

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
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

バイオアナライザーを用いた X 染色体不活化解析

研究分担者 黒澤 健司

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター 遺伝科 部長

研究要旨

バイオアナライザーを用いた X 染色体不活化アッセイの方法を確立した。X;常染色体均衡型転座例、代表的 X 連鎖劣性遺伝病である Opitz-BBB 症候群などの対象症例や保因女性を用いてアッセイを行い、極めて正確な評価が可能であることを確認した。これまでの大がかりなシーケンサーを用いた解析と異なり、バイオアナライザーによるアッセイは正確で迅速な解析が可能であった。次世代シーケンスによる非症候群性精神遅滞では、ATR-X を初めとした症候群性精神遅滞原因遺伝子と考えられきた遺伝子に変異が検出される可能性もあり、このアッセイは診断さらには遺伝カウンセリングの上でも極めて有用なものと思われる。今後臨床解析手技として整備すべき解析技術である。

A . 研究目的

ヒトを初めとした哺乳動物では、X 染色体の不活化により量的補正がなされている。この不活化は発生初期に起こり、正常な女性では不活化される X 染色体の選択はランダムであるが、いったん決定されるとその細胞系列では不活化される X 染色体は維持される。つまり、基本的に女性は X 連鎖遺伝子の発現についてはモザイクといえる。過剰な X 染色体を有する患者においても同様の現象は観察される。しかし、X 染色体の構造異常や重症の X 連鎖劣性遺伝病における保因者女性では、非ランダムな X 染色体不活化が起こることがあり、病態の把握や保因者診断の際に X 染色体の不活化解析は臨床的にも重要となる。また、遺伝カウンセリングにおいてリスク評

価の有力な手掛かりとなることもある。しかし、一般診療の中で、X の不活化を観察するためにはシーケンサーなどの大型機器が必要で、必ずしも診療の中で用いることは容易ではない。今回我々は、バイオアナライザーを用いて比較的簡便に、しかしながら非常に正確に X 不活化解析が行えることを X 染色体均衡型転座症例、あるいは X 連鎖劣性遺伝病保因者家系で確認したので、その方法をまとめた。

B . 研究方法

対象は以下の 3 家系における保因女性で解析を行った。

1) 症例 1

発達遅滞、大頭症、過成長を主訴に精査希望で来院した児（男児）の母親。児は、

マイクロアレイ染色体検査 (Agilent Technologies, SurePrint G3 8x60k) で 15q24 欠失症候群 (15q24.1-q24.2 に 2.5Mb の欠失) と診断された。児では 15q24 領域の他に大田原症候群原因遺伝子 ARX を含む Xp22.11-p21.3 に 0.7Mb の重複を有し、母親でも同様に Xp22.11-p21.3 の 0.7Mb の重複が確認された。本家系において ARX 重複が臨床症状に影響を及ぼすかを評価するために X 不活化解析を行った。

2) 症例 2

発達遅滞を主訴に来院の 3 歳男児で、マイクロアレイ染色体検査 (Agilent Technologies, SurePrint G3 8x60k) で、MID1 遺伝子 exon 1-4 を含む領域の微細欠失を確認し、臨床症状から Opitz-BBB 症候群と診断した。保因者診断目的に母親の切断点シーケンス解析および X 染色体不活化解析を行った。

3) 症例 3

先天性心疾患、成長障害を主訴に来院した女児で、染色体検査の結果 chrX と chr22 の均衡型転座を示し、核型は 46,X,t(X;22)(p11.21;q11.2)であったため、臨床症状を検討するために、X 不活化解析を行った。

Androgen receptor 領域 CAG リピート多型を用いたアッセイ

高い多型性を呈する CAG リピートを持ち、その近傍に X 不活性化と相関する HpaII および HhaI 制限酵素サイトをもつ Androgen receptor 遺伝子を解析対象とした。方法は Allen ら (Am J Hum Genet 51;1229, 1992) に従った。最初に、一定量の gDNA を HpaII 処理、HhaI 処理、未処理の 3 種類準備し、それぞれ酵素処理を行い、そのあとにビーズ精製 (Agencourt

AMPure XP, Beckman Coulter A63881) により DNA を回収。Touch down PCR により Xq12 領域の Androgen receptor の (CAG)_n の多型領域を増幅した (n=11-31)。増幅産物を Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) で解析した (DNA1000, Agilent Technologies)。増幅産物は平均 300bp であった。

(倫理面への配慮)

解析は、神奈川県立こども医療センター倫理審査において、承認を得たものである。検査前に十分な説明を行い、文書により同意のもとで解析を行った。解析にあたっては、全ての個人情報情報を潜在化した。

C. 研究結果

1) 症例 1

未処理 49:51、HpaII 50:50、HbaI 43:57 で X はランダムな不活性化だった。

2) 症例 2

HpaII 24:76、HbaI 6:94

Skewed パターンとなっていた。疾患の特性から矛盾ない。

3) 症例 3

HpaII 98:2、HbaI 96:4

Skewed パターンとなっていた。均衡型転座であることから、現象として矛盾ない。

D. 考察

Allen ら (Am J Hum Genet 51;1229, 1992) の方法は、X 染色体不活性化アッセイとして現在まで広く使われている。歴史的には、最初の報告ではアイソトープを用いた方法が主で、後にシーケンサーを用いた fragment 解析が主流になっている。しかし、このシーケンサーを用いる方法は、シーケンサーの準備や fragment 解析のための操

