

## 総 説

## 疾患遺伝子診断法—福山型筋ジストロフィーを中心として—

<sup>1)</sup>東京女子医科大学 医学部 小児科学 (主任:大澤真木子教授)<sup>2)</sup>東京大学 医科学研究所 ヒトゲノム解析センター近藤 恵里<sup>1)2)</sup>・戸田 達史<sup>2)</sup>・斎藤加代子<sup>1)</sup>・大澤真木子<sup>1)</sup>

(受付 平成12年2月16日)

## はじめに

分子遺伝学のめざましい進歩により、様々な疾患の原因遺伝子や原因蛋白質が明らかになった。遺伝医学が発展し、今や遺伝子診断は、各臨床分野において急速な普及を遂げている。“遺伝子診断”の対象としては、本稿で取りあげる福山型筋ジストロフィー (FCMD) などの単一遺伝子疾患はもちろんのこと、いわゆる common disease と呼ばれる多因子遺伝性疾患、さらには癌 (早期発見、再発予測、悪性度の判定) や感染症 (細菌、ウイルスなどの迅速診断)、個人識別、進化と人類学 (ヒト、民族の起原) などがあげられ、様々な分野が関与している。

遺伝子診断の原理と技術は、ほぼ確立されているといえるが、いかにして正確かつ効率よく検査を進めるべきかは、常に要求される重要な課題である。また、その疾患の表現型上の特徴、疾患遺伝子の構造上の特徴と変異の種類などを十分に理解し、その疾患と家系にとって最も適切な診断法を選択することが大切である。本稿では、疾患の遺伝子診断の手法を概説し、FCMD の症例を中心として解説してゆきたい。

責任遺伝子が同定されている疾患について、臨床で遺伝子診断が行われるのは、①臨床診断を遺伝子レベルで確認する場合、②遺伝子型 genotype と表現型 phenotype との関連性を検討する場合、

③変異が同定されていない疾患の家系について、遺伝カウンセリングのための家系内の遺伝子解析を行い、保因者診断、出生前診断または発症前診断に利用する場合等があげられる。

また、遺伝子診断には、疾患遺伝子の変異を直接検出する方法と、DNA 多型を利用して間接的に検出する方法がある (表)。前者は主に①②、後者は③の場合に利用されることが多い。

なお、遺伝子診断の臨床応用にあたっては、遺伝カウンセリングが必須であり、倫理的な十分な配慮をしつつ実施することはいうまでもない。

## 直接的解析

## 1. 遺伝子欠失, 挿入, 重複

サザンブロット法 (図1) は、ゲノム DNA の制限酵素での切断パターンの違いによって、ある程

表 遺伝子診断法

## A 変異遺伝子の直接診断法

1. サザンブロットあるいはPCR法による遺伝子の欠失や再構成の検出
2. SSCP, 塩基配列の解析による点変異の検出
3. PCR-制限酵素処理, ASO, アレル特異的PCR法等による既知変異の確認

## B 変異遺伝子の間接的診断法

1. 家系内で検出されるDNA多型(RFLPまたはSTR: short tandem repeat)を利用した診断
2. 連鎖不平衡を利用した診断

Eri KONDO-IIDA<sup>1)2)</sup>, Tatsushi TODA<sup>2)</sup>, Kayoko SAITO<sup>1)</sup> and Makiko OSAWA<sup>1)</sup> [<sup>1)</sup>Department of Pediatrics (Director: Prof. Makiko OSAWA), Tokyo Women's Medical University, School of Medicine, <sup>2)</sup>Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo]: Molecular genetic diagnosis: with special reference to Fukuyama type congenital muscular dystrophy

