
American Journal of Human Genetics, 64:1570-1579 : Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor.	1999		Mardy S., Miura Y., Endo F., Matsuda I., Sztrihla L., Frossard P., Moosa A., Ismail EA., Macaya A., Andria G., Toscano E., Gibson W., Graham GE., Indo Y.
Kidney International 55:63-70 : Chloride channel CLCN5 mutations in Japanese children with familial idiopathic low molecular weight proteinuria.	1999		Nakazato H., Yoshimuta J., Karashima S., Matsumoto S., Endo F., Matsuda I., Hattori S.

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業）

分担研究報告

先天奇形症候群における染色体微細欠失の検索

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：1) 多発性骨癒合症候群患者で本症の責任遺伝子であるNog遺伝子を含む17q23内の潜在性微細欠失をFISH法で検出した。これは本症候群が同遺伝子のハプロイド不全で発症することを示す。2) 無虹彩症患者で11p13 (PAX6-WT1) 領域の欠失の有無をFISHで解析した。解析した12例中6例に欠失を検出した。欠失があった6例中、Wilms腫瘍発症例は3例、腎臓の嚢胞例1例、腎臓異形成1例であった。欠失がない患者にWilms腫瘍発生はなかった。11p13領域のFISH解析でWilms腫瘍発生リスクの予測が可能と考えられ、無虹彩症患者の定期的腹部エコー検査によるフォローアップを行う上での有益な情報になると思われる。

A. 研究目的

- 1) 均衡型染色体転座をもつ多発性骨癒合症候群症例の切断点のFISH解析：1999年に symphalangism/multiple synostoses syndrome においてNog遺伝子（17q23に座位）の変異が報告された（報告の7例全てがmissense mutation）。均衡型染色体転座 t(10;17)(p15;q23)を伴った symphalangism/multiple synostoses syndrome 患者について17q23領域の潜在性欠失の有無を検討した。
- 2) 無虹彩症患者でのWilms腫瘍発生予測のためのPAX6-WT1領域の欠失のFISH解析：無虹彩症は11p13に位置するPAX6遺伝子の変異や欠失を原因とする。無虹彩症患者の約1/3にWilms腫瘍を発生することが知られ、PAX6から隣接するWT1にまで欠失が及んだためと考えられる。無虹彩症患者でPAX6-WT1領域の欠失と腫瘍発生の関連をFISH法で検討する。

B. 研究方法

- 1) 多発性骨癒合症に、中等度の知的発達障害、性腺機能不全を認める22歳男児。均衡型染色体転座 t(10;17)(p15;q23)を認める。17q23に位置するNog遺伝子を含むBAC clone (112J9) を用いてFISHを行う。
- 2) 対象は無虹彩症の患者12人。11p13のPAX6-WT1領域に位置する4つのPAC clone (PAX6, D11S2163, PER, WT1; telomere側からの順番通り) を用いてFISHを行い、欠失の有無を検討する。

C. 結果

- 1) Nog遺伝子を含むBAC clone (112J9) のシグナルを認めず、17q23に潜在性の微細欠失が存在することが判明した。
- 2) 全てのcloneの分析は未完了だが、現段階では少なくとも12例中6例に11p13領域に欠失が存在することが判明した。6例中、Wilms腫瘍発症例は3例、腎臓の嚢胞例1例、腎臓異形成が1例であった。逆に欠失がない患者にWilms腫瘍発生は認められていない。

D, E. 考察および結論

- 1) symphalangism/multiple synostoses syndrome 患者でNog遺伝子を含む17q23領域の潜在性欠失を認めたことは、本症がNog遺伝子のハプロイド不全で発症することを示す。患者が付加的に有する知的発達障害と性腺機能不全はNog遺伝子に隣接する遺伝子の障害に起因する可能性が考えられる。17q23微細欠失の症状把握のために症例の蓄積が必要である。
- 2) 11p13領域のFISH解析で家室の有無を判定することは無虹彩症患者で定期的腹部エコーによるフォローアップを行う上で有益な情報になると考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表
武藤玲子、松嶋一成、三井規雅、大橋博文、森安弘、長 紹元。t(10;17)(p15;q23)を伴った指趾節骨癒合症の一例。第44回日本人類遺伝学会。平成11年11月、仙台。

平成 11 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 の病因遺伝子座は、FRDA の病因遺伝子座が存在する第 9 染色体以外の常染色体上に存在する可能性が高いことが明らかとなった。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 (FRDA) 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、家族性痙性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関分析 (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関分析 (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

我々は EOAHA と FRDA が臨床的類似点を有する点に注目し、EOAHA の病因遺伝子座を明らかにすることを目的に、第 9 染色体長腕の 14 種類のマイクロサテライト多型マーカーを用いて、連鎖解析を行うと同時に、FRDA の原因である "GAA" 3 塩基リピートの異常増大ホモ接合の有無を EOAHA において検討した。結果、Frataxin の "GAA" 3 塩基リピートについて異常増大は認められず、EOAHA は FRDA とは原因遺伝子を異にし、連鎖解析の結果も考え合わせると EOAHA の病因遺伝子座は第 9 染色体以外の常染色体上に存在する可能性が高いと考える。

ま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考ええる。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考える。

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。

EOAHA の病因遺伝子座は、FRDA の病因遺伝子座が存在する第 9 染色体以外の常染色体上に存在する可能性が高い。

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 愛知県名古屋市長瀬区瑞穂町字川澄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	06-6833-5012 06-6872-7486
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	06-6833-5012 06-6872-7486
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)	〒812-8282 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	06-6833-5012 06-6872-8100
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 愛知県名古屋市長瀬区瑞穂町字川澄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 北海道旭川市西神楽4線5号3-11	0166-68-2410 0166-68-2419
分担研究者 清水 宏	北海道大学医学部 (皮膚科)	〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目	011-716-1161 011-706-7820
分担研究者 孫田 信一	愛知県心身障害者ユニ (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
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