

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19790706
 研究課題名 (和文) 新しい遺伝子検査 MLPA 法による小児髄鞘化障害関連遺伝子検索と髄鞘化過程の検討
 研究課題名 (英文) Genetic analysis about myelination associated genes using MLPA method and investigation for myelination process
 研究代表者
 植松 貢 (UEMATSU MITSUGU)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：904000316

研究成果の概要：先天性髄鞘化障害の症例を全国より収集し、従来 of 遺伝子検査 (シーケンス法) に加えて、遺伝子の数的な異常を簡便かつ安価に検出できる MLPA 法を用いて解析を行った。髄鞘化に関連する 3 つの遺伝子 (PLP1、GJA12、MBP) について 1 回の検査で行えるように実験系の確立に成功し、17 症例中 PLP1 に 2 例と GJA12 に 1 例の遺伝子異常を検出できた。今後さらに症例を収集し、検査遺伝子も増やして研究を行い、髄鞘化の過程の検討を行う。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000 円	0 円	2,000,000 円
2008 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000 円	330,000 円	3,430,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：先天性髄鞘化障害、PLP1 遺伝子、GJA12 遺伝子、MBP 遺伝子、HSP60 遺伝子
 MLPA 法、ダイレクトシーケンス法、遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

先天性髄鞘化障害は頭部 MRI 検査で診断ができるが、その原因は PLP1 遺伝子異常 (Pelizaeus-Merzbacher 病) 以外はほとんど不明である。近年 GJA12 遺伝子に家系例で異常が報告され、研究者も当院にて 1 例の 1 allele に遺伝子異常を発見した。PLP1 遺伝子異常は欠失や重複などの遺伝子コピー数異常が主であるが、GJA12 では遺伝子コピー数異常を検討した報告はない。従来のシーケン

ス法を用いた遺伝子解析以外に、近年開発された MLPA 法というコピー数異常解析法を用いることにより、簡便で安価なスクリーニング法の確立が可能となってきた。また、コピー数異常による遺伝子過剰発現は、RNA 干渉などの発現調節技術の開発により、将来的に治療法開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 先天性髄鞘化障害の症例を収集し、既報あるいは未報の髄鞘化関連遺伝子の解析を行

い、遺伝子異常の有無を検索し病因遺伝子を明らかにする。

(2) PLP1 遺伝子異常は欠失や重複などコピー数の異常が大部分であり、本研究で行う髄鞘化関連遺伝子検索は、従来のシーケンス法に加えて、MLPA 法による解析を行ってコピー数異常のチェックも行う。遺伝子コピー数異常が主原因であれば、将来 RNA 干渉などによる発現調節を用いた治療法につながる。

3. 研究の方法

(1) 対象は年齢、性別を問わず、頭部MRI検査にて非進行性の髄鞘化障害を認める症例で、明らかな原因が不明のものとする。

(2) 症例の収集は、当院および当院関連病院、さらに全国の小児神経科をもつ病院の協力を得て症例を収集した。また、小児神経科医のメーリングリストや小児神経学会において研究協力の呼びかけを行った。研究は当院や関連病院の倫理委員会に申請を行い許可を得た上で、主治医が患者もしくは家族よりインフォームドコンセントを得て行った。

(3) 解析方法は、症例の末梢血よりDNAを抽出して保存し、MLPA法及びシーケンス法を用いた遺伝子解析を行った。まず、すでに症例報告のあるPLP1遺伝子、GJA12遺伝子について解析を行った。PLP1遺伝子については、市販のMLPA法解析キットを用いて解析系を確立し、次にGJA12遺伝子はキットが市販されていないため、独自にプライマーを作成した。

(4) 上記で遺伝子異常が見つからなかった場合、髄鞘化関連の原因候補遺伝子として、まずMBP(Myelin basic protein)のプライマー作成および実験系を確立し、MLPA法及びシーケンス法を用いた解析を行った。

(5) 研究期間中にさらなる候補遺伝子の報告についてバイオインフォマティクスを用いて情報収集にあたり、2008年に新たに家系例で報告があったHSP60遺伝子について新たに解析準備を行った(現在1例にシーケンスを行