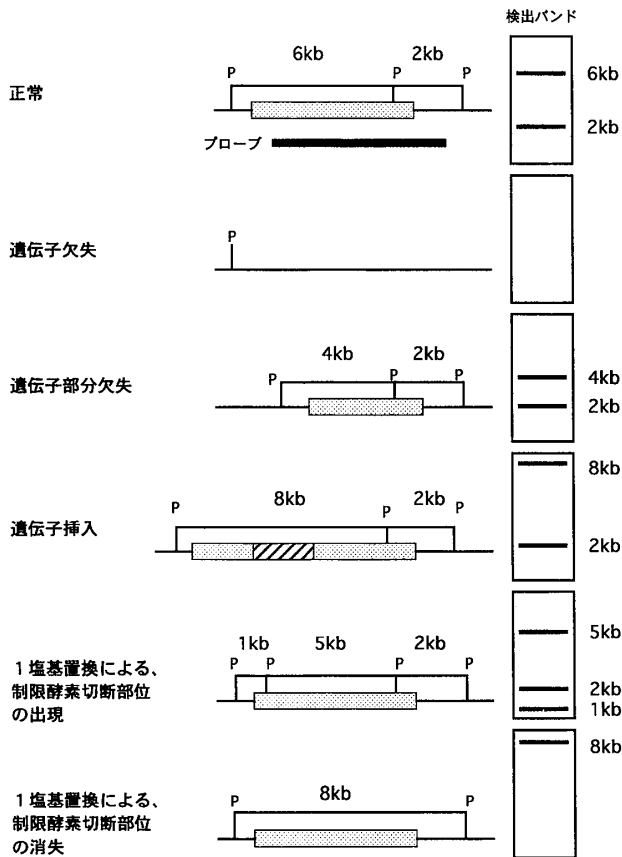


図1 サザンプロットで見出せる遺伝子変異  
 □: 目的遺伝子, P: 制限酵素切断部位.

度の大きさの遺伝子欠失, 挿入, 重複を検出する方法である。また, 制限酵素の認識部位に変化を来す変異であれば, 1塩基置換でも検出できる(後述参照)。この方法は, まずゲノムDNAを, 特定の塩基配列を認識して切断する制限酵素で切断し, アガロースゲル電気泳動で大きさ別に分ける。さらにこのDNA断片をアルカリ変性で1本鎖状態にしてから, ナイロン膜上に移し(ブロットし)固定する。これに, 標識した目的遺伝子DNAプローブを, 同じく1本鎖状態でハイブリダイゼーション(塩基配列の相補性による会合反応)させ, 目的遺伝子を検出する。プローブは $^{32}\text{P}$ のアイソトープで標識し, 膜をX線フィルムに感光させて検出するのが一般的だが, 最近では, ビオチンやジゴキシゲニンで標識したプローブを用いて蛍光基質で検出することもできる。このように検出した遺伝子のバンドのサイズパターンを, 正常者と比較することにより診断する。

