

論文内容要旨

論文題目

PCR-based analysis using deaminated DNA of dodecamer repeat variants in the cystatin B gene, associated with progressive myoclonus epilepsy of the Unverricht-Lundborg type

(Unverricht-Lundborg 型ミオクローヌステんかんの原因となる cystatin B 遺伝子内 dodecamer repeat variants に対する脱アミノ化 DNA を用いた PCR 解析)

責任講座 :法医病態診断学分野
氏 名 :堀内 英和

【内容要旨】

(目的) Unverricht-Lundborg 病は、ミオクローヌス性てんかんと進行性の神経変性症状を主徴とする進行性ミオクローヌステんかん疾患群の一つであり、常染色体劣性遺伝を示す。主な原因は、cystatin B (CSTB) 遺伝子 5' 上流領域にある 12 塩基 (CCCCGCCCGCG) からなる variable number of tandem repeat (VNTR) の異常伸長による。高度に伸長した VNTR では局所的に GC 含量が増加するため、通常の PCR 法で増幅することは困難であり診断法は確立されていない。一方で、bisulfite 処理により非メチル化シトシンをウラシルに変換すれば、C 含量が低下し PCR 抵抗性の原因となる 2 次構造形成を解消できることが考えられた。本研究では、脱アミノ化 DNA を鋳型にした PCR 増幅により VNTR 変異の検出法の確立を試みた。

(方法) 健常成人 190 名および 2 名の患者と 1 名の父親の末梢血から DNA を抽出した。本研究は本人から書面での同意を得た上で山形大学医学部倫理委員会の承認を受け行われている。VNTR の検出は、bisulfite 処理による脱アミノ化変換配列に特異的なプライマーにて PCR 増幅後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて行った。伸長例の塩基配列は、PCR 産物を p3T ベクターにサブクローニング後解析した。さらに、nested PCR 法により 12 塩基ラダーの形成を行った。パプロタイプは、遺伝子座全体を 6 組のプライマーで PCR 増幅し直接シーケンス法にて解析した。末梢血リンパ球における CSTB 遺伝子の発現量は、GAPDH 遺伝子を対照として定量的 real-time RT-PCR にて測定した。

(結果) 脱アミノ化 DNA を用いて、日本人の一般集団における VNTR の解析を行ったところ、2 回・3 回・4 回以上の繰り返しを検出され、頻度はそれぞれ 0.70、0.28、0.02 であった。従来、2 ないし 3 回繰り返しが通常とされてきたが、新たに 4~9 回繰り返しを認めた。シーケンスおよびラダー形成により、2 症例は 41 回と 48 回伸長のホモ接合であった。これら伸長例の遺伝子内ハプロタイプは 3 回繰り返しと連鎖する CSTB*6 と判定され、伸長が 3 回繰り返しから発生していることが示唆された。また、この領域においては、CpG site の C はすべて T に変換されており DNA メチル化現象は認められなかった。患者の末梢血リンパ球における CSTB 発現量は、健常者の 14% 程度であった。

(考察) Unverricht-Lundborg 病は、北欧を中心とした白人種に多い遺伝性疾患とされる。本邦においては稀な疾患であるとされ、今回の症例は Kagitani らに次ぎ 2 報目である。従来の遺伝子診断法としてはサザンブロット法が用いられてきたが、bisulfite 処理による脱アミノ化 DNA を用いた PCR 増幅法は、異常伸長を始めとする GC-rich な VNTR 変異体の検出には極めて有用であることが分かった。VNTR の異常伸長が CSTB 発現低下をもたらす機序は不明であるが、伸長領域はメチル化を受けておらず、類似したリピート病である脆弱 X 症候群とは異なり、DNA メチル化は関与していないと考えられた。CSTB 欠損の病態はアポトーシス細胞死であるとされているが、なぜ神経系特異的な症状を呈するのかよく分かっていない。本研究により診断法が確立されたことから、本疾患の病態や疫学の解明が進むと考えている。

平成 17 年 1 月 18 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 堀内英和

論文題目：PCR-based analysis using deaminated DNA of dodecamer repeat variants in the cystatin B gene, associated with progressive myoclonus epilepsy of the Unverricht-Lundborg type
(Unverricht-Lundborg 型ミオクローヌステんかんの原因となる cystatin B 遺伝子内 dodecamer repeat variants に対する脱アミノ化 DNA を用いた PCR 解析)

審査委員：主審査委員

早 二 三 浩

副審査委員

加藤 丈夫

副審査委員

吉 田 正



審査終了日：平成 16 年 12 月 27 日

【論文審査結果要旨】

Unverricht-Lundborg 病は、進行性ミオクローヌステんかん疾患群の一つであり、常染色体劣性遺伝を示す。cystatin B (CSTB) 遺伝子の 5' 上流領域にある 12 塩基 (CCCCGCCCGCG) からなる variable number of tandem repeat (VNTR) の異常伸長が主な原因である。異常に伸長した VNTR 領域では GC 配列が増加し二次構造をとり、通常の PCR 法では増幅が困難となり簡便な診断法は確立されていない。堀内英和氏は、ゲノム DNA を bisulfite 処理により非メチル化シトシンをウラシルに変換 (脱アミノ化) し、C 含量を低下させることにより PCR による増幅を容易とし、本疾患の簡便な遺伝子診断の確立を試みた。

方法として健常成人 190 名および患者 2 名と父親 1 名の末梢血から DNA を抽出した。Herman らの方法に従いゲノム DNA を bisulfite 処理し鋳型として用いた。VNTR 領域は、脱アミノ化後の配列に特異的なプライマーを用いて PCR 増幅し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い解析した。また、伸長した塩基配列は、PCR 産物を p3T ベクターにサブクローニングし解析した。患者の反復数は nested PCR 法により 12 塩基 ladder 形成を行い確認した。ハプロタイプは、6 個の SNP を解析し決定した。末梢血リンパ球における CSTB 遺伝子の mRNA は、real-time RT-PCR 法を用いて定量した。

結果として、健常日本人の VNTR では 2 回・3 回・4 回以上の反復を検出し、頻度はそれぞれ 0.70、0.28、0.02 であることを確認した。また、正常人では、2 ないし 3 回の反復が確認されていたが、新たに 4、5、7、8 および 9 回の反復を確認した。塩基配列および ladder 形成により、2 症例は 41 回と 48 回反復伸長のホモ接合体であることを確認した。これら伸長例のハプロタイプは 3 回反復と特異的に連鎖する CSTB*6 である事を確認し、3 回反復から派生していることを推察した。また、この領域においては、CpG site の C はすべて T に変換されておりメチル化されていない事を確認した。患者の末梢血リンパ球における CSTB の mRNA は、健常者の約 14% と減少していることを確認した。

堀内英和氏は以上の研究から、bisulfite 処理による DNA を用いた PCR 法は Unverricht-Lundborg 病における VNTR の異常伸長の検出に簡便で有用な方法であること、また VNTR の伸長領域はメチル化を受けていないが、伸長により CSTB 遺伝子の発現が低下する事を確認した。堀内英和氏の研究は本疾患の簡便な診断法を確立し、本疾患の病態や疫学の解明を促進するものと考えられ、学位 (医学) の授与に値するものと判定した。

(1, 200 字以内)