

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）  
総合研究報告書

染色体脆弱症候群に関する研究

分担研究者 松浦伸也

広島大学 教授

**研究要旨**

染色体脆弱症候群の標準的診断法の確立と合併症の予見・早期治療による医療の質の向上を目的として、染色体脆弱症候群の代表的疾患の一つである PCS (MVA) 症候群の症例を収集して、診断基準と診療ガイドラインを策定した。また、収集した患者細胞を用いて、疾患の病因と病態について検討した。

**A. 研究目的**

本研究は、染色体脆弱症候群の標準的診断法の確立と合併症の予見、早期治療による医療の質の向上を目的としている。また、疾患発症のメカニズムの解明により、将来的な治療法の開発を目指している。本年度は、PCS (MVA) 症候群について検討した。

**B. 研究方法**

1) PCS (MVA) 症候群の症例を収集して、臨床症状と合併症知見を蓄積した。この結果に基づいて診断基準と診療ガイドラインを作成した。

2) PCS (MVA) 症候群の患者細胞を用いて病因および病態の解明を試みた。

**C. 研究結果**

1) PCS (MVA) 症候群は、海外の 25 例と国内の 15 例が知られている。これまでに国内のほぼ全ての症例を収集して、臨床症状と合併症を検討した。患児は出生前から発育遅滞 (81%) を示し、重度の小頭症 (88%) を呈していた。小脳虫部の低形成を伴う Dandy-Walker 奇形を示し (75%)、生後数ヶ月から難治性けいれんを発症していた (88%)、両眼の白内障 (100%)、小眼球症・口蓋裂・男児の外性器異常・肥満をときに認めた。ウィルムス腫瘍 (80%) または横紋筋肉腫 (40%) を発症していた。ウィルムス腫瘍は両側性が多く、腎嚢胞を伴うことが多かった。原因タンパク質は、紡錘体形成チェックポイントの主要因子である BUBR1 であるが、最近私たちは BUBR1 が細胞表面に存在する一次繊毛の形成にも必須であることを報告した (Miyamoto et al. *Hum Mol Genet* 2011)。これらの結果から、本疾患で見られる Dandy-Walker 奇形や腎嚢胞・肥満は、繊毛病の症状であることが明らかとなった。

染色体核型は基本的に正常だがすべての染色体で姉妹染色分体が分離した染色分体早期解離 (PCS) を 49~87% の頻度で観察した。また、末梢血リンパ球の染色体数を計測すると、10% 以上の細胞で染色体数の異常が見られた。

以上の結果から、PCS (MVA) 症候群の診断基準を以下のとおり提案する。

下記の臨床症状を持ち、特徴的な染色体所見を示した場合、PCS(MVA)症候群と診断する。

**【臨床症状】**

**主症状**

出生前から始まる低身長と低体重

小頭症、両眼の白内障

Dandy-Walker 奇形、生後数ヶ月から始まる難治性けいれん

ウィルムス腫瘍または横紋筋肉腫の合

併

**副症状**

小眼球症

口蓋裂

外性器異常

肥満

**【染色体所見】**

染色分体早期解離 (PCS) 陽性細胞を 49~87%、かつ多彩異数性モザイク (MVA) 陽性細胞を 10% 以上認める。

**【遺伝子所見】**

紡錘体形成チェックポイント遺伝子 BUB1B のコード領域または遺伝子間領域に変異を認める。

次に、PCS (MVA) 症候群患児の両親と主治医から、患児の日常生活および診療における問題点について聞き取りを行って、診療ガイドラインの作成を試みた。以下に、新生児期から学童期までの健康管理ガイドライン (案) を示す (表 1, 表 2)。

表1. 早老症 PCS (MVA) 症候群  
 新生児期 乳児期 健康管理ガイドライン (案)

	新生児期	乳児期
総合的	症状から本疾患が疑われた場合、染色体検査と悪性腫瘍の精査を実施する。	総合診察・身体計測・遺伝カウンセリングなど
発達・神経	運動発達評価、脳神経検査、けいれんの精査と加療、家族支援	精神運動発達評価、脳神経検査、けいれんの精査と加療、家族支援
心臓・循環器	心エコー・心電図・胸部レントゲン	定期検査
消化器	経口栄養管理・嚥下障害の評価管理	経口栄養管理・嚥下障害の評価管理
耳鼻咽喉科	聴力検査	定期検査
眼科	白内障・小眼球の精査	白内障の精査・治療、視力検査、視能訓練、定期的眼科検診
泌尿器・内分泌	腹部CT検査による悪性腫瘍の精査、外性器の精査	悪性腫瘍の精査・治療、成長評価、骨年齢検査
歯科・口腔	口唇口蓋裂の検査、哺乳力評価	口唇裂修復術

表2. 早老症 PCS (MVA) 症候群  
 幼児期 学童期 健康管理ガイドライン

	幼児期	学童期以降
総合的	総合診察、身体発育評価、療育機関との連携・遺伝カウンセリング	総合診察、身体発育評価、学校との連携、学習面のサポート
発達・神経	修学相談、精神運動発達評価、けいれんの加療	修学相談、精神運動発達評価、けいれんの加療
心臓・循環器	定期検査	定期検査
消化器	嚥下障害の評価管理	嚥下障害の評価管理
耳鼻咽喉科	定期検査	定期検査
眼科	視能訓練、定期的眼科検診	視能訓練、定期的眼科検診
泌尿器・内分泌	悪性腫瘍の精査・治療、成長評価、骨年齢検査	悪性腫瘍の発悪性腫瘍の精査、成長評価、骨年齢検査
歯科・口腔	定期的歯科健診、齲歯予防	定期的歯科健診、齲歯予防

