

200936180A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

クラインフェルター症候群およびターナー症候群の
臨床病態・治療プログラムの検討と発症機構解明による
診断法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高田修治

平成22（2010）年3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

クラインフェルター症候群およびターナー症候群の
臨床病態・治療プログラムの検討と発症機構解明による
診断法の開発

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 高田修治

平成22（2010）年3月

目次

I. 総括研究報告

成人ターナー症候群患者の合併症 1

研究代表者 高田 修治

研究分担者 堀川玲子、浅原弘嗣、柳谷隆宏、横山成俊、伊藤義晃、平岡秀一

II. 分担研究報告

クラインフェルター症候群の病態解明のための1細胞レベルでのX染色体からのアレル特異的遺伝子発現解析 7

柳谷隆宏、伊藤義晃、山下聡

III. 研究成果の刊行・発表に関する一覧表 13

I. 統括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

「成人ターナー症候群患者の合併症」に関する研究

研究代表者 高田修治 国立成育医療センター研究所 成育社会医学研究部室長

研究要旨

性染色体の数的・構造的異常を原因とするクラインフェルター症候群およびターナー症候群は、X染色体の過剰（クラインフェルター症候群）や欠損（ターナー症候群）に関連した様々な障害を生ずる。これらの性腺機能低下症に対しては、対処療法としてホルモン補充療法が有効であるが、それでもなお、両疾患患者のQOLを低下させている要因は、両疾患において高頻度に併発する様々な合併症の存在にある。特に、耐糖能異常・糖尿病や自己免疫疾患の発症リスクは生涯に渡るため、患者や家族の不安・精神的苦痛は計り知れない。それ故に、将来直面するかもしれない合併症を予測することや合併症のリスクをコントロールすることは、患者の生命予後を改善するだけでなく、患者および家族の精神的・経済的負担を軽減する上でも重要な課題である。本研究では、ターナー症候群、特に、成人期以降の患者に注目し、合併症の実態把握調査を行うことによって臨床的特徴を見出し、より効果的な合併症のスクリーニング法に関する知見を得ることを目標とする。

研究分担者

堀川玲子 国立成育医療センター第一専門
診療部内分泌代謝科 医長
浅原弘嗣 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 部長
柳谷隆宏 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員
伊藤義晃 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員
山下 聡 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員
平岡秀一 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員

症候群の主徴である不妊の根本的治療法は存在しないものの、類宦官体型（クラインフェルター症候群）や低身長・無月経（ターナー症候群）などに対してはホルモン療法が有効である。しかし、高い効果を得るには早期に治療を開始する必要があるが、早期に診断されないケースは少なくない。一方、これらの疾患は、外表小奇形のほか、心・血管疾患（ターナー症候群）や骨粗鬆症（クラインフェルター症候群）、耐糖能異常（ターナー症候群）、自己免疫疾患（クラインフェルター症候群およびターナー症候群）といった、患者の生命予後を低下させる合併症を伴う疾患でもある。そのため、患者に対しては、小児から成人期以降の長期に渡ったホルモン治療のほか、生涯に渡る合併症のスクリーニング、精神的サポートが必須となる。

ターナー症候群における合併症や治療に関する実態調査は、主に未成年者に対して行われており、成人期以降の患者における

A. 研究目的

クラインフェルター症候群およびターナー症候群は、X染色体の数的・構造的異常に起因した症状の総称であり、患者頻度は1/1000（クラインフェルター症候群、男性）から1/1600（ターナー症候群、女性）である。クラインフェルター症候群およびターナー

合併症調査は、非常に小規模のものを除き、ほとんど行われていない。そこで、本研究では、国立成育医療センターにおいて定期診療を行った 20 歳以上の患者における合併症調査を行い、成人期以降の患者における臨床的特徴を見出すことによって、より効果的な合併症スクリーニングを行うための知見を得ることを目標とした。

一方、クラインフェルター症候群やターナー症候群の発症には、X 染色体に関連した遺伝子発現パターンの変化が関係していると考えられているが、詳細についてはほとんど分かっていない。その理由は、X 染色体不活性化機構が 1 細胞単位でランダムに起こるためであり、技術的に困難であるため 1 細胞単位での検討はほとんど行われていない。そこで、本研究では、X 染色体の数的・構造的異常によって X 染色体からの遺伝子発現がどのように変化しているのかについて、1 細胞単位での遺伝子発現解析を行い、X 染色体不活性化機構による遺伝子発現制御に対する X 染色体の数的・構造的異常の影響について明らかにすることも目標とした。

