

SCA12の遺伝子座に連鎖するが、*PPP2R2B* 遺伝子の変異を認めない優性遺伝性脊髄小脳変性症の1家系

学位論文内容の要旨

背景と目的

Spinocerebellar ataxias(SCA)は、小脳および脊髄に病変の主座をもつ、運動失調を主症候とする遺伝性変性疾患の総称であるが、遺伝学的には多様な一群である。疾患遺伝子座同定には連鎖解析が有力な方法であるが、マイクロサテライトによる方法では、マーカー間距離が長く、核家族などの小家系における連鎖解析での検出力には限界があった。近年のDNAマイクロアレイ技術の進歩は、SNP(Single Nucleotide Polymorphism)のハイスループットジェノタイピングを可能にし、得られた多数のSNPによる連鎖解析は、小家系においてもより高い検出力を持つことが期待できる。

我々は優性遺伝性脊髄小脳変性症の1家系について、約400のマイクロサテライトマーカーを用いて連鎖解析を行い、第5染色体上、D5S436とD5S2014との間に最大LODスコア2.39を得たが、マーカー密度が十分ではなく、他領域の可能性を除外することは困難であった。今回、本家系の疾患遺伝子のより正確なマッピングと疾患遺伝子の同定を目的に、DNAマイクロアレイを用いたSNPジェノタイピングならびに連鎖解析を行い、候補遺伝子の遺伝子変異の有無を検討した。

対象と方法

DNA収集と既知SCAに関する検討 発症者4名を含む本家系10名を対象とした。本研究は北海道大学倫理委員会の承認に基づいて行われた。末梢血白血球から抽出したゲノムDNAを用いた。SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA10, SCA12, SCA17 および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)の各原因遺伝子のCAG/CTGリピートの異常伸張の有無を評価するため、各遺伝子のトリプレットリピートをはさむ領域のPCR増幅をおこない、4%ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動を行った後GeneScan Analysis Ver. 2.0(Perkin Elmer)によりフラグメント解析をおこなった。SCA5, SCA13, SCA14, SCA27については、それぞれの原因遺伝子におけるエクソン領域をPCR増幅し、これらをテンプレートとしてシークエンス反応を行い、ABI PRISM 310 genetic analyzer(Applied Biosystems)にて解析を行った。SCA15における*CNTN4*およびSCA31における*puratrophin-1*遺伝子多型の有無については、これらの部位を含む領域を含むPCR産物を酵素処理し、電気泳動を行い確認した(RFLP法)。

SNPジェノタイピングと連鎖解析 16の既知のSCAを除外診断した後、909,622 SNPを含むthe Genome-Wide Human SNP Array 6.0(Affymetrix)を用いて、ジェノタイピングを行った。パラメトリック連鎖解析は、解析ソフトとしてAllegroを用い、LODスコアは優性遺伝形式、浸透率100%、性別間での同等の組み換え率、遺伝子頻度0.001を仮定して計算された。また、以下の条件を満たすSNPを選択した: Hardy-Weinberg平衡 >0.05 , call rate=1, confidence score <0.02 。さらに、80~120kbの間で最もマイナーアレル頻度が高いSNPを選択し解析に用いた(Min-Max法)。遺伝子座の存在が疑われた染色体では、全SNPマーカーによりMLINKを用いて解析をおこなった。

DNAシークエンス 候補遺伝子である*PPP2R2B*(protein phosphatase 2, regulatory subunit B, b isoform)のエクソン1の2つのスプライス変異を含む9エクソンおよびプロモーター領域

のDNA塩基配列の検討を行った。

結 果

既知のSCAとの鑑別 SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA10, SCA17およびDRPLAの各疾患遺伝子におけるCAG/CTGリピート数の異常伸張は認められなかった。また、SCA5, SCA13, SCA14およびSCA27の各疾患遺伝子におけるORF (Open Reading Frame)内の病的変異は認められなかった。さらに、SCA15およびSCA31において連鎖不平衡にある遺伝子多型も認められなかった。

5qへの連鎖 多点解析から、5q31-q33.1に存在する4.28Mb領域に、本家系における理論的
最大値である多点LODスコア2.408が得られた。また、二点LODスコアから、候補領域の境界
は、セントロメア側境界がrs681591とrs10477291との間に、テロメア側境界がrs741580と
rs32582との間に存在すると考えられた。この領域にはSCA12の原因遺伝子である*PPP2R2B*遺
伝子が含まれる。

*PPP2R2B*のDNAシーケンス 本家系においては、SCA12の病的変異とされる*PPP2R2B*のプロ
モーター領域におけるCAGリピートの異常伸張は認められなかった(全発症者において16/17
リピート)。また、同遺伝子ORF, 各エクソン・イントロン境界領域およびプロモーター領
域における点変異, 欠失, 挿入は認められなかった。

本家系の臨床像 緩徐に進行する純粋小脳性運動失調を特徴とする。四肢体幹部の運動失
調, 構音障害, 滑動性眼球運動障害が認められるが, 一部に不随意運動(頭部振戦)を認め
る。認知症, パーキンソニズム, 末梢神経障害, 自律神経障害を認めない。脳MRIでは著明
な小脳萎縮を認める。

考 察

SCA12は*PPP2R2B*のプロモーター領域のCAGリピート異常伸張に起因する(変異アレル55
~78リピート, 正常7~32)が, 本邦での報告はない。本家系ではSCA12の主症状である頭
部振戦にて発症した1例があるが, 緩徐進行性の純粋小脳性運動失調を呈し, SCA12で高頻
度に認められる認知症, 末梢神経障害, 自律神経障害, パーキンソニズムの存在は認めら
れない。また, 脳MRIではびまん性大脳萎縮を認めるSCA12に対し, 本家系では小脳に限局
している。このように, SCA12と本家系では異なった臨床像を呈し, 本家系の発症者は,
*PPP2R2B*におけるCAGリピートの異常伸張を持たず, 本家系はSCA12とは遺伝学的に異なる
疾患であると考えられるが, SCA12と本家系はアレル病である可能性も考えられる。

本家系における4.28Mbの候補領域には44の遺伝子が含まれる。今後,*PPP2R2B*のイント
ロンを含むより広範な検索と候補領域における他の遺伝子の変異の有無についての検討が
必要とされる。

結 語

優性遺伝性背髄小脳変性症の1家系において, 疾患遺伝子座の候補領域を第5染色体長腕上
4.28Mb領域に同定した。同領域には, SCA12の原因遺伝子である*PPP2R2B*が含まれるが,
同遺伝子のORF, プロモーター領域には病的変異を認めなかった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 佐々木 秀 直

学位論文題名

SCA12の遺伝子座に連鎖するが、*PPP2R2B* 遺伝子の 変異を認めない優性遺伝性脊髄小脳変性症の1家系

Spinocerebellar ataxia(SCA)は、小脳および脊髄に病変の主座をもつ、運動失調を主症候とする遺伝性変性疾患の総称であるが、遺伝学的には多様な一群である。いまだ疾患遺伝子座が同定されていない優性遺伝性小脳失調症(ADCA)家系も多い。連鎖解析は疾患遺伝子座同定のための有力な方法であるが、従来の方法に比べDNAマイクロアレイによる一塩基多型(SNP)タイピングにより得られた多数のSNPをマーカーとした連鎖解析は、小家系においてもより高い検出力を持つことが示されている。

こうした背景を踏まえて、本論文では、ADCAの1家系について疾患遺伝子座のマッピングと疾患遺伝子の同定を目的として、DNAマイクロアレイを用いたSNPタイピングならびに連鎖解析を行い、さらに候補遺伝子における変異の有無を検討した。

対象は発症者4名を含む10名からなる1家系である。既知のSCAについては以下のように評価し除外した。すなわち、SCA1, SCA2, MJD/SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA10, SCA12, SCA17 および歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)については、CAG/CTGリピートの異常伸張の有無をDNAフラグメント解析にて評価した。また、SCA5, SCA13, SCA14, SCA27については、各原因遺伝子のエクソンにおける点変異、欠失の有無をダイレクトシーケンス法にて評価した。さらに、SCA16およびSCA31については、連鎖不平衡にある遺伝子多型の有無についてPCR-RFLP法により評価した。既知のSCAを除外診断後、DNAマイクロアレイによりタイピングしたSNPをマーカーとしてパラメトリック連鎖解析をおこない、5q31-q33.1上4Mb領域に、本家系における理論的最大値であるLODスコア2.408を得た。同領域にはSCA12の疾患遺伝子である*PPP2R2B*が含まれるが、本家系においては、SCA12の変異である*PPP2R2B*プロモーター領域のCAGリピート異常伸張を認めず、また、同遺伝子のエクソンおよびプロモーター領域にも遺伝子変異がないことをダイレクトシーケンス法により確認した。本家系はSCA12と臨床像を異にし、遺伝学的に異なる疾患であり、あらたなSCAである可能性が示唆され、今後疾患遺伝子同定のため候補領域の詳細な検討が必要とされる。

公開發表にあたっては、はじめに副査の笠原教授より、SCA12とアレレル病の関係にある可能性とその評価方法について質問があり、申請者は、アレレル病の例としてSCA6の例を挙げ、本家系におけるアレレル病の可能性は否定できないが、現時点では本家系における*PPP2R2B*には変異を認めなかったことをスライドおよび文献を引用しながら回答した。また、イントロンにおける変異の検出法についての質問があり、申請者はSCA31の例を挙げ、リピートの異常伸張などの変異が存在する場合にはサザンブロットを用いて健常アレレルとの差を検出できる可能性があることを、文献を引用して回答した。また、*PPP2R2B*や他の候補遺伝子である*ADRB2*や*HTR4*発現の臓器特異性について質問があり、申請者は、*PPP2R2B*は脳に特異的に発現しているが、他は脳特異的ではないことを、文献を引用し回答した。さらに、

今後の研究の方向性として、脳以外の発現臓器を用いて検討を行うことの重要性についてアドバイスがあった。

次いで、主査の有賀教授より、SCA12家系における遺伝子型と表現型の違いについての質問があり、申請者は、CAGリピートの異常伸張は共通しているが、インドの家系ではパーキンソニズムが目立たず、やや異なった表現型を持つことが知られており、その原因については未解明であることを、文献を引用して回答した。また、本家系におけるPPP2R2Bのlarge deletionの可能性について質問があり、申請者は、未発表データとしてarray CGH解析結果を示し、候補遺伝子座にはlarge deletionも含めたコピー数多型を認めなかったことを回答した。さらに、今後の研究の方向性として未解析の発症者を加えた上で解析を行うようアドバイスがあった。

最後に、副査の佐々木教授より、今後の疾患遺伝子同定のための方法について質問があり、申請者は、次世代シーケンサーによる候補領域の網羅的な塩基配列の解読が有力な方法のひとつと考えられることを、文献を引用し回答した。

この論文は、あらたなSCAの存在する可能性を示唆する点で高く評価され、今後の疾患遺伝子同定が期待される。審査員一同は、これら成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。