

中島光子論文内容の要旨

主 論 文

A Genome-wide Linkage Analysis and Mutation Analysis of Hereditary Congenital Blepharoptosis in a Japanese Family

遺伝性眼瞼下垂症の日本人 1 家系におけるゲノムワイド連鎖解析
および変異解析

中島光子、中野基、平野明喜、木住野達也、近藤新二、三輪晋智、新川詔夫、
吉浦孝一郎

Journal of Human Genetics, 2008;53(1):34-41

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
発生分化機能再建学講座構造病態形成外科学
(主任指導教員：平野明喜教授)

緒 言

遺伝性先天性眼瞼下垂症は眼瞼の下垂のみを症状として示し、その他の付随症状を伴わない事の特徴とする疾患である。これまでに常染色体優性遺伝形式をとる PTOS1 と X 染色体劣性遺伝形式をとる PTOS2 の 2 型が報告されている。PTOS1 は 8q21.12 および 1p34.1-p32 に、PTOS2 は Xq24-q27.1 にマップされており、PTOS1 では ZFH4 遺伝子との関連が疑われている。

本研究は、常染色体優性遺伝形式を示す遺伝性先天性眼瞼下垂症の日本人 1 家系の協力の下、疾患関連遺伝子の検索を連鎖解析およびその他の分子遺伝学的解析法を用いて行ったものである。

対象と方法

- (1) 連鎖解析：研究協力者には、可能な限り形成外科医 2 名が面談を行い、家系図作成、臨床診断、写真撮影を行った。日本人 1 家系 18 名（罹患者 5 名、非罹患者 12 名、配偶者 1 名）から、末梢血 10ml または爪検体を採取し DNA 抽出を行った。ABI Prism Linkage Mapping Set-MD10 と、Genescan、Genotyper software を用いて遺伝子型解析を行い、MLINK program、Genehunter software を用いて LOD スコア算出を行った。LOD スコアが有意な値を示した領域には新たにマーカーを作成し、ハプロタイプ解析による候補領域の絞込みを行った。
- (2) 変異解析：ZFH4 遺伝子の全エクソンおよびプロモーター/エンハンサー領域に対するプライマーを用いて PCR を行い、オートシーケンサー 3100 にてダイレクトシーケンスを行った。

- (3) サザンブロット解析：罹患者 3 名およびコントロール DNA を *Bam*HI、*Hind*III、*Eco*RI の各酵素で完全切断後 0.8%アガロースゲルにて電気泳動を行い、ナイロンメンブレン上に DNA を転写する。ZFHX4 遺伝子の各エクソンを含むフラグメントに特異的なプローブを作成し、ハイブリダイゼーションを行った。
- (4) メチル化解析：罹患者 3 名およびコントロール DNA を bisulfite 処理し、ZFHX4 遺伝子の CpG 領域特異的なプライマーによる Methylation Specific PCR と、*Eco*RI 切断部位に対するプライマーによる Bisulfite シークエンスとを用いて ZFHX4 遺伝子のメチル化解析を行った。

結果および考察

- (1) 連鎖解析：8q21.11-q22.11、12q24.32-q24.33、14q21.1-q23.2 の 3 領域が候補領域として考えられたが、いずれの領域においても非罹患者が疾患関連ハプロタイプを有しており、責任領域の同定には至らなかった。その原因として軽症者を見落としたかあるいは不完全浸透であるかが考えられた。新しい協力者を得る事が困難であったため、これ以上の絞込みを行うことができなかった。しかし、8q21.11-q22.11 領域は PTOS1 の候補領域を含んでおり、ZFHX4 遺伝子との関連が疑われたことから、ZFHX4 遺伝子に関する分子遺伝学的解析を行った。
- (2) 変異解析：ZFHX4 遺伝子の患者特異的な変異は認められなかった。
- (3) サザンブロット解析：ZFHX4 遺伝子のエクソン 2 および 12 を含む *Eco*RI フラグメントにおいて、患者特異的なエクストラバンドの出現を認めた。他の酵素のフラグメントに対して同じプローブを用いても、エクストラバンドは認められなかったことから、遺伝子の構造異常であるとは考え難かった。エクストラバンド出現の原因として *Eco*RI 切断部位の多型による影響、あるいは遺伝子のメチル化による影響が考えられた。
- (4) メチル化解析：ZFHX4 遺伝子の CpG 領域のメチル化および *Eco*RI 切断部位のメチル化は認められず、また *Eco*RI 切断部位の Restriction Site Polymorphism も認められなかった。現在のところサザンブロットでエクストラバンドが認められた原因は不明である。

結 語

連鎖解析および変異解析の結果より、明らかな責任遺伝子の同定には至らなかったが、本疾患と 8q21.11-q22.11 領域および ZFHX4 遺伝子との関連が強く示唆された。また、ZFHX4 遺伝子の *Eco*RI フラグメントにおいて、患者特異的なエクストラバンドの出現を認め、今後、この ZFHX4 遺伝子の解析が重要であると思われた。