

表1 入院時の胎児超音波検査所見

頭部	大横径：8.1cm (mean+1.6SD)	
	周囲長：26.8cm (クローバー状頭蓋等の形態異常なし)	
胸郭	周囲長：17cm	
腹部	周囲長：22cm	
四肢長	右 (cm)	左 (cm)
大腿骨	2.4 (mean-5.2SD)	2.2 (mean-5.6SD)
脛骨	1.8	1.9
腓骨	1.7	1.5
上腕骨	1.8	1.9
尺骨	1.9	1.9
橈骨	1.7	1.7

表2 線維芽細胞成長因子受容体III遺伝子の構造と致死性骨異形成症における変異

	DNA 塩基配列		アミノ酸配列			
	位置	野生型	変異型	位置	野生型	変異型
①	742	C	T	248	Arg	Cys
②	746	C	G	249	Ser	Cys
③	1111	A	T	371	Ser	Cys
④	1118	A	G	373	Tyr	Cys
⑤	1948	A	G	650	Lys	Glu
⑥	2419	T	G	807	終始	Glu
⑦	2419	T	A	807	終始	Ser

本症例は①が認められた。

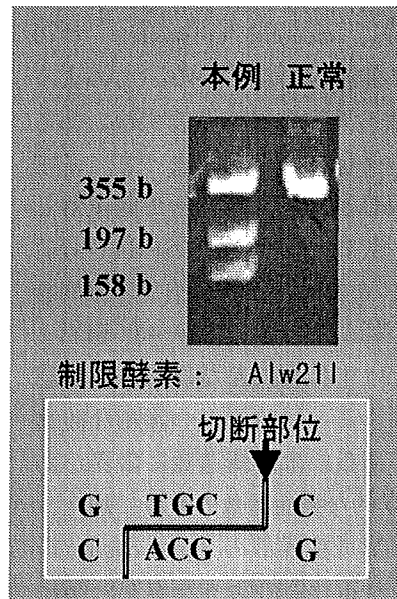
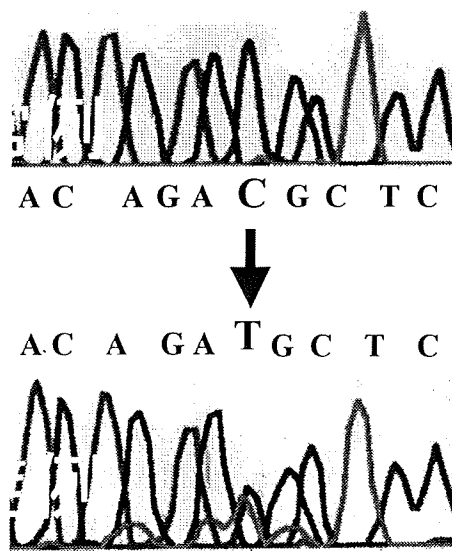


図1 線維芽細胞成長因子受容体・遺伝子の変異

# 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

家族性および先天性心筋疾患におけるカドヘリン分子の発現解析

分担研究者：下山 豊

国立大蔵病院臨床研究部

（研究要旨）家族性心筋症、乳児期心不全死亡および胎児水腫症例において、カドヘリン分子の分布異常あるいは発現異常が認められる例が発見された。これらにおいてはカドヘリン細胞間接着システムの異常が正常心筋組織の発生や構成に異常を引き起こし、それらが各疾患の発症に結びついている可能性が示唆された。

## A. 研究目的

カドヘリン分子群は組織・器官の発生・分化・維持において極めて重大な役割を果たしていると考えられ、その異常が様々な家族性遺伝性疾患の原因に成り得ると考えられる。今年度は家族性心筋症、乳児期心不全死亡および胎児水腫における心筋不全とカドヘリン分子との関連の解析を目的とした。

## B. 研究方法

昨年度までに作製したカドヘリン分子に対する特異的抗体などを用いて、家族性心筋症、乳児期心不全死亡、胎児水腫および各対照症例剖検例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を免疫組織化学的に染色し、各疾患におけるカドヘリン発現異常を検索した。

（倫理面への配慮）研究に使用する臨床材料はすべてインフォームド・コンセントの得られた剖検病理組織を使用した。

## C. 研究結果

まず、正常例（対照症例）の染色結果により、正常心筋において発現されているカドヘリンは、N-カドヘリン、カドヘリン-13 および P-カドヘリンであり、特に前二者が主体であることが明らかとなった。N-カドヘリンは胎生初期より心筋細胞に強く発現され、乳児期以降にはほとんどが介在板に濃縮していた。カドヘリン-13 も胎生初期より心筋細胞に強く発現されていたが、細胞膜に様に分布し、特定の領域への濃縮は認められなかった。家族性拡張型心筋症 4 例、家族性肥大型心筋症 4 例を検索したところ、前者 1 例および後者 2 例に明らかな N-カドヘリン分布異常、すなわち、“介在板への濃縮が減弱かつ細胞膜への分布移行が増加”が認められた。一方、非家族性心筋症 8 例、う

っ血性心不全 8 例、正常 8 例では同様の分布異常は認められなかった。家族性心筋症にはカドヘリン-13 の発現異常は認められなかった。乳児期心不全死亡症例 3 例および胎児水腫（心筋障害が疑われるもの）3 例においては、前者 1 例で心筋細胞における N-カドヘリン発現の減弱、後者 1 例でカドヘリン-13 発現のほぼ欠損が認められた。

## D. 考察

N-カドヘリンは介在板に濃縮して心筋細胞間の接着を強化し、心筋組織および機能の恒常性に寄与していると考えられる。家族性心筋症においてその分布異常が認められたことは、これらの症例において N-カドヘリン細胞間接着システムに何らかの異常が存在し、N-カドヘリンと細胞骨格系との連結が不十分となり、さらに N-カドヘリンの介在板への濃縮が妨げられ、心筋細胞間接着の脆弱化から最終的に心筋症の発症をきたしたことが推測される。また、乳児期心不全死亡例および胎児水腫において N-カドヘリンあるいはカドヘリン-13 の発現減弱や欠損を示す症例が認められた。以上の研究結果より、これらカドヘリン分子が心筋組織の発生・分化・維持において極めて重大な役割を果たしているとともに、その異常が家族性、先天性心疾患を引き起こしている事例が存在することが強く示唆された。

## E. 結論

家族性心筋症のなかには N-カドヘリン細胞間接着システムの異常により惹起されるものが存在することが推定された。N-カドヘリンおよびカドヘリン-13 はいまだに原因が不明である先天性の心筋障害の原因遺伝子と成り得る可能性がある。

F.研究発表

1.論文発表

Shimoyama, Y., Tsujimoto, G., Kitajima, M. and Natori, M. Identification of three human type-II classic cadherins and frequent heterophilic interactions between different subclasses of type-II classic

cadherins. *Biochem. J.*, 349: 159-167, 2000.