B. 研究方法

臨床情報の収集 国立成育医療センターに定期通院中、または定期受診の既往があり、治療、二次性徴発来、合併症に関する基本データが得られた 78 例のターナー症候群患者を対象に調査を行った。なお、これらの患者の年齢は 22 歳から 50 歳までとなった。

C. 研究結果

まず、2 次性徴に関しては、78 例中 10 例 (12.8%) で月経自然発来が認められた。詳しい内訳は、11 歳が 1 例、12 歳が 2 例、13 歳が 4 例、18 歳が 3 例であった。一方、閉経を確認した症例は 3 例あった (19、20、30 歳)。

先天的合併症として高頻度で併発する心血管系合併症について調査したところ、約

3 割 (57 例中 17 例) の患者で異常が認められた (図 1)。最も多いものとしては、大動脈縮窄 (7 例) であり、続いて、大動脈弁狭窄症 (2 例)、心房中隔欠損 (2 例)、心室中隔欠損 (2 例)、僧帽弁逆流 (1 例) であった。また、今回調査した 78 名中、3 名において大動脈起始部動脈瘤が確認された。

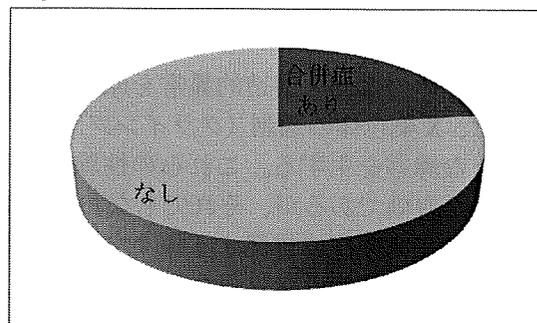


図 1 心血管系合併症の合併割合。

次に、腎尿路系合併症に関する調査の結果、2 割強 (56 例中 12 例、21.4%) の患者で異常が認められ (図 2)、内訳としては、馬蹄腎 (5 例) や水腎症 (3 例) が多く、少数症例として、腎片側無形成 (1 例) や重複尿管 (1 例)、重複腎 (1 例)、回旋異常 (1 例) などが認められた。

自己免疫性甲状腺疾患 (甲状腺機能低下症) に関しては、1 割弱 (43 例中 4 例、9.3%) の患者で認められた (図 3)。甲状腺機能低下症に至らない患者でも、約 7 割 (43 例中 30 例) で抗甲状腺抗体が陽性であった。同様の調査を 15 歳未満のターナー症候群患者に対して行ったところ、抗甲状腺抗体陽性患者は見出されず、自己抗体の上昇には、加齢の影響が関与していることが示唆された。一方、甲状腺機能亢進症 (バセドウ病) の症例については認められなかった。

次に、糖代謝異常に関しては、4 割弱の患者 (39 例中 14 例、35.9%) で認められた (図 4)。年齢依存的な耐糖能異常の発現率の増加が認められることから、加齢による影響のほか、思春期の肥満増加に伴う耐糖能異常の増加が関わっていると考えられるが、家族歴から推測される遺伝的要因

も深く関わっていると考えられる。

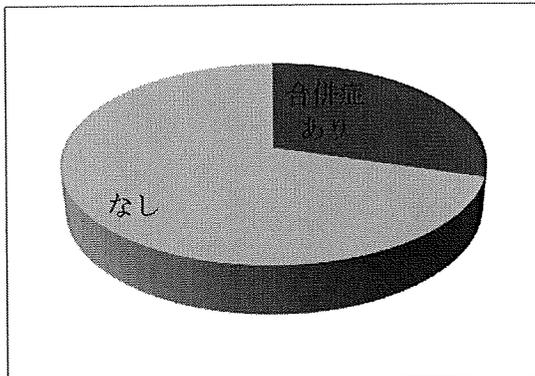


図2 腎尿路系合併症の合併割合。

次に、精神・神経系疾患に関する調査の結果、成人ターナーの約 15% (78 例中 12 例) において、精神・神経系疾患が認められた (図 5)。その内訳としては、てんかんが 2 例 (2.5%)、中程度以上の精神発達遅滞が 3 例 (3.8%)、神経症・統合失調症が 7 例 (9.0%) であった。

