

総括研究報告

課題番号：12 公 - 4

課題名：成育医療に適した包括的遺伝子医療の実現に向けた臨床的研究

主任研究者名及び所属施設：山田正夫 国立成育医療センター研究所

(研究成果の要約)近年のヒト遺伝子の研究成果を臨床の場に適用するために、技術的及び社会学的倫理的諸問題を明らかにし、成育医療分野の包括的遺伝子医療を実現させるためのシステム構築を検討する。研究班構成員はそれぞれが対象とする遺伝性疾患の遺伝子研究を一層進展させ、その成果を基に検討する。

本研究班構成員はこれまでも疾患責任遺伝子研究に大きな貢献をしてきた。すなわち、山田は、神経変性疾患の1つである歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)がトリプレットリピート伸長によることを見出し、また孤立性黄斑低形成症がPAX6のミスセンス変異によることを見出した。犬童は先天性無痛無汗症がチロシンキナーゼ型神経成長因子受容体遺伝子TRKA(NTRK1)の変異であることを見出した。責任遺伝子同定の本来の目的は遺伝子研究に基づく治療法の開発にあるので、疾患責任遺伝子の機能に関する研究を推進する必要がある。DRPLA、PAX6、TRKAで機能解析が進んでいる。新川はこれまでも数多くの貢献があるが、本研究課題期間中に、ソトス病がNSD1のハプロ不全によることを見出したことは大きな成果である。責任遺伝子と変異が明らかにされ、体系的な解析方法が考案され、分子病理学的診断法が確立されていく。しかし、変異が見出されなかったことはその遺伝子異常によらないことと同じではない。仲里は巣状分節性糸球体硬化症患者6例について、責任遺伝子として報告されたNPHS2遺伝子を解析したが、変異を見出さなかった。しかし、その産物であるポドシンについて抗体を開発して解析したところ、患者では減少していることを見出した。また、病態が同じ遺伝病であっても、別の機序による発症例があることを犬童が示している。次に、変異と病態(表現型)との関係が主要な課題となる。新川は先の例で、微小欠失例と点突然変異例での表現型の差を認めた。また、佐々木は、性染色体上の骨成長と発達に関与するSHOX遺伝子について研究してきたが、極めて稀なホモ欠失患者を見だし、病態に遺伝子の量的効果のあることを見出した。単一性遺伝病は一般に稀で、対象となる患者数が少なく、遺伝子診断が商業ベースにのりにくい。先駆的な研究グループが継続して解析依頼を受ける保障は無い。そこで、実施機関の分担体制化が必要である。森尾は、原発性免疫不全症候群について、全国およびアジア地域からの検体を引き受け、受領後24時間以内の確定診断を可能としてきた。検査結果を患者に戻す場合の遺伝相談のあり方についても解析結果は多くの示唆を示している。久間木はX-SCIDに対する遺伝子治療を進めるべく着実に準備を進めたが、外国での副作用報告で留保となった。遺伝子解析研究に関わる倫理問題について、3省合同指針が示され、一定の基準が確立したが、遺伝性疾患のような稀少疾患を扱う場合の問題点を指摘した。

1. 研究目的

近年、疾患遺伝子同定や変異解析技術が進展し、さらにヒトゲノム計画の進捗も相まって、すでに相当数の遺伝病責任遺伝子が明らかにされている。これらの基礎医学における成果を臨床の場に適用するために、技術的問題及び社会学的倫理的諸問題を明らかにし、成育医療に適した包括的遺伝子医療を実現させるためのシステム構築を検討する。このために、班構成員はそれぞれが対象とする遺伝性疾患に関する責任遺伝子研究を一層進展させ、その成果を基盤として、出生前診断・発症前診断を含む遺伝子解析を実施する場合の精度の向上・適用疾患の範囲・技術的問題・倫理的問題について検討し、また、遺伝子を直接生体に導入して治療することを目

指す遺伝子治療についての将来の方向や倫理問題について検討する。

2. 研究組織

研究者	所属施設
山田 正夫	国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部
新川 詔夫	長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設変異分子医療部門
佐々木 悟郎	東京電力病院小児科 (平成14年3月~)
仲里 仁史	熊本大学医学部小児科教室
森尾 友宏	東京医科歯科大学医学部小児科学教室
犬童 康弘	熊本大学医学部小児科教室

久間木 悟 東北大学医学部
緒方 勤 東京電力病院小児科(平成12年
4月~平成14年3月)

3. 研究成果

1) 眼および腎形成不全症における、責任遺伝子変異から発症機構の解析(山田): PAX6は発生分化時に作動する転写因子であり、眼形成に關与する。ハプロ不全により無虹彩症を生じ、ミスセンス変異はPeter奇形、黄斑低形成症など様々な病態を呈することを明らかとしてきた。同定したミスセンス変異を組み込んだPAX6発現ベクターを培養細胞に導入し、転写調節能とDNA結合能を解析し、またニワトリ胚に導入して眼の形成に及ぼす効果を解析した。本年度、選択的スプライスによるエクソン5aとホメオドメインの役割について進展し、エクソン5aを持つアイソフォームは網膜の形成を促進することを見出した。泌尿生殖器の形成に關与するWT1について、同様に、同定した変異の転写調節能などについて解析した。

2) ソトス症候群の発症機構(新川): 精神遅滞、特異な顔貌、脳内奇形、痙攣を示す過成長症候群であるソトス症候群(脳性巨人症)の原因がNSD1のハプロ不全であることを同定した(Nature Genetics, 2002)。本邦例総計95例を解析し、49例にNSD1を含む染色体微細欠失、11例に点突然変異を見出した。微細欠失例と点突然変異例の詳細な表現型解析から、特異な顔貌・過成長・精神発達遅滞は両群に共通してみられるが、心奇形・泌尿器系異常・繰り返す痙攣は欠失群にのみ認められた。過成長を伴う精神発達遅滞の患者群(約1~2万人に1例)の確定診断に非常に有用であり、また、遺伝子研究から将来の治療・予防法の開発が期待できる。

3) 性染色体異常症の表現型を招く遺伝的機序の解明とその臨床応用(佐々木): 性染色体上の骨成長と発達に關与するSHOX遺伝子について研究してきた。本年度、本邦初のSHOXのホモの欠失患者を見だし、その臨床像を明確にした。患者は1歳の男児で、父親からSHOXを含む擬常染色体領域の微小欠失を、母親からホメオボックス内のミスセンス変異を受け継いでいた。患者の病態はLanger型中肢骨短縮症であり、SHOXのヘテロ変異患者に見られるLeri-Weill型軟骨異形成の重症型に相当する。一方、ターナー症候群において高頻度に認められる短径、小顎症、高口蓋、中手骨短縮、外反肘はみられなかった。この結果は、ターナー症候群において稀あるいは存在しない中肢骨の変形が主にSHOXの遺伝子量効果に支配されること、

また、ターナー症候群において高頻度に認められる骨格徴候が主に拡張リンパ管の骨圧迫効果に影響されることを示唆する。

4) 小児期発症腎炎の病因解明と、早期診断・出生前診断・遺伝子治療の検討(仲里): 慢性腎不全にて透析導入に至る小児は、我国で1年間に約100名であり、その2割は治療抵抗性の巣状分節性糸球体硬化症である。小児期に発症する常染色体劣性遺伝様式を示す本症は、腎糸球体に存在する蛋白Podocin(NPHS2遺伝子)の異常であることが近年報告された。我国における家族性または若年性発症で末期腎不全へ進行した患者6例について、NPHS2遺伝子の塩基配列を解析したが、変異を認めなかった。しかし、昨年度作成し、正常人で腎糸球体上皮側に局在することを明らかにしたPodocinに対する特異的抗体を用いた解析で、患者では減弱あるいは消失している例が多いことを本年度見出した。作成した抗体による検査によって、病因と進展機序を解明し、また腎障害の早期診断、進展阻止および治療を可能にすると考える。

5) 原発性免疫不全症などの小児遺伝疾患の遺伝子解析と遺伝子治療に関する研究(森尾): X連鎖性高IgM症候群(XHIM)、CD40L異常以外の高IgM症候群(HIM-II)、Wiskott-Aldrich syndrome(WAS)、X連鎖血小板減少症(XLT)などの原発性免疫不全症候群患者について、遺伝子変異と症状の相関を明らかにして診断法を確立し、遺伝子変異と重症度との連関を明らかにして生直後からの適切な治療方針の決定を可能にすること、また、正常遺伝子導入により是正すること(遺伝子治療)を開発することを目的とすしている。全国およびアジア地域からの検体を引き受け、5種程度の疾患について、受領後24時間以内の確定診断を可能とした。研究成果を患者に還元するため、病院内に全学的な支援を得た「遺伝相談立ち上げ部会」を組織した。本格的な遺伝子カウンセリング体制はまもなく確立できる。

