

出生前における遺伝性疾患の遺伝子診断

小須賀基通 奥山虎之

◎遺伝子検査によって診断可能な遺伝性疾患が増加するにつれ、出生前診断が可能な胎児の遺伝性疾患も増加してきている。しかし、出生前遺伝子検査が可能な遺伝性疾患の多くは出生前や出生直後に行うことのできる有効な治療がないため、検査の適応と結果の取扱いにはより慎重な態度が必要とされる。妊娠前半期に行われる出生前の遺伝子診断の適応については、疾患の重篤度、治療方法の有効性、診断の精度、夫婦および夫婦を取り巻く環境などを考慮して十分な遺伝カウンセリングの後に決められるべきである。現在、遺伝性疾患に対する遺伝子治療や細胞治療などの先端医療と、安全で精度の高い遺伝子検査技術の研究開発が急速に進んでいる。したがって、将来的には早期の治療を前提とした遺伝性疾患の出生前診断が増えってくるものと思われる。

Key word 遺伝子診断, 羊水検査, 絨毛検査, 胎児治療

● 遺伝性疾患の遺伝子診断

近年、多くの遺伝性疾患の責任遺伝子が同定されると同時に遺伝子変異の検出法の開発が進み、染色体やヒト DNA を用いた遺伝子診断は飛躍的な進歩を遂げている。さらに、その技術は胎児の遺伝性疾患の診断にも応用されるようになった。出生前の遺伝子診断の適応となる疾患については日本産婦人科学会¹⁾や日本人類遺伝学会²⁾ではそれぞれガイドラインを公表し、これに準拠して出生前診断における遺伝子診断を行うことを提言している。

出生前に遺伝子検査を行う場合、発端者の病名が明らかになっているだけでは十分ではなく、遺伝子変異部位が同定されているか、診断に利用できる遺伝子多型が明らかになっていることが必要である。胎児の染色体や DNA を採取するためには、一般に羊水検査と絨毛検査が行われる。羊水検査は妊娠 15~18 週に行われ、羊水細胞を 2~3 週間培養してから染色体検査や遺伝子検査を行うため、最終的な結果が得られるまでに時間がかかることが多い。近年、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法が開発され、臨床の現場でも使わ

れている。分裂中細胞を得るための培養の必要がないため短時間で結果が得られ、性の判別、トリソミー型の染色体異常や一部の隣接遺伝子症候群の診断に有用である。さらに spectral karyotyping (SKY) 法は分裂中期細胞を用い、蛍光色素によってヒト 24 種類の各染色体を異なった色調で検出

サイド
メモ

胎児治療

今日の医療技術の進歩は胎児の出生前診断を可能にただけでなく、胎児の治療をも可能にしつつある。胎児治療には内科的胎児治療と外科的胎児治療がある。内科的治療は 21 水酸化酵素欠損症(21-OHD)、不整脈、胎児感染症などの疾患に対して母体へ薬物投与することにより、胎盤を経由させて胎児を治療する方法である。外科的治療は閉鎖性尿路疾患、先天性嚢胞性腺腫様奇形(CCAM)、横隔膜ヘルニア、胎児胸水、髄膜瘤や双体間輸血症候群などの疾患に直接的に外科的操作を行い治療する方法である。現時点では一部の疾患を除いて胎児治療の有効性はいまだ確立していないが、今後は現行の治療方法の改良に加え、細胞療法や遺伝子治療などの先端医療が積極的に行われるようになり、胎児治療が可能な疾患が増えてくると期待される。これに平行して安全で精度の高い出生前診断法の確立が必要となる。

Prenatal genetic diagnosis for hereditary diseases
Motomichi KOSUGA and Torayuki OKUYAMA :
国立成育医療センター遺伝診療科

する新しい染色体解析法である。本検査は複雑な構造異常や由来不明のマーカー染色体の解析に有用であり、G分染法などとの併用からさらに詳細な結果を得ることができる。絨毛検査の適応は原則的に羊水検査と同じであるが、妊娠9~11週から採取でき、培養をしなくても十分なDNA量が得られるため、羊水検査より早期診断が可能である。以前は手技的に困難であり、絨毛採取後の流産率も若干高いことから、遺伝的にハイリスクな症例に行われることが多かったが、熟練した医師が行えば流産率も自然流産率と変わらなくなっている。また、最近では母体末梢血液から胎児由来細胞を採取することも可能となってきた。

遺伝性疾患として出生前診断をする機会が多いと思われるのは、①21水酸化酵素欠損症、②筋緊張性ジストロフィー、③Duchenne型筋ジストロフィー、④オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症、⑤血友病などである³⁾。このうち遺伝形式の異なる3つの疾患と本施設で遺伝子検査を行った症例を取り上げて遺伝性疾患の出生前診断について説明する。

● 21 水酸化酵素欠損症(21-OHD)

21水酸化酵素欠損症(21-OHD)は副腎における糖質コルチコイドおよび鉱質コルチコイド合成に必要な21水酸化酵素(P-450c21)の欠損による先天性副腎皮質過形成症のひとつである。21水酸化酵素が欠損した結果、コルチゾールおよびアルドステロン産生の障害とアンドロゲンの過剰分泌が起こる。コルチゾールおよびアルドステロンの産生が障害されることにより新生児期から低血糖、哺乳不良、血圧低下、電解質異常、循環障害、ショックなどが起こる。また、アンドロゲン過剰分泌によって出生時より女児では外性器の男性化(陰核肥大、陰唇の癒合)が、一方、男児においては成長促進、早期の男性化が起こる。本症は常染色体性劣性遺伝形式をとり、21水酸化酵素遺伝子(CYP21)は6番染色体短腕上にその偽遺伝子(CYP21P)とともに存在している。

遺伝子解析により、CYP21遺伝子の欠失の割合は欧米では15~30%、わが国では10~15%と報告されている。遺伝子の欠失が認められない症例で

はCYP21遺伝子からCYP21P遺伝子への変換、点突然変異などが同定されており、本症の約90%は遺伝子検査で診断可能となっている⁴⁾。本症は新生児マススクリーニングの対象疾患であり、ほとんどの症例が早期に発見され、治療が行われるようになった。しかし、胎児期にアンドロゲンに過剰曝露されることにより、すでに女児の外性器男性化や胎児脳の性分化障害が進行していることから、現在では出生前診断で本症と診断されれば積極的に胎児期の治療が行われるようになった。

出生前診断と胎児治療の実際としては、すでに21-OHDと診断された児をもった母が次児を妊娠した場合が対象となる。児の妊娠が確認された時点から母体にデキサメタゾンを投与する。絨毛採取によりDNA抽出し、まずFish法により性別を確認し、男性と診断した場合は母体へのデキサメタゾン投与を中止する。胎児が女性で、その後の遺伝子解析により本症と診断された場合は、妊娠末期までデキサメタゾンの投与を継続する。胎児治療による有効性は75%程度と報告されている。本症は比較的頻度が高く、出生前診断により有効な胎児治療が可能な数少ない疾患である。しかし、胎児治療の無効例も1/4程度認められ、長期的な胎児・母体の予後が不明であること、胎児治療は妊娠が確認された時点から開始されるため、出生前診断で本症が否定された場合、不必要な治療を受ける胎児・母体が少なからず存在することを理由に、出生前診断および胎児治療に慎重な意見もある⁵⁾。

● 筋緊張性ジストロフィー

筋緊張性ジストロフィーは常染色体優性遺伝形式をとり、19番染色体長腕(19q13)に存在するMT-PK(myotonin protein kinase)遺伝子の3'側非翻訳領域にあるCTGの3塩基の繰返し配列の増加が原因である。健常人ではCTGの繰返し配列は5~30回程度であるが、患者では50~2,000回にも達する。このリピート数と臨床症状は相関し、また親から子、子から孫へと世代を経るに従ってこのリピート数が増加して症状が重くなる表現促進(anticipation)が認められる⁶⁾。成人における臨床症状は、収縮した筋肉が弛緩にくくなるミオト

ニア現象や、筋力低下・筋萎縮による特異顔貌、眼瞼下垂、嚥下障害などがみられ、筋症状に加えて白内障、心病変、中枢神経病変を伴うことがある。筋強直性ジストロフィーの母親から生まれた子供に新生児期から重度の筋緊張低下と中枢神経症状をみることがあり、先天性筋強直性ジストロフィーとよばれる。この場合、CTGのリピート数は親より子供のほうが圧倒的に増加している。

筋強直性ジストロフィーの遺伝子診断方法は以下のとおりである。絨毛細胞あるいは培養羊水細胞から抽出されたDNAを制限酵素(*EcoR* I, *Bgl* II)で消化した後、MT-PK遺伝子をプローブとしたSouthern hybridizationを行うことにより、伸張したリピート数を測定する。先天性筋強直性ジストロフィーの患児が出生するのは母親が筋強直性ジストロフィーの罹患者である場合がほとんどで、父親が罹患者の場合に先天性筋強直性ジストロフィーの患者が生まれることはきわめてまれであること、先天性筋強直性ジストロフィーの患児は出生時期の呼吸・哺乳障害を克服すれば生命予後・機能的予後はDuchenne型筋ジストロフィーや福山型筋ジストロフィーに比べるとはるかによいことなど、本症に対する出生前遺伝子診断を行う際にはこれらの特徴を踏まえたうえで十分な遺伝カウンセリングを行ってから検査にのぞむべきである。

● Duchenne型筋ジストロフィー

Duchenne型筋ジストロフィーはX連鎖劣性遺伝形式をとり、母親が保因者の場合に男児の50%に発病し、女児の50%が保因者となる。本症の頻度は男児出生4,000人に1人、人口10万人に3~5人といわれている。新生児・乳児期にはめだつた症状を認めないことが多く、2~4歳ごろから、走れない、転びやすい、階段の昇降困難など歩行に関する異常が認められるようになり、さらに進行すると10歳前後で歩行不能となり、20歳前後で人工呼吸器が必要となることが多い。一般に保因者である母親には症状は認められず、血清CK値の軽度上昇を認めることがある程度である。ジストロフィン遺伝子はX染色体短腕(Xp21.2)に存在しており、2,300 kbのサイズで、79のエクソン

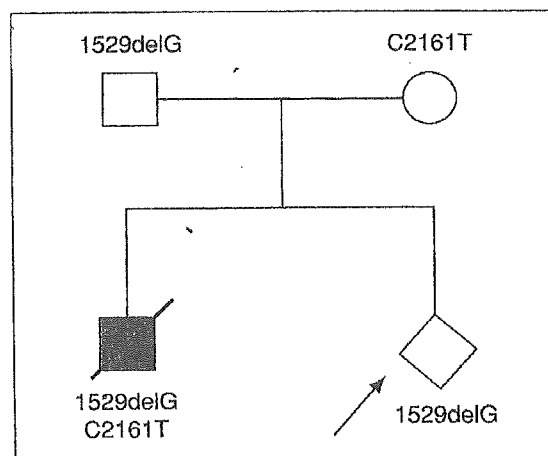


図1 CPS I欠損症の家系解析

発端者である第1子は1529delGとC2161Tの複合ヘテロ接合体でCPS I欠損症を発症した。父親は1529delGのヘテロ接合体で、母親はC2161Tのヘテロ接合体であった。今回、第2子の出生前遺伝子検査を行い、父親と同様の1529delGのヘテロ接合体であった。

