

厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
ATR-X 症候群の臨床研究および基礎研究のための基盤整備に関する研究

分担研究報告書

ATR-X 症候群の分子遺伝学的診断に関する研究

研究分担者 小坂 仁 自治医科大学

研究要旨：X連鎖性 α サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群が臨床的に疑われる症例の確定診断や、その女性同胞の保因者診断、あるいは男性精神遅滞患者の鑑別診断として、ATR-X 症候群の責任遺伝子 *ATR-X* の分子遺伝学的検討を行った。本研究では、患者末梢血液から直接 RNA を抽出し、cDNA を合成し、PCR+ダイレクトシーケンス法により、あるいはゲノム DNA を用いた PCR+ダイレクトシーケンス法により、*ATR-X* 遺伝子を解析した。また、*ATR-X* 遺伝子内のエクソン欠失を検出する方法を開発し、ATR-X 症候群の兄弟例の母親の詳細な検討により、従来法では解析できなかった母親の体細胞モザイクを検出し、その頻度を推定した。

研究協力者
新保裕子 神奈川県立こども医療センター
臨床研究所 研究員

例の母親の保因者診断を詳細に検討し、従来方法では検出できなかった体細胞モザイク検出方法を確立した。

A．研究目的

X連鎖性 α サラセミア精神遅滞（ATR-X）症候群は男性のみに発症し、重度の精神遅滞、サラセミア(HbH病)、特徴的顔貌、外性器異常、骨格異常、独特の姿勢・行動異常を臨床的特徴とする。その責任遺伝子は Xq13 に局在するクロマチンリモデリング蛋白をコードする *ATR-X* 遺伝子であり、Gibbons et al. 1995)、X連鎖精神遅滞症候群の一つである。

ATR-X 遺伝子は 36 エクソン、300kb の genomic DNA からなり、10.5kb の mRNA の転写産物をコードする。機能的に重要な ADD(*ATR-X*-DNMT3a/b-DNMT3L)ドメインとクロマチンリモデリングドメインの2つの領域を持ち、患者のほとんどがこの2つの領域に変異を持っている。

我々は、患者末梢血液から直接 RNA を抽出し、cDNA を合成し、PCR+ダイレクトシーケンス法により *ATR-X* 遺伝子を解析する方法を確立し、臨床応用している。

本研究においては、ATR-X 症候群が疑われ当センターに紹介された10例に対して *ATR-X* 遺伝子解析を行った。また、エクソン欠失をもつ兄弟

B．研究方法

1．*ATR-X* 遺伝子解析

a. 検体として患者末梢血液 5ml (EDTA 採血管) を採取し、3ml をゲノム DNA の抽出、2ml を total RNA 抽出に用いる。ゲノム DNA の抽出は従来法による。全血 2ml から 2~10 μ g の total RNA を抽出。

b. PrimeScript[®] RT reagent Kit (Perfect Real Time)(Takara 社)を用いて、抽出した total RNA 2 μ g を用いて、cDNA を合成。

c. *ATR-X* 遺伝子の全コーディング領域をカバーするプライマーペア 12組を独自に設計し、PCR 産物 (600~1009 塩基対) を得る。

d. RT-PCR 産物を電気泳動により確認後、カラム精製し、シーケンス反応に使用。

e. cDNA 解析で見つかった異常をゲノム DNA で確認する。

2. 女性保因者のヘテロ接合におけるエクソン欠失の解析 (詳細は Shimbo H, et al. J Hum Genet. 2014 (in press)を参照)

患児 (exon 2-5 の欠失) の解析(概要)

- a. 患児末梢血液からゲノム DNA を抽出し、exon2-5 の PCR により PCR 産物を確認
- b. 末梢血 RNA より cDNA を合成し、exon 2-5 欠失の確認
- c. ゲノム DNA を用いて、ブレイクポイントを同定
- d. エクソン 5 (欠失領域)および 6 (非欠失領域)に対するプライマーを設計し、quantitative PCR (qPCR)により定量し、欠失が定量出来るか解析 .
- e. ブレイクポイントを挟んだ領域にプライマーを設計しを PCR により解析 .