2.学会発表 なし

G.知的所有権の取得状況

なし

分担研究者 由谷 親夫 国立循環器病センター臨床検査部長

研究要旨：ヒトの乳児心疾患剖検例において、心筋細胞の介在板に存在するカルシウム依存性細胞接着分子であるN-カドヘリンの分布を病理組織学的に検討する。

#### 研究目的

N-カドヘリンは、心筋細胞の介在板に存在し、心筋細胞の機械的結合に重要な役割を果たしていると考えられている。今回、左心室は正常の機能を有し、右心室に高度な機能不全および拡張を呈した乳児剖検例において、両心室心筋細胞のN-カドヘリン分布を検討することを目的とした。

#### 研究方法

対象は、病理組織学的に右室の高度異形成が認められた乳児剖検材料で、ホルマリン固定後、両心室横切面でのパラフィン切片を作製し、抗ヒト筋線維アクチン・マウスモノクローナル抗体、抗ヒトデスミン・マウスモノクローナル抗体、抗ウシビメンチン・マウスモノクローナル抗体、抗ヒトミオグロビン・ウサギポリクローナル抗体および抗ヒトN-カドヘリン・ポリクローナル抗体を用いて各々免疫染色を施行し、病理組織学的に検討した。

#### 研究結果

右心室は肉眼的にゼラチン様で、組織学的には正常に分化した心筋細胞が消失し、多形性細胞により置換されていた。同細胞は、筋線維アクチン、デスミン、ビメンチン、ミオグロビンに陽性で、筋原性由来と考えられた。また、左心室心筋細胞の介在板に一致して認められたN-カドヘリンは、右心室の筋原性由来多形性細胞には介在板への濃縮像が認められず、細胞膜への異常分布が認められた。

#### 考察

N-カドヘリンは、心筋細胞の介在板に存在し、心筋細胞の機械的結合に重要な役割を果たしていると考えられている。ニワトリの胎生期の心筋細胞培養の検討では、発生過程に伴って、細胞膜全周性に分布するN-カドヘリンが、介在板に集積し、収縮を開始する。また、カドヘリンは細

胞内領域においてカテニン分子と結合しており、カドヘリンの分布異常が認められた肺低分化腺癌培養株ではカテニンの遺伝子変異が同定されていることから、これら細胞骨格蛋白の異常により、カドヘリン分布異常が生じることが想定される。今回、同一個体において、正常の心機能を呈した左心室心筋細胞には、形態学的に心筋細胞の接合異常がなく、N-カドヘリンは介在板に濃縮しており、一方、高度な収縮能低下を呈し、組織学的に個々の心筋細胞が離開し、多形性を示した右心室心筋細胞には、N-カドヘリンの分布異常が認められたことから、介在板におけるN-カドヘリンの分布異常が、収縮能低下の一因である可能性が示唆された。また、今後、カドヘリンと結合する細胞骨格蛋白の異常についても検索を要すると考えられた。

#### 結論

高度な右室異形成を呈した右心室の心筋細胞にN-カドヘリンの分布異常が認められた。

#### 研究発表

学会発表：高度右室機能不全を呈し、剖検にて右室異形成が認められた1小児例．日本循環器学会第89回近畿地方会，2000．6.24，大阪

# 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業） 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  
-検体バンクの再整備とデータバンクとの連携-

分担研究者 種村 光代

名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室助手

## <研究要旨>

平成12年度は、まず周産期部門の一施設として症例の登録を継続した。システムについては、平成11年度までの臨床運用により、専用回線による通信の困難さやデータ入力や検体送付システムの煩雑さなどが明らかとなった。さらに、検体バンクとデータバンクの連携を図るためにもシステム設計の変更が必要となり、平成12年度には、旧システムをそのまま維持しつつ、問題点を改変したシステムを導入し、シュミレーション稼働を経て新システムへ移行した。新システムでは、症例情報の入力・閲覧に留まらず、ネットワーク上で、採取された検体の登録や保存、バンクへの検体送付指示、解析結果の入力を行うことが可能となった。EメールやFAXの送信指示も可能であり研究者間の連携がよりスムーズになっている。なお、検体バンクで保存されているサンプルの詳細についてもデータバンクに入力され、検体の管理が容易となった。本年度は、データバンク、検体バンクも整備され、セキュリティを重視したネットワークがほぼ完成した。

### A. 研究目的

1. 周産期部門の一拠点施設として症例登録を継続する。
2. 検体バンクの管理者として、新システムへの移行をスムーズに行い、検体バンクを再整備しデータバンクとの連携を図る。

### B. 研究方法

1. 当施設内での発生症例の登録のみならず、中部地区拠点施設として、他施設からの問い合わせ等にも応じて、積極的に症例の受け入れ、登録を図る。
2. 平成12年度には、旧システムをそのまま維持

しつつ、通信の困難さ、データ入力や検体送付システムの煩雑さなどの問題点を改変したシステムを導入し、シュミレーション稼働を経て新システムへ移行した。検体バンクのサンプル情報もデータバンクへ登録し、検体の保存や解析の進行状況がネットワーク上で検索できるようなシステムへの改変を目指し、安全で円滑なサンプルの管理、保全に努めた。

### C. 研究結果

1. 現在、ネットワーク全体で約170症例500検体がバンクに登録され、無脳症や全前脳胞症の遺伝子解析、流産や奇形症候群の染色体分析などが進

行している。なお、ネットワーク外の臨床施設より、当施設のような拠点周産期施設を經由した症例登録も始まりつつり、当科遺伝カウンセリング外来への紹介患者も増加している。

2. 新システムでは、症例情報の入力・閲覧に留まらず、ネットワーク上で、採取された検体の登録や保存、バンクへの検体送付指示、解析結果の入力を行うことが可能となった。EメールやFAXの送信指示も可能であり研究者間の連携がよりスムーズになっている。なお、検体バンクで保存されているサンプルの詳細<検体の内容、保存条件、解析担当者、現在地（どの施設にて解析中か）>についてもデータバンクに入力、閲覧することが実現し（検体バンク管理者のみ）、検体の管理が容易となった。

#### D. 考察

本年度は、データバンク、検体バンクも整備され、セキュリティを重視したネットワークがほぼ完成した。システムネットワーク上での検体情報の閲覧、管理も容易になった。しかし、参加希望施設の増加や検体種類の多様化もあり、専用回線の持続の困難さが明らかとなり、今後の運営にはインターネット利用の可能性についても検討してゆく必要がある。ネットワーク外の臨床施設からの症例問い合わせや患者紹介は少なくなく、本ネットワークのような総合遺伝診療システムの潜在的需要は大きいと推察された。

#### E. 結論

新システムによりデータバンク、検体バンクも整備され、セキュリティを重視したネットワークがほぼ完成した。研究事業期間の終了後も、権体バンクの管理・保全を図るとともに、本システムの運用を推進して、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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

種村光代, 鈴木薫: 家族性遺伝性疾患の解析のための情報・検体集積分配ネットワーク. 産婦人科の世界: 52(12); 93-104, 2000

##### 2. 学会発表

種村光代 (家族性遺伝性疾患解析のためのネットワーク構築に関する研究グループ, 名古屋市大他13 機関, 責任者: 鈴木薫): 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

種村光代, 鈴木薫: 家族性遺伝性疾患の情報・検体の集積分配ネットワークシステム. 第7回日本遺伝子診療学会大会, 2000

種村光代, 鈴木薫: 遺伝性疾患解析のための情報・検体の集積分配ネットワークの構築. 第36回日本新生児学会総会, 2000

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

研究要旨 福山型先天性筋ジストロフィー原因遺伝子FCMDのマウスホモログFcmdを単離し、この遺伝子がマウス第4染色体上にあることを明らかとした。さらに、作製したFcmd遺伝子欠損マウスの解析により、この遺伝子が胚発生に重要であること等を明らかとした。

#### A. 研究目的

マウスFcmd遺伝子変異マウスをジーンターゲット法により作製し、福山型先天性筋ジストロフィー発症のメカニズムをin vivoにて精査する。

#### B. 研究方法

マウスFcmd遺伝子のcDNA及びゲノミックDNAクローンを単離する。得られるcDNAよりanti-sense RNAプローブを調製し、マウス組織におけるFcmd遺伝子発現部位をin situ hybridizationにて検討する。また、マウスRadiation hybrid (RH) panelを用いて、マウスFcmd遺伝子の染色体上のマップポジションを決定し、既存の自然発生変異マウスのマップポジションと比較する。さらに、マウスFcmd遺伝子破壊用ターゲットベクターを作製し、Fcmd遺伝子座を不活性化したES細胞を樹立する。このES細胞より得られるキメラマウスの交配により、ヘテロ欠損マウスおよびホモ欠損マウスを作製し、その表現型を解析する。さらに、3'非翻訳領域を含むマウスFcmdゲノミックDNAクローンよりFcmd遺伝子3'非翻訳領域ターゲットベクターを構築し、Cre-loxPシステムにより、マウスFcmd遺伝子の3'非翻訳領域にヒトFCMD遺伝子3'非翻訳領域のレトロトランスポンを挿入した遺伝子改変マウスを作製する。

#### C. 研究成果

ヒトFCMD遺伝子の翻訳開始コドンを含むエクソン2をプローブとして、マウス脳由来cDNA libraryおよび129SvEvマウス由来cosmid libraryより、それぞれcDNAおよびゲノムDNAクローンを得た。マウスFcmd遺伝子は、翻訳領域において核酸レベルで87.5%、また、アミノ酸レベルでは89.6%と、ヒトFCMD遺伝子に高い相同性を示した。

anti-sense RNAプローブを用いたin situ hybridizationにより、Fcmd mRNAの分布をマウス胚で調べたところ、様々な組織でFcmd遺伝子のメッセージを検出できたが、中枢および末梢神経系において特に強い発現が認められた。

成熟マウスの脳においては、海馬のCA領域と歯状回、小脳のプルキンエ細胞層と顆粒層での発現が認められた。

また、RH panelを用いて染色体マッピングを行ったところ、マウスFcmd遺伝子はヒトFCMD遺伝子の存在する9q31のシンテニー領域にあたるマウス第4染色体上のDNAマーカーD4Mit272のテロメア側、約2 cRに位置することが明らかとなった。

ジーンターゲット法により作製されたFcmd遺伝子のF1ヘテロ欠損マウスは、見かけ上は正常であり、また、繁殖可能であった。このF1ヘテロ欠損マウス間の交配により得られるF2離乳マウスのgenotypingを行ったところ、ワイルドタイプマウス：ヘテロ欠損マウス：ホモ欠損マウス=35：62：0であり、ホモ変異マウスが胎生致死であることが明らかとなった。さらに、F2マウス胚のgenotypeを調べた結果、8.5日胚、9.5日胚、10.5日胚、13.5日胚で、ワイルドタイプマウス胚：ヘテロ欠損マウス胚：ホモ欠損マウス胚が、それぞれ8：13：2、24：34：2、2：7：0、14：27：0であった。

マウスFcmd遺伝子の3'非翻訳領域を含むマウスFcmdゲノミックDNAクローンの塩基配列を決定し、詳細な制限酵素地図を作成した。これをもとにloxP配列を組み入れた3'非翻訳領域置換ターゲットベクターを構築した。このターゲットベクターをマウスES細胞に導入し、相同組換えにより一方の遺伝子座が置換されたES細胞株を樹立した。

#### D. 考察

in situ hybridizationの結果より、マウス胚発生過程において、中枢および末梢神経系を含む様々な組織でFcmd遺伝子が機能していることが示唆された。さらに、Fcmd遺伝子のホモ欠損マウスは胎生8.5-9.5日前後に死亡することが明らかとなり、Fcmd遺伝子がマウスの胚発生に必須であることが示唆された。これらの事実は、ヒトFCMD遺伝子にノンセンス点変異を

ホモで持つ患者が、これまでのところ見つかっていない疫学的事実と合致するものである。

#### E. 結論

Fcmd遺伝子ホモ欠損マウスは胎生致死であり、この遺伝子のマップされたD4Mit272の近傍に、責任遺伝子がマップされている自然発生変異マウスの報告もないため、ヒトFCMD遺伝子3'非翻訳領域のレトロトランスポゾン挿入した遺伝子改変マウスの作製が、福山型先天性筋ジストロフィー発症メカニズムの解明に必要であると示唆された。そのレトロトランスポゾン挿入マウス作製は、その第1段階であるマウスFcmd遺伝子3'非翻訳領域へのloxP導入ES細胞株樹立の過程に至った。Fcmdホモ欠損マウス胚の詳細な病理組織学的解析ならびにレトロトランスポゾン挿入マウスの解析が、福山型先天性筋ジストロフィー発症の分子メカニズム解明の糸口になると期待される。

#### F. 研究発表

##### 論文発表

Jong YJ, Kobayashi K, Toda T, Kondo-Iida E, Huang SC, Shen YZ, Nonaka I, Fukuyama Y. Genetic heterogeneity in three Chinese children with Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 10:108-112, 2000

Toda T, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Sasaki J, Nakamura Y. The Fukuyama congenital muscular dystrophy story. *Neuromuscul Disord* 10:153-159, 2000

Toda T, Kobayashi K, Nonaka I. Congenital muscular dystrophies with special reference to the Fukuyama type. *Neurosci News* 3:39-45, 2000

Saito K, Osawa M, Wang Z-P, Ikeya K, Fukuyama Y, Kondo-Iida E, Toda T, Ohashi H, Kurosawa K, Wakai S, Kaneko K. Haplotype-phenotype correlation in Fukuyama congenital muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 92:184-190, 2000

Chadani Y, Kondoh T, Kamimura N, Matsumoto T, Matsuzaka T, Kobayashi O, Kondo-Iida E, Kobayashi K, Nonaka I, Toda T. Walker-Warburg syndrome is genetically distinct from Fukuyama type congenital muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 177:150-153, 2000

Villanova M, Mercuri E, Bertini E, Sabatelli P, Morandi L, Mora M, Sewry C, Brockington M, Brown SC, Ferreira A, Maraldi NM, Toda T, Guicheney P, Merlini L, Muntoni F. Congenital muscular dystrophy associated with calf hypertrophy, microcephaly and severe mental retardation in three Italian families: evidence for a novel CMD syndrome. *Neuromuscul Disord* 10:541-547, 2000

Asano Y, Minagawa K, Okuda A, Matsui T, Ando K, Kondo-Iida E, Kobayashi O, Toda T, Nonaka I, Tanizawa T. A case of Walker-Warburg syndrome. *Brain Dev* 22:454-457, 2000

Sasaki J, Ishikawa K, Kobayashi K, Kondo-Iida E, Fukayama M, Mizusawa H, Takashima S, Sakakihara Y, Nakamura Y, Toda T. Neuronal expression of the fukutin gene. *Hum Mol Genet* 9:3083-3090, 2000

Colombo R, Bignamini AA, Carobene A, Sasaki J, Tachikawa M, Kobayashi K, Toda T. Age and origin of the FCMD 3'-untranslated-region retrotranspositional insertion mutation causing Fukuyama-type congenital muscular dystrophy in Japanese population. *Hum Genet* 107:559-567, 2000

Kobayashi K, Sasaki J, Kondo-Iida E, Fukuda Y, Kinoshita M, Sunada Y, Nakamura Y, Toda T. Structural organization, complete genomic sequences, and mutational analyses of the Fukuyama-type congenital muscular dystrophy gene, fukutin. *FEBS Lett* 489:192-196, 2001



厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
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  
集収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。これまでの無脳症における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。市販のマーカーに加え、ウェブ上で得られた情報より約1センチモルガン間隔でマーカーを作成し計29マーカーで検索したが、遺伝子欠失は見いだせなかった。また、同領域に位置する候補遺伝子ZIC2のエクソンおよびプロモーターのシーケンシングをおこなったが、原因と考えられる塩基置換は見いだせなかった。また、致死性四肢短縮症が疑われた6症例のFGFR3遺伝子解析をおこなった。このうち4症例は日本人で最も多い248番目のアルギニンがシステインに置換する変異であった。この変異が無かった2症例は、それぞれ骨形成不全症Ⅱ型と軟骨異栄養症であることがわかった。

A. 研究目的

研究目的は以下の2項目である。

- ① 無脳症の原因遺伝子を同定する。
- ② 致死性四肢短縮症の解析

①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。

## ② に関して

本研究班のネットワークを利用して、致死性四肢短縮症の遺伝子解析をおこない、日本人における本症の遺伝子変異の実態を把握し、本ネットワークの有用性を検証する。

## 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 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)	D13S 156(HEX)
D13S 1265(FAM)	D13S 159(FAM)
D13S 1322(FAM)	D13S 1306(NED)
D13S 285(HEX)	D13S 170(HEX)
D13S 158(FAM)	D13S 173(FAM)
D13S 1241(FAM)	D13S 293(NED)

このプライマーセットに加え、可能性の高いと考えられた D13S159 から D13S293 の領域から、Mashfield Research Institute の情報から 17 個のプライマーセットを作成した。両親および

胎児の DNA を鋳型として遺伝子増幅し、Perkin-Elmer 社のシークエンサーで解析する。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。

### ③ 候補遺伝子 ZIC2 の遺伝子解析

候補遺伝子領域に存在する ZIC2 遺伝子は holoprocencephaly の原因遺伝子として単離されたもので、無脳症の候補遺伝子として、エクソンおよびプロモーター領域を解析した。

### ④ 致死性四肢短縮症の解析

本研究班のネットワークを介して紹介された致死性四肢短縮症が疑われた 6 症例の遺伝子解析をおこなった。これまでの報告例 (7 種類) をすべてカバーするプライマーセットを準備し、シークエンシングおよび制限酵素による多型検出により診断した。

### ⑤ 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 遺伝子欠失の検索

症例および両親の DNA を用いて、29 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。

### ② ZIC2 遺伝子の解析

エクソン 3 に存在するグリシンのコード

ン(GGT)が GGC となる 1266 番目の塩基置換を見つけたが、アミノ酸は変化しないサイレント変異であった。

### ③ 致死性四肢短縮症の解析

6 例の解析で、4 例は最も頻度の高い R248C の変異であった。残りの 2 例をこれまでの報告のあった塩基置換について解析したが、変異は見つからなかった。そのうち、1 例は生後、軟骨異栄養症であることがわかった。他の 1 例は症状から骨形成不全症の II 型と診断した。

## D. 考察

### ① 13q31.2-ter 領域の遺伝子欠失

今回、検出に使用した 29 種類のプライマーは 13q31.2-ter 領域を、約 1 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小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。今後のヒトゲノム計画で得られる知見を基に、戦略を見直すべきであると考えられる。