2) PCS (MVA) 症候群は、紡錘体形成チェックポイント遺伝子 *BUB1B* の変異により、*BUBR1* タンパク質の量が正常の 50% 以下になることにより発症する (Matsuura et al. *AJMG* 2006)。これま

での研究から、国内症例はすべて、*BUB1B* のヌルタイプの変異と、コード領域に変異はないが発現低下したアレルの複合ヘテロ接合体であることが判明している。本研究では、この「コード領域に変異が見られない *BUB1B* 遺伝子」について次世代シーケンサーを用いて詳細に解析した。その結果、原因変異の有力候補として新規の一塩基置換を遺伝子間領域に同定した。この一塩基置換が原因変異であるか否かの判定には、これをヒト正常細胞に導入して、*BUBR1* タンパク質の量が低下するかどうか調べるのが有効である。そこで、人工ヌクレアーゼを作成して、これを利用して、一塩基置換をヒト正常細胞に導入した。得られた細胞は、PCS (MVA) 症候群患者細胞と同様に、*BUBR1* タンパク質の量が低下して、PCS 頻度が高くなった。さらに、この一塩基置換を両アレル性に持つ PCS (MVA) 症候群患者 1 例を経験した。以上の結果から、この一塩基置換が、PCS (MVA) 症候群の原因変異であることを証明した。

#### D. 考察

PCS (MVA) 症候群の症例を収集して臨床症状を検討し、本疾患の診断基準と診療ガイドラインを策定した。未だ症例数が少なく、今後さらなる改定が必要と思われるが、まずはベッドサイドで利用できる診断基準と診療ガイドラインが作成できた。

原因遺伝子 *BUB1B* は厳密な発現制御を受けている。本研究で、患者の *BUB1B* 遺伝子の上流 44kb に原因変異 (一塩基置換) を同定した。これにより本疾患患者 (日本人症例) の遺伝子診断が初めて可能となった。本研究は、遺伝子間領域の異常とヒト遺伝病の因果関係を初めて証明した例として、*PNAS* 誌に Commentary 解説論文が紹介され、注目を集めた (Urnov FD. Human genome editing as a tool to establish causality. *PNAS* 111, 1233-1234, 2014)。

今後さらに、この原因変異による発症メカニズムを解明して、最終的に *BUB1B* の転写を正常化させる薬剤を開発したい。こうした薬剤が得られれば、PCS (MVA) 症候群患児で見られる難治性てんかんや精神発達遅滞の治療薬に利用できると期待される。

#### E. 結論

- 1) PCS (MVA) 症候群の診断基準と診療ガイドラインを策定した。
- 2) *BUB1B* 遺伝子近傍の遺伝子間領域に、PCS (MVA) 症候群の原因変異を同定した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Sakuma T., et al. Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells* Epub ahead of print (2013)
- 2) Kobayashi J., et al. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage

response through MDC1-dependent pathway. *PLoS One* 2012; 7(11); e49245

- 3) Ochiai H., *et al.* Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 109; 10915-10920, 2012
- 4) 落合 博 他 TALE nuclease (TALEN)を用いた培養細胞におけるゲノム編集 **実験医学** 31, 95-100, 2013
- 5) Ochiai H., *et al.* TALEN-mediated single-base-pair editing identification of an intergenic mutation upstream of *BUB1B* as causative of PCS (MVA) syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* Epub ahead of print (2013)
- 6) Sakuma T., *et al.* Repeating pattern of non-RVD variations in DNA-binding modules enhances TALEN activity. *Sci Rep* Epub ahead of print (2013)
- 7) Miyamoto R., *et al.* Exome sequencing reveals a novel MRE11 mutation in a patient with progressive myoclonic ataxia. *J Neurol Sci* Epub ahead of print (2013)

## 2. 学会発表

- 1) 落合 博 他 人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子間領域に存在する一塩基変異導入によるヒト疾患モデル細胞の樹立 第35回日本分子生物学会年会(福岡)2012年12月
- 2) 宮本達雄 他 紡錘体形成チェックポイント欠損症における分裂期キナーゼPLK1による一次繊毛抑制機構 第35回日本分子生物学会年会(福岡)2012年12月
- 3) 小林純也 他 ATMキナーゼの活性制御におけるMRE11/RAD50/NBS1複合体の役割 第35回日本分子生物学会年会(福岡)2012年12月
- 4) 落合 博 他 人工ヌクレアーゼ TALEN を利用した DSB 導入とその応用 第55回日本放射線影響学会(仙台)2012年9月
- 5) 宮本達雄 他 分裂期キネシンを標的とした単極性紡錘体形成の誘導法の探索 第55回日本放射線影響学会(仙台)2012年9月

- 6) 小林純也 他 低線量率放射線細胞応答におけるヒストン修飾の役割 第55回日本放射線影響学会(仙台)2012年9月
- 7) 宮本達雄 他 分裂期キネシン KIF2A を介した細胞増殖に共役した繊毛退縮機構 第35回日本分子生物学会年会(神戸)2013年12月
- 8) 宮本達雄 他 人工ヌクレアーゼを用いたヒト培養細胞での一塩基編集:放射線感受性 SNP の評価系構築への試み 第56回日本放射線影響学会(青森)2013年10月
- 9) 小林純也 他 酸化ストレスによる ATM キナーゼの活性制御 第56回日本放射線影響学会(青森)2013年10月
- 10) 松浦伸也 他 人工ヌクレアーゼによる一塩基編集法を利用した PCS (MVA)症候群の遺伝子間領域変異の同定 第58回日本人類遺伝学会(仙台)2013年11月
- 11) Ochiai H, *et al.* Identification of an extragenic mutation of *BUB1B* gene for PCS (MVA) syndrome and functional analysis using TAL effector nucleases. 63rd annual meeting of American Society of Human Genetics, Boston, Oct 2013

## G 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし