

学 位 論 文 題 名

Angelman 症候群および Prader-Willi 症候群の
DNA 診断法開発とその評価

学位論文内容の要旨

Angelman症候群 (AS) およびPrader-Willi症候群 (PWS) の原因遺伝子は15q11-q13に近接して存在し、ゲノム刷り込みを受けていると考えられている。すなわち、DNA欠失もしくは片親性ダイソミー (UPD:相同15番染色体両方が同一の親由来) により父由来15q11-q13を欠いたときにPWS、母由来15q11-q13を欠いたときにASを発症する。PWSと比較してASは臨床診断が難しく多数例における解析の報告は少ない。また、従来のDNA診断は主としてサザン法を用いたために、方法の煩雑さや低い多型検出率などの点で問題があった。本研究の目的は①AS多数例におけるDNAレベルの異常を検討する。②ASおよびPWSに対するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いた簡便なDNA診断法を開発する。の2点である。

対象と方法

患者: AS患者61名 (男28名、女33名、平均年齢10.2歳) とPWS患者14名 (男8名、女6名、平均年齢5.5歳) を対象にした。AS患者61名中8名 (4家族) は家族例で、残り53名は散発例であり、PWS患者はすべて散発例であった。

染色体分析: 染色体高精度GTG分染法による分析をASの57例 (57家族) 中49例、PWS14例全例に行った。

分子遺伝学的解析:

(1) サザン解析: 15q11-q13にマップされる6種類のクローン化DNAをプローブとした (括弧内は座位): IR39 (D15S18), ML34 (D15S9), IR4 (D15S11), TD3-21 (D15S18), 28β3-H3, (GABRB3), IR10 (D15S12)。内部対照プローブとして21-4U (D21S110) を用い、シグナル強度を比較してDNAコピー数を判定した。

(2) 二塩基反復多型 (DNRP): 15q11-q13にマップされる3種の座位 (D15S11, GABRB3, D15S97)、15q13-terにマップされる2種の座位 (ACTC, D15S87)、および11qに

マップされるD11S527の計6種のDNRPを用いた。PCRにて増幅し、放射性同位元素（RI）標識法、および非RI法にて検出、比較した。

結果

AS患者におけるDNA欠失の頻度、欠失幅、欠失の親起源

AS患者57例（家族例は1患者として扱った。）中38例（65.5%）にDNA欠失を検出した。散発例における欠失幅はD15S9-D15S12領域の5座位を共通して含み、数例ではD15S18に及んでいた（表1）。家族例では1家族にのみ欠失を認め、その欠失幅は小さくD15S10とGABRB3の2座位だけを含んでいた。欠失の親起源は判定可能であった26家族全例において母由来であった。欠失がなくかつ家族検索のできた14例すべてにUPDは検出されず、そのうち11例（78.6%）の15番相同染色体は両親由来であった。

染色体分析結果とDNA解析結果との比較

AS患者49例中12例（24.5%）とPWS患者14例中6例（42.8%）とに染色体分析結果とDNA解析結果との不一致を認めた。

DNRPによるDNA欠失およびUPDの検出

両親の検索が可能でかつサザン解析によりDNA欠失の有無が既知のAS患者37例およびPWS患者14例についてDNRPによる解析を行った。その結果（表2）、サザン解析と矛盾するものは無く、RI標識ではAS患者の33（89.2%）/37、PWS患者の12（85.7%）/14において遺伝学的情報を得た。非RI法ではAS患者の30（85.7%）/37、PWS患者の12（85.7%）/14であった。

考察

AS患者におけるDNA欠失およびUPD

本研究においてAS症例の約65%がDNA欠失をもつことが示された。欠失の親起源は例外なく母由来であり、ゲノム刷り込み仮説を支持する。散発例での欠失範囲はD15S9-D15S12の5座位を含み、それより小さいものは無く、PWS患者での典型的欠失範囲と一致し、欠失生成機序の共通性を示唆する。この典型的な大きな欠失は家族例ではみられず、1家族にのみ小さな欠失が検出された。非欠失例ではUPDは認めず、大部分（85.7%）で15番染色体の両親由来が証明された。したがって、AS患者におけるUPDの頻度はPWS患者の場合と異なり非常に低いと考えられる。

染色体欠失率とDNA欠失率の比較評価

染色体分析結果とDNA解析結果との不一致が少なからずみられた。染色体15q11-q13領域は正常変異が多く、正確な診断にはDNA解析が必要と考えられる。

DNRP診断法の評価

本研究は15q11-q13領域では複数のDNRPを組み合わせることによりPCRと通常の電気泳動との組合せでも高率に多型情報がえられることを示した。手技の簡便さを考え合わせると、DNA診断の第一選択であると考ええる。

表 1. 61例AS患者における欠失範囲

群	症例数	欠失例数／解析例数					
		D15S18	D15S9	D15S11	D15S10	GABRB3	D15S12
家族、非欠失 (AS1-AS5)	5	0/5	0/5	0/4	0/5	0/3	0/5
家族、欠失 (AS6-AS8)	3	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	0/3
散発、欠失 (AS9-AS45)	37	10/34	28/28	13/13	34/34	37/37	25/25
散発、非欠失 (AS46-AS61)	16	0/12	0/12	0/10	0/15	0/13	0/10

表 2 : RI標識法と非RI法によるDNRP解析結果

群	RI標識法 患者数				非RI法 患者数			
	AS		PWS		AS		PWS	
	DNA欠失	非欠失	DNA欠失	非欠失	DNA欠失	非欠失	DNA欠失	非欠失
1 母由来欠失	14	0	0	0	13	0	0	0
父由来欠失	0	0	2	0	0	0	2	0
2 母性UPD	0	0	0	5	0	0	0	5
父性UPD	0	0	0	0	0	0	0	0
3 両親由来	0	8	0	3	0	7	0	3
4 欠失/UPD	11	0	2	0	10	0	2	0
5 情報なし	3	1	2	0	5	2	2	0
計	28	9	6	8	28	9	6	8

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 小 林 好 宏

副 査 教 授 葛 巻 暹

Angelman症候群およびPrader-Willi症候群のDNA診断法開発とその評価

Angelman症候群 (AS) およびPrader-Willi症候群 (PWS) の約60%に15q11-q13の微小欠失が合併し、染色体高精度分染法のレベルでは区別できない。欠失の親由来はPWSでは父由来、ASでは母由来である。PWSでは欠失の無い症例の大部分が両方の15番染色体が母親に由来する母性片親性ダイソミー (母性UPD) である。これに対し、ASでは極少数の例に父性片親性ダイソミーが見つかっている。PWSと比べてASは臨床診断が難しく、多数例におけるDNA異常の検討はなく、DNA診断の可能性を明らかにするためには、DNA異常の種類と頻度を明らかにすることが必要であった。また、従来のDNA診断は主としてサザン法により行われていたため、手技の煩雑さ、低い多形検出率等の点で問題があった。最近、開発された二塩基反復多形は多形性に富み、PCRを用いるために、簡便に行い得る。この新手法の両疾患に対する応用の可能性を明らかにすることもまた必要である。

そこで齊藤氏はAS患者61名とPWS患者14名を対象として高精度GTG分染法による染色体分析を行うと同時に15q11-q13にマップされる6種類のクローン化DNAをプローブとして用いサザン解析を行った。更に又計6種の二塩基反復多型を用い、PCRにて増幅し、放射性同位元素 (RI) 標識法、および非RI法により検出、比較を行った。その結果AS患者57例中38例 (65.5%) にDNA欠失を検出した。散発例における欠失幅はD15S9-D15S12領域の5座位を共通して含み、数例ではD15S18に及んでいた。家族例では1家族にのみ小さな欠失を認めた。欠失の親起源は例外なく母由来であった。欠失がなくかつ家族検索のできた14例すべてにUPDは検出されず、そのうち11例 (78.6%) の15番相同染色体は両親由来であった。AS患者49例中12例 (24.5%) とPWS患者14例中6例 (42.8%) とに染色体分析結果とDNA解析結果との不一致を認めた。

一方、両親の検索が可能でかつサザン解析によりDNA欠失の有無が既知のAS患

者37例およびPWS患者14例について二塩基反復多型による解析を行った結果、サザン解析と矛盾するものは無く、RI標識ではAS患者の(89.2%)、PWS患者の(85.7%)において遺伝学的情報を得た。以上の結果から斉藤氏はAS症例散発例の約65%にDNA欠失をもつことを示し、欠失範囲はD15S9-D15S12の5座位を含むので、これらのDNAマーカーを用いることによりDNA診断が可能であることを明らかにした。非欠失例ではUPDは認めず、大部分で15番染色体の両親由来が証明されたのでこれらの症例ではDNA診断は困難と考えられた。

また染色体分析結果とDNA解析結果との不一致が少なからずみられたことから、正確な診断にはDNA解析が必要と考えられた。同時に斉藤氏は複数の二塩基反復多型を組み合わせることによりPCRと通常の電気泳動との組合せでも高率に多型情報がえられることを示し、手技の簡便さを考え合わせると、これら疾患の診断にはDNA診断が第一選択であることを強く示唆した。

このように臨床診断の難しいAngelman症候群に関して、DNA診断の可能性を明らかにしたことに加え、本症やPrader Willi症候群のDNA診断に際しては、二塩基反復型(DNRP)を組み合わせるPCRを行う新手法が最も実用的であることを明らかにした点は両疾患の診断をより明確かつ簡便にする上で重要な知見であり、学位論文として十分に評価できるものと判断された。発表後に副査の小林、葛巻両教授並びに藤本教授からそれぞれ二、三の質問があり、更に副査の両教授からは後日個別に質疑が交わされたが、いずれにおいても適切な評価が得られ、合格と判定された。