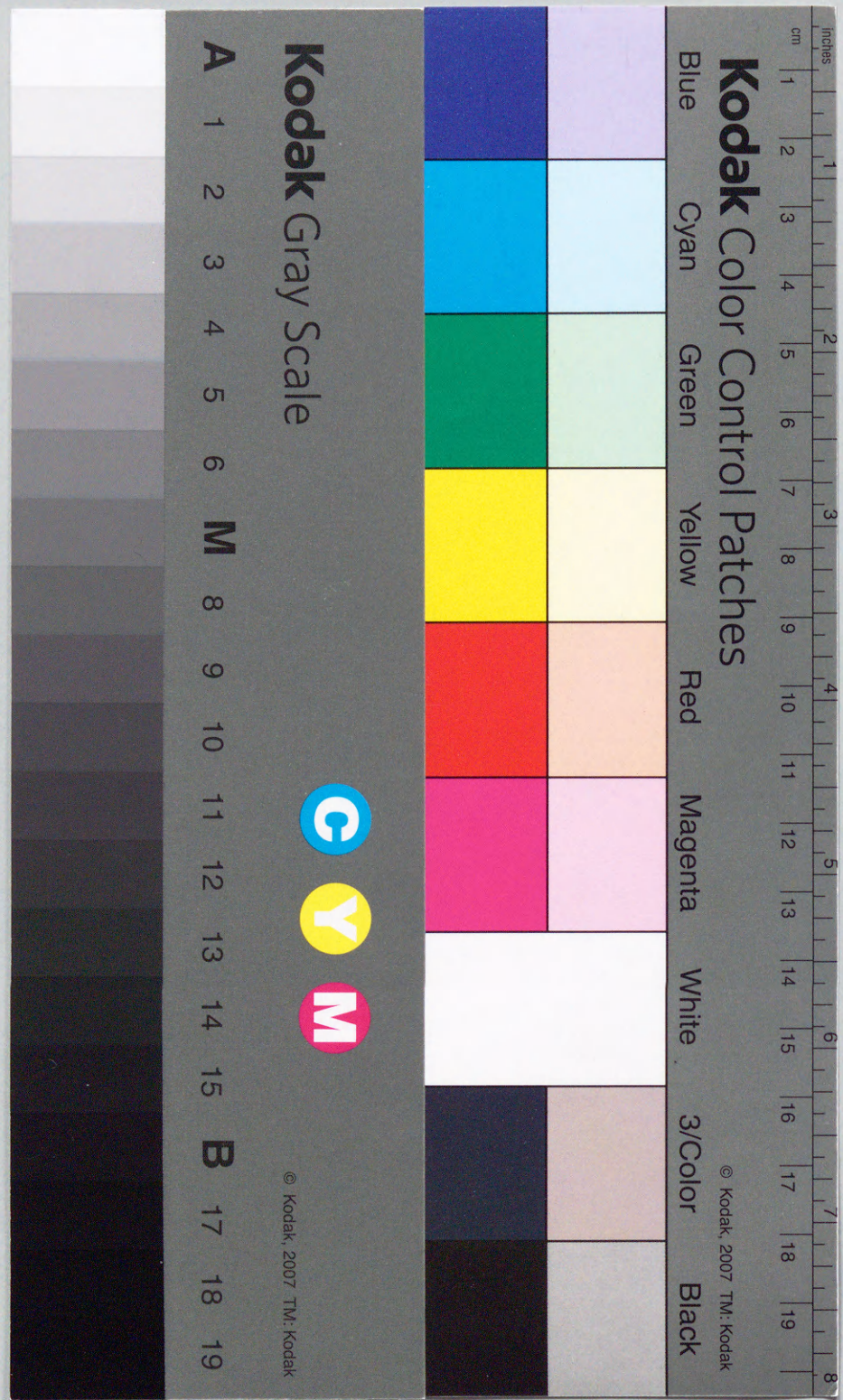


国立療養所南九州病院における進行性筋ジストロフィー患児の遺伝子解析
と保因者診断を施行した2家系

田中主美

鹿児島大学医学部小児科学講座



国立療養所南九州病院における進行性筋ジストロフィー患児の遺伝子解析と保因者診断を施行した2家系

田 中 主 美

鹿児島大学医学部小児科学講座（主任：宮田晃一郎教授）

A study of dystrophin gene analysis for the patients with progressive muscular dystrophy in Minamikyushuu National Hospital and a carrier status diagnosis in two families

Kazumi TANAKA

Department of Pediatrics (Director: Prof. Koichiro MIYATA, M. D., Ph. D), Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima 890-8520, Japan.

Abstract

Progressive muscular dystrophy is a X-linked recessive disease and the clinical course is very severe. Therefore, dystrophin gene analysis and carrier status diagnosis are important.

The method of multiplex PCR was introduced in this study. Eighteen subjects showed dystrophin gene deletion out of 28 subjects who were administered in Minamikyushuu National Hospital. The regions of deletion tended to gather around exon 43-52, and 72.2% of deletion was detected in these area. Gene analysis of 10 subjects who didn't show dystrophin gene deletion were not examined about point mutation.

The carrier status diagnosis was detected by the methods of PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) and PCR-VNTR (variable number of tandem repeat) for 2 families. The targeted 2 subjects did not show carrier status, but this result was not perfect because of high possibility of genomic translocation which originated from giant size of dystrophin gene. For this reason, we carried out 5 analysis for more correct diagnosis, and the procedurs were simple.

This carrier status diagnosis was the first report in Kagoshima prefecture.

key words : progressive muscular dystrophy, multiplex PCR, carrier status diagnosis.

緒 言

進行性筋ジストロフィーは代表的な筋萎縮性疾患である。このうち Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、発症頻度が高く、重篤な疾患である。遺伝形式は X 染色体劣性で、新生男児3,000~4,000人に1人の頻度で発症するが、他の遺伝性疾患に比べ孤発例が多く、発症者の1/3は新たな突然変異によるものと考えられている¹⁻³⁾。

1986年に DMD 患者で欠失している遺伝子 (DMD 遺伝子) が Kunkel らにより単離された。DMD 遺伝子は 2,400 Kb にわたる巨大遺伝子で75以上のエクソンが平均35 kb のイントロンに挟まれて存在している。DMD

の遺伝子診断は1990年 Beggs ら⁴⁾と Chamberlain ら⁵⁾によって確立された。これはマルチプレックス PCR 法と呼ばれ、36個のプライマーを用いた2つの PCR を行う方法であり、全遺伝子欠失の95%まで解析可能と報告されている。今回、著者は平成7年度に国立療養所南九州病院筋ジストロフィー病棟に入院中で臨床症状・免疫組織化学的所見より進行性筋ジストロフィーと診断された28名について上記の方法で遺伝子解析を施行した。さらに、2家系で PCR-RFLP 法、PCR-VNTR 法を用い保因者診断を行った。

対象および方法

1) 対象：国立療養所南九州病院筋ジストロフィー病棟に入院中の患者77名の中で臨床症状、CK 高値などの

検査所見, ジストロフィン染色などの免疫組織化学的所見より進行性筋ジストロフィーと診断された28名である。年齢は10歳から40歳までの男児で, 平均年齢は21.4歳であった。また, この中の2家系に対し保因者診断を家族の希望により施行した。

2) 方法

a) DMD 遺伝子解析: フェノール, クロロホルム法により血漿より DNA 抽出を行い1988年 Chamberlain, 1990年 Beggs らが報告したマルチプレックス PCR 法に準じて解析を施行した。以下, プログラムを略記する。

* Chamberlain program (PCR condition)

- step 1 94°C 6 min
- 2 94°C 30 sec (denaturation)
- 3 53°C 30 sec (annealing)
- 4 65°C 4 min (elongation)
- 5 back to step 2 (repeat 24 times)
- 6 65°C 7 min
- 7 4°C until running on gel

18 primer を用い exon 4, 8, 12, 17, 19, 44, 45, 48, 51の検出が可能である。

* Beggs program (PCR condition)

- step 1 94°C 7 min
- 2 94°C 30 sec (denaturation)
- 3 65°C 4 min (elongation)
- 4 back to step 2 (repeat 24 times)
- 5 65°C 10 min
- 6 4°C until running on gel

18 primer を用い exon 3, 6, 13, 43, 47, 50, 52, 60 および promoter の検出が可能である。

Chamberlain および Beggs program による PCR 産物は 3% nusieve agalose gel を用い電気泳動を行った。

b) 保因者診断: PCR-RFLP 法, および PCR-VNTR 法を用いて異なる5種類の方法で診断を行った。以下, 手順を略記する。

I) primer PH 1331, PH 1332 を用い, Chamberlain program により DNA を増幅後, 制限酵素 XmnI で37°C, 1 hr 処理した産物を 3% nusieve agalose gel を用い電気泳動した。

II) primer PH 1341, PH 1342 を用い, Chamberlain program により DNA を増幅後, 制限酵素 BamHI で37°C, 1 hr 処理した産物を 3% nusieve agalose gel を用い電気泳動した。

III) primer PH 1351, PH 1352 を用い, Chamberlain program により DNA を増幅後, 制

限酵素 TaqI で65°C, 1 hr 処理した産物を 3% nusieve agalose gel を用い電気泳動した。

IV) primer 3' - CA (F, R) を用い Beggs program により DNA を増幅後, 8% acrylamide gel を用い電気泳動した。

V) primer 5' DYS - III (F, R) を用い Chamberlain program により DNA を増幅後, 8% acrylamide gel を用い電気泳動した。

結果

1) 進行性筋ジストロフィー患者28名の遺伝子解析の

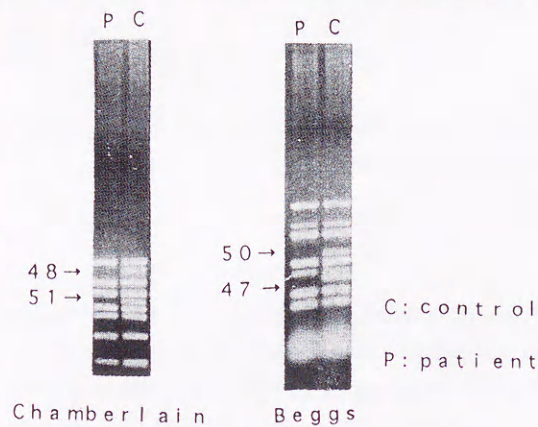


図1: マルチプレックス PCR 法によるジストロフィン遺伝子の欠失部位を示す。(数値は欠失 exon)

結果を図1, 2に示す。図1はある症例の Chamberlain と Beggs のマルチプレックス PCR の具体例を示したものである。右に示すコントロールではそれぞれ9本のバンドを認めるが, 症例では Chamberlain program で exon 48, 51 Beggs program で exon 47, 50の欠失を認める。この症例において全体

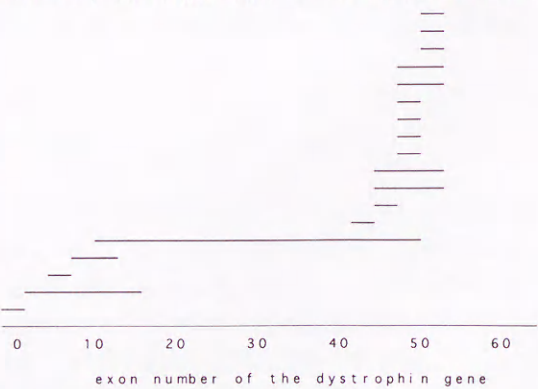


図2: 18症例で認められたジストロフィン遺伝子の欠失部位を示す。

では exon 47-51の欠失が存在している。遺伝子解析を施行した28名中18名(64.2%)に欠失が認められた。各症例の欠失部位を図2に示す。遺伝子欠失を認めた18名

中13名(72.2%)で exon 43-52の部位での欠失であった。その他の欠失部位は exon 12-51までの広範囲のものが1名, exon 10前後に認めたものが2名, 単 exon の欠失が2名であった。

2) 次に保因者診断を施行した家系(A, B)に関する結果を示す。A家系は父母, 患児, 妹の4名について解析を施行した。図3は XmnI で処理後のものである。730 bp のバンドが520 bp と210 bp に切断されるアリルを a, 非切断アリルを b として示してある。図4は TaqI で処理後の泳動写真である。160 bp のバンドが85 bp と75 bp に切断されるアリルを a, 非切断アリルを b とした。図5は BamHI 処理後である。216 bp のバンドが166 bp と50 bp に切断されるアリルを a, 非切断のアリルを b とした。図6は primer 5' DYS - III の PCR 産物の泳動写真である。アリルの CA-repeat の違いにより泳動距離の差がみられる。長い CA-repeat のアリルを a, 短いアリルを b とした。図7は primer