D. 考察

今回の研究では、殆んど調査が行われていない成人におけるターナー症候群患者の合併症に焦点を絞り、国立成育医療センターに定期通院、定期受診の既往のあるターナー症候群患者での実態調査を行った。心血管系合併症に関しては、大動脈縮窄や、大動脈弁狭窄症、心房中隔欠損、心室中隔欠損、僧帽弁逆流などの先天的な異常のみならず、大動脈起始部動脈瘤などの後天的な異常も確認された。また、内分泌代謝疾患に関しても、年齢依存的な耐糖能異常の発現率の増加が認められることから、これらの合併症に対する定期検査などのフォローが必要であると言える。また、腎尿路系合併症に対しても、長期フォローが必要となる。

一方、今回の調査では、約 15% において精神・神経系疾患が認められた。これらの合併症が高頻度に認められたことを念頭に、当該患者に対しては、現状より早期からの介入が必要であると考えられる。

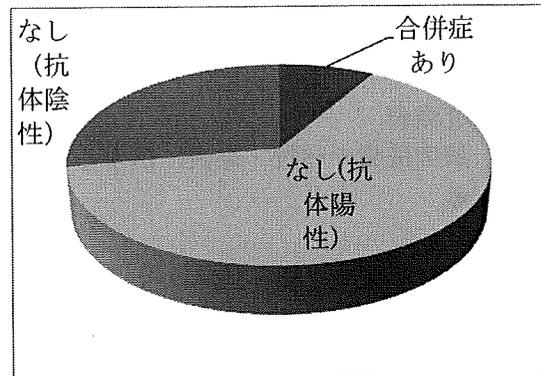


図3 甲状腺機能低下症の合併割合。

精神・神経系疾患や、今回の調査では確認されなかった稀な自己免疫疾患などの合併症に関しては、全国規模の実態調査を行うことにより、頻度や発症時期、治療に関するより詳細な実態把握が可能となる。今回の調査ではターナー症候群患者を中心に研究を進めたが、クラインフェルター症候群患者に関しては、十分な症例数が得られなかったため、調査を行うことが出来なかった。そのため、クラインフェルター症候群についても全国規模の調査を通して、合併症に関する実態を把握する必要がある。

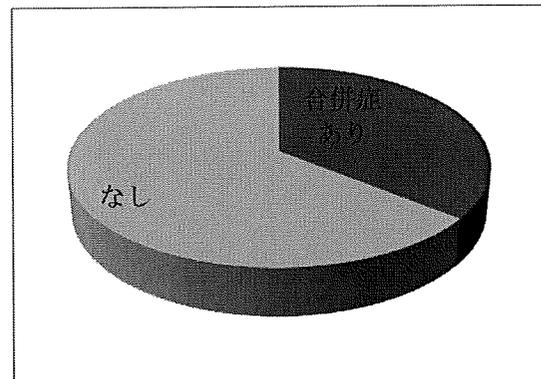


図4 耐糖能異常の合併割合。

E. 結論

ほとんど調査されていない、成人のターナー症候群患者における合併症に関する知見を得ることが出来た。より詳細な実態把握のためには、全国規模の実態調査が必要となる。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

III. 研究成果の刊行・発表に関する一覧表に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

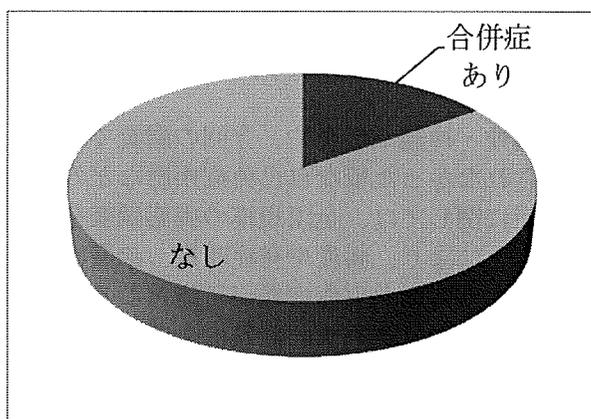


図5 精神・神経系疾患の合併割合.