C . 研究結果

1 . *ATRX* 遺伝子解析

臨床的に *ATR-X* 症候群が疑われた 10 症例を対象に *ATRX* 遺伝子解析を行い、うち 4 症例において変異を同定し、一例において女性保因者診断を行った .

c.536A>G; r[532_594del], p.V178_K198d

c.5498 A>G, p.Tyr1833Cys ,

c.736 C > T, p.Arg246Cys,

exon2-5 (350bp)deletion (保因者診断を含む)

2. 女性保因者のヘテロ接合におけるエクソン欠失の解析 (詳細は Shimbo H, et al. J Hum Genet. 2014 (in press)を参照)

患者で検出された exon 2-5 の欠失は 78.6kb におよぶ遺伝子内の微小欠失であることがゲノム DNA の解析で明らかにされた . エクソン 5 および 6 に対する qPCR を行ったが、欠失をヘミで持つ患児のゲノム DNA では欠失を同定できたが、欠失をヘテロで持つと推測される母親においては、エクソン 5 および 6 の PCR 産物増幅の優位な差異は認めなかった .

ブレイクポイントを同定し、患児および母親のゲノム DNA を用いて、ブレイクポイントを挟

む領域の PCR を行ったところ、患児では 30 回の PCR 増幅で、母親は 40 回で PCR 産物を確認することができ、検量線を用いて解析したところ母親の体細胞モザイク率が 1%未満と推定された .

D . 考察

本研究期間に *ATRX* 遺伝子解析を依頼された 10 例中 4 例で遺伝子変異を同定した . 変異を同定されなかった症例の臨床診断は、*ATR-X* 症候群としては非典型的であり、他の臨床診断が疑われ、*ATRX* 遺伝子解析の検出方法は妥当であると推測された .

エクソン欠失に対する保因者診断は、女性のため変異をヘテロに持つため、従来のゲノム PCR 法では欠失の有無を検出することが出来ない . 今回の解析は同胞例の母親の解析であり、すでに、母親が保因者であることは明らかであったが、分子遺伝学的メカニズムを明らかにするために解析を行った . 母親の体細胞モザイク率が 1%以下であったため、エクソン 5 (欠失領域)および 6 (非欠失領域)に対する quantitative PCR による定量では検出できず、ブレイクポイントを同定して、初めて解析が可能となった .

X 連鎖性疾患の孤発例において、患児で遺伝子変異が見つかり、母親の末梢血液のゲノム DNA の解析で変異を認めない場合も、母親の germline mosaicism の可能性は否定できず、次子の再発危険率は 0~50%と幅がある . 逆に、通常の方法で変異を検出できたとしても、通常、野生型と変異型のアレルの頻度は解析しないため、母親の体細胞の体細胞モザイクの可能性は否定できない .

後者の場合、次子の再発危険率の推定は前者と同じであるが、母親の同胞女性の保因者診断について検討した場合、母親の mosaicism が明らかとなれば、母親の変異は受精卵の体細胞分裂以降の変異獲得であり、母親の女性同胞が保因者の可能性は無視できることになる . これは、不要な情報提供や負担を避けることが出来るため、遺伝カウンセリング上、非常に重要である .

E . 結論

我々の開発した、患者の末梢血から抽出した RNA、および、ゲノム DNA を用いた *ATRX* 遺伝子解析は患者の診断に有効であり、検出率も

高いと推測される。

X連鎖性疾患における末梢血液由来ゲノムDNAを用いた女性保因者診断において、同胞例であり、母親が明らかに保因者(obligate carrier)であっても、常に、体細胞あるいは生殖細胞モザイクの可能性を考慮することは遺伝カウンセリング上、重要であることが再認識された。

F．健康危険情報

特になし。

G．研究発表

論文発表

1. Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T. A case report of two brothers with ATR-X syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the *ATR-X*. J Hum Genet. 2014 (in press)

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