### ② ZIC2 遺伝子

ZIC2 は、この領域に遺伝子座位があり全前脳症(holoprosencephaly)の原因遺伝子の一部として知られている。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たが、今回の症例では塩基置換などは見つからなかった。少なくとも ZIC2 は今回解析した無脳症の原因であ

る可能性は低い。

### ③ 致死性四肢短縮症の診断

今回、診断した 6 例中 2 例は、典型例ではなく、あとで他疾患と診断された。従って、典型的な 4 例に関しては、同一の塩基置換であり、これまでのわが国での知見と一致するものであった。この変異は、羊水あるいは血液到着後、即日診断が可能で、確定診断を希望されても対応できることが分かった。

## E. 結論

無脳症の原因遺伝子を単離するために 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。今後のヒトゲノム計画から得られる知見の集積に期待したい。致死性四肢短縮症の遺伝相談、遺伝子診断、その後のフォローアップは問題なく進行し、本研究班のネットワークがうまく機能したと思われる。

## F. 研究発表

千葉伸一他. 第 13 番染色体上に存在する無脳症の原因遺伝子の検索. 日本人類遺伝学会第 45 回大会 (福岡)

厚生労働省研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

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 清水 宏 北海道大学大学院医学研究科皮膚粘膜病学分野教授

## 研究要旨

分担研究者の転任に伴い、新たに北海道において「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」によって紹介受診した重症型表皮水疱症家系を対象に、効率的に遺伝子変異同定を行えるようなシステムの構築を試みた。その結果新たに確立した遺伝子解析システムは効率的に機能し、北海道第一例目の重症型表皮水疱症の出生前診断を実施することができた。さらに重症型遺伝性皮膚疾患への遺伝子治療への応用に関する研究を開始した。

### A.研究目的

本年の研究は、分担研究者の転任により新たに北海道大学附属病院皮膚科に効率的な遺伝子解析システムを導入して先天性皮膚疾患の遺伝子変異の同定、phenotype-genotype correlation の解明、重症型遺伝性皮膚疾患の出生前診断を可能にするシステムを確立することにある。。

表皮水疱症は希少難治性疾患に指定されている。なかでも劣性栄養障害型と Herlitz 致死接合部型は最重症型であり、最も予後が悪い。常染色体劣性遺伝を示す両症はそれぞれ TypeVII collagen、Laminin 5 に対する遺伝子変異であり、その蛋白の欠損により水疱を形成し、現在有効な治療法がない。これら欠損蛋白を補充するべく遺伝子導入自家培養表皮シートを用いた治療に関する基礎研究を開始する。

### B.研究方法

本年の研究は、分担研究者清水らがすでに集積している症例に加えて、本研究グル

ープから紹介のあった患者を集積し、インフォームドコンセントに基づき、研究協力の同意を得られた患者のみを研究対象とする。また動物実験に関しては、北海道大学医学部の「動物実験に関する指針」に基づき実施する。

1)免疫学的解析：患者皮膚を基質として基底膜に対する各種モノクローナル抗体を用いて免疫蛍光抗体法を試行し、Conforcal Laser 走査型蛍光顕微鏡により欠損または減少蛋白を同定する。

2)超微構造学的解析：透過型電子顕微鏡により病変部の超微構造を明らかにして水疱形成部位を決定する。

3)分子生物学的解析：患者 DNA を解析し遺伝子変異を同定する。

以上により、phenotype-genotype correlation を解明する。

4)出生前診断：重症型家族性遺伝性皮膚疾患の遺伝子変異をもつ両親からの胎児に対し、胎児 DNA を用いて遺伝子解析を行い、出生前診断を試行する。

4)動物実験系を用いて遺伝子導入予備実験を行う。naked DNA の局注、gene gun、electroporation など種々遺伝子導入方法を行い、皮膚への最も効率的な遺伝子導入方法を検討する。

### C.研究結果

1)2000年7月に Herlitz 致死接合部型表皮水疱症のリスクを伴う妊娠に対して、上記の計画にて確立した遺伝子診断法に基づき、胎児 DNA を用いた出生前診断を施行した。検索の結果胎児は genetically normal で妊娠を継続、2001年1月に男児を出産、clinically normal であった。

2)効率的な遺伝子導入方法を検討するため、緑色蛍光蛋白を発現する GFP gene を naked で hairless rat 真皮浅層に局注し経時変化を観察した。注入遺伝子は特異的に表皮細胞に導入され、緑色蛍光により導入遺伝子による蛋白発現が確認された。表皮に導入された遺伝子による GFP 蛋白は短時間に消失し継続的な発現を維持するには至っていない。

### 3)研究結果補足

2000年1月北海道大学附属病院皮膚科に皮膚科遺伝相談外来を新たに設立した。

2000年4月北大倫理委員会により、「重症型遺伝性皮膚疾患の出生前診断」の承認を受ける。

2000年10月北大倫理委員会により、「培養表皮シートを用いた遺伝子治療」の承認を受ける。

### D.考察

本研究により、妊娠早期に正確な DNA レベルによる出生前診断を可能にし、妊婦の

精神的、肉体的負担を大きく和らげることが可能となった。遺伝子導入実験に関しては、注入遺伝子が特異的に表皮細胞に導入され蛋白の発現が確認されたが、その機序は不明であり、また発現蛋白は早期に消失することから持続的な蛋白発現にも課題が残る。

### E.結論

本研究により、家族性遺伝性疾患の症例が効率よく集積・分配されることにより DNA レベルの解析がなされ、皮膚科領域においても重症型表皮水疱症の原因の解明、治療が進むものと考えられた。

### G.研究業績 (2000年以降抜粋)

1. Kurose K, Mori O, Hachisuka H, **Shimizu H**, Owaribe K, Hashimoto T:  
Cultured keratinocytes from plectin/HD1-deficient epidermolysis bullosa simplex showed altered ability of adhesion to the matrix.  
J Dermatol Sci in press.
2. Akiyama M, Amagai M, Smith LT, Hashimoto K, **Shimizu H**, Nishikawa T:  
Epimorphin expression during human fetal hair follicle development.  
Br J Dermatol in press..
3. Sato-Matsumura KC, Matsumura T, Kobayashi H, Fujimoto K, Itoh T, Shimizu M, **Shimizu H**:  
Marked swollen erythema of the face together with sicca syndrome as a sign for chronic active Epstein-Barr virus infection.  
Br J Dermatol in press.
4. Ajithkumar DD, George S, Chandi SM, Thomas PP, Kawahara Y, Amagai M, **Shimizu H**:  
Epidermolysis bullosa acquisita with IgM nephropathy.  
Clin Exp Dermatol in press.
5. 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 in press.

6. Akiyama M, Takizawa Y, Kokaji T, **Shimizu H**: Novel mutations of TGM1 in a child with congenital ichthyosiform erythroderma. Br J Dermatol in press.
7. Nonaka S, Ishiko A, Masunaga T, Akiyama M, Owaribe K, **Shimizu H**, Nishikawa T: The extracellular domain of BPAG2 has a loop structure in the carboxy terminal flexible tail in vivo. J Invest Dermatol 115:889-892, 2000.
8. Hakuno M, **Shimizu H**, Akiyama M, Amagai M, Wahl JK, Wheelock MJ, Nishikawa T: Dissociation of intra- and extracellular domains of desmosomal cadherins and E-cadherin in Hailey-Hailey disease and Darier's disease. Br J Dermatol 142:702-711, 2000.
9. Masunaga T, **Shimizu H**, Matsui C, Aozaki R, Morohashi M, Yasumoto S, Nishikawa T: LAMB3 gene transfection into SV40-transformed keratinocytes from patient with Herlitz junctional epidermolysis bullosa. Arch Dermatol Res 292:195-197, 2000.
10. 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.
11. 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 114:616-619, 2000.
12. 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 114:1061-1064, 2000.
13. Akiyama M, Smith LT, **Shimizu H**: Changing patterns of localization of putative stem cells in developing human hair follicles. J Invest Dermatol 114:321-327, 2000.
14. Akiyama M, Smith LT, **Shimizu H**: Expression of transglutaminase activity in developing human epidermis. Br J Dermatol 142:223-225, 2000.
15. Takizawa Y, Kato S, Matsunaga J, Aozaki R, Tomizawa Y, Nishikawa T, **Shimizu H**: Electron microscopic DOPA reaction test for oculocutaneous albinism. Arch Dermatol Res 292:301-305, 2000.
16. 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 42:1051-1066, 2000.
17. Takizawa Y, Hiraoka Y, Takahashi H, Ishiko A, Yasuraoka I, Hashimoto I, Aiso S, Nishikawa T, **Shimizu H**: Compound Heterozygosity for a point mutation and a deletion located at splice acceptor sites in the LAMB3 gene leads to generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. J Invest Dermatol 115:312-316, 2000.
18. Zillikens D, Ishiko A, Jonkman M, Chimanovitch I, **Shimizu H**, Hashimoto T, Broker E-B: Autoantibodies in anti-p200 pemphigoid stain skin lacking laminin 5 and type VII collagen. Br J Dermatol 143:1043-1049, 2000.
19. Takizawa Y, Pulkkinen L, Chao S-C, Nakajima H, Nakano Y, **Shimizu H**, Uitto J: Complete Paternal Uniparental Isodisomy of Chromosome 1: A Novel Mechanism for Herlitz Junctional Epidermolysis Bullosa. J Invest Dermatol 115:307-311, 2000.
20. Ishii K, Amagai M, Ohata Y, **Shimizu H**, Hashimoto T, Ohya K, Nishikawa T: Development of pemphigus vulgaris in a patient with pemphigus foliaceus: Antidesmoglein antibody profile shift confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay. J Am Acad Dermatol 42:859-861, 2000.
21. Shimizu S, Chen K, Pratchyapruit W, **Shimizu H**: Tropical-wood-induced bullous erythema

multiforme.

Dermatology 200:59-62, 2000.

22. Nagasaka T, Tanaka M, Ito D, Tanaka K,  
**Shimizu H:**

Protean manifestations of lipoid proteinosis in a 16-year-old boy.

Clin Exper Dermatol 25:30-32, 2000.

23. 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.

24. Murata T, Masunaga T, **Shimizu H**, Takizawa Y, Ishiko A, Hatta N, Nishikawa T:

Glycine substitution mutations by different amino acids in the same codon of COL7A1 lead to heterogeneous clinical phenotypes of dominant dystrophic epidermolysis bullosa.

Arch Dermatol Res 292:477-481, 2000.

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室長

研究要旨 本研究班のネットワークをとおして、全国の研究・医療機関より搬送された家族性遺伝性疾患の患児（者）及びその家族より提供を受けた検体からBリンパ芽球様細胞株を樹立し、株化細胞の保存を行った。また、遺伝性疾患の患者とその家族の抹消血から簡便で効率的な細胞株化方法の開発を図った。今年度は遺伝性疾患等の家系由来の46検体から細胞株を樹立し保存した。また、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、各種染色体異常の発生メカニズムを明らかにした。さらに、染色体異常を示さない自然流産の原因についてマイクロサテライト多型解析などを用いて引き続き検討した。

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

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の検索を目指した。

B. 研究方法

以下の計画、方法に沿って研究を実施した。

1) 遺伝性疾患の患児（者）家系由来のBリンパ芽球様細胞の株化とその保存：本研究班において家族性遺伝性疾患の患児（者）及びその家族由来のBリンパ芽球様細胞の株化とその保存を行う中心施設として、全国の研究・医療機関から輸送された検体の受け入れ体制を整えて実施した。各種遺伝性疾患の家族から協力を得て収集される検体に関して、効率的な細胞株化の方法を確立し、株化細胞の保存を進めた。

2) 保存細胞の品質管理：集積した各遺伝性疾患家系に由来する検体から樹立した細胞株の品質を管理し、解析研究を担当する各研究者にこれらに関する情報提供を行なった。

3) 染色体構造異常の発生機序の解析：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。さらに、臨床症状から染色体異常が疑われたが異常の見つからないものも存在する。我々は異常の判明した症例について、FISH法やマイクロサテライト多型解析を用いて各染色体異常の起源を精査し、発生メカニズムの解明を図った。各染色体の起源については、患児の細胞とマウス変

A. 研究目的

家族性遺伝性疾患の患児（者）及びその家族より提供された検体から、株化細胞及びDNAとして保存することは、原因遺伝子の解析、病態発現の解明、治療及び予防法の開発にとって極めて有用である。このような研究材料を系統的に保存し、それらの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ためのネットワークの構築は重要である。しかし、このようなネットワークは限られた目的のものや一部のグループにおいて作られたものが多く、広く情報を提供するものは国内ではまだ確立されていない。「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」を目指した本研究班では、系統的な検体の収集と検体に関する情報を研究者に随時提供していくためのネットワークが形成された。我々は、本研究班の中で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・検体の集積を試みた。さらに、家族性染色体異常症及び遺伝性疾患については