からなる⁷⁾。

本疾患の遺伝子異常は、ジストロフィン遺伝子の欠失が50~60%、重複が約10%で、残りの30~40%は点変異である。ジストロフィン遺伝子の欠失の遺伝子診断はmultiplex PCR法が一般的である。欠失の好発部位である19個のエクソンに対してPCRにより欠失をみつける方法であり^{8,9)}、検体が少量ですみ、短時間で結果が出るが、重複や点変異は検出できない。重複の場合はcDNAをプローブとした定量的Southern blot法が行われる。点変異に対してはsingle strand conformational polymorphism(SSCP)法、直接シーケンス法、変異遺伝子異常により合成された異常蛋白を解析するprotein truncation test(PTT)などの方法が行われる¹⁰⁾。これらの方法により約90%の症例の遺伝子異常が検出可能である。

● カルバミルリン酸合成酵素 I 欠損症

カルバミルリン酸合成酵素 I 欠損症(carbamoyl phosphate synthetase I deficiency: CPS I deficiency)は尿素サイクルの酵素のひとつであるCPS Iの欠損によって引き起こされる高アンモニア血症である。新生児期発症の場合、嘔吐、意識障害、痙攣、高アンモニア血症などの症状を起こす予後不良の疾患である。本疾患は常染色体劣性

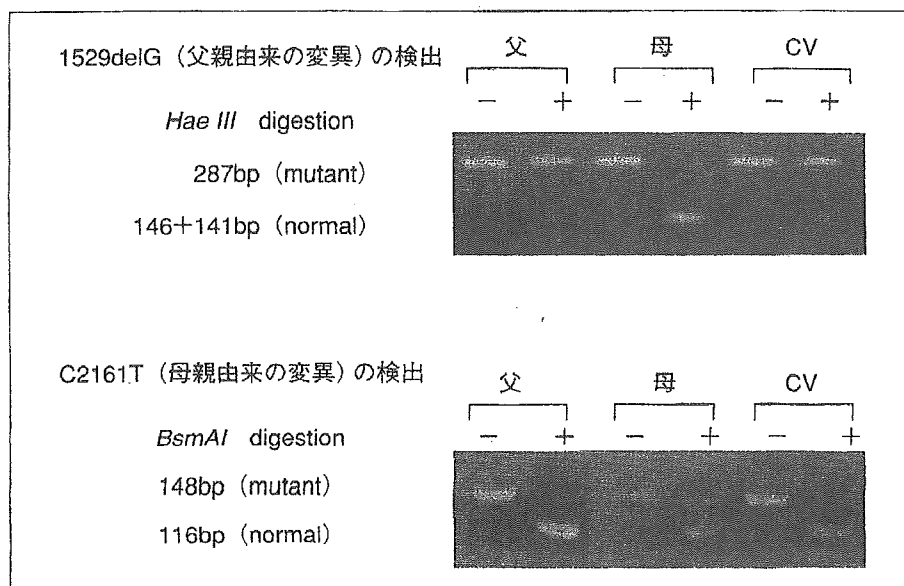


図 2 PCR-RFLP による CPSI 欠損症の遺伝子診断

胎児絨毛細胞(CV)を用いて PCR-RFLP を行った。1529delG の保因者(父親と CV)の場合、287 bp の PCR 産物は制限酵素 *Hae*III で切断されず 287 bp のままである。点変異のない場合(母親)は 287 bp のバンドが 146 bp と 141 bp に切断される。C2161T の保因者(母親)の場合、148 bp の PCR 産物は制限酵素 *Bsm*AI により 116 bp と 31 bp(検出されず)に切断されず、148 bp のままである。点変異のない場合(父親と CV)は 148 bp のバンドが 116 bp と 31 bp に切断される。したがって、CV は 1529delG のみの保因者である。

遺伝形式である。CPS I 遺伝子は 2q35 に存在し¹¹⁾、すでにいくつかの変異遺伝子が判明している^{12,13)}。本センターにおける本症の出生前診断の症例を提示する。出生直後の高アンモニア血症などから第 1 子が CPS I と診断され、早期に死亡している。患者の CPS I 遺伝子を遺伝子解析したところ、児は 1529delG と C2161T の複合ヘテロ接合体、さらに両親の解析を行ったところ父親は 1529delG、母親は C2161T のヘテロ接合体であることが判明した。それぞれの変異を PCR-RFLP により同定できるようにプライマーを作製し、次子の妊娠時に出生前診断を行った。絨毛細胞から得られた DNA 検体に上記の PCR-RFLP を行い、胎児は父親と同じ 1529delG のヘテロ接合体であることが判明した(図 1, 2)。

おわりに

妊娠前半期に行われる遺伝子診断の対象疾患は、疾患の重篤度、治療方法の有効性、診断の精度、夫婦の環境などを考慮して決められるべきである。また、遺伝子診断前後の遺伝カウンセリングの実施、診断によって得られた個人の遺伝子情

報や生体試料の取扱いなどにも十分な配慮が必要である。今後は胎児に対する遺伝子治療や細胞治療などの先端医療の開発が進み、治療を前提とした出生前診断が増えてくるものと思われる。

文献

- 1) 日本産婦人科学会：先天異常の胎児診断，特に妊娠前期絨毛検査に対する見解，1988。
- 2) 日本人類遺伝学会：遺伝カウンセリング・出生前診断に関するガイドライン。 *Jpn. J. Hum. Genet.*, **40**：(綴込み)，1995。
- 3) 奥山和彦・他：臨床婦人科産科，**55**：860-862，2001。
- 4) Speiser, P.W. : *Am. J. Pharmacogenomics*, **1**：101-110, 2001。
- 5) Ritzen, E. M. et al. : *Semin. Neonatol.*, **6**：357-362, 2001。
- 6) Buxton, J. et al. : *Nature*, **355**：547-548, 1992。
- 7) Koenig, M. et al. : *Cell*, **53**：19-226, 1988。
- 8) Chamberlain, J.S. et al. : *Nucleic Acids Res.*, **16**：11141-11156, 1988。
- 9) Beggs, A. H. et al. : *Hum. Genet.*, **86**：45-48, 1990。
- 10) Roest, P.A. et al. : *Hum. Mol. Genet.*, **2**：1719-1721, 1993。
- 11) Hoshida, R. et al. : *Genomics*, **28**：124-125, 1995。
- 12) Finckh, U. et al. : *Hum. Mutat.*, **12**：206-211, 1998。
- 13) Aoshima, T. et al. : *Hum. Hered.*, **52**：99-101, 2001。

先天性代謝異常症

●特集編集

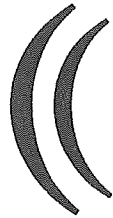
小林庸次 [大阪市立総合医療センター病理部]

奥山虎之 [国立成育医療センター病院特殊診療部遺伝診療科]

先天性代謝異常症は、各種の代謝系に關与する酵素の先天性な欠損が原因で発症する単一遺伝性疾患である。近年、細胞生物学および分子遺伝学の発展に伴い、先天性代謝異常症についての詳細な病態解明が進み、ほとんどの疾患で疾患責任遺伝子が同定されるに至っている。また、酵素補充療法や骨髄移植などの先進的治療法が導入され、いくつかの疾患は、治療が可能な疾患と理解されるようになってきた。さらに最近では、遺伝子治療や再生医療・細胞治療の対象疾患としても注目され、先天性代謝異常症の臨床像は、近い将来著しく変化する可能性も少なくない。

先天性代謝異常症の診断においては、血液や尿などの試料を用いて中間代謝産物の過剰蓄積を検出する方法や罹患臓器での酵素活性の欠損を明らかにする方法が主に用いられている。これらの生化学的診断方法に加えて遺伝子変異を直接検出する遺伝子検査を施行することにより、診断がより確実になるだけでなく、保因者診断・出生前診断が可能となり、遺伝カウンセリングにおいても有益な情報が得られる。病理形態学的検索は、先天性代謝異常症の診断においては補助的な意味合いが強いが、代謝異常のおおまかな方向づけをするためにはきわめて有用であり、依然として診断には欠かすことのできない最も重要な検査の一つである。

1986年に刊行された本誌第4巻11号では、特集「小児代謝異常の病理」で肝・腎・骨など臓器別に各疾患による病変の特徴が記載されている。今回の特集では、各種代謝系(脂質, 糖質, 多糖体など)の代表的疾患について生化学的診断法および治療法, 生検・剖検の現状などを中心に解説した。



先天性代謝異常症の新規治療開発と病理

小須賀基通* 奥山虎之*

はじめに

先天性代謝異常症 inborn error of metabolism は、生体内における物質代謝の異常により、その結果として生理的に重要な機能をもつ特定物質の生成障害が生じたり、代謝過程の前駆物質が過剰産生し、蓄積したりすることにより発症する疾患群である。一般的には障害される酵素あるいは蓄積基質等から、脂質代謝異常症、プリン・ピリミジン代謝異常症、リソソーム病、アミノ酸代謝異常症、核酸代謝異常症、糖質代謝異常症、ポルフィリン代謝異常症、金属代謝異常症、有機酸代謝異常症などに分類される。

症状は障害された代謝経路によるが、生化学的所見の異常値を示すだけのものから、早期に神経変性疾患様の症状を呈するものまでさまざまである。

先天性代謝異常症に対する治療は一般的には対症療法が主であったが、一部の先天性代謝異常症、特にリソソーム病に対しては酵素補充療法や骨髄移植による治療が試みられている。しかし、酵素補充療法は骨・中枢神経病変に対しては著しい治療効果は得られておらず、繰り返し投与が必要で、莫大な費用がかかるという問題点がある。骨髄移植は早期に行われた場合、中枢神経病変にも治療効果が期待できるが、ドナー不足や安全性などの問題を抱えている。そのため、根治的治療法として遺伝子治療法の開発が期待されている。

リソソーム病などの先天性代謝異常症の病変は、通常全臓器に認められるため、治療には十分量の欠損酵素を各臓器に広く行き渡らせる必要があることが重要である。すなわち目的遺伝子を体内の各臓器の細胞に広く発現させること、あるいは必要な酵素が過剰分泌できるように目的遺伝子を高発現する細胞を移植し生着させることにより、リソソーム病の遺伝子治療が可

能になると考えられる。遺伝子治療の効果を評価するに当たっては、組織における欠損酵素活性値の変化、臨床所見の改善などに加えて、組織所見の改善も重要な評価項目である。

本稿では現在、臨床の現場で行われている先天性代謝異常症に対する治療と今後、開発が期待される遺伝子治療についての概略を簡単に述べる。さらにリソソーム病の一つであるムコ多糖症 VII 型 mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII) のモデルマウスに対して、われわれが行った遺伝子治療の効果を病理所見の改善例を提示して紹介する。