作が必要で、必ずしも簡便とは言えない。そこで我々は、こうした短い fragment の定量解析を得意とし、高分解能で正確な定量性を再現できる Bioanalyzer を用いて、X 染色体不活化アッセイを行った。対象は今後の汎用性を考慮して、X 染色体均衡型相互転座、代表的 X 連鎖劣性遺伝病を選んだ。結果は、期待通りで 2 つの制限酵素 HpaII および HhaI を用いることで、より正確に X 染色体不活化状態を定量化することが可能であった。実際の遺伝形式や症状と矛盾ないことが確認できた。

この方法が簡便に利用できることにより臨床応用が可能となる。一つは、原因不明の X 染色体微細構造異常がマイクロアレイ染色体検査で検出された場合に、保因者である母親の X 染色体不活化状態を確認することにより、その X 染色体微細構造異常が病原性 (Pathogenic) か否かの判定の参考となるからである。同胞や血縁者内に変異 X を受けついた罹患者がいない場合に、それが病原性変異であるかの判定は遺伝カウンセリングにおいて極めて重要である。同様に、X 連鎖性疾患においても参考となる。X 連鎖劣性遺伝を呈する ATR-X 症候群の保因女性における X 染色体不活化は、skewed パターンを示す。既知報告変異例では、X 染色体不活化アッセイは必ずしも診断上必須ではない。しかし、今後、次世代シーケンスによる網羅的な変異スクリーニングがなされた際に、X 染色体上の不活化を受ける遺伝子の未報告変異が検出されることもあり、上述の変異 X による罹患者が家系内にいない場合には、X の不活化アッセイが有力な参考資料となる可能性がある。ATR-X は、身体所見が診断上極めて有用であるが、非症候群性精神遅滞症例でも報告があり、必ずしも臨床

所見が診断確定の手掛かりになるとは限らない (Guerriniet al., A nonsense mutation of the ATRX gene causing mild mental retardation and epilepsy. *Ann Neurol* 2000;47;117-121.; Moncini et al., *Meta Gene* 2013;1:102-108.)。現在まで、複数の非症候群性精神遅滞例で ATRX の変異が検出されている。次世代シーケンスの時代になっても基本的診断技術としてのサンガーシーケンスと並んで、こうした X 染色体不活化アッセイは重要であり、臨床研究室として装備しておくべきシステムと考えられた。

E . 結論

バイオアナライザーを用いた X 染色体不活化アッセイの方法を確立した。X;常染色体均衡型転座例、代表的 X 連鎖劣性遺伝病である Opitz-BBB 症候群などの対象症例や保因女性を用いてアッセイを行い、極めて正確な評価が可能であることを確認した。これまでの大がかりなシーケンサーを用いた解析と異なり、バイオアナライザーによるアッセイは正確で迅速な解析が可能であった。次世代シーケンスによる非症候群性精神遅滞では、ATR-X を初めとした症候群性精神遅滞原因遺伝子と考えられてきた遺伝子に変異が検出される可能性もあり、このアッセイは診断さらには遺伝カウンセリングの上でも極めて有用なものと思われる。今後臨床解析手技として整備すべき解析技術である。

F . 研究発表

1 . 論文発表

Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C,

Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. Gain-of-Function Mutations in RIT1 Cause Noonan Syndrome, a RAS/MAPK Pathway Syndrome. *Am J Hum Genet* 2013;93(1):173-80.

Ishikawa A, Enomoto K, Tominaga M, Saito T, Nagai JI, Furuya N, Ueno K, Ueda H, Masuno M, Kurosawa K. Pure duplication of 19p13.3. *Am J Med Genet A*. 2013 Sep;161(9):2300-4

Yasuda S, Imoto K, Uchida K, Machida D, Yanagi H, Sugiura T, Kurosawa K, Masuda M. Successful Endovascular Treatment of a Ruptured Superior Mesenteric Artery in a Patient with Ehlers-Danlos Syndrome. *Ann Vasc Surg*. 2013;27(7):975.e1-5.

2. 学会発表

黒田友紀子、大橋育子、高野亨子、和田敬仁、小坂仁、松井潔、黒澤健司 先天奇形症候群での次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析．第 116 回日本小児科学会学術集会 2013.4.19-21. 広島

黒田友紀子、大橋育子、高野亨子、和田敬二、松井潔、小坂仁、黒澤健司 次世代シーケンサーを用いた小児神経疾患のターゲットシーケンス解析のワークフロー．第 55 回日本小児神

経学会学術集会 2013.5.30-6.1 大分
黒田友紀子、大橋育子、松浦久美、西川智子、黒澤健司 次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析における遺伝カウンセリング．第 37 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 2013.6.20-23.

Kuroda Y, Ohashi I, Saito T, Nagai J, Ida K, Naruto T, Masuno M, Kurosawa K. Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of mandibulofacial dysostosis. 63rd American Society of Human Genetics, 2013.10.22-26. Boston

成戸卓也、黒田友紀子、大橋育子、黒澤健司 ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた小児疾患ターゲットシーケンスの臨床応用 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013.11.20-23. 仙台

黒田友紀子、大橋育子、成戸卓也、高野亨子、和田敬仁、黒澤健司 Ciliopathy (Joubert 類縁疾患)パネルを用いた網羅的遺伝子解析 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013.11.20-23. 仙台

G. 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