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担報告書

「クラインフェルター症候群の病態解明のための1細胞レベルでのX染色体からのアレル特異的遺伝子発現解析」に関する研究

研究分担者 柳谷隆宏 国立成育医療センター研究所 研究員

研究要旨

クラインフェルター症候群およびターナー症候群は、性染色体の数的・構造的異常を原因とする様々な障害を生ずる。X染色体の過剰や欠損によるクラインフェルター症候群やターナー症候群の分子発症機構としては、X染色体上の遺伝子発現を染色体レベルで制御するX染色体不活性化機構の破綻・逸脱に関連したメカニズムが提唱されているが、詳細についてはほとんど分かっていない。その理由は、X染色体不活性化機構が1細胞単位でランダムに起こっているためであり、技術的に困難であるため1細胞単位での検討はほとんど行われていない。本研究では、X染色体の数的・構造的異常によってX染色体からの遺伝子発現がどのように変化しているのかについて1細胞単位での発現解析を行い、疾患発症におけるX染色体由来の遺伝子発現異常についての解析を目指すものである。

研究分担者

柳谷隆宏 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員
伊藤義晃 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員
山下 聡 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員
平岡秀一 国立成育医療センター研究所
移植・外科研究部 研究員

が期待されるにも関わらず、思春期以降において染色体異常が発見される例も少なくない。そのため、思春期以前での簡便で正確な診断法の開発が望まれる。一方、これらの疾患は、生命予後を低下させる先天的・後天的合併症を伴うことが多い疾患でもある。そのため、それぞれの疾患の主病態に対するホルモン療法のほか、長期間に渡った合併症に対する予防医学的処置や治療、患者・家族に対するサポートが必要となる。

A. 研究目的

性染色体の数的・構造的異常を原因とするクラインフェルター症候群およびターナー症候群は、X染色体の過剰（クラインフェルター症候群）や欠損（ターナー症候群）に関連した様々な障害を生ずる。クラインフェルター症候群で見られる思春期発来の遅延や不完全な二次性徴に関連する類宦官症、ターナー症候群における低身長や二次性徴の欠如、無月経症などに対しては対処療法としてホルモン補充療法が有効である。しかし、早期からの治療によって高い効果

X染色体の数的・構造的異常によるクラインフェルター症候群やターナー症候群の分子発症機構としては、X染色体上の遺伝子発現を染色体レベルで制御するX染色体不活性化機構の破綻・逸脱に関連したメカニズムが提唱されている。しかし、詳細についてはほとんど分かっていない。その理由は、X染色体不活性化機構が1細胞単位でランダムに起こっているためであり、技術的問題のため1細胞単位での検討はほとんど行われていない。さらに、多くのケースにお

いて染色体異常を起こした細胞と正常な細胞が混在する場合があるため(モザイク型)、「細胞集団」を対象にした解析では平均的な現象しか観察できない。そこで、我々は、クラインフェルター症候群やターナー症候群患者の末梢血細胞におけるX染色体由来の遺伝子発現パターン(2つまたは3つのアレルからの遺伝子発現)について1細胞レベルで調べるための技術的な開発を進めた。本研究は、X染色体の数的・構造的異常によってX染色体からの遺伝子発現パターンがどのように変化するか、さらに、その変化が後天的に発症する様々な合併症に対して、どのような影響を及ぼしているかについて調べることを目標としている。

B. 研究方法

末梢血細胞の分離 本研究では、まず初めに、1細胞単位でのX染色体からの遺伝子発現解析に関する技術的な開発を試みた。解析対象とする細胞は、末梢血リンパ球を選んだ。北里大学臨床薬理研究所に來所した成人女性ボランティアに対して十分な研究計画・目的の説明を行った上で、研究協力への同意が得られたボランティアからのみ採血(5ml)を行った。採血した血液サンプルは、採血当日のうちに国立成育医療センター研究所移植・外科研究部に輸送した。なお、本研究については、国立成育医療センターおよび北里大学の倫理委員会において厳正な審査を受け、倫理委員会の承認ならびに機関長(総長)の許可を得て、全ての研究を適正に遂行した。

血液サンプルより末梢血リンパ球の分離作業を行った。5mlの全血に対して等量の緩衝液A(0.01% anhydrous D-glucose, 0.005 μ M CaCl₂·2H₂O, 0.098 μ M MgCl₂·6H₂O, 0.54 μ M KCl, 0.0145M Tris-HCl pH7.6, 0.126M NaCl)を加え転倒混和して希釈血液サンプルを調整した。15ml遠心管に4.5mlのFicoll-Plaque PLUSを分注したのち、希釈血液サンプルを5ml重層して、400 x gで30分間遠心した(密度勾配遠心)。