I. 先天性代謝異常症に対する治療法

リソソーム病の治療法としては酵素補充療法と、骨髄移植などに代表される細胞療法 cell-mediated therapy が研究されており、すでに一部の疾患では臨床応用されている¹⁻⁴⁾。いずれの治療法も、リソソーム酵素の細胞間輸送機序である、cross-correction の原理に基づいている⁵⁾。細胞内で合成されたリソソーム酵素の一部は分泌され細胞外に放出されるが、その後、細胞表面に存在するマンノース 6-リン酸受容体などの受容体と結合し、エンドサイトーシスにより、再び細胞内に転送され最終的にリソソームに輸送される。これが、“cross-correction” の機序である。酵素補充療法の場合は、経静脈的に投与されたリソソーム酵素が、細胞表面にあるマンノース 6-リン酸受容体やマンノース受容体を介して各臓器の細胞内に積極的に取り込まれ、リソソームに輸送され、欠損酵素が「補充」される。また、骨髄移植などの細胞療法の場合は、体内に欠損酵素を分泌できる細胞集団を作成し、体循環により欠損酵素が体全体に分配されることを期待する治療法である。さらにベクターを用いて目的酵素の遺伝子の導入を行う遺伝子治療法も研究が進められている。以下、それぞれの治療方法について解説する。

*国立成育医療センター病院特殊診療部遺伝診療科

1. 酵素補充療法

一般的に先天性代謝異常症は、ある代謝に関与する酵素の活性低下あるいは欠損によって、当該酵素に対する基質が過剰蓄積するために発症する。そこで低下あるいは欠損している酵素を補うことにより、蓄積した中間代謝産物を減少させる治療方法が酵素補充療法である。1990年に、リソソーム病の一つである Gaucher 病に対して酵素補充療法の臨床治験が行われてから⁶⁾、現在までに全世界で約3,000例の症例に酵素補充療法が行われており、その治療効果が認められている。最近では Fabry 病^{7,8)}、Pompe 病^{9,10)}、ムコ多糖症 I 型(Hurler, Scheie 病)¹¹⁾などのリソソーム病に対しても酵素補充療法の臨床治験が行われている。酵素補充療法は、診断がつけば直ちに治療を始められること、副作用が少ないこと、酵素活性の調節が容易であることなどが利点であるが、その反面、莫大な医療費が必要であること、中枢神経病変・骨病変への治療効果が明確でないこと、生涯を通じた投与が必要であるなどの改善点がある。

2. 骨髄移植

先天性代謝異常症の根治的治療の一つとして、骨髄移植をはじめとする造血幹細胞移植がある。移植した造血幹細胞から正常な酵素を有する血液細胞を供給させることにより、必要な酵素をそれらの細胞から分泌させて補うという考えである。1980年代に初めて Hurler 病の患者に骨髄移植が行われてから¹²⁾、現在までに約400例の骨髄移植治療が先天性代謝異常症に対して全世界で行われている。一方、わが国でも現在までに約50例の骨髄移植治療が行われている。対象疾患の多くがムコ多糖症や Gaucher 病などのリソソーム病と副腎白質ジストロフィーなどのペルオキシソーム病である。造血幹細胞移植は生後早期に行われた場合、内臓病変や中枢神経症状に対して、良好な長期予後の改善が認められる。しかし、すでに病変が進行してからの造血幹細胞移植の場合には、中枢神経病変と骨病変に対しては、酵素補充療法と同様にあまり治療効果は期待できない。さらに造血幹細胞移植には、ドナー不足や大量化学療法と放射線療法の副作用、GVHD(移植片対宿主病)などの問題点を抱えている。

3. 遺伝子治療法

上述のように先天性代謝異常症に対して現在、行われている酵素補充療法や骨髄移植にはそれぞれ利点と欠点がある。これらの治療法に代わる根治的治療法として遺伝子治療法の開発が期待されている。ほとんどの先天性代謝異常症は、酵素をコードする遺伝子にお

ける異常によって引き起こされる単一遺伝子病である。したがって、代謝の中心となる臓器の細胞において、目的酵素の遺伝子を修復する、正常遺伝子に置き換える、あるいは正常遺伝子を付加することによって治療が可能になる。さらには目的とする酵素の遺伝子をあらかじめ生体外でドナー細胞に導入し、必要な酵素を十分量産生する細胞を調整し、それを移植する細胞療法の研究も進んでいる。

(1) ベクター

細胞に目的遺伝子を導入するにあたり用いられるベクターは、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別される。現在、遺伝子治療の臨床応用およびその研究に用いられているウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどがある。

アデノウイルスベクターは高力価のウイルス溶液の精製が比較的容易であり、遺伝子導入効率が高く、非分裂細胞への導入が可能であるという利点をもつが、その反面、強い細胞毒性があり、免疫原性が高い、発現が一過性である、という欠点ももっている¹³⁾。

アデノ随伴ウイルスベクターは生体に対する毒性がなく、非分裂細胞にも効率よく遺伝子導入が可能であるが、高力価のウイルス溶液の精製が困難である¹⁴⁾。

レトロウイルスベクターは導入された遺伝子が染色体 DNA に組み込まれるため、長期発現が期待できるが、非分裂細胞に遺伝子導入できない、染色体 DNA へランダムに組み込まれるため重要な遺伝子を不活性化させる、癌遺伝子を活性化させる可能性がある、といった欠点をもつ¹⁵⁾。

レンチウイルスは、レトロウイルスの長所に加え、非分裂細胞にも効率よく遺伝子導入が可能であり、今後、安全性の問題が克服されれば臨床応用も期待される¹⁶⁾。

非ウイルスベクターとして代表的なものはリポソームが挙げられるが、従来の方法では遺伝子導入効率があまり高くなく、生体への応用は困難であった。最近、不活化したセンダイウイルス(HVJ)の膜エンベロープがもつ細胞融合性を利用した HVJ エンベロープベクターが開発され注目を浴びている¹⁷⁾。ウイルスベクターに比べ、細胞毒性や免疫原性が低く、遺伝子導入効率も従来の HVJ ベクターに比べ改善している。

(2) 遺伝子導入方法

先に述べたベクターを使って、標的となる細胞に目

的遺伝子を導入する方法として、*ex vivo*法と*in vivo*法の2つがある。

① *ex vivo*法：*ex vivo*法は、造血幹細胞、リンパ球、臓器細胞など目標とする細胞に体外で目的遺伝子をベクターで導入し、培養して体内に入れる方法である。*ex vivo*法は、遺伝子導入操作を体外で行うため、遺伝子導入効果や導入遺伝子の発現を確認して、あらかじめ遺伝子が導入された細胞のみを選択して生体内に入れることが可能であるが、大量細胞培養操作が必要であり、培養が可能な細胞を対象とする治療に限られる。MPS VII マウスを用いた研究では、体外に取り出し培養状態にある骨髓細胞¹⁸⁾、線維芽細胞¹⁹⁾、筋原細胞²⁰⁾にレトロウイルスベクターで β -グルクロニダーゼ遺伝子を導入し、同酵素を大量に分泌する細胞を作成し、これらを移植する方法が試みられている。

② *in vivo*法：*in vivo*法は、目的遺伝子の細胞導入を直接生体内で行う方法である。例えば、ウイルスベクターの目標臓器実質内への直接投与や血流を介した投与などが試みられている。*ex vivo*法と比較して、細胞培養が必要でなく、手技が容易であるという利点があるが、問題点としては体内の目的細胞にだけ遺伝子を導入するのが困難であることである。例えばアデノウイルスベクターを経静脈的に投与すると、ウイルスは主に肝臓に集積し、遺伝子の発現は主に肝臓で起こることが知られている。しかし、肝臓以外にも、心臓、腎臓、脾臓などの臓器細胞に遺伝子導入が行われることが確認されている²¹⁾。したがって、標的細胞以外の細胞、特に生殖細胞への遺伝子導入を防ぐために、特定の標的細胞にのみ遺伝子を導入する工夫が必要となる。

II. ムコ多糖症 VII 型モデルマウスを用いた遺伝子治療の開発

1. ムコ多糖症 VII 型 (Mucopolysaccharidosis type VII, Sly disease)

ムコ多糖症 VII 型 (MPS VII) はリソソーム酵素の一つである β -グルクロニダーゼの先天性欠損に起因する常染色体劣性遺伝病である。 β -グルクロニダーゼの全身性欠損のため、リソソーム内に中間代謝産物であるデルマタン硫酸、ヘパラン硫酸などのムコ多糖が過剰蓄積するため、病理組織学的にはリソソームの肥大による空胞変性がほとんどの罹患臓器で共通に認められる。ガルゴイ様と呼ばれる特徴的な顔貌、肝脾腫、精神運動発達遅滞、難聴、角膜混濁、骨の変形など、多くの臓器組織に及ぶ多彩な臨床症状が認められ

る²²⁾。診断は尿中ムコ多糖の過剰排泄や白血球や培養皮膚線維芽細胞における β -グルクロニダーゼ活性の測定による。ムコ多糖症 VII 型の疾患モデルマウス (B6/MPS VII) は、肝脾腫、角膜混濁、扁平な鼻などの特徴的な顔貌、行動異常など、ヒトムコ多糖症 VII 型やその他のリソソーム病と共通の表現型を有することから、これらの疾患における新規治療法の開発研究に幅広く用いられている²³⁾。

2. 組み換えアデノウイルスベクターを用いたムコ多糖症 VII 型モデルマウスに対する遺伝子治療

おとなのムコ多糖症 VII 型マウスに、組み換えアデノウイルスベクターを経静脈的に全身投与した場合、ウイルスは主に肝臓に集積し、 β -グルクロニダーゼ遺伝子の発現は主に肝臓で起こる。肝臓で産生された酵素が血流に乗って各臓器の細胞に取り込まれる、いわゆる cross-correction によって各臓器の β -グルクロニダーゼ酵素活性値が上昇する²¹⁾。また病理所見では、各臓器の細胞の空胞変性の縮小あるいは消失が認められる。しかし中枢神経系には脳-血液関門が存在するためにアデノウイルスベクターおよび肝臓から体循環に分泌された β -グルクロニダーゼ蛋白の脳内への移行が妨げられる。また関節・骨変形は不可逆的であり、無血管野である関節軟骨にはアデノウイルスベクターによる直接の遺伝子導入や β -グルクロニダーゼ蛋白の取り込みは不可能である。そのため、中枢神経や軟骨細胞での β -グルクロニダーゼ活性値の上昇はみられず、病理組織所見も改善は得られない。これらの問題点を改善するため、われわれは組み換えアデノウイルスベクターを生後早期のムコ多糖症 VII 型マウスに全身投与することを行った。具体的には生後 72 時間以内のムコ多糖症 VII 型マウス新生仔の浅側頭静脈から β -グルクロニダーゼ遺伝子組み換えアデノウイルスベクターを投与し、30 日後に各臓器の病理組織所見を検討した。生後早期に遺伝子導入を行う利点の一つは、脳-血液関門が未熟なためアデノウイルスベクターおよび肝臓から体循環に分泌された β -グルクロニダーゼ蛋白の脳内への移行が可能であること、リソソーム病は進行性の疾患であるため生後早期に治療を行うことにより病変の進行、特に中枢神経と関節・骨の病変が進んでいない段階で治療が可能となり治療効果が期待できることである²⁴⁾。

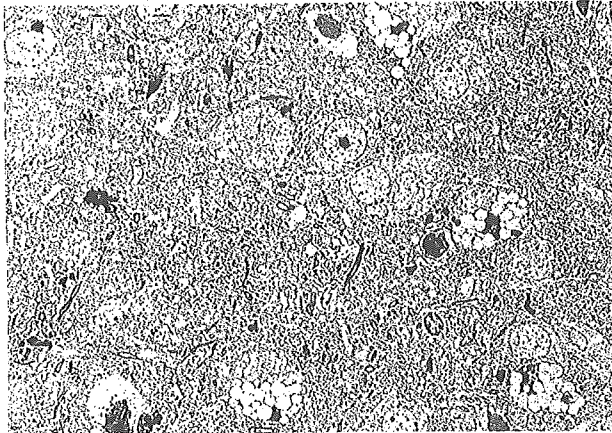


図1 未治療 MPS VII マウスの神経細胞 一部の神経細胞にリソソーム腫大による空胞変性細胞がみられる。

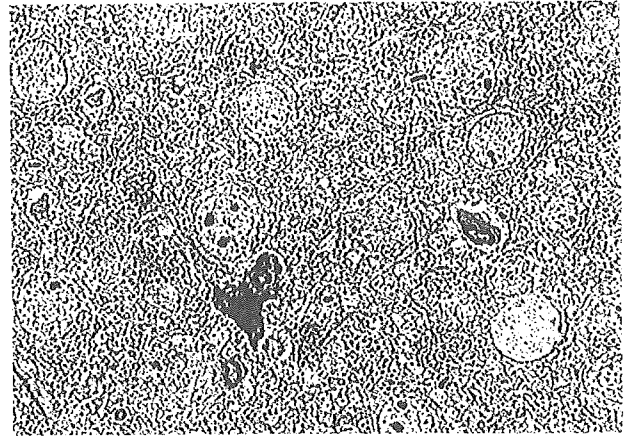


図2 生後早期に治療された MPS VII マウスの神経細胞 空胞変性した神経細胞はみられない。

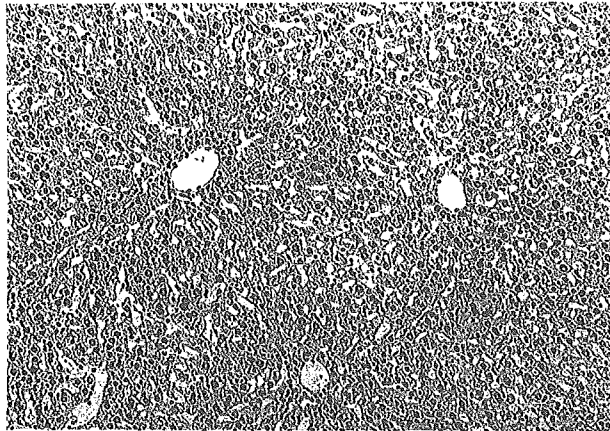


図3 未治療 MPS VII マウスの肝細胞 ムコ多糖蓄積による肝細胞の空胞変性がみられる。

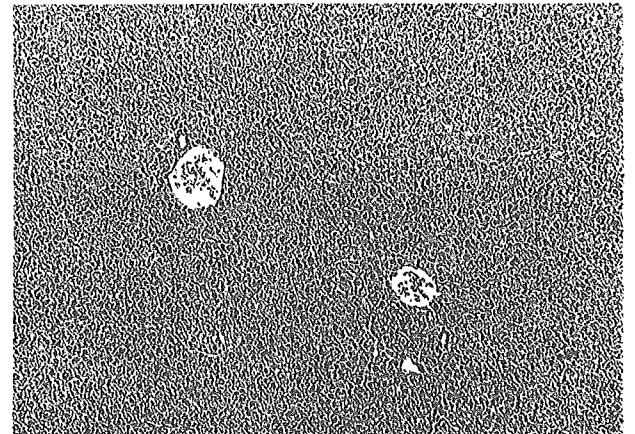


図4 治療 MPS VII マウスの肝細胞

3. ムコ多糖症の病理所見および生後早期ムコ多糖症 VII 型マウスに対する組み換えアデノウイルスベクター全身投与による病理所見の改善

(1) 中枢神経

MPS VII マウスの神経病変は、組織学的にはスダン好性グングリオシドの蓄積と、電顕上では蓄積物質は楕円形の同心円性膜状構造(membranous cytoplasmic body: MCB)が認められ、神経細胞の脱落やグリオーシスが起ることもある。未治療群 MPS VII マウスと治療群 MPS VII マウスの神経細胞を比較すると、未治療群では、ムコ多糖蓄積による空胞変性がみられるが(図1)、治療 MPS VII マウスの神経細胞には空胞変性はみられない(図2)。

(2) 肝臓

MPS VII マウスの肝は肉眼所見上、硬く腫大し灰黄色調となる。組織学的には、肝細胞と Kupffer 細胞は空胞状に腫大する。Disse 腔の膠原線維の増殖による線維化がみられることもある。未治療 MPS VII マウスの肝細胞においてはムコ多糖蓄積による空胞変性がみられるが(図3)、治療後の MPS VII マウスの肝細胞には空胞変性はみられない(図4)。

(3) 関節軟骨および成長板

未治療の MPS VII マウスの膝関節軟骨においては、ほとんどの軟骨細胞において空胞変性による腫大がみられるが(図5)、治療を受けた MPS VII マウスの関節軟骨においては空胞変性の数の減少と大きさの縮小がみられる(図6)。正常マウスの軟骨細胞には軟骨細

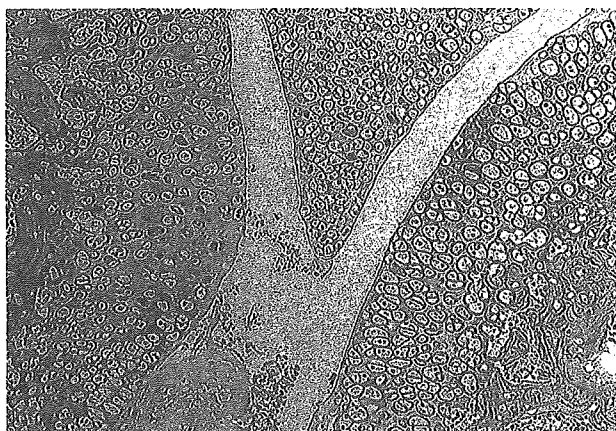


図5 MPS VII マウスの膝関節軟骨病理所見 空胞変性による軟骨細胞の腫大が多数みられる。

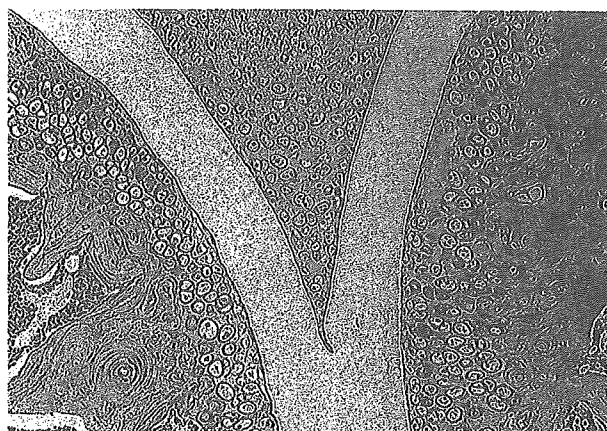


図6 治療 MPS VII マウスの関節軟骨病理所見 空胞変性が改善し、腫大した軟骨細胞の減少と縮小がみられる。

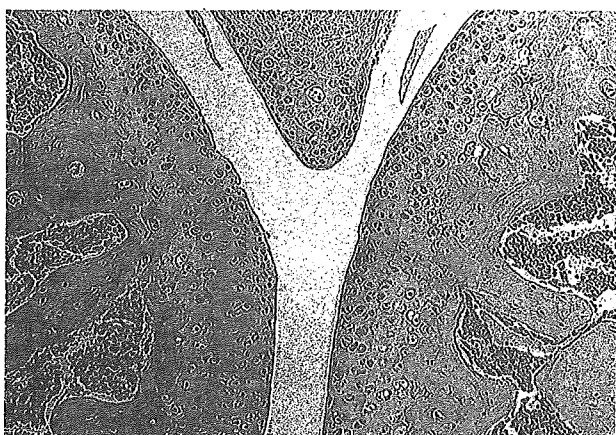


図7 正常 B6 マウスの関節軟骨病理所見

胞において空胞変性はほとんどみられない(図7)。

(4) 網膜・角膜

未治療群と治療群の MPS VII マウスにおける網膜と角膜を比較検討した。未治療の MPS VII マウスの網膜と角膜においては、ムコ多糖蓄積による色素上皮細胞の腫大と杆状体・錐状体の不整(図8)および角膜細胞の空胞変性(図10)がそれぞれみられるが、治療を受けた MPS VII マウスの網膜色素上皮細胞と角膜細胞においては空胞変性がみられず、杆状体・錐状体は整然としており(図9)、角膜のコラーゲン走行も均一化している(図11)。

おわりに

先天性代謝異常症に対する治療は、対処療法、酵素補充療法、骨髄移植などが試みられてきたが、根治療法としての遺伝子治療の開発が期待されている。近年、各種ベクターの導入効率と安全性が向上したことや、骨髄間葉系幹細胞、神経幹細胞や ES 細胞などを用いた再生医学の進歩もあり、先天性代謝異常症に対する遺伝子治療は近い将来、実用化される可能性が高いと考えられる。先天性代謝異常症に対する診断や治療効果の判定には通常、血液・尿・培養線維芽細胞での蓄積物質や活性酵素の測定が用いられる。しかし、欠失酵素が補充されても代謝サイクルが正常化されていることを判定するには組織所見が有効である。本稿で提示したムコ多糖症は先天性代謝異常症のなかでも形態学的変化を認めやすい疾患であり、またその変化は全臓器に及ぶ。今後、遺伝子治療などの先端的治療を行うにあたり、治療効果の検討に組織学的所見の検討も重要となると考えられる。

文 献

- 1) Beutler, E. : Gaucher disease. *Curr Opin Hematol* 1997, 4 : 19-23
- 2) 井田博幸 : 先天異常症に対する酵素補充療法の最近の進歩. *日本小児科学会誌* 2002, 106 : 337-349
- 3) Vellodi, A., Young, E. P., Cooper, A. et al. : Bone marrow transplantation for mucopolysaccharidosis type I : experience of two British centres. *Arch Dis Child* 1997, 76 : 92-99
- 4) Ringden, O., Groth, C. G., Erikson, A. et al. : Ten years' experience of bone marrow transplantation