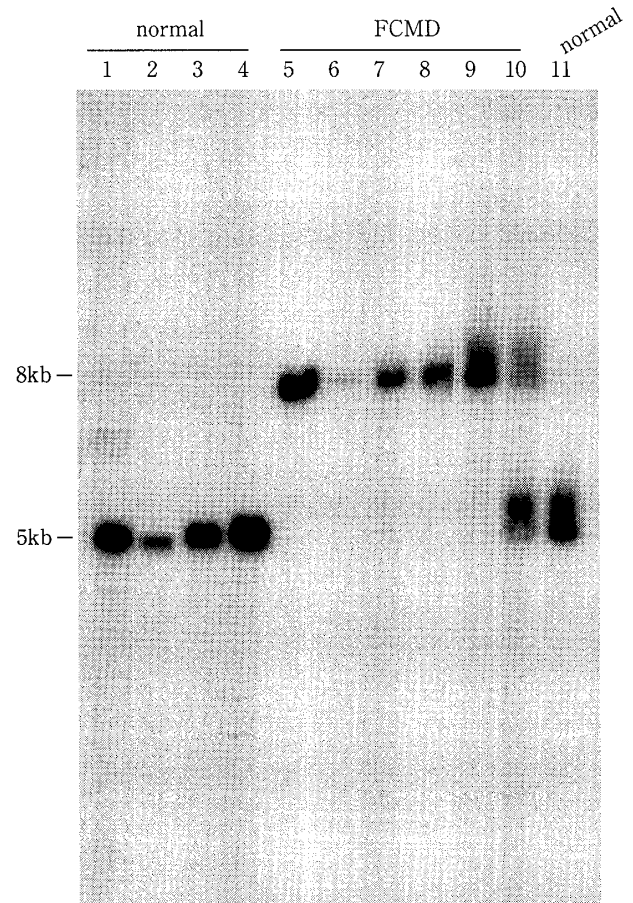


図2 サザンプロット解析による福山型筋ジストロフィー (FCMD) 患者における 3kb insertion の検出。ゲノムDNAを制限酵素 PvuII で消化後, プローブ fEco8-1 を用いて解析。FCMD 患者 DNA では正常のバンドより 3kb 長くなっている。レーン 5~9: insertion ホモ接合, レーン 10: insertion ヘテロ接合の FCMD 患者。

図2はFCMD患者における診断の例を示した。FCMDは9q31に原因遺伝子をもつ常染色体性劣性遺伝の疾患である。3'非翻訳領域に, 約3kbのレトロトランスポゾン(特徴的な配列を有し, 内在性で, RNA中間体を経て移動する遺伝子)挿入変異が, 患者の約98%にホモ接合あるいはヘテロ接合で認められている<sup>12)</sup>。このcommon mutationを有するFCMD患者では, このサザンプロット解析により(病名)診断が可能となる。

これに対し遺伝子変異が多彩で, アレル異質性に富んでいる疾患もある。その一つであるDuchenne型筋ジストロフィーは, X連鎖性劣性遺伝疾患であり, その約60%では, 筋細胞膜の裏

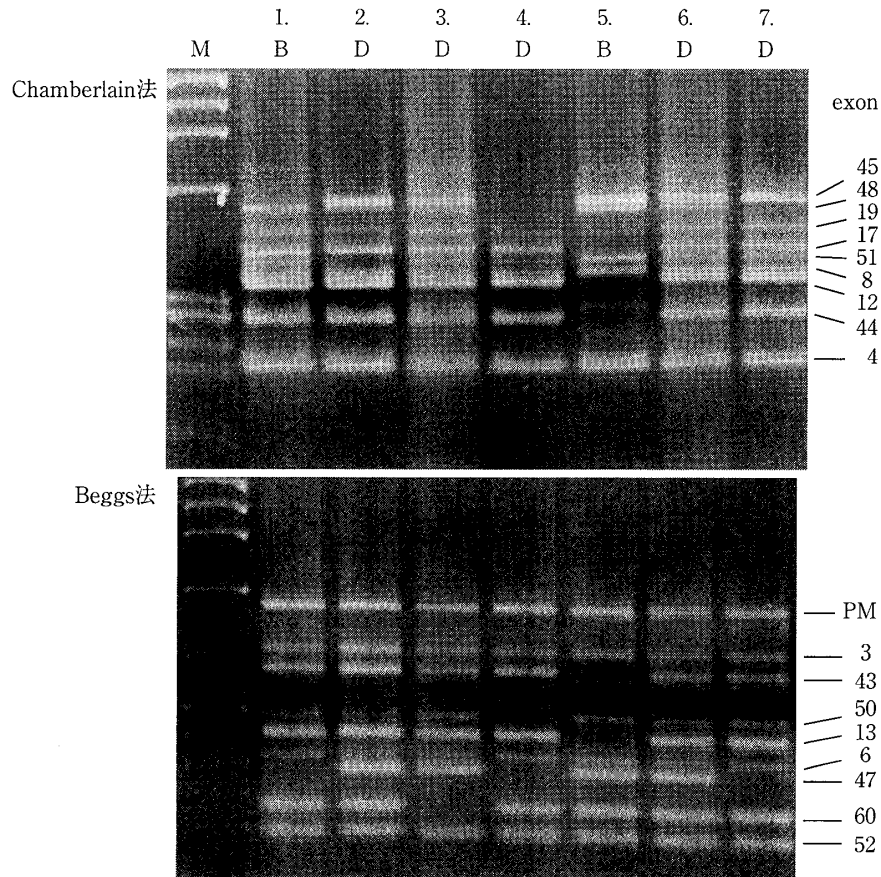


図3 Duchenne/Becker型筋ジストロフィー患者における multiplex PCR を用いた遺伝子欠失のスクリーニング

M: サイズマーカー, B: Becker型, D: Duchenne型, PM: プロモーター.

Chamberlain法<sup>3)</sup>と Beggs法<sup>4)</sup>により, 合計18カ所をスクリーニングした. 患者1ではエクソン45-47, 患者2はエクソン51, 患者3はエクソン60, 患者4はエクソン45-50, 患者5はエクソン12-44, 患者7はエクソン47-48がそれぞれ欠失していると判定される. 患者6は, この方法では欠失が見つからなかった.

打ち蛋白であるジストロフィン遺伝子の欠失, 重複がみられる. しかし, ジストロフィン遺伝子は79個のエクソンをもち, mRNAでも14kbもある巨大遺伝子である. そのため multiplex polymerase chain reaction (PCR) という, 遺伝子欠失のホットスポットであるエクソン3-19とエクソン43-52領域を中心として9箇所ずつを一度にPCRで増幅してスクリーニングする方法<sup>3)4)</sup>が一般的に普及している(図3). PCRとは, 増幅したい特定のDNA領域を挟むように2本のプライマー(相補的なオリゴヌクレオチド)を設計し, DNAポリメラーゼを働かせることにより, その領域を増幅する方法である. 正常者であれば設定したプライマーセットの数のバンドが得られる

が, もしバンド数に欠失があれば罹患者と判定される.

また, サザンブロット法で説明したFCMDの3kbレトロトランスポゾン挿入変異は, PCRを用いて検出することも可能である(図4). 図のごとく, 3kbレトロトランスポゾンが挿入する位置を挟むようにデザインした正常配列プライマーセットとinsertionの中の配列のプライマー(1つ)をmixしてPCRを行うと, insertionをもつ患者では, 通常より約200bp長いバンドが検出される. この方法はDNA検体量も少なく時間も短くてすむ利点がある.

## 2. 未知の点変異の検出

点変異とは, 1~数塩基の置換, 欠失, 挿入をさ

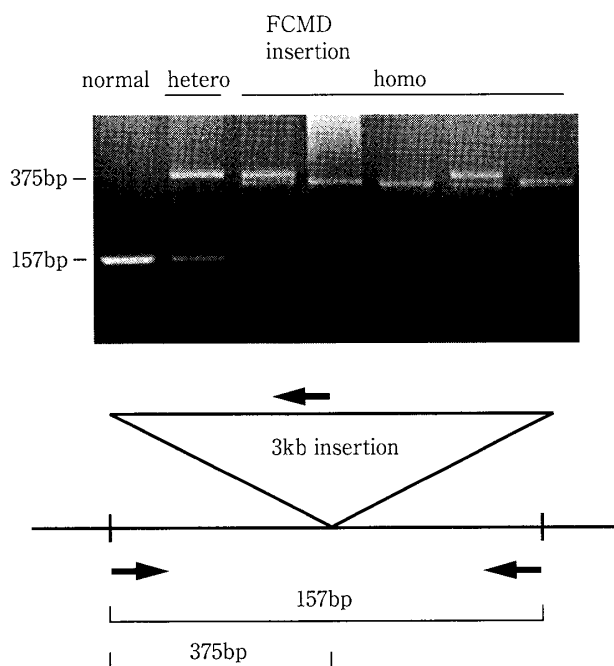


図4 PCR法によるFCMD患者の3kb insertionの検出

➡: プライマー

通常は157bpのバンドのみであるが、insertionを含む染色体があるときは約375bpのバンドが検出できる。そのバンドは、insertion中の繰返し配列の長さの違いにより染色体ごとに微妙にサイズが異なる。

す。サザンブロット法では点変異を見つけるのは難しい。そこで、遺伝子の各エクソン部位（スプライス部位を含む）をPCRで増幅し、塩基配列を解析して点変異を検出する。この時にスクリーニングとしてよく用いられるのが、SSCP（single-strand conformation polymorphism）という方法である。これでは、PCRで増幅したDNA断片（100～300bp程度）を1本鎖に変性させて電気泳動する。点変異があればその高次構造が変化するため、移動度の差として、正常の配列を持つDNA断片との鑑別ができる。つまり、SSCPで異常があったPCR産物について優先的に塩基配列を解析すればよいのである。ただしSSCPの検出率は約87%といわれており、異常を検出しなかった検体については、全コーディング領域の塩基配列を解析せねばならない。図5にはFCMD家系における点変異検索結果を示した。

点変異が起きてもアミノ酸としての暗号（コード

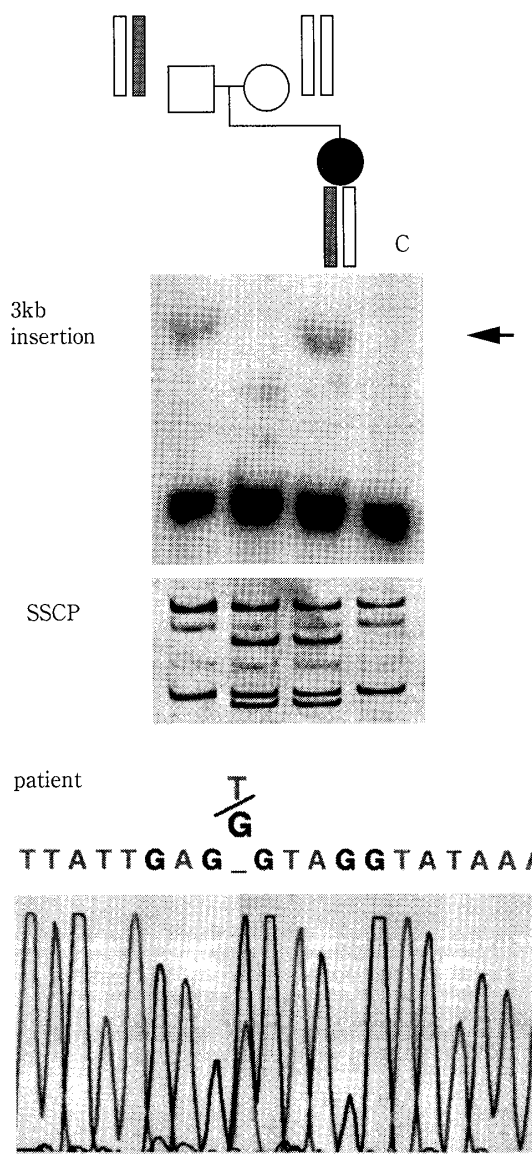


図5 FCMD家系における点変異の解析

3kb insertionを父由来でヘテロ接合性にもつ患者において、他方のアレルにつきSSCPで点変異のスクリーニングを施行した。エクソン6において母由来の異常バンドが検出され、塩基配列を解析したところTがGに置換するミスセンス変異（T859G→Cys250Gly）が確認できた。

ン）が変わらない場合（サイレント変異）は、蛋白質として何の変化も起こらず病因とはならない。終止コドンを導入するような点変異（ナンセンス変異）であれば病因と決められるが、アミノ酸置換を伴う変異（ミスセンス変異）では、その変異が必ずしも機能異常と直接関係があるとは限らない。ミスセンス変異が病因になっていることを確認するためには、患者と血縁関係のないヒトの染

色体 100 本以上について、その変異の出現頻度を調査しなければならない。あるいは、変異遺伝子 cDNA をベクターに組み込み、適切な培養細胞を用いて発現実験を行い、その産物についての蛋白質定量や機能測定をすることもある。

### 3. 既知の変異を確認するその他の方法

患者において検出した変異（特に点変異）について、再確認あるいは家系内解析を行う場合などによく用いられる方法がいくつかある。

PCR-制限酵素処理法は、病因遺伝子上の変異によって正常遺伝子に存在した制限酵素部位が消失したり、逆に新しい制限酵素部位が生じた場合にはきわめて有効な検出法である。変異部を含む領域の PCR 産物が、その制限酵素で切断されるか否かを確認する。

ASO (allele specific oligonucleotide: アレル特異的オリゴヌクレオチド) ハイブリダイゼーション法は、PCR で増幅した変異部位を含む DNA をフィルター上にスポットし、そこに正常型と中央に変異を設定した変異型の 2 種類のオリゴヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイゼーションさせ、それぞれの結合の有無で変異の有無を短時間に判定できる方法である。

#### 間接的解析

ある特定の遺伝子について直接変異が同定できなくても、DNA 多型をマーカーにすることにより、変異遺伝子を遺伝しているのか否かの判定をすれば、かなりの確率で診断することができる。これは、出生前診断や保因者診断など、遺伝カウンセリングのための家系内の遺伝子解析に利用されることが多い。ある集団内で、特定の遺伝子座に 2 つ以上の対立遺伝子が、1% 以上の頻度で見られるものを多型という。言い換えれば、1% 以上の頻度で見出せる病因とはならない変異（バリエーション）、DNA の個人差のことである。

多型マーカーとしては、RFLP 多型やマイクロサテライト多型がよく使われる。

制限酵素部位の多型は、適切なプローブを用いたサザンブロット法で、制限酵素断片の長さの違いとして検出する。これを RFLP: restriction fragment length polymorphism とよんでいる。

マイクロサテライト DNA 多型は CA リピートに代表され、CA などの繰り返し配列がヒトゲノム上のいたるところに存在し（ゲノム上に 5,000 個以上がカタログ化されている<sup>9)</sup>）、その繰り返し数が人によって高度に異なっていることを利用したものである。PCR により少量の検体で解析できる利点もあり、近年ではもっぱら繁用されている。

これらの用途は前述の他にも、連鎖解析、個人識別、親子鑑定、双生児の卵性診断、犯人の特定など多岐にわたる。当然、いずれの多型マーカーでも、目的遺伝子のより近傍（あるいは遺伝子内）に存在するもの程優れており、診断確率が高い。実際には、目的遺伝子を挟むような位置の複数のマーカーを用い、ハプロタイプ（1 本の染色体にある連続した多型の組み合わせ）を決めて診断にあたるのが望ましい。

#### 1. 家族内で検出される DNA 多型を利用した診断

マーカーを用いて、対象となる家族や胎児が、正常もしくは変異遺伝子をもつ染色体のうち、いずれの染色体を遺伝しているかを診断する。この診断法は責任遺伝子が単離、同定されている場合はもちろん、そうでなくても、その遺伝子の局在が確定していれば診断できる。図 6 に FCMD 家系における CA リピート多型を利用した出生前診断の例を示した。変異遺伝子が存在する側の染色体を同定するには、発端者は勿論のこと、その両親の解析が最低限必要である。

#### 2. 連鎖不平衡を利用した診断

ある特定のハプロタイプを持つヒト集団に、特定の変異遺伝子が有意に高率に存在することを連鎖不平衡 (linkage disequilibrium) とよんでいる。このことは、その特定のハプロタイプをもつ染色体上のある遺伝子に突然変異が生じ、それが世代を経て集団に広まったことを反映すると考えられる。

FCMD ではこういった創始者効果が強く見られており、連鎖不平衡を示す複数のマーカーより、創始者ハプロタイプがわかっている (図 6-a)<sup>9)</sup>。FCMD 染色体には D9S2105-D9S2170-D9S2171-D9S2107 の約 230kb の範囲で、138-192-147-183 とい

