

学位論文題名

Genetic Heterogeneity of Dominantly Inherited Olivopontocerebellar Atrophy(OPCA)in the Japanese:Linkage Study of Two Pedigrees and Evidence for the Disease Locus on Chromosome 12q(SCA2)

(本邦優性遺伝性オリブ橋小脳萎縮症の遺伝的異質性-2家系の連鎖解析による第12染色体長腕上の遺伝子座(SCA2)に関する研究)

学位論文内容の要旨

背景と目的

従来の疾患概念である優性遺伝性オリブ橋小脳萎縮症(OPCA)には遺伝子異常の異なる複数の疾患が含まれていると推定されている。その中で、最初に遺伝子座の決定されたものはspinocerebellar ataxia type 1(SCA1)と命名されている。SCA1遺伝子は第6染色体短腕(6p22-p23)上に位置し、CAG trinucleotide repeat(CAGリピート)の異常増幅に起因する疾患であることが最近明らかにされた。既に我々は連鎖解析の結果より、本邦の遺伝性OPCAがSCA1を含みながらも、SCA1とは遺伝子座の異なる疾患も含まれていることを明らかにした。更に、両者には疾患像にも相違点のあることを報告した。一方、最近キューバの家系分析により、第2番目の遺伝子座がspinocerebellar ataxia type 2(SCA2)として、第12染色体長腕(12q23-q24.1)上に決定された。更に、米国のイタリア系家系の解析を通じて、SCA2遺伝子座は、IGF1とD12S105/D12S84の区間にまで絞られている。そこで、SCA1とは異なる本邦家系について、SCA2近傍のDNAマーカーとの連鎖解析を行い検討したので報告する。

対象

対象は北海道内の家系から数世代にわたる発症を確認しえた2家系(P2及びP35)を選んだ。この2家系は連鎖解析とCAGリピートの分析により、遺伝子異常がSCA1とは異なっていることを確認済みである。連鎖解析は、家系P2については27人、家系P35については14人について行った。うち家系P2の10人、家系P35の6人は発症者である。発症年齢は17~52歳にわたり、平均は $34.2 \pm 11.4$ (S.D.)歳である。なお一部の世代間では発症年齢の若年化が認められた。

方法

本人の承諾を得た上で採血し、白血球よりDNAを分離した。連鎖解析を行う上で使用したマーカーは、D12S78、IGF1、D12S105、D12S84、PLA2及びD12S76の6種類であり、いずれもSCA2近傍に位置しているマイクロサテライトマーカーである。各マーカーに特異的なプライマーを用いて、polymerase chain reaction(PCR)法により遺伝子増幅を行った。PCRの各反応はDNA 50ng、プライマー各0.4pmole、dNTP 250 $\mu$ M、KCl 50mM、Tris-HCl (pH 8.0)10mM、MgCl<sub>2</sub>1.5mM 及びTaq polymerase 0.5Uを含み合計6 $\mu$ lで行った。プライマーのうち一方を<sup>32</sup>P- $\gamma$  ATPで標識した。反応は、94 $^{\circ}$ Cの加熱変性(60秒)及び72 $^{\circ}$ CでのDNA鎖合成(90秒)を含む30サイクルを原則とした。アニーリング温度(60秒)はD12S76の56 $^{\circ}$ C以外はすべて55 $^{\circ}$ Cに設定した。各反応液を、95%formamide、20mM EDTA、50mg/ml bromophenol

blue, 及び50mg/ml xylene cyanolからなるloading buffer45 $\mu$ lで希釈後, 7M尿素を含むポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分画した. 1600Vで3~4時間の泳動後, DNA多型を検出した.

解析ソフトLIPEDを用いて2点解析によるロッド値を算出し, 各マーカーと疾患遺伝子座との連鎖の可能性を検討した. 疾患遺伝子の頻度は1/10,000とし, 各組み替え率(交叉率,  $\theta$ )の性差はないものとした. 浸透率は100%とし, ロッド値は年齢依存性浸透率により補正した. 一方, LINKAGE program packageを用いて疾患遺伝子座の同定を試みた. マーカーの配列を決定するために, 対象2家系の他に別の自験例4家系を追加し, 合計6家系について遺伝子間距離を計算した. この計算結果より作成した連鎖地図にもとづき, 各対立遺伝子の番号からハプロタイプを組み, 交叉例を検討した. 更に多点解析により, 疾患遺伝子座が隣接する2つのマーカーの間に存在する可能性をロッド値として算出し, 最高値を示す部位を求めた.

## 結果

### 2点解析

各家系単独では, いずれのマーカーについてもロッド値は有意水準値の3には達しなかった. ただしD12S105及びD12S84については, ロッド値の2家系の合計が交叉率( $\theta$ )0.04でそれぞれ3.182及び3.468に達し, 連鎖が示唆された.

### 連鎖地図

文献報告例及び自験例6家系を用いて計算した結果から得られた遺伝子マーカーの配列並びにその距離は以下の通りである: cen-D12S78-(2.4cM)-IGF1-(6.2cM)-D12S105/D12S84-(6.4cM)-PLA2-(0.0cM)-D12S76-tel.

### 発症者のハプロタイプ

各家系で発症者に共通のハプロタイプが得られた. 家系P2では8-6-5-2-5-1が発症者特有のハプロタイプとなっている. うち2例では, D12S84とPLA2の間の交叉により, D12S78からD12S84までの対立遺伝子の組み合わせが共通である. 別の1例ではD12S78とIGF1, 更にその子ではIGF1のみが共通であり, IGF1に近接した交叉が示されている. 一方, 家系P35では6例中5例で8-2-5-12-7-6が発症者のハプロタイプとなっている. 残りの1例ではIGF1とD12S105の間の交叉により, D12S105/D12S84からD12S76までが共通である. すなわち, 発症者におけるハプロタイプの交叉は, いずれもIGF1からD12S105/D12S84にかけての領域でおこっており, この部分に疾患遺伝子座が含まれることが想定される.

一方, 未発症ながら罹患者の親からそのハプロタイプを受け継いでいるキャリアーもあり, 将来発症する可能性がある.

### 多点解析

連鎖地図をもとに2家系について, 疾患遺伝子座のとりうる位置を3点解析によるロッド値として算定した. ただし, D12S105とD12S84との間, 及びPLA2とD12S76との間には交叉が認められなかったため, それぞれ単一の遺伝子座とみなした. そのロッド値は, D12S105/S84からIGF1側に向かって3.2cMの位置で最高値5.0に達した. この結果はSCA2の報告例と一致するものであった.

### 考察

SCA2遺伝子座は, 12q23-q24.1またはIGF1とD12S105/S84の間に決定されている. 今回の2家系は, いずれもSCA1でないことは確認済みであり, 連鎖解析の結果, 人種が異なり地理的にも隔絶された北米のSCA2家系と, 分子遺伝学的に同類であることが示されたものである. しかしながら, その遺伝子異常の詳細については, 現時点では不明である.

一方, SCA1遺伝子については, CAGリピートの異常蓄積を伴うことが明らかにされて

いる。更に、世代が下るに従って発症年齢が若年化する世代間促進現象が認められ、発症年齢が若いほどCAGリピートの増幅の程度が大きい関係にあることも確認されている。同様に、自験例でも米国の報告と同様に発症年齢の世代間促進の傾向がみられている。すなわち、SCA2の遺伝子についてもSCA1と同様に、反復する塩基配列の蓄積異常を伴うことが考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 真 野 行 生  
副 査 教 授 吉 木 敬  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

## 学 位 論 文 題 名

Genetic Heterogeneity of Dominantly Inherited Olivopontocerebellar Atrophy(OPCA)in the Japanese:Linkage Study of Two Pedigrees and Evidence for the Disease Locus on Chromosome 12q(SCA2)

(本邦優性遺伝性オリブ橋小脳萎縮症の遺伝的異質性-2家系の連鎖解析による第12染色体長腕上の遺伝子座(SCA2)に関する研究)

臨床病理学的な疾患概念である優性遺伝性オリブ橋小脳萎縮症(OPCA)には遺伝子異常の異なる複数の疾患が含まれていると推定される。その中で、最初に遺伝子座の決定された疾患はspinocerebellar ataxia 1 (SCA1)と命名されている。最近、SCA1はCAGリピートの異常増幅による疾患であることが明らかにされた。我々は本邦の家系の遺伝学的な検討により、SCA1とは異なる疾患の含まれていることを明らかにした。ところで第2番目の疾患遺伝子座がSCA2として、キューバの家系解析により、第12染色体長腕(12q23-q24.1)上に決定されている。その後の解析により、SCA2遺伝子はIGF1とD12S105もしくはD12S84の区間内に位置していることが明らかにされている。そこで、我々はSCA1と異なる家系について、SCA2遺伝子座の近傍に位置しているマイクロサテライトDNAマーカ-との連鎖解析を検討した。

対象は遺伝子診断によりSCA1とは異なる疾患であることを除外診断できたものの中から、3世代以上にわたって発症者が推定されている“遺伝性OPCA”2家系を選んだ。患者16名の発症年齢は17-52歳、平均34.2±11.4(SD)である。なお、家系の一部には世代間で発症年齢の若年化が認められた。

本人の同意を得た上で、総数41名から採血を行った。このうち、16名は発症者である。DNAは末梢血白血球より分離した。分析したマイクロサテライトマーカ-はD12S78, IGF1, D12S105, D12S84, PLA2, D12S76である。DNA多型の分析はPCR法、ゲル電気泳動、オートラジオグラフィーにより行った。疾患遺伝子とマーカ-との2点連

連鎖解析にはコンピュータソフトLIPEDを用い、ロッド値は年齢依存性浸透率で補正して算出した。同じく、3点連鎖解析にはLINKAGEを用いた。

疾患遺伝子とマーカー遺伝子との2点連鎖解析の結果、2家系のロッド値の加算値は交叉率0.04で、D12S105は3.18、D12S84は3.47となり、有意水準である+3を越えた。推定されるマーカーの配列(cen-D12S78-IGF1-D12S105/D12S84-PLA2-D12S76)に従ってハプロタイプ解析を行ったところ、疾患と連鎖しているハプロタイプにおいてD12S84-PLA2間で2例、D12S78-IGF1間で1例、IGF1-D12S105間で1例の交叉が認められた。いずれの場合においてもD12S105/D12S84は共通しているため、この2つのマーカー遺伝子の周辺に疾患遺伝子が位置しているものと推定された。D12S105とD12S84の間には交叉が認められないので単一遺伝子座として疾患遺伝子との3点連鎖解析を行ったところ、D12S105/D12S84の動原体側3.2cMにおいて最大値5.0を得た。

これらの結果は、我々の対象家系がSCA2であることを強く示唆している。SCA2は世界各地より報告されているが、同一の染色体領域に疾患遺伝子座が決定されていることから、遺伝学的にも同一疾患である可能性が高い。ところで類似疾患であるSCA1においては変異遺伝子のCAGリピート数は世代間で不安定であり、SCA1に認められる促進現象と対応していることが知られている。SCA2の遺伝子異常は現時点では不明であるが、同様の促進現象を伴うことから、SCA1と類似した遺伝子異常のあるものと予想された。

公開発表にあたり、副査の吉木教授より、SCA2もtriplet repeat病の可能性が高いがその細胞死を起こす機序、病変部位の選択性、創始者効果の有無、実験モデルについて、また副査の長嶋教授より多系統萎縮症に入る孤発性OPACと、遺伝性OPACの病理像の比較、とくに自律神経系、乏突起膠細胞内の封入体について、また主査の眞野教授より腱反射減弱の機序、家族への説明、遺伝子診断の問題点、などについて質問がなされたが発表者はおおむね妥当な回答を行った。また、脇坂助教授、田代教授より遺伝子診断、ならびに北大が本邦の脊髄小脳変性症研究に果たした役割について補足説明があった。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有すると判定した。