

三宅紀子 論文内容の要旨

主 論 文

先天異常症候群の分子遺伝学的解析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
主任指導教員: 森内浩幸 教授

緒 言

先天異常症候群の発症機構は多様であり、発症の成因而によって解析方法も多岐にわたる。ソトス症候群 (SS) は染色体 5q35 に局在する *MSD1* 遺伝子のハプロ不全によって発症する疾患であり、本邦の患者の約半数は *MSD1* を含む約 2.2Mb の共通欠失をもつ。一般的に、ゲノム病における欠失機構はゲノム上に存在する low copy repeat と呼ばれる相同反復配列を介した組み換え異常で起こるとされ、その欠失の親起源は各疾患によって異なる。12 番染色体長腕(12q)の部分欠失は非常に稀で、世界で 5 症例の報告があるのみである。コルネリア・ダランガ症候群 (CDLS) は多毛・眉毛叢生・四肢形成異常・成長障害を特徴とする先天奇形症候群であり、2004 年疾患責任遺伝子である *NIPBL* 遺伝子が同定された。歌舞伎メーキャップ症候群 (KMS) は特徴的な顔貌、精神遅滞、骨格異常を特徴とする先天奇形症候群である。近年 8p22-8p23.1 領域の重複が原因だとする報告があるが、発症機構はまだ解明されていない。全人口の 2~3% を占める精神遅滞 (MR) の約半数は原因不明であり、微細染色体構造異常が推測されている。実際、テロメア領域の解析で非症候性精神遅滞の 5~6% に染色体構造異常が発見されている。

本研究では SS、12q 欠失、CDLS、KMS、MR について、それぞれの解析法により疾患発症機構を解明することを目的とした。さらに従来、検出不能な微細な染色体構造異常を検出するマイクロアレイ CGH 法の開発とその応用も行った。

対象と方法

- (1) ソトス症候群: 両親試料の得られた 26 家族を対象に、5q35 欠失領域と近傍から 16 のマイクロサテライトマーカーを用いたハプロタイプ解析を行い、欠失の親起源を追及した。
- (2) 12 番染色体部分欠失: 精神遅滞、斜視、耳介低位を示す 2 症例を解析した。欠失領域を FISH 法により共通欠失領域を同定し、同領域中の遺伝子を同定・解析した。
- (3) コルネリア・ダランガ症候群: 本邦患者 15 症例を対象にして、直接塩基配列決定法により点突然変異解析、および FISH 解析による欠失の有無を検討した。
- (4) マイクロアレイ CGH 法の開発: ヒト BAC ライブラリーから、5q35、染色体サブテロメア領域、X と Y 染色体、および 8 番染色体短腕に局在するクローンを選択し、染色体 FISH により本来のゲノム上に 1 シグナルを示すものだけを使用し、DOP PCR により増幅後、スリットピン方式の Stampman Pro またはインクジェット方式を用いてスライドガラス上にスポットしマイクロアレイを構築した。また同様に全ゲノムマイクロアレイを構築した。Cy3 ラベルした患者 DNA と Cy5 ラベルした対照 DNA を混合させたものを CGH-1、色素を逆転ラベルしたものを CGH-2 としてマイクロアレイ上で 72 時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後、GenePix 4000B でスキャンし、GenePix Pro 4.0 で解析した。CGH-1、CGH-2 各スポットの ratio of means 値から標準化を行い、3 SD 以上偏倚したクローンに関してはすべて FISH で検証を行った。

- (5) 歌舞伎メーキャップ症候群：近年 8p22-8p23.1 領域の重複が原因だとする報告があるため、FISH 法および性染色体特異的あるいは全ゲノムマイクロアレイ法で 28 症例における欠失・重複の有無を検討した。
- (6) 非症候性精神遅滞：30 症例の非症候性精神遅滞患者において、全ゲノムマイクロアレイによる解析を行った。

結果と考察

- (1) ソース症候群における欠失の親起源：16 例が父親起源、2 例が母親起源であった。祖父母や非罹患同胞試料が利用できた 8 例中 6 例の欠失は染色分体間または染色分体内組換え、2 例では染色体間組換えで生じていた。この結果は、5q35 欠失は単一の原因で生じていないことを示す。
- (2) 12q 部分欠失：62Mb の共通欠失領域を同定した。同領域に局在する 15 個の遺伝子中には、心筋・骨格筋分化に関わる *YAF2* と、神経軸索結合や髄消化に関わる *AMIGO2* があり、同疾患の精神遅滞に關与する可能性がある。
- (3) コルネリア・ダランガ症候群における変異解析：4 種の新規変異と 3 種の SNPs を同定した。また、全身に多面発現することや変異検出率が低い (25 ~ 30%) ことから、隣接遺伝子症候群が疑われていたので、点変異がなく核型標本の得られた症例において FISH 解析を行ったが欠失は観察されなかった。これらの結果は従来の知見を支持するものである。
- (4) 歌舞伎メーキャップ症候群：8p22-8p23.1 領域特異的プローブによる FISH 解析では、全例において重複は観察されなかった。一方、本症の隣接遺伝子症候群仮説を検証するため、34 例において、性染色体特異的および 1.5Mb 間隔で網羅した全ゲノムマイクロアレイ法による解析を行ったが、欠失・重複などの異常は同定されなかった。これらの結果は、既報告である 8p22-8p23.1 重複は大多数の KMS 患者では見られないことを示すものである。
- (5) マイクロアレイ CGH 法の開発とその応用：5 種類の BAC DNA マイクロアレイ (5q35 特異的、性染色体特異的、テロメア特異的、8 番染色体短腕特異的マイクロアレイ、全ゲノムマイクロアレイ) を作成した。上記の歌舞伎メーキャップ症候群における解析以外に、非症候性精神遅滞 30 例において、全ゲノムマイクロアレイによる解析を行い、4 例に 5 種の微細構造異常 (1q 部分欠失、3p 部分欠失、15q 部分欠失、19p 部分重複/22q 部分欠失) を同定した。この結果は、非症候性精神遅滞の一部が微細異常による遺伝子 (群) 欠失が原因であることを示す。