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した。異常のみつからない症例については、片親性ダイソミーの関与、インプリントの異常、不活性化の異常の有無を検討した。

4) 原因不明の遺伝性疾患家系の連鎖解析及びインプリントの解析：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症候群非典型例など）について片親性ダイソミーの関与などを解析した。

5) 遺伝性疾患の情報集積に関わる諸問題の検討：家族性遺伝性疾患の情報及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。特に、検体保存グループとしての問題点、改良された検体登録システムにおける解析グループから検体ファイルへの解析結果書き込み等の問題について検証した。

## C. 研究結果

### 1) 遺伝性疾患の家族由来のBリンパ芽球様細胞の株化と保存

本研究班のネットワークをとおして集まった検体のうち、特にBリンパ芽球様細胞株、及び繊維芽細胞初代培養の樹立とその保存を担当した。本研究班で既に作成されている検体の収集・保存マニュアルに沿って実施した。抹消血等から高い細胞株化率を得るためには許容保存期間は限られる。すなわち、輸送に要する日数が長くなるに従って株化の成功率は低下するため、輸送日数の短縮化を検討した。これまで主任研究者及び各分担研究者から輸送された遺伝性疾患等の患児（者）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。また、自然流産とその夫婦由来の検体についても保存を行った。本年度は46検体由来のBリンパ芽球細胞株を保存した。

### 2) 各遺伝性疾患家系に由来する細胞株化簡便法の検討

採取された抹消血から、通常はリンポプレブ (Lymphoprep, Nycomed Pharma AS) を用いてリンパ球を遠心分離し、EBウイルスを吸着後24穴プレートにて培養する。通常は2～3週以内に十分な増殖が得られるので、それ

らの細胞を液体窒素中に保存する。しかし、検体によっては当初増殖がほとんど見られず、株化に8週以上を要する場合もあった。このように増殖力が弱く株化に相当の日数を要するものには、輸送期間が長く、保存状態のよくない検体が多数含まれていた。また、胎児血の場合のように試料が極めて微量のものについては、遠心分離等の操作を省略し、全血にEBウイルスを吸着させて形質転換を図った。培養開始後の培養液等の適宜交換などを工夫することにより、高率に株化に成功した。

一方、長期保存されたストックのいずれでも高率に細胞の再増殖が認められ、保存期間と増殖率は必ずしも相関がないこと、保存直前の培養状態を特に良好に保つことが保存後の増殖率を高くすることが判明している。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) 染色体構造異常症例の発生メカニズムの解析

特徴的な臨床症状を示し明らかに染色体異常が疑われる症例の中に、染色体に何ら異常の見つからないケースがある。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。その臨床症状から関与する染色体領域が推測できるものではその染色体のマイクロサテライト多型性を利用して染色体起源を解析した。その結果、小顎症、人中突出、瞼裂狭小などの特異な顔貌と、胸郭狭小、肋骨の変形などを呈し、中等度から重度の精神運動発達遅滞を示す1例に染色体14の父親性ダイソミーが認められた。特徴的な異常を伴う症例の中に、このような片親性ダイソミーが他にも存在する可能性があるため、調査を継続してきた。

de novoの染色体構造異常については染色体異常の起源と発生メカニズムを検討した。構造異常を有する患児（者）及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多数のマイクロサテライトの多型を各プライマーを用いて解析し、染色体異常の起源を検討した。染色体4と22の相互転座、染色体13どうしのロバートソン型転座（13トリソミー）、染色体14と21、及び21と21のロバートソン型転座（ダウン症

候群)などの各症例について解析した。患者由来の細胞とマウス変異株の雑種細胞を作製し、各構造異常染色体、または構造異常に関わる正常染色体をそれぞれ1個だけ有する細胞クローンを分離し、各染色体上にあるマイクロサテライトの多型解析により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1例の構造異常染色体は、母親と父親の両方の染色体成分を有していた。このことは第一体細胞分裂において雄核及び雌核由来の染色体間の組み換えにより成立した異常であることを示す。これまでの起源解析による調査を総合すると、このようなタイプの異常がある程度の頻度で存在することを示唆した。

#### 4) 連鎖解析及びインプリントの解析

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報告された。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遺伝子を含む領域及び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なかった。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。

#### 5) 家族性遺伝性疾患の検体・情報集積に関する諸問題の検討

家族性遺伝性疾患の検体・情報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てきた。特に検体提供者の人権とプライバシー保護を最優先にした情報の管理が重要である。このようなネットワークの継続が今後の研究に極めて重要になることが確認された。

### D. 考察

我々は当施設及び中部地区の医療機関に受診した各種遺伝性疾患、染色体異常症などの家系を中心に、患児(者)及び家族の協力を得て20数年前から細胞株化とその保存を実施し、これらの保存細胞を広く研究者へ提供してきた。本研究班では、これらの細胞株化・保存の技術と経験を活かして、さらに効率的な細胞株化・

保存システムの改良を図り、「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」に積極的に参加してきた。我々が担当してきた各疾患由来のBリンパ芽球様細胞の株化と保存は、DNAだけでは解析が困難な領域(例えばRNAや蛋白合成系の解析等)などで、将来の研究に有用な研究材料を提供するものである。

我々はネットワークで集積された検体から他の研究者と共同で異常染色体の発生機序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座位の解析を図ってきたが、このネットワークをとおして集積された検体数はまだ十分な数ではない。さらに広範囲で多数の検体収集を図るとともに、目的を狭め特定疾患について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を期待したい。

各種の遺伝性疾患に由来する細胞やDNAの系統的な集積は、これら疾患の原因遺伝子及び病態発現メカニズムの研究にとって極めて有用である。言うまでもなく、遺伝性疾患の中には発生頻度が極めて低いものが多く存在し、広範な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は重要である。しかも、これらのネットワークが特定の組織だけなどに利用されるのではなく、多くの研究者に利用されることが重要である。勿論、ネットワークには患者の個人情報絶対に漏れることがなく、患者のプライバシーや人権は完全に守られなければならないことは言うまでもない。我々の研究班の今回の試みはこの点についても十分配慮し試行錯誤しながら実施してきた。我々は情報ネットワークについては検体の染色体解析結果等の情報提供を担当したが、情報の入力及び管理等について十分に機能していたと思われる。我々が担当する細胞保存に関する点からみると、採取された検体が他施設に送付された場合の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と、ネットワーク上の研究者すべてに解析結果に関する情報が速やかに伝達されるようになり、有効に利用されるようにな