遠心後、ピペットを用いて単核球画分(PBMC画分)を回収し、ここに3倍量の緩衝液Aを加えて転倒混和した。100 x gで10分間の遠心操作ののち、上清を除去してペレットを得た。同様の操作をもう一度繰り返したのち、PBMCを得た。このPBMCのペレットに1mlのPBS(-)を加えて細胞懸濁液を調整した。細胞懸濁液のうちの300 μ lについては、ゲノムDNAの抽出のために、RLT plus bufferで溶解して-80 $^{\circ}$ Cで保存した。なお、このゲノムDNAは、SNP genotypingに用いた。残った細胞懸濁液は再度遠心操作(200 x g, 5分間)を行い、細胞をペレットにした後、50 μ lのPBS-BSAに懸濁した。この懸濁液に、CD4およびCD8に対する抗体を金属ビーズで標識したparticleを添加して室温で30分間反応させた。PBS-BSAによって洗浄のための混和作業を行い、マグネットを用いてビーズと反応した細胞を固定した状態で洗浄液を別の試験管に移した。ここで得られた固定された細胞画分をT細胞画分(CD4+/CD8+ cell mixture)とした。T細胞画分は1mlのPBS-BSAに懸濁したのち、一部をtotal RNAの抽出用サンプルとして扱った。残りについては、1細胞レベルでの遺伝子発現解析用サンプルとし、顕微鏡下にてマウスピペットを用いて1細胞ずつ拾い上げた。各細胞は0.2mlのPCR用チューブに移したのち、4 μ lの細胞溶解液を添加してから-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。1個人由来の末梢血T細胞として、8個から24個の細胞を拾い上げた。

DNA抽出・SNP genotyping

細胞分離の際に回収したPBMCを用いてDNA抽出を行った。DNAは、DNA/RNA Mini Kit (Qiagen)を用いて抽出した。SNP genotypingは、TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems)を用いて行った。タイピングを行ったSNP IDとそれに対するTaqMan SNP Genotyping AssayのAssay IDは次の通り。B2M (rs7151, C_12080823_10)、MSL3 (rs2240196,

C_16176476_20)、GPRASP1 (rs2235804, C_25760560_10)、SEPT6 (rs7060, C_2292065_1)、HUWE1 (rs2281481, C_15875873_20)。なお、SNP genotyping は ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて行った。

cDNA 合成、RT-PCR

1 細胞レベルでの cDNA 合成は、次のように行った。細胞溶解液 (4μl) と細胞 (1 個) の混合液に 16μl の逆転写反応液 (5x First-Strand Buffer, 300ng random hexamer, 0.625mM dNTP, 6.25μM DTT, 100U SuperScriptIII, 20U RNaseOUT RNase inhibitor, 1000 copies XenoRNA control) を加えて、全量を 20μl とした。この反応液を 25°C で 15 分間、42°C で 60 分間インキュベートしたのち、75°C で 10 分間加温した。1unit の RNase H (Invitrogen) を添加したのち 37°C で 20 分間インキュベートした。すべての反応は GeneAmp 9700 thermal cycler (Applied Biosystems) を用いて行った。合成された cDNA は SNP 周辺領域の増幅のための multiplex RT-PCR のサンプルとした。まず、cDNA 溶液を 7μl ずつに分注して、それぞれに 43μl の multiplex PCR 反応液を加えて全量を 50ul とした。PCR は 95°C で 3 分間の反応ののち、94°C で 20sec, 57°C で 20sec, 72°C で 30sec の反応を 20 サイクル行った。Multiplex PCR に用いたプライマーセットは以下の通り。B2M; 5'-TGCCGCATTTGGATTGGATGAATTC-3' and 5'-CCCCAAATTCTAAGCAGAGTATGTA AATTG-3', MSL3; 5'-GTTTTTAGCAGAATACCACGATGAC TTC-3' and 5'-GTTCTTGCTAACTAAGTCAATGTCT ACTG-3', GPRASP1; 5'-AGTTGAACAGGAGCCTGATCCTTC-3' and 5'-GTATGCAGTTACAGGATGAACTCTC-

3', SEPT6; 5'-GGTTTGGTTTCTACCTCCAAGCATATG G-3' and 5'-GCACACAGTCAAACAAGGTTATGC-3', HUWE1; 5'-GCCGGGCTTCGGAGAATAG-3' and 5'-CTGTGACCTTCATCCAGACTCTG-3', GAPDH; 5'-GCGAGATCCCTCCAAAATCAAGTG-3' and 5'-AGTCTTCTGGGTGGCAGTGATG-3'