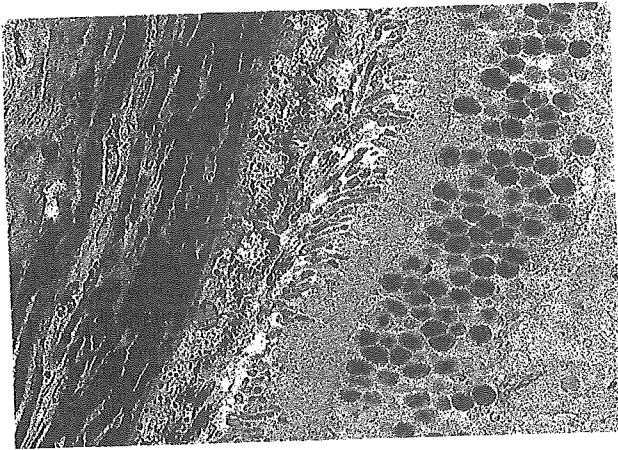


図8 未治療 MPS VII マウスの網膜 色素上皮細胞に空胞変性がみられ、杆状体・錐状体層の不整がみられる。

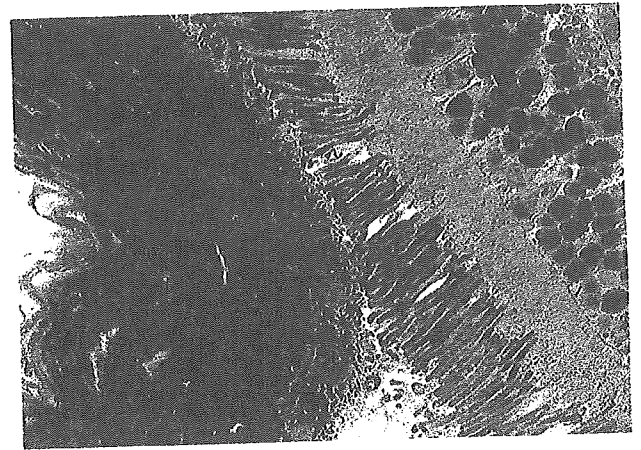


図9 治療 MPS VII マウスの網膜 色素上皮細胞においては空胞変性が消失し、杆状体・錐状体層は整然としている。

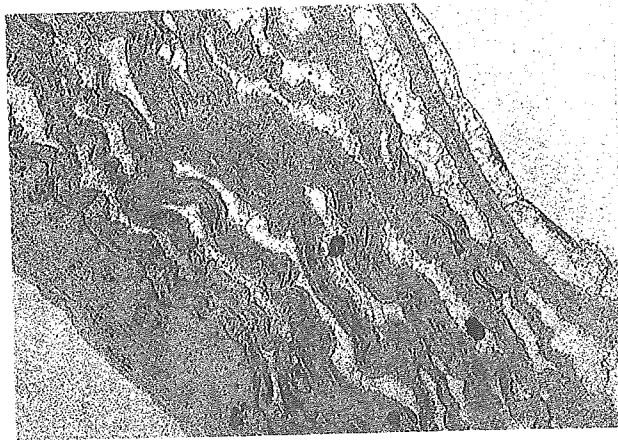


図10 未治療 MPS VII マウスの角膜 角膜細胞に空胞変性がみられる。

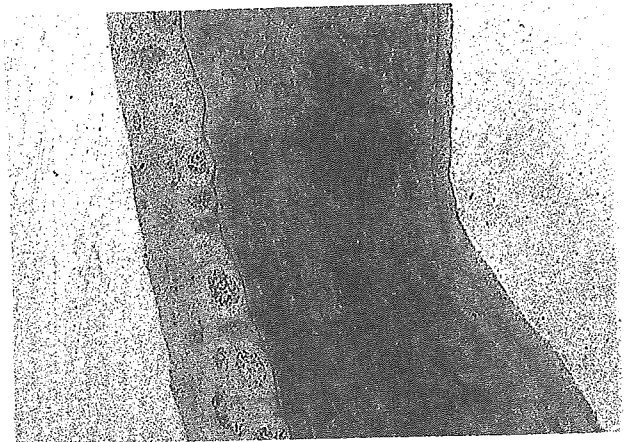


図11 治療 MPS VII マウスの角膜 角膜細胞においては空胞変性がみられず、コラーゲンの走行も整然と並列化している。

- for Gaucher disease. *Transplantation* 1995, **59** : 864-870
- 5) Kornfeld, S. : Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 1992, **61** : 307-330
 - 6) Barton, N. W., Brady, R. O., Dambrosia, J. M. et al. : Replacement therapy for inherited enzyme deficiency—macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1991, **324** : 1464-1470
 - 7) Eng, C. M., Banikazemi, M., Gordon, R. E. et al. : A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in Fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am J Hum Genet* 2001, **68** : 711-722
 - 8) Schiffmann, R., Murray, G. J., Treco, D. et al. : Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, **97** : 365-370
 - 9) Van den Hout, H., Reuser, A. J., Vulto, A. G. et al. : Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. *Lancet* 2000, **356** : 397-398
 - 10) Amalfitano, A., Bengur, A. R., Morse, R. P. et al. : Recombinant human acid alpha-glucosidase enzyme therapy for infantile glycogen storage disease type II: results of a phase I/II clinical trial. *Genet Med* 2001, **3** : 132-138
 - 11) Kakkis, E. D., Muenzer, J., Tiller, G. E. et al. :

- Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *N Engl J Med* 2001, **344** : 182-188
- 12) Hobbs, J. R., Hugh-Jones, K., Barrett, A. J. et al. : Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 1981, **2** : 709-712
 - 13) Brody, S. L., Crystal, R. G. : Adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Ann NY Acad Sci* 1994, **31** : 90-101
 - 14) Snyder, R. O. : Adeno-associated virus-mediated gene delivery. *J Gene Med* 1999, **1** : 166-175
 - 15) Boris-Lawrie, K., Temin, H. M. : The retroviral vector. Replication cycle and safety considerations for retrovirus-mediated gene therapy. *Ann NY Acad Sci* 1994, **31** : 59-70
 - 16) Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P. et al. : In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 1996, **72** : 263-267
 - 17) Kaneda, Y., Nakajima, T., Nishikawa, T. et al. : Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol Ther* 2002, **6** : 219-226
 - 18) Marechal, V., Naffakh, N., Danos, O. et al. : Disappearance of lysosomal storage in spleen and liver of mucopolysaccharidosis VII mice after transplantation of genetically modified bone marrow cells. *Blood* 1993, **82** : 1358-1365
 - 19) Moullier, P., Bohl, D., Heard, J. M. et al. : Correction of lysosomal storage in the liver and spleen of MPS VII mice by implantation of genetically modified skin fibroblasts. *Nat Genet* 1993, **4** : 154-159
 - 20) Naffakh, N., Pinset, C., Montarras, D. et al. : Long-term secretion of therapeutic proteins from genetically modified skeletal muscles. *Hum Gene Ther* 1996, **7** : 11-21
 - 21) Kosuga, M., Takahashi, S., Sasaki, K. et al. : Adenovirus-mediated gene therapy for mucopolysaccharidosis VII : involvement of cross-correction in wide-spread distribution of the gene products and long-term effects of CTLA-4lg coexpression. *Mol Ther* 2000, **1** : 406-413
 - 22) Sly, W. S., Quinton, B. A., McAlister, W. H. et al. : β -glucuronidase deficiency : report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *J Pediatr* 1973, **82** : 249-257
 - 23) Birkenmeier, E. H., Davisson, M. T., Beamer, W. G. et al. : Murine mucopolysaccharidosis type VII. Characterization of a mouse with β -glucuronidase deficiency. *J Clin Invest* 1989, **83** : 1258-1266
 - 24) Kamata, Y., Tanabe, A., Kanaji, A. et al. : Long-term normalization in the central nervous system, ocular manifestations, and skeletal deformities by a single systemic adenovirus injection into neonatal mice with mucopolysaccharidosis VII. *Gene Ther* 2003, **10** : 406-414

Report

Mutations of the *PAX6* Gene Detected in Patients with a Variety of Optic-Nerve Malformations

Noriyuki Azuma,^{1,2} Yuki Yamaguchi,³ Hiroshi Handa,³ Keiko Tadokoro,² Atsuko Asaka,² Eriko Kawase,^{1,2} and Masao Yamada²

¹Department of Ophthalmology, National Center for Child Health and Development, and ²Department of Genetics, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo; and ³Department of Biomolecular Engineering, Frontier Collaborative Research Center, Tokyo Institute of Technology, Yokohama, Japan

The *PAX6* gene is involved in ocular morphogenesis and is expressed in the developing central nervous system and numerous ocular tissues during development. *PAX6* mutations have been detected in various ocular anomalies, including aniridia, Peters anomaly, corneal dystrophy, congenital cataracts, and foveal hypoplasia. However, it has not been identified in patients with optic-nerve malformations. Here, we identified novel mutations in eight pedigrees with optic-nerve malformations, including coloboma, morning glory disc anomaly, optic-nerve hypoplasia/aplasia, and persistent hyperplastic primary vitreous. A functional assay demonstrated that each mutation decreased the transcriptional activation potential of *PAX6* through the paired DNA-binding domain. *PAX6* and *PAX2* are each thought to downregulate the expression of the other. Four of the detected mutations affected *PAX6*-mediated transcriptional repression of the *PAX2* promoter in a reporter assay. Because *PAX2* gene mutations were detected in papillorenal syndrome, alternation of *PAX2* function by *PAX6* mutations may affect phenotypic manifestations of optic-nerve malformations.

Previous ophthalmoscopy and medical imaging studies have established a variety of clinical entities in optic-nerve malformation (Brown and Tasman 1983), since numerous tissues and developmental events contribute to the optic-nerve architecture. The optic nerve first arises as the optic stalk between the forebrain and optic vesicle at 3 wk human gestation. At 5–6 wk, mesenchymes and vessels invade through the embryonic fissure, a transiently appearing ventral cleft of the optic stalk and optic cup, into the vitreous cavity. Nerve fibers of retinal ganglion cells then begin to project into the CNS at 8–10 wk. In the middle stage, the optic nerve is coated with a collagen sheath and propped up by glial cells, and the nerve head is transiently covered with glial cells and hyaloid vessels. In this series of events, developmental failure of the embryonic fissure (resulting in coloboma), ret-

inal ganglion cells (optic-nerve hypoplasia/aplasia), and hyaloid vessels (persistent hyperplastic primary vitreous) cause disease (Brown and Tasman 1983). Most of these anomalies are sporadic, but autosomal dominant inheritance has been reported in families with coloboma of the optic nerve (CON [MIM 120430]) and optic-nerve hypoplasia (ONH [MIM 165550]). Mutations causing autosomal dominant syndrome have been identified in two transcription factor genes. The *PAX2* gene, one of nine known paired box genes, is expressed in the developing optic stalk, the ventral half of the optic cup, and the kidney, and its mutations cause papillorenal syndrome (PRS [MIM 120330]) (Sanyanusin et al. 1995). *HESX1* gene mutations, expressed in the ventral half of the forebrain, Ratke's pouch, and pituitary gland, were identified in patients with septo-optic dysplasia (SOD [MIM 182230]) (Dattani et al. 1998). However, there has not been genetic interpretation of various manifestations of optic-nerve malformations.

The *Pax6/PAX6* gene, first isolated as a candidate gene for human aniridia and expressed in developing CNS and various ocular tissues (Walther and Gruss 1991; Nishina et al. 1999), encodes a transcription factor that is involved in eye morphogenesis (Gehring 1996). Genetic analysis

Received December 30, 2002; accepted for publication March 24, 2003; electronically published April 29, 2003.

Address for correspondence and reprints: Dr. Noriyuki Azuma, Department of Ophthalmology, National Center for Child Health and Development, 2-10-1, Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan. E-mail: azuma-n@ncchd.go.jp

© 2003 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved. 0002-9297/2003/7206-0021\$15.00

has detected numerous *PAX6* mutations, not only in patients with aniridia but also with other eye anomalies (summarized in the Human *PAX6* Mutation Database). In situ hybridization and immunohistochemistry indicated *PAX6* expression in the developing optic nerve (Walther and Gruss 1991; Nishina et al. 1999), and the small eye (*Sey^H*) mouse mutant with a deletion of the *Pax6* locus showed coloboma, a defect of the initial invagination in the optic stalk and cup (Glaser et al. 1990). However, there is no evidence of *PAX6* mutations in patients with optic-nerve malformations.