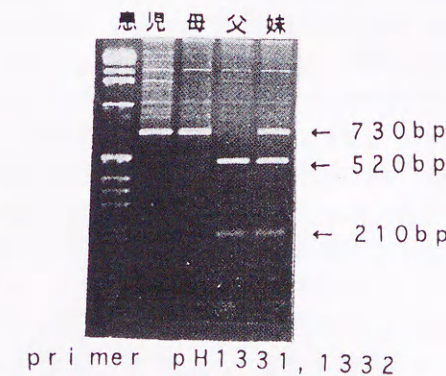


図3: PCR 産物を XmnI で digestion 後 3% nusieve agalose gel 上で電気泳動した。

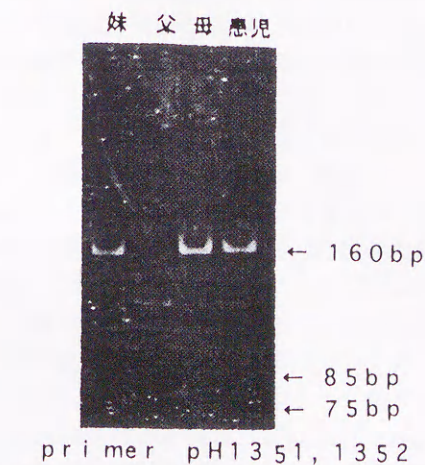


図4: PCR 産物を TaqI で digestion 後 3% nusieve agalose gel 上で電気泳動した。

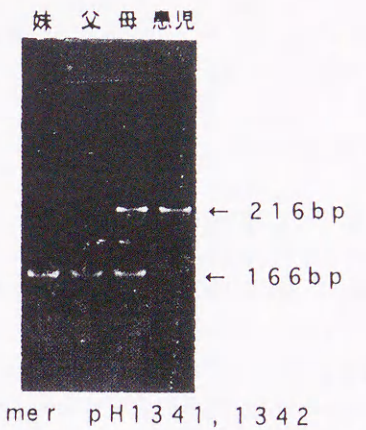


図5: PCR 産物を BamHI で digestion 後 3% nusieve agalose gel 上で電気泳動した。

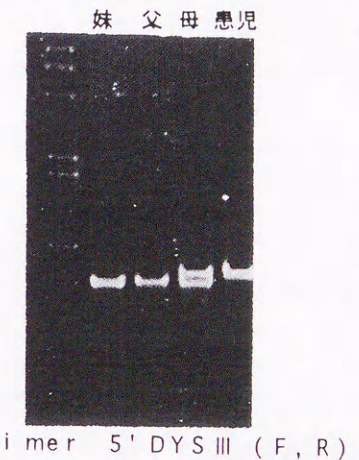


図6: PCR 産物を 8% acrylamide gel 上で電気泳動した。

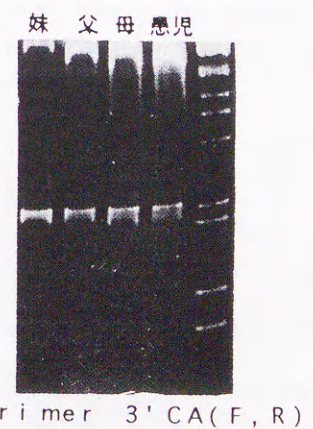


図7: PCR 産物を 8% acrylamide gel 上で電気泳動した。

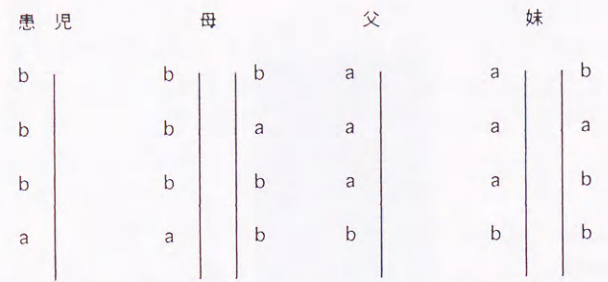


図8：解析結果よりA家系の各個人の持つアリルを模式化した。

3 - CA による PCR 産物である。アリルによる泳動差を認めなかった。図8は上記の結果より各個人の持つアリルを模式化したものである。キャリアー遺伝子は患児、母親の持つ (b, b, b, a) であり、妹の持つ (b, a, b,