アレル特異的発現解析

各アレルからの遺伝子発現については、TaqMan SNP Genotyping Assay のプロトコールに従って調べた。Multiplex PCR 反応液 (計 150ul) のうち、3ul をサンプルとした。TaqMan probe は、SNP genotyping に用いたものと同じ probe を利用した。各アレルからの遺伝子発現を調べるにあたっては、検量線を用いて発現割合を算出するが、検量線用のサンプルとしては、各 SNP に関して homozygote (遺伝子型が AA/AB/BB となる場合、AA homozygote と BB homozygote) となる不死化 B 細胞由来の 2 種類の DNA の混合サンプル (AA homozygote と BB homozygote の混合比が 10:0, 8:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1.5:1, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:8, 0:10 となるように混合したサンプル) を用いた。リアルタイム PCR は ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System を用いて行い、すべてのサイクル数での蛍光強度をモニターした。PCR 終了後、30 または 35 サイクル目での蛍光強度を抽出して、 $\log_2(\text{FAM intensity}/\text{VIC intensity})$ を算出した。検量線のデータに当てはめ、FAM の蛍光に関連するアレルの発現割合を算出した。VIC の蛍光に関連するアレルからの発現割合は、VIC-allele expression (%) = 100 - (% of FAM-allele expression) として計算した。なお、我々は、1 細胞ごとの単離、cDNA 合成や RT-PCR の精度を調べるため、GAPDH の発現解析を併せて行った。もし、

細胞の単離が出来ていなかったり、RNA が分解していたり、cDNA 合成・RT-PCR が正確に出来ていなかった場合、GAPDH の発現は検出できなくなる、または、発現量が非常に低く見積もられるので、そのようなことがないかどうかについて調べた(実験や操作精度の検証)。GAPDH の発現解析はリアルタイム PCR によって調べたが、その時に用いたプローブ・プライマーは次の通りである。
 5'-ATGCTGGCGCTGAGTACGT-3', 5'-AGCCCCAGCCTTCTCCAT-3',
 5'-VIC-CTGGCGTCTTCACCAC-NFQ-3'

C. 研究結果

まず、我々は、1 細胞単位での遺伝子発現をアレル毎に見分けるための基盤技術開発を行った。本解析で用いる技術は、1 細胞単位での RT-PCR と、解析対象とする遺伝子の 5'UTR、CDS または 3'UTR 上に存

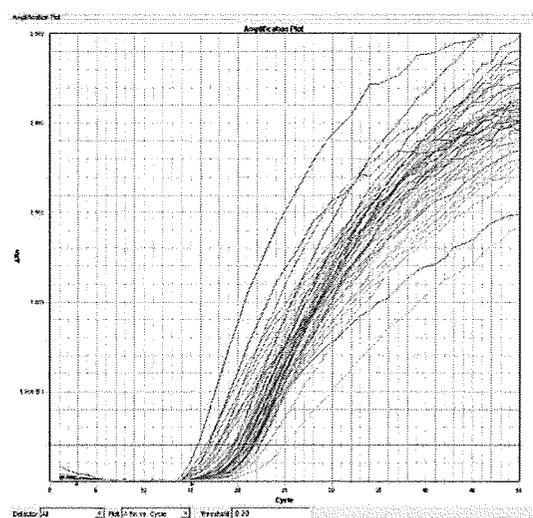


図 1 B2M のリアルタイム PCR (SNP Genotyping Assay)の増幅曲線。各アレルに由来する蛍光シグナルの増加が同時に認められることから、両アレルから遺伝子が発現していることになる。

在する一塩基多型(SNP)に対する SNP genotyping を組み合わせたものである。そ

のために、1) ある程度の頻度で存在する SNP を検索して解析可能な遺伝子を絞り込む、2) 血液サンプルから抽出した genomic DNAを用いて SNP genotyping を行い、マーカーとする SNP に関して heterozygote である検体を採す、3) 解析可能な検体に関して 1 細胞レベルでの cDNA 合成を行い、解析予定遺伝子の SNP 周辺領域の RT-PCR による増幅を行い、4) TaqMan SNP Genotyping probe を用いて、PCR 産物の SNP genotyping を行った。まず初めに我々は、常染色体上に存在するハウスキーピング遺伝子について、各アレルからの遺伝子発現を 1 細胞レベルで見分けることが出来るかどうか調べた。前述したように、SNP をマーカーとして用いるが、発現した(転写された)遺伝子上に SNP が存在する必要がある。そこで我々は、B2M (beta-2 microglobulin)を解析対象として選択した。B2M は第 15 番染色体上に存在す

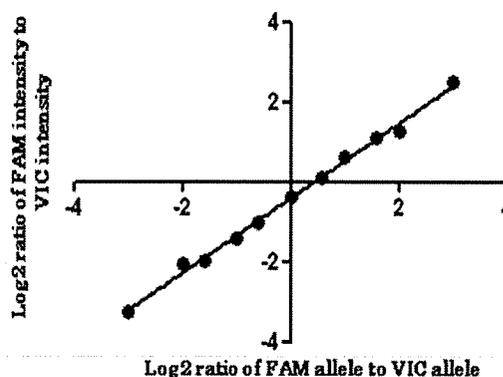


図 2 B2M のアレル特異的発現解析で用いた検量線

る遺伝子であり、この遺伝子の 3'UTR には日本人集団における遺伝子型頻度が 0.750 (C/C)、0.227 (C/G)、0.023 (G/G) となる SNP、rs7151 が存在していた。そこで、rs7151 に対する SNP Genotyping を行い、C/G heterozygote となるサンプルを選んだ。このサンプルについて、1 細胞レベルでの cDNA 合成を行い、これをテンプレートと

して rs7151 周辺領域の RT-PCR を行った。RT-PCR によって増幅された amplicon に対して、TaqMan SNP Genotyping probe を用いて genotyping を行ったところ、2つのアレルからの転写物に由来する蛍光シグナルの増加が認められた (図 1)。これらのデータについては、検量線を用いて相対的な遺伝子発現量を算出した (図 2)。今回の検討では、4人の末梢血 T細胞について各 8個の細胞 (計 32 サンプル) における B2Mのアレル特異的発現について調べた。その結果、32 サンプルのすべてで有効と判断できるデータが得られた。ほとんどのデータは、片方のアレルからの遺伝子発現割合が約 50~65%の中に当てはまった (図 3)。すなわち、もう片方のアレルからの発現割合は 50~35%であることが分かった。この結果は、常染色体上の遺伝子である B2Mの各アレルからの遺伝子発現比は 1:1~1:1.8程度であることを示しており、当初から予想された結果に合致した。

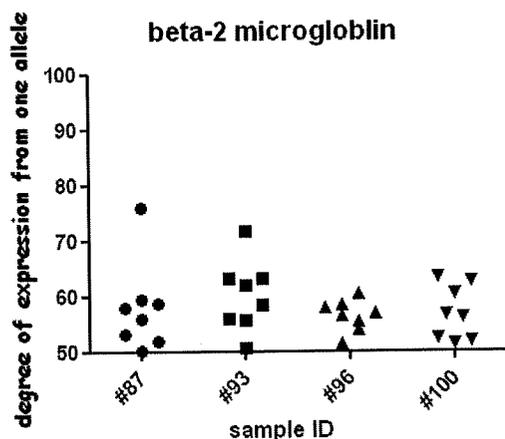


図 3 B2M のアレル特異的発現解析の結果。4人の末梢血 T細胞に関して各 8細胞ずつ拾い上げ、それぞれの細胞での発現を調べた。グラフ中の各ドットは 1つ1つの細胞における遺伝子発現割合を示す。グラフの縦軸は片方のアレルからの発現割合を示し、70%の場合、もう片方のアレルからの発現割合は 30%となる。

そこで、次に、X染色体上の遺伝子について、同様の実験を行った。我々は SNP の遺伝子型頻度や SNP の位置、遺伝子の発現レベルなどを考慮して、4つの遺伝子を解析対象に選んだ。各遺伝子、SNP ID、遺伝子型頻度などは図 4 に示した。これらについて B2M と同様に 1細胞レベルでの X染色体の各アレルからの発現割合を調べた。その結果、X染色体短腕の偽常染色体領域の近傍に存在する MSL3 に関して、有効な解