ると思われる。

これまでも他の研究班などでネットワーク構築が試みられてきたが、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ている。「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」を目指した本研究班では、種々の問題点について検討して徐々に活用段階へと発展してきた。このようなネットワークは網羅する範囲と継続期間が重要であり、本研究班の成果が次のさらに発展したネットワークへと引き継がれることを期待したい。

#### E. 結論

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行った。また、提供された遺伝性疾患等の検体から簡便で効率的な細胞株化法を検討し、検体から高い率で細胞株化に成功した。収集された家族性遺伝性疾患等の症例について一部染色体解析を実施し、異常の発生機序を明らかにした。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充実と発展は今後のヒトゲノム研究及びヒト疾患の病態解明の研究にとって極めて重要である。

#### F. 謝辞

本研究に用いた多数のマイクロサテライト多型解析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) 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) Sonta, S., Kondo, Y., Suzumori, K., Kawamoto, T.: Mechanism of malsegregations at meiosis: premature centromere

separation and precocious division in female Chinese hamsters stimulated with gonadotropic hormones. *Cong. Anom.* 40:162-168, 2000.

##### 2. 学会発表

1) 山田裕一、三浦清邦、熊谷俊幸、黒澤健司、谷口寛子、孫田信一、若松延昭：レット症候群（RIT）におけるMECP2遺伝子の変異。日本生化学会、2000.10.12（横浜）。

2) 若松延昭、山田裕一、小野教夫、山田憲一郎、谷口寛子、鬼頭浩史、野村紀子、武藤宣博、山中 勲、孫田信一、長屋昌宏：Hirschsprung病、知的障害、てんかん、特異な顔貌を呈する患者の病因遺伝子の解析。日本生化学会、2000.10.12（横浜）。

3) 種村光代、鈴木薫、千葉喜英、名取道也、石川睦男、佐藤昌司、孫田信一、神崎徹、宇津正二、西島光茂、川籒一郎、松田義雄、久保隆彦、村越毅、篠原康一、福島明宗：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。日本人類遺伝学会、2000.10.25（福岡）。

4) 山田憲一郎、鬼頭浩史、山田裕一、谷口寛子、孫田信一、加藤兼房、乾俊夫、足立克仁、河合尚臣、若松延昭：R760Xのナンセンス変異を有する成人型 $\alpha$ -マンノシドーシス患者の $\alpha$ -マンノシダーゼ蛋白の解析。日本人類遺伝学会、2000.10.25（福岡）。

5) 孫田信一、西尾公男、三輪恭裕、犬飼和久、小野教夫：片親性14ダイソミーの染色体起源解析。日本人類遺伝学会、2000.10.26（福岡）。

6) 山田裕一、三浦清邦、熊谷俊幸、早川知恵美、山中 勲、宮崎修次、黒澤健司、谷口寛子、孫田信一、若松延昭：日本人レット症候群におけるMECP2遺伝子変異。日本人類遺伝学会、2000.10.26（福岡）。

7) 孫田信一、西尾公男：片親性ダイソミー、発生機序と臨床への関わり。遺伝性疾患の生殖遺伝学研究会、2000.12.16（名古屋）。

#### 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

先天性無痛無汗症の家系に関する研究

分担研究者 遠藤 文夫 (熊本大学医学部 教授)

**研究要旨** 先天性無痛無汗症(CIPA: MIM256800)は温痛覚欠損、発汗障害、精神遅滞を特徴とする常染色体性劣性遺伝性疾患である。この疾患の責任遺伝子は染色体 1q21-22 に位置する神経成長因子(NGF)のチロシンキナーゼ型受容対遺伝子 TRKA である。本研究において、日本人 24 家系について遺伝子変異を明らかにした。また多型解析も行い日本人患者に特徴的なハプロタイプを見出した。これら情報は遺伝子診断の基盤を確立する上で重要である。

#### A. 研究目的

先天性無痛無汗症(CIPA: MIM256800)は温痛覚欠損、発汗障害、精神遅滞を特徴とする常染色体性劣性遺伝性疾患である。温痛覚を欠損しているために四肢末端の外傷や自傷行為が絶えず、長期間経過することにより悲惨な状況が生じる。この疾患の診断はこれまで臨床的な特徴に頼るしかなく、出生前診断も不能であった。共同研究者の犬童康弘らはこの疾患の責任遺伝子を最近初めて明らかにしたが、遺伝子解析により遺伝子診断への道が開かれた。そこで本研究においては日本人患者家系の解析を行い、その遺伝子変異を明らかにするとともに、ハプロタイプの解析を行い、確度の高い遺伝子診断を可能にする事をめざした。それにより出生前診断を含めた診断技術の向上をはかることを目的とした。

#### B. 研究方法

日本人 CIPA 24 家系を研究対象とした。CIPA の診断は臨床所見と病理組織を含む臨床検査所見により行った。これらの家系の中で両親が血族結婚であったのは 5 家系あった。原則として CIPA 患者とその両親を解析対象としたが、2 家系では患者 DNA が得られず、両親の遺伝子解析だけを行った。また別の 2 家系では

両親の DNA が得られず、患者の遺伝子解析だけを行った。末梢血から DNA を単離し、遺伝子解析に用いた。TRKA 遺伝子の構造はすでに明らかにされている。それによるとエクソン数は 17 個で全長約 23 kbp であり、エキソン-イントロン結合部位の塩基配列も明らかにされている。そこで、これらの情報にもとづき各エクソンを増幅し塩基配列を決定した。スプライス異常が疑われた症例ではエキソントラップ法によって異常なスプライスの存在を確認した。なお塩基配列は ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いた決定した。

#### C. 結果

日本人 24 家系 48 染色体の解析によって 13 種の変異を明らかにした。このうちスプライス異常は 1 種、ミスセンス変異は 5 種、フレームシフト変異は 4 種、ナンセンス変異は 3 種であった。

フレームシフト変異のひとつである R548 fs (cDNA 塩基番号 1726 C の 1 塩基欠失) はもっとも頻度が高く、24 染色体で見いだされた。次に多かったのはスプライス異常で 5 染色体、またミスセンス変異 D668Y は 4 染色体でみられた。