い異常認めず)。当初検索を予定していたM6b、Id4遺伝子については、その後解析報告が見られず原因遺伝子の可能性は低いと判断している。

4. 研究成果

(1) 症例の収集

平成21年4月末時点で、先天性髄鞘化障害の症例を17例収集した。うち当院症例が6例、当院関連施設が5例、全国の他施設からの症例が6例であった。2007年度に7例、2008年度に10例収集しており、今後も全国からの症例収集がさらに進むと考えている。

(2) 実験系の確立

① PLP1 遺伝子

既製のPLP1遺伝子用のMLPAキット(ファルコバイオシステムズ)を用いてMLPA法についての手技を習得し、PLP1遺伝子の各エクソンについて安定した結果を得ることができた。シーケンス法については、PLP1遺伝子各エクソン近傍にプライマーを作成してPCR productのダイレクトシーケンスを行った。

② GJA12 遺伝子

GJA12遺伝子は既製のキットはなく、遺伝子コピー数を解析した報告もなかったため、ファルコバイオシステムズのプライマーデザインガイドラインを参考に独自にプライマーをデザインした。既製のPLP1遺伝子用のプライマーセットにGJA12のプライマーをmixしてMLPAを行い、安定した結果を得ることに成功した。シーケンス法については、GJA12遺伝子のエクソンを両端が重なるように3部分に分け、その両端近傍にプライマーを作成してPCR productのダイレクトシーケンスを行った。

③ MBP 遺伝子

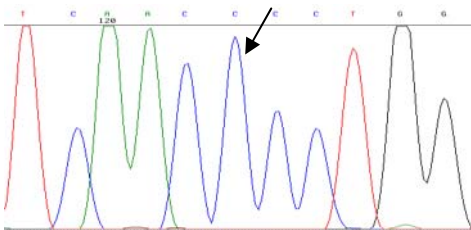
MBP遺伝子は髄鞘の主要な構成蛋白であるが、これまで遺伝子異常の報告はない。しかしMBP遺伝子領域の微細欠失(18q-)を持つ症例で髄鞘化障害が生じることが知られている。MBP遺伝子コピー数を定量PCRにて解析した報告はあるが、既製のキットは存在しない。

そこで、GJA12 遺伝子と同様の方法にて MBP 遺伝子の 11 エクソンにプライマーをデザインし、PLP1、GJA12 のプライマーセットと mix して MLPA 法を行い、これも安定した検査結果を得ることに成功した。これにより、一回の検査で髄鞘化の主要な蛋白である PLP1、GJA12、MBP の遺伝子コピー数異常を簡便かつ安価にスクリーニングすることが可能となった。シーケンス法については、MBP 遺伝子の各エクソンの両端近傍にプライマーを作成して PCR product のダイレクトシーケンスを行った。

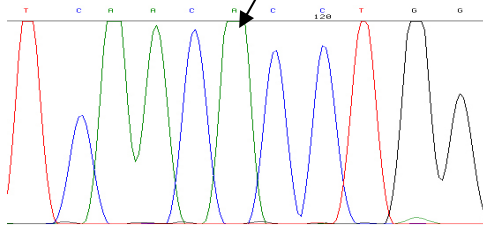
(3) 解析結果

上記の解析系を用いて、全国より収集した先天性髄鞘化障害の17症例について解析を行った。その結果、3歳男児のPLP1遺伝子にミスセンス変異c. 538 A>C (p. Thr180Pro)を確認し(図1)、Pelizaeus-Merzbacher病と診断が確定した。

<図1>症例の PLP1 遺伝子異常 (矢印)

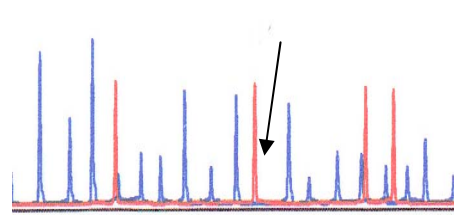


正常コントロール

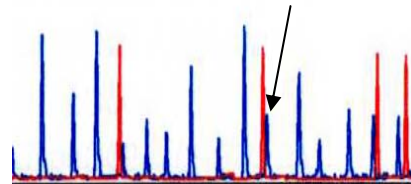


また、1歳4か月男児でPLP1のExon4のみ欠失を認め、Pelizaeus-Merzbacher病と診断が確定した(図2)。

<図2>症例の PLP1 Exon4 欠失 (矢印)