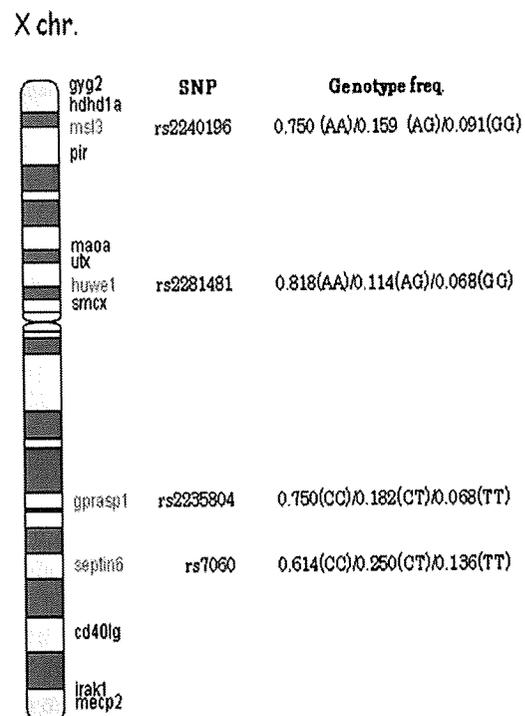


図 4 解析を行った X染色体上の遺伝子のローカスとマーカーとした各 SNP およびその遺伝子型頻度。

析データ (4/8) のうちの 1つで、両アレルからの発現に由来すると思われるシグナルが検出された (図 5)。これは、多くの細胞では、2つある X染色体の片方からのみ遺伝子発現しているが (X染色体不活性化機構が正常に働いている)、細胞によっては、不活性化を免れて両方の X染色体から遺伝子

発現が起こっていることを示す。一方、他の遺伝子に関しては、ほぼ片方のアレルからの発現のみが検出され、X染色体不活性化機構による制御を受けていることが示された。

D. 考察

今回の研究によって、1細胞レベルでのX染色体からの遺伝子発現を見分けるための技術開発に成功した。遺伝子発現量が非常に高いB2Mでは、実験に用いた8細胞中、すべての細胞で解析データが得られたが、X染色体上の遺伝子に関しては、8細胞中3~4つのデータしか得られなかった。これは、発現量が非常に低いいためか、または、細胞

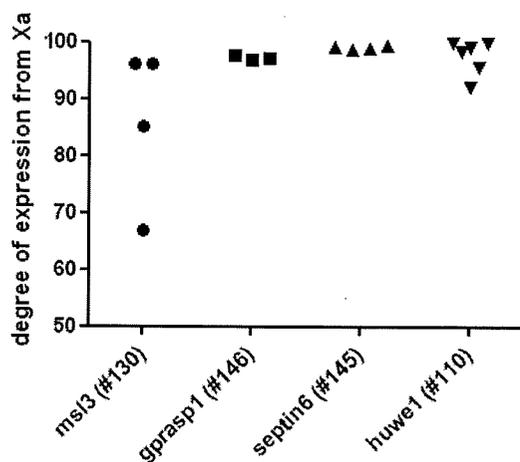


図5 X染色体上の遺伝子からのアレル特異的発現解析の結果. MSL3では、X染色体不活性化機構を免れて発現するケースが認められた。ほかの遺伝子では、ほぼ片方のX染色体からのみ遺伝子発現しており、X染色体不活性化機構による制御を強く受けていると思われる。

によっては遺伝子発現していない場合があるためであると思われる。どのような遺伝子を解析対象にするのかに関する検討が必要であると思われる。一方、本計画では、クラインフェルター症候群またはターナー症候群患者由来の末梢血細胞を用いて解析

することを目指しているが、ターナー症候群の場合、完全なX染色体モノソミー型での解析は出来ない。片方のX染色体の短腕欠損型の場合、残った長腕での解析は可能である。また、クラインフェルター症候群の場合でも、X染色体が3つ以上ある場合、解析が困難になる場合がある。例えば、1つの活性化X染色体が母親由来で2つの不活性化X染色体が父親由来の場合は解析可能だが、活性化X染色体が母親由来で2つの不活性化X染色体の1つが母親由来だった場合、不活性化アレルからの発現か活性化アレルからの発現かの区別が出来ない。今後、どのようなケースで解析が可能かについて、実際の患者サンプルを用いて検討する必要がある。

E. 結論

1細胞レベルでのX染色体からの遺伝子発現解析に関する基盤開発に成功した。

F. 健康危機情報

(総括研究報告書に記載)

G. 研究発表

III. 研究成果の刊行・発表に関する一覧表に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行・発表一覧表

学会発表

一般演題発表

柳谷隆宏, 高田修治, 蓮沼智子, 川合眞一, 浅原弘嗣. Application of Taqman method for allele-specific transcription quantification at a single-cell level. 第32回日本分子生物学会年会; ポスター「2-f分子・複合体の機能—エピジェネティック制御」, 神奈川. 12月9～12日, 2009.