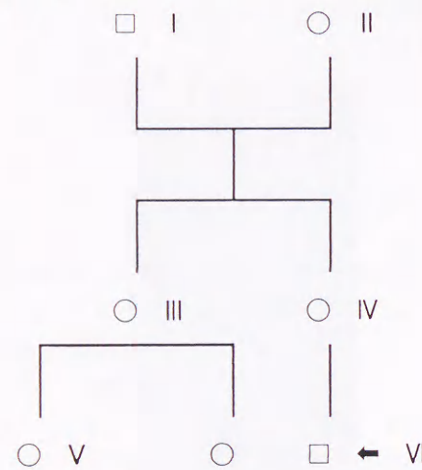


図9：B家系の構成を示す。(◀は発端者である。)

b) は非キャリアー遺伝子である事が判明した。次に B 家系の家族構成を図9に示す。保因者診断の目的は V の女児であったが血液が確保されず、個人IIIの保因者診断を施行することにより間接的に結果が得られた。図10

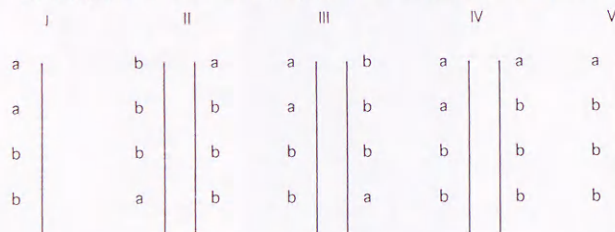


図10：解析結果よりB家系の各個人の持つアリルを模式化した。

は各個人の持つアリルを前記同様に模式化したものである。個人IIIはキャリアー遺伝子を持たず、従って個人Vがキャリアーでないことが判明した。

考 察

進行性筋ジストロフィーは遺伝子診断の先駆的な疾患であり、その手法は Chamberlain と Beggs により確立され、マルチプレックス PCR 法と呼ばれている。この方法により遺伝子欠失の95%まで検出可能と報告されている。今回、著者はこの方法で遺伝子解析を施行した。遺伝子欠失は28名中18名 (64.2%) に認められた。荒畑ら⁹⁾ は進行性筋ジストロフィーの50-80%に欠失を認めると報告しており、今回の解析でも同様の結果が得られた。

進行性筋ジストロフィーは臨床症状より Duchenne 型 (DMD) と Becker 型 (BMD) に分類されている。遺伝子解析とジストロフィンの免疫染色より、遺伝子上の欠失や変異によるジストロフィン蛋白の完全欠損が DMD であり、同蛋白の構造異常や発現異常が BMD であることが判明した。Beggs ら⁷⁾ は遺伝子欠失部位の検索より、DMD ではジストロフィン遺伝子の exon 50前後に、BMD では exon 45前後に欠失のホットスポットが存在すると報告している。著者の解析でも欠失部位は exon 43-52に集中しており、18名中13名 (72.2%) でこの部位で欠失がみられた。なお、今回の解析では、DMD, BMD に分類しての欠失部位の同定は施行していない。28名中10名 (35.8%) で遺伝子欠失を認めなかった。これらの患児ではジストロフィン遺伝子上の点突然変異が存在すると考えられる。今後、PCR-SSCP 法などによる突然変異の解析も考慮中である。

進行性筋ジストロフィーはX染色体劣性遺伝であるため、保因者診断は重要である。最近では PCR-RFLP 法⁸⁾ と CA-repeat を利用しての PCR-VNTR 法⁹⁾ が主流となっている。これらの方法は従来行われていたサザンプロット法に比較して簡便であり極めて有用と思われた。

ジストロフィン遺伝子は2,400 kb にもおよぶ巨大遺伝子であるため9%の確率で疾患遺伝子との組み換えを起こすと報告されている。¹⁰⁾

このため著者は5つの方法を組み合わせて保因者診断を施行したが、結果に関しては危険率を考慮する必要がある。また、X染色体の不活性化の研究から、父親のX染色体由来で発病する孤発型女性 DMD (保因者となる) も知られるようになった。¹¹⁾ そこで、診断にあたっては従来行われてきた血清クレアチニンキナーゼ活性の測定や生検筋の抗ジストロフィン抗体による免疫組織化学などの所見も考慮する必要がある。