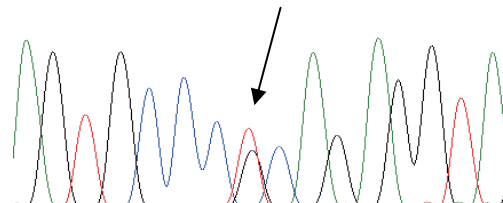
正常コントロール



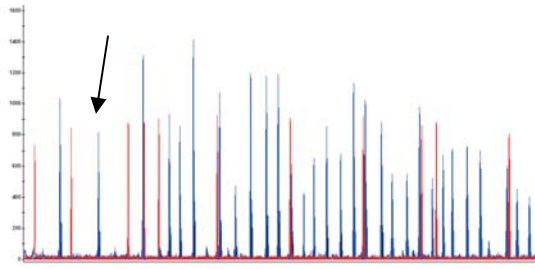
さらに2歳女児にGJA12遺伝子の1アリのミスセンス変異c. 1199 C>A (p. Ara400Gln)を確認した(図3)。この変異は多型の報告はなく、本邦でのGJA12遺伝子異常の初めての報告となった(小児神経学会2008)。しかしこれまでのGJA12遺伝子異常はすべて2アリとも変異が見られており、病因変異と確定するにはさらなる解析が必要である。本症例においてGJA12のコピー数異常の解析を行ったが、正常コントロールと同じでありコピー数異常は認めなかった(図4-1, 図4-2)。

<図3>症例の GJA12 遺伝子異常 (矢印)

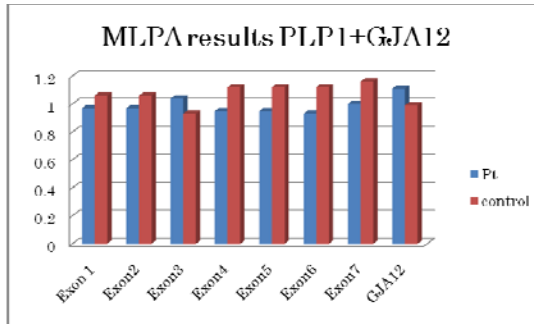
A G T G C C C C 230 C A G A G G T A



<図4-1>症例の MLPA 法による GJA12 遺伝子のコピー数解析 (矢印が GJA12 遺伝子)

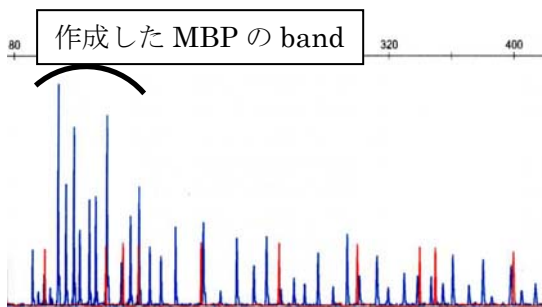


<図 4-2>症例の PLP1 と GJA12 のコピー数結果



他の 14 症例については検索した 3 遺伝子において変異は見つからなかった。しかし、染色体検査で MBP 遺伝子を含む領域の微細欠失 (18q-) が疑われた 1 症例について解析を行った結果、MBP 遺伝子のコピー数が正常であることを確認することができ、欠失の有無の確認に有用であった (図 5)。

<図 5>MBP の MLPA の画像 (コピー数正常)



(4) 今後の展望

現在も症例解析の依頼が全国から集まりつつある状況であり、引き続き解析を行っていく予定である。現在次のスクリーニング遺伝

子として、髄鞘化障害の家系において新たな遺伝子異常の報告がなされた (Neurology, 2008) HSP60 遺伝子について、解析の準備を行っている。研究成果について、2008 年の小児神経学会総会において研究成果を報告した。さらに 2009 年度中に論文報告を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

植松 貢、先天性髄鞘化障害の原因遺伝子検索、第 50 回日本小児神経学会総会、2008 年 5 月 29 日 東京

[その他]

ホームページ

東北大学医学部小児科

<http://ped-thk.umin.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植松 貢 (UEMATSU MITSUGU)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90400316

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし