

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590538

 研究課題名（和文） 単一遺伝子疾患における遺伝子変異の新規検出方法確立  
—関連解析の応用—

研究課題名（英文） Establishment of the new method to identify causal mutations in single-gene hereditary diseases - Applying the haplotype-based case-control studies-

研究代表者

中山 智祥（NAKAYAMA TOMOHIRO）

日本大学・医学部・教授

研究者番号：00339334

研究成果の概要（和文）：

単一遺伝子疾患のサンプルを短期間で集めるのは容易ではないが、申請者が最終年度末までに集めることができたのは、脊髄小脳変性症 42 症例、ハンチントン病 6 症例、多発性内分泌腫瘍症 3 症例、Gitelman 症候群 23 症例である。脊髄小脳変性症とハンチントン病については疾患の原因であるトリプレットリピート領域を PCR にて増幅した後電気泳動することによってリピート数確認を行った。多発性内分泌腫瘍症、Gitelman 症候群については塩基配列決定法にて原因変異を同定した。遺伝子マーカーとして適している single nucleotide polymorphism (SNP) を選択した。最終的に論文化によって世界に発信していきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：

The aim of the present study was to perform a case-control study using single nucleotide polymorphisms (SNPs) and haplotypes in order to identify novel mutations in the candidate genes. We enrolled 42 patients with spinocerebellar degeneration, 6 patients with Huntington disease, 3 patients with multiple endocrine neoplasia and 23 patients with Gitelman's syndrome. The all patients were diagnosed by the genetic testing such as nucleotide sequencing and polymerase chain reaction (PCR). The SNPs for the haplotype-based case-control study have been selected. We are going to get the achievements of the project.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：遺伝子、変異、多型、単一遺伝子疾患、ハプロタイプ

## 1. 研究開始当初の背景

① ヒトゲノム解析計画が終了したことによって、臨床遺伝学の研究は単なる塩基配列の解読から遺伝性疾患の原因・病態解明へと移行した。すなわち遺伝性疾患の原因遺伝子がヒトゲノム上に存在する約 22,000 個の遺伝子のどれかという事のみならず、原因変異の同定や変異と疾患の重症度（表現型）などとの関係が究明課題として残されたのである。

② 一つの遺伝子が原因である単一遺伝子疾患の原因変異はアミノ酸が変化するミスセンス変異、アミノ酸への翻訳が終了してしまうナンセンス変異、1 個から数塩基が挿入したり欠失したりするものなどさまざまなタイプが知られている。これら原因変異は、基本的にまず塩基配列決定法で検索されるのが一般的である。少なくとも各 exon のコード領域をすべて解析することが必要であるため、各 exon を増幅するような PCR プライマーを exon の両側 intron に設定し、ゲノム DNA を鋳型として父由来配列と母由来配列の両方を PCR 増幅した後、それを直接塩基配列決定するダイレクトシーケンシングが、頻繁に行われる。

③ DNA の塩基配列決定法は 1977 年アメリカのサンガー氏による dideoxy 法、同年アメリカのマクサム氏とギルバート氏が開発した化学修飾法が知られ、サンガー氏とギルバート氏はその業績により 1980 年ノーベル化学賞を受賞した。また 1983 年にマリス氏によって発明された PCR 法の登場以降は PCR 法と組み合わせたダイレクトシーケンシング、温度サイクルを用いるサイクルシーケンシングが広く普及し分子生物学や、臨床遺伝学の発展に大きく貢献した。試薬・機器の発達も目覚ましく、放射性同位元素 (RI) を用いたものから蛍光色素を用いた

非 RI 法が主流となり、電気泳動もガラス板とゲルを用いる方法からキャピラリー法へと変遷したことで自動化された機器が用いられるようになった。最近ではポストゲノム時代の到来とともに次世代シーケンサーと呼ばれる大きなスペックを持つ解析機器が導入されるようになり、一人の人間の全ゲノム配列が数時間で解析可能となるようなスピードのものも現れた。

④ 疾患の原因遺伝子を特定するには、しっかりとした家族歴のある家系について遺伝子マーカーを用いて連鎖解析をし、原因遺伝子の遺伝子座を同定するポジショナルクローニング法が一般的である。しかし疾患の家族歴がしっかりと把握できた家族のデータやサンプルを収集することは容易ではない。

⑤ そのような折、遺伝子座がまだはっきりとしない遺伝病の原因変異を検索することとなり、経済的・労力的な理由により全 exon を塩基配列決定法によって解析する方法を取らず、本申請者が多因子遺伝性疾患に適用してきた case-control study (関連解析) を適用することにした。特に連鎖解析に用いられるハプロタイプを関連解析に応用することにした。ハプロタイプを用いた関連解析は多因子遺伝性疾患では検出力が上がる事が想定されており、原因変異単離が期待された。

⑥ 実際皮膚科疾患である弾力線維性仮性黄色腫 (Pseudoxanthoma elasticum : PXE) に眼科疾患である網膜色素線条症 (Angioid streaks : AS) が多く合併することから、PXE の原因遺伝子と考えられている ABCC6 遺伝子内の遺伝子マーカー (single nucleotide polymorphism: SNP) を用いて関連解析を施行した。AS 群 54 例、control 群 150 例を対象とした。結果は本申請者の予測

を凌駕するものであった。すなわち一つ一つの SNP での関連解析では選択した 5 個すべてで有意差を示し、うち 2 個が  $p < 0.0001$  だった。ハプロタイプを用いた関連解析では 7 個のハプロタイプが有意差を示し、うち 5 個が  $p < 0.01$  であった。こうした著明な有意な結果は多因子遺伝性疾患での関連解析では報告されたことのないレベルであった。このことから有意差を示した特定のハプロタイプに連鎖する原因変異が本遺伝子に存在すると考え、塩基配列決定法にて検索したところ、実際に原因変異を発見した (Sato N, Nakayama T et al. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 2009: 研究業績欄文献 N0. 6)。PXE、AS とともに常染色体劣性遺伝形式と考えられた。このことから単一遺伝子疾患の原因変異を単離するのに本法が有効で、労力、時間ともに軽減することができる。またサンプル収集が困難な連鎖解析の一家系サンプル収集をしなくて済むことは大きい。

## 2. 研究の目的

今後、単一遺伝子疾患の遺伝学的検査が発展する中で、効果的に原因変異を見出すことは重要である。そこで AS 以外の単一遺伝性疾患で関連解析の有効性を確認することが必要であると考えた。具体的にどれくらいの case 群、control 群が必要なのか、どのような基準で遺伝子マーカーを選別する必要があるのか、有意基準はどれくらいに設定すべきかなどを検討する必要がある。そうしたことを着想し本研究ではいくつかの単一遺伝子疾患において関連解析を行い、効果的に原因変異を検索する方法を確立し、遺伝学的検査に応用することを目指すことにした。

## 3. 研究の方法

単一遺伝子疾患として申請者が今まで解

析してきたものの中で脊髄小脳変性症、ハンチントン病、多発性内分泌腫瘍症、Gitelman 症候群について原因遺伝子内に遺伝子マーカーとなりうる SNP を複数設定し、健常成人群を control 群として関連解析を行う。特にハプロタイプを用いた関連解析では有意差を示したハプロタイプが原因変異と連鎖するか否かを確認し、必要最小限の case 群、control 群のサンプル数、SNP 数を割り出す。

## 4. 研究成果

単一遺伝子疾患のサンプルを短期間で集めるのは容易ではないが、申請者が最終年度末までに集めることができたのは、脊髄小脳変性症 42 症例、ハンチントン病 6 症例、多発性内分泌腫瘍症 3 症例、Gitelman 症候群 23 症例である。これらは臨床症状からそれぞれの疾患が疑われていたもので、脊髄小脳変性症とハンチントン病については疾患の原因であるトリプレットリピート領域を PCR にて増幅した後電気泳動することによってリピート数確認を行った。多発性内分泌腫瘍症、Gitelman 症候群については塩基配列決定法にて原因変異を同定した。原因変異の精度保証については研究分担者のもとで実施し、確実であることを確認することを予定している。これら確定診断が決定したのについては抽出した DNA は冷蔵保存し、血漿・血清は凍結保存した。DNA は一部 PCR と塩基配列決定法に使用したものについては濃度調整したため、今後もすぐに使用可能な状態にある。

臨床データは、case-control study に必要なものである性別、年齢、当該疾患家族歴などその都度 check した。今後引き続き本研究で収集したサンプルを用いて Haplotype-based case-control studies を実

施し成果報告をしてゆきたいと考える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Shimodaira M, Nakayama T, Sato I, Sato N, Izawa N, Mizutani Y, Furuya K, Yamamoto T: Glucocorticoid synthesis related-genes: HSD11B1 and HSD11B2 in hypertensive disorders in pregnancy. *Gynecological Endocrinology* 2013. [Epub ahead of print] 査読有
2. Pan S, Nakayama T, Sato N, Izumi Y, Soma M, Aoi N, Ma Y: A Haplotype of the GOSR2 Gene Is Associated with Myocardial Infarction in Japanese Men. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013. [Epub ahead of print] 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 中山智祥: 臨床検査医学科での自費診療に特化した遺伝学的検査・カウンセリングの問題点。第 36 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、松本、2012.6.8-6.10 (Oral 6.9)
2. 中山智祥、佐藤直之、常喜信彦、柳田靖子、田中友里、長谷弘記、相馬正義、青井則子: 新しい変異が見出された Gitelman 症候群の家系 (第 2 報)。第 85 回 日本内分泌学会学術総会、神戸、2012.4.19-4.21 (Poster 4.19)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 智祥 (NAKAYAMA TOMOHIRO)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号 : 00339334

### (2) 研究分担者

登 勉 (NOBORI TSUTOMU)  
三重大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授  
研究者番号 : 60106995

野村 文夫 (NOMURA FUMIO)  
千葉大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授  
研究者番号 : 80164739

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号 :