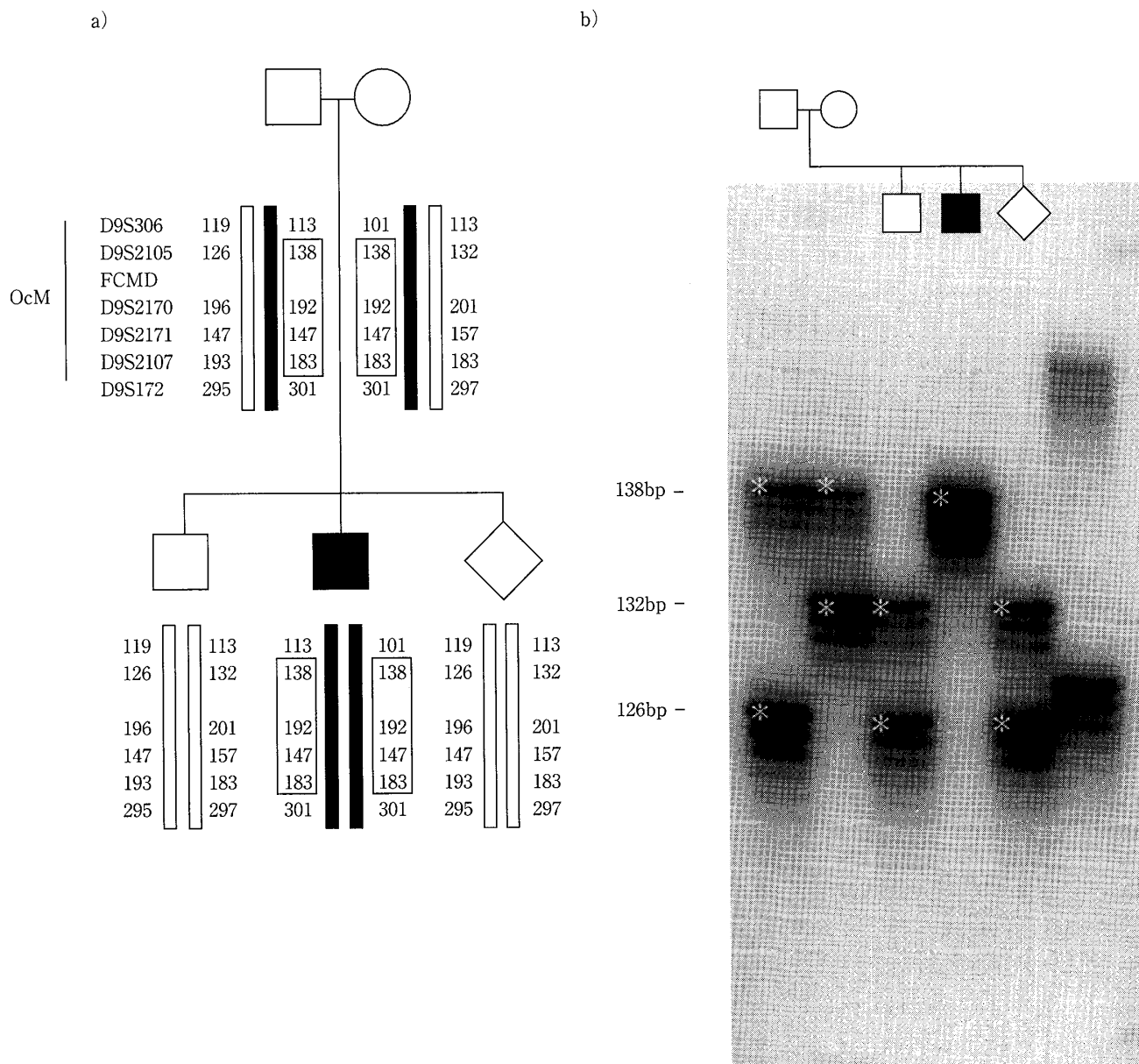


図6 CAリピートマイクロサテライトDNA多型マーカーを用いて解析したFCMDの出生前診断の例

a) ハプロタイプ解析結果：患者である第二子は、父由来、母由来とも D9S2105-D9S2170-D9S2171-D9S2107 の領域で 138-192-147-183 というハプロタイプをホモ接合性にもっていた。このハプロタイプは FCMD 患者の染色体の 82% に共通な創始者ハプロタイプである。出生前診断をした第三子は、このハプロタイプの染色体は全く受け継いでおらず(健康な第一子と同じハプロタイプ)、健常者であると判定できた。

b) マイクロサテライト多型の電気泳動パターン：a) において、CA リピート多型マーカー D9S2105 を使用した時の電気泳動パターンである。それぞれのアレルが様々な回数の CA リピートを有するため、非常に多型性に富みヘテロ接合性が高い。ホモ接合はバンドを 1 本、ヘテロ接合はバンドを 2 本認める。\*で示したメジャーバンドの他に PCR の副産物によるマイナーバンドがラダー状に見られる。

うハプロタイプが82%に示され、患者でいえば約98%がこのハプロタイプのホモ接合あるいはヘテロ接合であった。このハプロタイプは正常染色体には現在まで見出されていない。逆に言えば、このハプロタイプをもつ人はかなりの確率でFCMDの保因者、あるいは患者であるということにもなる。

さらに、FCMD創始者ハプロタイプを示す染色体は、先にも述べた3kbレトロトランスポゾン挿入変異が生じているものに一致することがわかっている。この創始者変異は(遺伝子と隣接多型マーカーとの距離, 組み換え率, および遺伝子頻度からの計算により), 今から約100世代前に生じたものと推定される。1世代25年として約2,500年前, 弥生時代に大陸から渡ってきた渡来人から伝わったのか, あるいは日本人に突然変異が生じたのか, などと想像される。今後, アジア地域の患者の探索が必要である。

連鎖不平衡がよく知られる疾患としては他に, サルジニアでみられるサラセミアもある。

#### おわりに

以上, 現在行われている基本的な遺伝子診断の手法と原理, その結果の解釈に関し概説してきた。疾患の遺伝子診断の施行(特に, 出生前, 発症前, 保因者診断)にあたっては, 遺伝カウンセリングの充実, インフォームドコンセントの徹底を十分に踏まえ, 慎重な対応を決して怠ってはならない。現実には, 年々新たな疾患遺伝子の同定, ならびにその原因蛋白の構造異常と病態との関連性などに関する知見が膨大に蓄積されており, それに

伴った高度な診断技術も開発されてきている。その情報は医薬品創製の際にも大きく影響しており, 遺伝子治療の開発も着実に進んでいる。つまり, 臨床医学領域における遺伝子医療の知識の必要性は近年増大の一途をたどっていると考えられる。臨床に携わる者として, 患者さんに夢を与える分野である遺伝子医学を, 倫理性を基盤として基本的知識, 理解を整理しつつ, 将来に向かって発展させ, 臨床応用していく義務があると考えられる。

#### 文 献

- 1) **Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M et al:** An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* **394**: 388-392, 1998
- 2) **Kondo-Iida E, Kobayashi K, Watanabe M et al:** Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Mol Genet* **8**: 2303-2309, 1999
- 3) **Chamberlain LS, Gibbs RA, Ranier JE et al:** Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *In* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ et al eds) pp272-281, Academic Press, New York, London (1990)
- 4) **Beggs AH, Koenig M, Boyce FM et al:** Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* **86**: 45-48, 1990
- 5) **Dib C, Faure S, Fizames D et al:** A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* **380**: 152-154, 1996
- 6) **Kobayashi K, Nakahori Y, Mizuno K et al:** Founder-haplotype analysis in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD). *Hum Genet* **103**: 323-327, 1998