We screened for *PAX6* mutations in genomic DNA from 155 individuals with a variety of congenital optic-nerve malformations by use of PCR-SSCP analysis. PCR primers used to amplify *PAX6* exons were synthesized on the basis of the reported sequence (Glaser et al. 1992); the primer sequences can be found in appendix A (online only), and the conditions of PCR and SSCP analyses were described elsewhere (Azuma et al. 1999). Nucleotide sequences were determined directly or after cloning into plasmid pUC18 by use of a Sequenase version 2 kit (Amersham) with PCR primers or universal primers in pUC18. Eight mutations were detected.

Patient 1, a 5-year-old girl, had bilateral morning glory disc anomaly. Mutation analysis identified 619C→T nucleotide substitution (according to GenBank accession number M93650), which is expected to result in P68S (fig. 1a). Patient 2, a 21-year-old male, had bilateral ONH and 1030C→T (Q205X) (fig. 1b). Patient 3, a 1-year-old boy, had an iris anomaly, large coloboma of the optic nerve, retina, and choroids, a remnant of hyaloid vessel proliferation (persistent hyperplastic primary vitreous) bilaterally, and growth and mental retardation; mutation analysis identified 1190T→C (F258S) (fig. 1c). Patient 4, a 2-year-old boy, had bilateral ONH, growth and mental retardation, an enlarged ventricle by computed tomography (CT) study, multiple spike and wave bursts by electroencephalogram, and vesicoureteral reflux; mutation analysis identified 1292G→T (S292I) (fig. 1d). Patient 5, a 1-year-old girl, had Peters anomaly in the left eye and slight corneal opacity, deep excavation of the optic-nerve head in the right eye, and 1504T→C (S363P) (fig. 1e). Patient 6, a 2-mo-old girl, had microphthalmos in the right eye, iris dysplasia and optic-nerve aplasia with a remnant of the hyaloid vessels in the left eye, and 1550A→G (Q378R) (fig. 1f). Patient 7, a 19-year-old male, had bilateral ONH and 1558A→G (M381V) (fig. 1g). Patient 8, a 4-mo-old girl, had bilateral optic-nerve aplasia and 1588A→G (T391A) (fig. 1h). Further clinical details can be found in appendix A (online only).

All patients except patients 3 and 4 had normal growth, intelligence, results of physical examination, and appearance on CT. Each had a normal karyotype. The mutations detected here occurred on one of the alleles (were thus heterozygous) and were not detected in unaffected

immediate family members or in >100 normal individuals, indicating sporadic occurrence. Since mutations of the *PAX2* gene were detected in patients with optic-nerve anomalies associated with renal anomaly (PRS) (Sanyanudin et al. 1995), we screened for *PAX2* but failed to detect any mutation in these patients (data not shown).

Although all the mutations are indicated to be sporadic, each occurred in an important amino acid residue, which suggests that they cause disease. Seven of the eight mutations were missense, one of which was positioned in the paired domain (PD), one in the homeodomain (HD), and five in the proline-serine-threonine-rich transactivating domain (PST). The proline residue at 68 in the PD and the phenylalanine residue at 258 in the HD are conserved throughout all Pax family members identified to date. The serine residues at 292 and 363, the glutamine residue at 378, the methionine residue at 381, and the threonine residue at 391 in the PST are conserved throughout all the vertebrate Pax6 homologues identified to date. Amino acid sequences of the PST are conserved in vertebrates but considerably diversified in invertebrates.

We next performed functional assay of the mutations. The mutant forms of *PAX6* cDNAs, generated by PCR-based in vitro mutagenesis, were cloned into plasmids pBluescript and pCAGGS, the latter of which contains a cytomegalovirus enhancer and chicken β -actin promoter (Yamaguchi et al. 1997; Azuma et al. 1999). Wild-type and mutant forms of *PAX6* proteins were synthesized by in vitro transcription and translation by use of rabbit reticulocyte lysate in the presence of [³⁵S] methionine. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and fluorography of the reactions revealed that the *PAX6* proteins with expected molecular weights were produced at similar efficiency (data not shown). It is, therefore, unlikely that the mutations affect the efficiency of translation or stability of *PAX6* protein.

To examine possible functional changes by the detected mutations, we performed a chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay in mouse embryonic carcinoma P19 cells, which are often used for functional analysis of the *PAX6* gene. First, a CAT-reporter construct carrying six copies of P6CON, the consensus binding sequence of the *PAX6* PD (Epstein et al. 1994; Yamaguchi et al. 1997), was used. Wild-type *PAX6* strongly activated CAT reporter-gene expression, and the transcriptional activation potential of *PAX6* was more or less affected by all the mutations reproducibly, with significant impairment by P68S, Q205X, F258S, and S292I (fig. 2b). The mutation within the HD (F258S) impaired the PD-mediated transcriptional activation and is consistent with a report of the functional interplay of the PD and the HD (Mishra et al. 2002).

In the optic stalk and ventral forebrain of the zebrafish embryo, *Pax2* and *Pax6* expression is inversely correlated

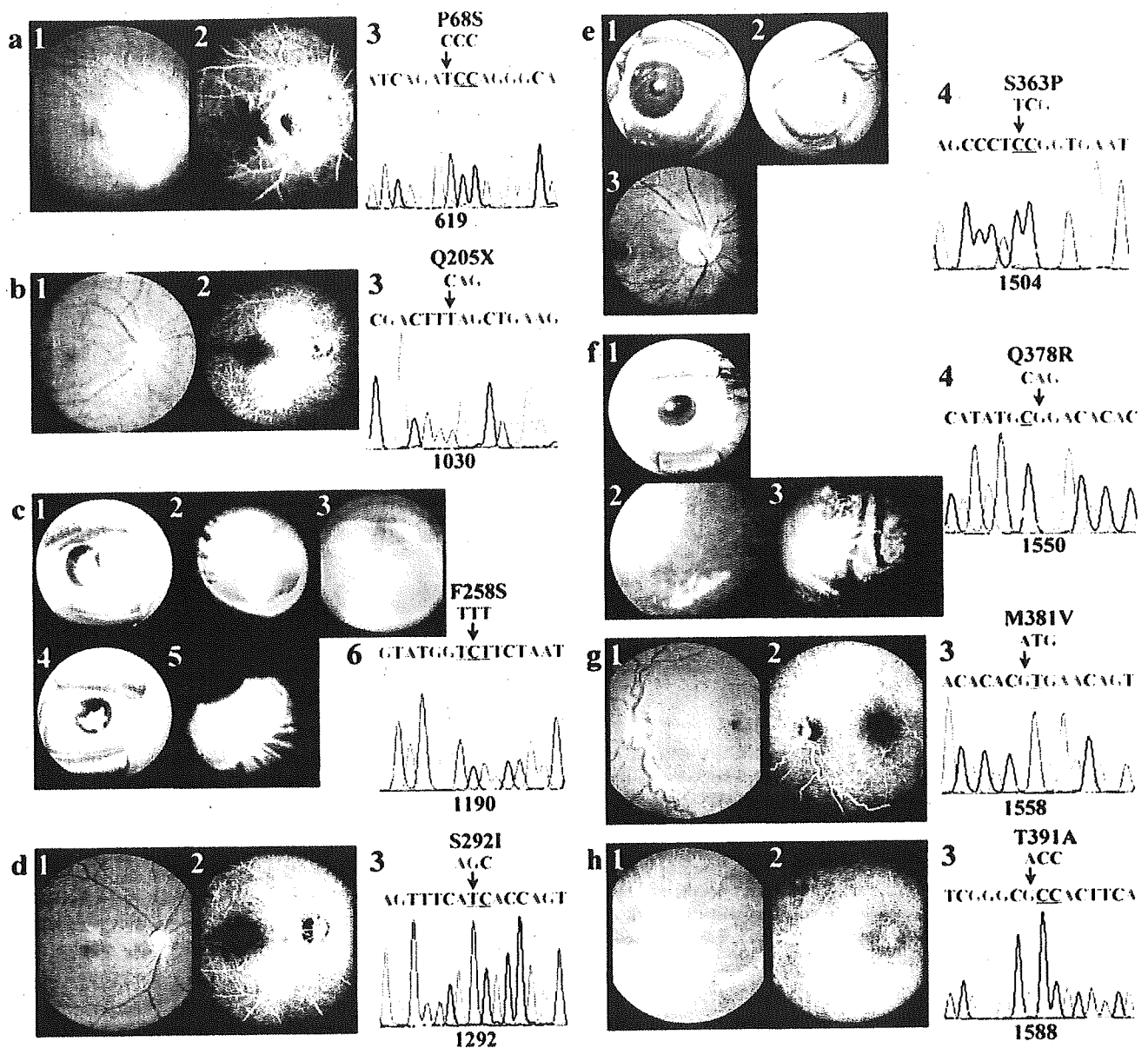


Figure 1 *a*, Fundus photography (*panel 1*) and fluorescein angiography (*panel 2*) of the right eye of patient 1, showing a morning glory disc anomaly. The optic-nerve region is excavated, and white tissue is present at the bottom. *Panel 3*, Mutation analysis identified 619C→T in exon 6 (P68S). *b*, Fundus photography (*panel 1*) and fluorescein angiography (*panel 2*) of the right eye of patient 2, showing a small optic-nerve head surrounded by a hypopigmented ring. *Panel 3*, Mutation detection of 1030C→T in exon 8 (Q205X). *c*, Photographs showing the anterior segments (*panel 1* and *panel 4*) and fundus (*panel 2*, *panel 3*, and *panel 5*) of patient 3. The iris is dysplastic and the posterior fundus showed large coloboma of the optic nerve, retina, and choroid. Hyaloid vessel proliferation is seen in the vitreous cavity. *Panel 6*, Mutation detection of 1190T→C in exon 10 (F258S). *d*, Fundus photography (*panel 1*) and fluorescein angiography (*panel 2*) of the right eye of patient 4, showing ONH. *Panel 3*, Mutation detection of 1292G→T in exon 10 (S292I). *e*, The right eye of patient 5 has a slight corneal opacity and iridocorneal adhesion (*panel 1*) and deep excavation of the optic-nerve head (3). The left eye has substantial corneal opacity (*panel 2*). *Panel 4*, Mutation detection of 1504T→C in exon 12 (S363P). *f*, The anterior segment (*panel 1*), fundus photography (*panel 2*), and fluorescein angiography (*panel 3*) of the left eye, with optic-nerve aplasia, of patient 6. The iris was dysplastic, and the optic-nerve head and retinal vessels were absent, with a remnant of the hyaloid vessels. *Panel 4*, Mutation detection of 1550A→G in exon 12 (Q378R). *g*, Fundus photography (*panel 1*) and fluorescein angiography (*panel 2*) of the left eye, with ONH, of patient 7. *Panel 3*, Mutation analysis identified 1558A→G in exon 12 (M381V). *h*, Fundus photography (*panel 1*) and fluorescein angiography (2) of the left eye, with optic-nerve aplasia, of patient 8. *c*, Mutation analysis identified 1588A→G in exon 12 (T391A).

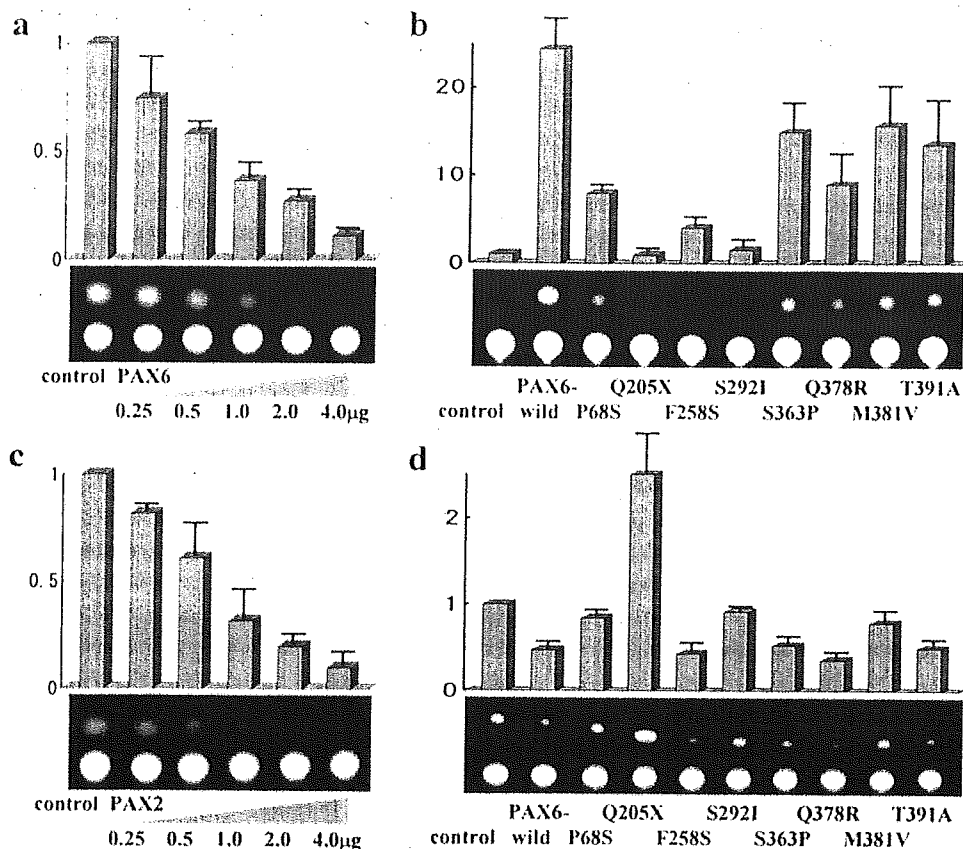


Figure 2 Effects of PAX6 on PAX2 (a) and of PAX2 on PAX6 (c). CAT activities were measured in P19 cells after cotransfection of effector and reporter constructs. Total volume of DNA was adjusted with an empty vector, pBluescript. Cell extracts were prepared after 48 h and assayed for CAT activities by use of a FAST CAT Green Reagent (Molecular Probes). The CAT activity was quantified by measurement with a phospho-fluor-imager (Molecular Dynamics) and illustrated in a fold-activation, compared with the condition with the vector alone. The levels of PAX2 were suppressed with increasing amounts of wild type of PAX6, and vice versa. b, Transactivating potential of PAX6 mutants. 0.1 µg of effector construct and 1 µg of reporter constructs were cotransfected in P19 cells. Transcription level from P6CON was disturbed significantly by P68S, Q205X, F258S, and S292I mutants and slightly by S363P, Q378R, M381V, and T391A mutants. d, Effects of PAX6 mutants on PAX2 expression. One µg of effector construct and 1 µg of reporter constructs were cotransfected in P19 cells. The decreasing level of PAX6 was significantly disturbed with the P68S, Q205X, S292I, and M381V mutants. Each photograph of CAT assay under the bar graph is representative of at least three independent experiments.

under the control of sonic hedgehog signaling (Macdonald et al. 1995). Data indicating reciprocal transcriptional repression of *Pax2* and *Pax6* also were obtained using mouse homologues (Schwarz et al. 2000). Thus, although PAX2 and PAX6 were initially considered to be transcriptional activators, they also may inhibit transcription of some genes to exert their roles during development. We next examined the effect of PAX6 and PAX2 proteins on activities of PAX2 and PAX6 gene promoters, respectively. A CAT-reporter construct carrying an ~2-kb PAX6 promoter region (the 1285th to 3381st nucleotides in GenBank accession number U63833), or a 1.2-kb PAX2 promoter region (the -1002nd to +190th nucleotides in GenBank accession number U45245) was used. When an increasing amount of the PAX6 or PAX2 expression construct was cotrans-

fecting into P19 cells with a constant amount of the PAX2 or PAX6 reporter construct, each CAT activity decreased in a dose-dependent manner, indicating that PAX6 represses PAX2 gene expression and vice versa (fig. 2a and 2c). By use of this assay system, we evaluated possible effects of the PAX6 mutations on PAX2 promoter activity. Four expression constructs carrying P68S, Q205X, S292I, or M381V mutations failed to repress the PAX2 promoter activity, unlike the wild-type PAX6 and other mutant constructs (fig. 2d). These mutations were found with morning glory disc anomaly or ONH and caused a functional change in our experimental system. Because PAX2 mutations were also found in coloboma and ONH (Sanyanusin et al. 1995), we speculate that failure of the PAX6-PAX2 regulatory circuit may affect phenotypic manifestations of these anomalies. Ex-

pression of the CAT-reporter gene was probably inhibited by endogenous PAX6 protein to some extent and stimulated by Q205X through its dominant-negative action on endogenous PAX6, as suggested elsewhere (Singh et al. 1998). Numerous processes are needed for optic-nerve formation, so PAX2 and PAX6 may cooperate in optic-nerve formation or occasionally share tasks; for example, opening and closing the embryonic fissure and mutations of either gene cause similar phenotypic changes.

Our patients had a wide variety of optic-nerve malformations, in which a full series of disease-causing events of optic-nerve malformation—including embryonic fissure (coloboma), retinal ganglion cells (ONH/aplasia), and hyaloid vessels (persistent hyperplastic primary vitreous)—are included (Brown and Tasman 1983). Because *Pax6/PAX6* is expressed in numerous tissues important for optic-nerve development—including the CNS, optic stalk, and retinal progenitors at an early stage, and retinal ganglion cells at a late stage—it is not surprising that many more variable phenotypes are caused by PAX6 mutations than by PAX2 mutations.

Genetic analysis indicated that haploinsufficiency of the gene causes the classical aniridia phenotype, in which all eye tissues are affected. Most mutations detected in aniridia result in premature translational termination on one of the alleles (Martha et al. 1994). In contrast, most missense mutations generate distinctive nonaniridia phenotypes—including anterior segment anomalies, congenital cataracts, and foveal hypoplasia—in which certain eye tissue is affected (Hanson et al. 1999). Because most of the amino acid residues are conserved, distinct missense mutations may alter the degree and specificity of DNA binding and transcriptional regulation by PAX6 protein to a different extent (Yamaguchi et al. 1997; Azuma et al. 1999). Some missense mutations are thought to be recurrently associated with a specific phenotype in eye anomalies. Two patients with an R128C mutation, independently identified in Japan and Europe, had the same phenotype, with foveal hypoplasia (Azuma et al. 1996; Hanson et al. 1999). Mutations associated with Peters anomaly were in the N-terminal subdomain of the PD (van Heyningen and Williamson 2002). In contrast, a missense mutation in the alternatively spliced exon was associated with a variety of ocular anomaly phenotypes (Azuma et al. 1999). No distinct positional effect of the missense mutations on phenotypic manifestation of optic-nerve malformations was found in the present study. Because the *Pax6/PAX6* gene is expressed repeatedly throughout ocular tissues, these missense mutations probably disturb PAX6 protein function in different ways, which result in various phenotypes.

Besides eye anomalies, patient 3 was mentally retarded, and patient 4 had an enlarged CNS ventricle and a urinary anomaly. PAX6 plays an important role in CNS

development, and CNS malformation and mental retardation associated with PAX6 mutations have been reported (Malandrini et al. 2001; Sisodiya et al. 2001). However, gene expression in the urinary tract was not reported. It is unknown if patient 4 carries compound mutations of the separate genes related to eye or urinary-tract development, or whether PAX6 is slightly, or for a short time, expressed in the urinary tract. Because PAX2 is expressed in the kidney, extensive analysis of expression and correlation of PAX6 and PAX2 throughout development would validate the significance of the genes in pathogenesis of the diseases in which multiple organs are involved.

Acknowledgment

This study was supported by grants for genome, tissue engineering biotechnology; for sensory and communicative disorders; and for pediatric research from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan; and by a grant for organized research combination system from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology, Japan.

Electronic-Database Information

Accession numbers and URLs for data presented herein are as follows:

GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> (for human PAX6 mRNA [accession number M93650], human PAX6, promoter and exons 1 and 2 [accession number U63833], human PAX2, promoter and exon 1 [accession number U45245])

Human PAX6 Mutation Database, <http://pax6.hgu.mrc.ac.uk/Tables/tables.htm>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/> (for CON, ONH, PRS, and SOD)

References

- Azuma N, Nishina S, Yanagisawa H, Okuyama T, Yamada M (1996) PAX6 missense mutation in isolated foveal hypoplasia. *Nat Genet* 13:141–142
- Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Hayakawa M, Kanai A, Yamada M (1999) Missense mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in eye anomalies. *Am J Hum Genet* 65:656–663
- Brown GC, Tasman WS (1983) Congenital anomalies of the optic disc. Grune & Stratton, New York
- Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Martensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JK, Hindmarsh PC, Krauss S, Bedington RS, Robinson IC (1998) Mutations in the homeobox gene *HESX1/Hesx1* associated with sepro-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet* 19:125–133
- Epstein JA, Cai J, Glaser T, Jepeal L, Maas RL (1994) Identification of a Pax paired domain recognition sequence and

- evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem* 269:8355-8361
- Gehring WJ (1996) The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes Cells* 1:11-15
- Glaser T, Lane J, Housman D (1990) A mouse model of the aniridia-Wilmus tumor deletion syndrome. *Science* 250:823-827
- Glaser T, Walton DS, Maas RL (1992) Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutation in the human PAX6 gene. *Nat Genet* 1:232-239
- Hanson I, Churchill A, Love J, Axton R, Moore T, Clarke M, Meire F, van Heyningen V (1999) Missense mutations in the most ancient residues of the PAX6 paired domain underlie a spectrum of human congenital eye malformations. *Hum Mol Genet* 8:165-172
- Macdonald R, Barth KA, Xu Q, Holder N, Mikkola I, Wilson SW (1995) Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121:3267-3278
- Malandrini A, Mari F, Palmeri S, Ganbelli S, Berti G, Bruttini M, Bardelli AM, Williamson K, van Heyningen V, Renieri A (2001) PAX6 mutation in a family with aniridia, congenital ptosis, and mental retardation. *Clin Genet* 60:151-154
- Martha A, Ferrell RE, Mintz-Hittner H, Lyons LA, Saunders GF (1994) Paired box mutations in familial and sporadic aniridia predicts truncated aniridia proteins. *Am J Hum Genet* 54:801-811
- Mishra R, Gorlov IP, Chao LY, Singh S, Saunders GF (2002) PAX6, paired domain influences sequence recognition by the homeodomain. *J Biol Chem* 277:49488-49494
- Nishina S, Kohsaka S, Yamaguchi Y, Handa H, Kawakami A, Fujisawa H, Azuma N (1999) PAX6 expression in the developing human eye. *Br J Ophthalmol* 83:723-727
- Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, Dobyns WB, Eccles MR (1995) Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 9:358-364
- Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Gruss P (2000) Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* 127:4325-4334
- Singh S, Tang HK, Lee JY, Saunders GF (1998) Truncation mutations in the transactivation region of PAX6 results in dominant-negative mutants. *J Biol Chem* 273:21531-21541
- Sisodiya SM, Free SL, Williamson KA, Mitchell TN, Willis C, Stevens JM, Kendall BE, Shorvon SD, Hanson IM, Moore AT, van Heyningen V (2001) PAX6 haploinsufficiency causes cerebral malformation and olfactory dysfunction in humans. *Nat Genet* 28:214-216
- van Heyningen V, Williamson KA (2002) PAX6 in sensory development. *Hum Mol Genet* 11:1161-1167
- Walther C, Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435-1449
- Yamaguchi Y, Sawada J, Yamada M, Handa H, Azuma N (1997) Autoregulation of Pax6 transcriptional activation by two distinct DNA-binding subdomains of the paired domain. *Genes Cells* 2:255-261

Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein is phosphorylated by c-Jun NH₂-terminal kinase

Yuko Okamura-Oho¹, Toshiyuki Miyashita¹, Kazuaki Nagao¹, Seigo Shima¹, Yukie Ogata¹, Toshiaki Katada², Hiroshi Nishina² and Masao Yamada^{1,*}

¹Department of Genetics, National Research Institute for Child Health and Development, 3-35-31 Taishido, Setagaya-ku, Tokyo, 154-8567, Japan and ²Department of Physiological Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0033, Japan

Received February 25, 2003; Revised and Accepted April 30, 2003

Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) is a dominant-inherited neurodegenerative disease characterized by selective cell loss in particular neuronal pathways. This is caused by expansion of CAG repeats in the coding region of the DRPLA gene, and the extended polyglutamine tract (polyQ) confers a toxic activity. It is valuable to characterize disease gene products for elucidation of the mechanism underlying neuron death at specific anatomical areas of the brain. Here, we define the DRPLA protein as a phosphoprotein, and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) is one of the major factors involved in its phosphorylation. Endogenous DRPLA protein was serine-phosphorylated. Phosphorylation was demonstrated in a recombinant JNK activation system *in vitro* and also in overexpressing cells by transfection after the JNK activation with osmotic pressure. One of the phospho-acceptor sites for JNK appearing in the DRPLA sequence was indeed phosphorylated, which was confirmed by a specific antibody raised against the phosphopeptide. Kinetic studies in the JNK recombinant system showed that expanded polyQ slightly reduced the affinity of JNK to the protein. Thus, the abnormal DRPLA protein seems to be slowly phosphorylated in a certain condition of JNK activation in patients. It may delay a process that is essential in keeping neurons alive.

INTRODUCTION

Dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA) is a dominantly inherited neurodegenerative disease characterized by selective neuron loss in the cerebellar and pallidal outflow pathways (1). The disease is caused by expansion of CAG repeats in the coding region of the DRPLA gene, and the extended polyglutamine tract (polyQ) confers a toxic activity to a subset of neurons (2–4). Several other neurodegenerative diseases including Huntington disease are also known to be caused by expansion of CAG repeats in the coding region of the respective genes (5). Thus, these diseases are collectively called polyglutamine diseases. It has been demonstrated that over expression of extended polyQ induces apoptosis in a variety of cells (6,7), but the precise mechanism leading to apoptosis has not yet been settled. Previous studies have implied impairment of transcription, retardation in cleaning of misfolding proteins, sequestering of essential factors or formation of pores with extended polyQ (8–20). Although several studies have excluded the involvement of aggregates visible under a microscope in these processes (21–23), all the proposed mechanisms seem to imply the cohesive force of polyQ.

We have been studying the normal functions of the DRPLA product (24–27), also known as 'atrophin-1'. As a specific subset of neurons are degenerated in different polyglutamine diseases, polyQ alone is not enough to elucidate the pathogenesis of patients. We previously reported binding partners with DRPLA protein (25). Among them, IRSp53 and DVL1 potentially activate signaling cascades of c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK), a family member of mitogen activated protein kinases (MAPKs), which phosphorylates serine/threonine (S/T) residues followed by proline (S/TP) (28–34). Seven other binding partners use phosphorylated S/T as a target (25,35). As there are many S/TP sequences in the DRPLA protein (4) (Fig. 1), we are interested on the phosphorylation state of the product. Recently, a DRPLA-like protein in *Drosophila*, Atro (or Grunge), was reported to have multiple functions in transcriptional regulation (36,37). It functions as a transcriptional co-repressor in the earliest stage of embryogenesis, and further participates in body patterning in multiple developmental stages as transcriptional regulators. Expression of the abnormal DRPLA protein with extended polyQ in *Drosophila* embryos causes deregulation of transcription. Atro/Grunge has

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +81 334160181; Fax: +81 334122259; Email: myamada@nch.go.jp

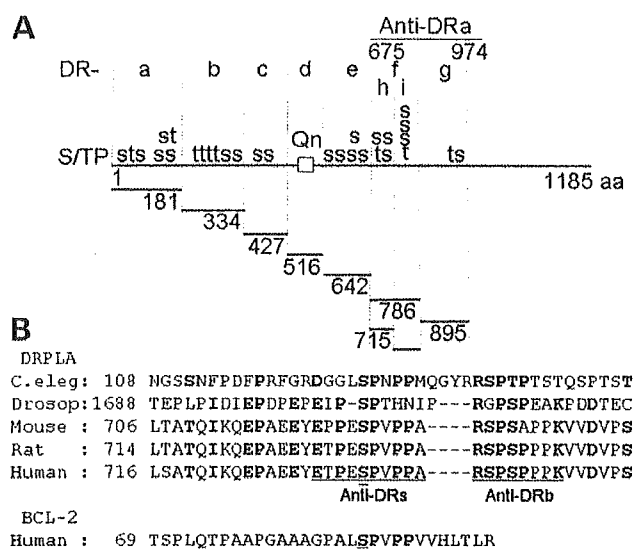


Figure 1. Putative phosphorylation sites in the DRPLA protein. (A) The amino acid sequence of the human DRPLA protein containing polyglutamine (Qn), serine (s) or threonine (t) followed by a proline residue (S/TP), fragments of the DRPLA protein (DR-a-i), and an antigen fragment used for generating the anti-human DRPLA antibody (anti-DRa) are indicated. (B) Conserved amino acid residues in the DR-1 fragment of the human DRPLA protein and in the homologous portion of other species. Accession numbers of the genes are AF068719, NM_079249, XM_132846, NM_017228 and D31840. Conserved residues at least in four species are bold. Serine 734 in the DRPLA protein and serine 98 in human BCL-2 are double-underlined. Amino acid residues for generating an anti-DRPLA phospho-serine 734 antibody (anti-DRs) and an anti-DRPLA peptide antibody (anti-DRb) are underlined.

evolved into two descendants, DRPLA and RERE, in mammals (4,26). Although human DRPLA protein lacks a putative DNA-binding domain in the N-terminal portion of the Drosophila homolog, it may be still be involved in transcriptional regulation as it gains additional motifs in the flanking region of polyQ. In light of these observations, we have characterized the phosphorylated state of the DRPLA protein and detected phosphorylation by JNK.

RESULTS

Endogenous DRPLA protein was phosphorylated

We first examined a phosphorylated state of the DRPLA protein in cultured cells (Fig. 2). The major form of the DRPLA protein in human neuroblastoma cells moved to the position of a 160 kDa protein through SDS-PAGE and was visualized with anti-human DRPLA antibody (anti-DRa), as shown previously (24). When the cell lysate was treated with alkaline phosphatase, the major form moved faster through SDS-PAGE and migrated to the same position as the *in vitro* translated product without post-translational modification (Fig. 2A). The major form precipitated with the anti-DRa antibody from the cell lysate was immuno-reactive to an anti-phosphoserine antibody (anti-pS), and it almost lost the reactivity when treated with the alkaline phosphatase (Fig. 2B and C). These results indicated that the major form of DRPLA protein in cultured cells was serine-phosphorylated.

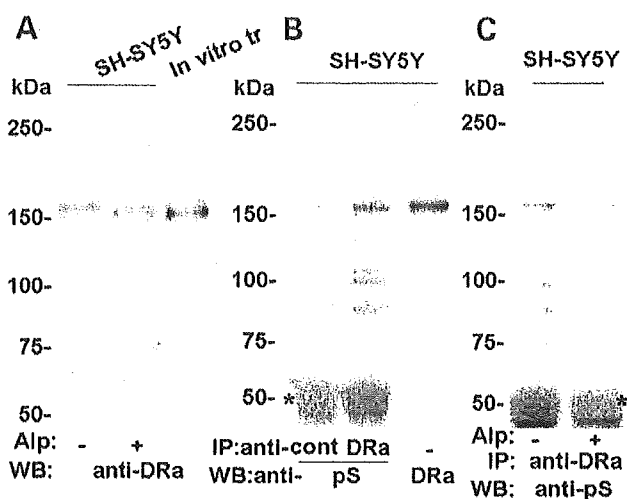


Figure 2. Phosphorylation of the DRPLA protein in cultured cells. (A) Treatment with alkaline phosphatase increases the mobility of the DRPLA protein through SDS-PAGE. Aliquots of neuroblastoma (SH-SY5Y) cell lysate were incubated with or without alkaline phosphatase (Alp + and -), applied to SDS-PAGE and blotted with an anti-recombinant DRPLA antibody (anti-DRa). The *in vitro* translation product of the DRPLA protein was in the parallel run. (B) and (C) DRPLA protein is serine-phosphorylated. Aliquots of cell lysate were immunoprecipitated with the anti-DRa antibody or a pre-immune serum (anti-DRa or cont), and analyzed by western blotting with an anti-phosphoserine antibody (pS). The molecular size of the DRPLA protein is indicated in the parallel run of cell lysate blotted with the anti-DRa antibody. The immunoprecipitated protein was treated with or without the alkaline phosphatase (Alp + and - in panel C). Bands indicated by asterisks are the heavy chains of immunoglobulin.

DRPLA protein was phosphorylated by JNK *in vitro*

In an attempt to establish a biochemical basis for the phosphorylation, we adopted an *in vitro* activation system for JNK in which purified forms of recombinant protein kinases were mixed together. In this mixture, JNK3 is synergistically activated by two forms of MAPK kinase (MKK), constitutive active MKK7 and native MKK4 that is activated by constitutive active MEK kinase 1 (MEKK1), as described previously (38-40).

In vitro translation products of DRPLA with normal or expanded repeats were subjected to the activation system and analyzed by SDS-PAGE. When incubated in the JNK mixture, the translation products migrated more slowly than the untreated counterparts (Fig. 3A, upper panel). As the mobility shift was not observed by omission of any member of the four kinases from the reaction, the shift must be due to synergistically activated JNK as previously demonstrated. The products translated in unlabeled conditions, were radiolabeled after incubation in the mixture containing [γ - 32 P]ATP (Fig. 3A, lower panel). When JNK-reacted products were further treated with alkaline phosphatase, the products moved faster than the untreated counterparts (Fig. 3B). Thus, we concluded that the normal and abnormal forms of the DRPLA protein were phosphorylated by JNK *in vitro*.

A time course study of phosphorylation showed that both the normal and abnormal DRPLA proteins were fully phosphorylated within 120 min (Fig. 3C and D). However, a