今回、施行した B 家系の保因者診断では対象となる個人の解析は未施行であったが、近親家族の組み合わせでは診断可能である。また、発端者が死亡している場合でも臍帯や病理標本を利用しての診断報告もみられ

る。¹²⁾

進行性筋ジストロフィーの保因者診断は、大人になった女性が自分で依頼の決定を行い、その結果に自分で責任を負う限り、大きな倫理的問題はないと考える。しかし、親が診断を依頼する場合、結果によっては子どもに対する養育に影響を与えかねず倫理的な問題を含んでいる。子供が大人になって結婚や生殖に関する計画を考慮する段階になって診断価値が存在することを考えると個人が成人するまで検査を遅らせる方が良いかもしれない。今回の2家系の解析において本人は成人しており、家族を含めた同意が得られた。同時に、2家系とも非保因者であったことは幸いであった。

結 語

国立療養所南九州病院筋ジストロフィー病棟に入院中の進行性筋ジストロフィーの患者28名を対象に遺伝子解析を施行した。同時に、この中の2家系で保因者診断を行った。

1. 28名中18名 (64.2%) にジストロフィン遺伝子の欠失を認めた。欠失部位は exon 43-52間に多くみられ、その頻度は全欠失の72.2%であった。この解析結果は諸家の報告とはほぼ類似していた。遺伝子欠失を認めなかった10名 (35.8%) は遺伝子上の点突然変異が推定された。
2. 保因者診断を PCR-RFLP 法と PCR-VNTR 法を用いて2家系を対象に施行した。この手技は従来行われていたサザンプロット法と比較して簡便であり、きわめて有用であると考えられた。なお、本県での筋ジストロフィーに関する保因者診断の報告は初めてと思われる。

謝 辞

稿を終るに際し、本研究を直接御指導いただいた国立療養所南九州病院福永秀敏院長、鹿児島大学附属病院第三内科吉留宏明先生に感謝致します。また、本論文作成を御指導いただいた鹿児島大学医学部小児科学教室宮田晃一郎教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) 塚原俊文, 石浦章一, 荒畑喜一. Dystrophin. Annual Review 神経1990. 東京: 中外医学社, 1990: 326.
- 2) 荒畑喜一. 遺伝性疾患の DNA (進行性筋ジストロフィー). 臨床科学1992; 28: 416-24.
- 3) 武田伸一, 荒畑喜一. 筋ジストロフィー (DMD / BMD). Brain Nursing 1993; 9: 731-5.
- 4) Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletion by polymerase chain reaction. Hum Genet 1990;

86: 45-8.

- 5) Camberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE et al. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic Acids Res 1988; 16: 11141-57.
- 6) 荒畑喜一, 杉田秀夫. Becker 型筋ジストロフィーとジストロフィン. Review 神経1994. 東京: 中外医学社, 1994: 283-300.
- 7) Beggs AH, Hoffman EP, Snyder JR, Arahata K et al. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: Dystrophin gene and protein studies. Am J Hum Genet 1991; 49: 54-67.
- 8) Zietkiewicz E, Simard LR, Melancon SB, Vanasse M, Labuda D. Carrier status diagnosis in Duchenne muscular dystrophy with "conformational" DNA polymorphism. Lancet 1992; 339: 134.
- 9) Beggs AH, Kunkel LM. A polymorphic CACA repeat in 3' untranslated region of dystrophin. Nucleic Acids Res 1990; 18: 1931.
- 10) Oudet C, Hanauer A, Clemens P, Caskey T, Mandel JL. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. Hum Mol Genet 1992; 11: 599-603.
- 11) Pegorora E, Schmke N, Arahata K et al: Dystrophinopathy in females. Am J Hum Genet 1994; 54: 989.
- 12) 荒畑喜一, 川口洋子, 後藤加奈子, 武田伸一他. 長期室温保存された臍帯及び筋病理標本によるジストロフィンの遺伝子診断. 厚生省「筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療開発に関する研究」平成4年度報告書, 1993: 166-8.