6) 先天性無痛無汗症をモデルとした遺伝子医療の対応策と将来像(犬童): 先天性無痛無汗症(CIPA)の責任遺伝子がチロシンキナーゼ型神経成長因子受容体遺伝子TRKA(NTRK1)であることを見出し、またNTRK1遺伝子のゲノム構造を決定し、すでに報告している。本年度、CIPAとピルビン酸キナーゼ(PK)欠損症による貧血を合併した症例を経験した。TRKAとPK遺伝子(PKLR)は1q21-22領域に位置するので、隣接遺伝子症候群の可能性もあったが、患者は両遺伝子にそれぞれ点変異を有するホモ接合体だった。また、父性片親性ダイソミーにより発症してい

る可能性を強く示唆する CIPA 症例を新たに見いだした。さらに、最近英国から HSAN-V 型症例で TRKA 遺伝子異常が報告されたが疑問な点も多い。我々はイタリアから依頼された HSAN-V 症例について TRKA 遺伝子異常を見出さなかった。一般に遺伝病は稀であり、その中には非常に稀な機序による発症病態があることに配慮する必要がある。本結果は、遺伝性希少難病における遺伝子医療の実施における技術的問題の具体例であり、また、遺伝相談において配慮すべき問題点を示している。

7) 変異 γ c 鎖を細胞表面に発現する X-SCID 患者に対する遺伝子治療の試み(久間木):
X-SCID は common gamma 鎖の変異によって発症する先天性の免疫不全症であり、骨髄移植が行なわれなければ感染症により総じて幼児期までに死亡する。X-SCID については外国で遺伝子治療が実施され、有効と判定され、世界で実施されている遺伝子治療の中で最も高く評価されていた。X-SCID に対する遺伝子治療法を本邦に導入すること、特に細胞表面に変異 c 鎖を発現している患者に安全に遺伝子治療を施行することを目的とした。本遺伝子治療臨床研究実施計画は平成 14 年 2 月 28 日に学内の遺伝子医療倫理委員会の承認を受け、平成 14 年 6 月 17 日に厚生労働省の認可を受けた。しかしこの間、フランスで遺伝子治療を受けた患者に副作用、白血病発生の報告があったため、保留中である。実験室レベルで、臍帯血 CD34 陽性細胞を用いた予備実験を行い、また、細胞表面に発現する変異 γ c 鎖がドミナントネガティブに作用する可能性を解析する簡易アッセイ系を確立した。

4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒトを対象とする遺伝子解析を進めている課題については、それぞれの機関の倫理委員会などに申請するなど、手続きを完了している。それらに加え、遺伝子解析を進めていく上での倫理問題や、手続き的な問題、さらには現場での問題などを議論してきた。倫理に関して国全体として、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」(平成 12 年 6 月 14 日科学技術会議生命倫理委員会) ミレニアムプロジェクトを対象に取りまとめられた「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」(平成 12 年 4 月 28 日厚生科学審議会先端医療技術評価部会)を経て、文部科学省、厚生労働省及び経済産業省の合同として、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」が平成 13 年 3 月 29 日に告示された。これらの制定過程には本研究班員も意見を表明してきている。3 省合同指針は、本研究班

が関係する遺伝性希少難病に適用する場合、いくつかの困難な点があることが指摘された。また、3 省合同指針では、各研究機関の倫理(審査)委員会に各種の判断がゆだねられた結果、全国各研究機関での判断が大きく異なる状況となっていることは大きな問題点となっている。全く同一の申請が、ある機関では即日承認され、別の機関では長時間の審議を要してもなお承認に至らない現状となっている。

5. 研究結果

新規に、ソトス病の責任遺伝子を同定した。班員がこれまで責任遺伝子として同定してきた DRPLA、PAX6、TRKA で機能解析が進み、将来の治療法開発の手がかりに迫った。各班員の責任遺伝子変異同定研究から、変異同定に伴う技術的あるいは社会的な諸問題が明らかとなった。稀少疾患を対象とする遺伝子診断体制について問題点を明確にし、部分的に実施体制を構築した。

6. 考察

責任遺伝子が同定されると的確な診断が可能になる。しかし、責任遺伝子同定の本来の目的は遺伝子研究に基づく治療法の開発にあるので、疾患責任遺伝子の機能に関する研究を推進する必要がある。

わが国における、稀少疾患を対象とする遺伝子診断体制を構築する必要がある。

遺伝性疾患の変異同定に伴う技術的あるいは社会的な諸問題を明らかとした。これらについての対応が求められる。

7. 結論

新規に疾患責任遺伝子を同定し、既知の責任遺伝子の機能について解析を進めた。変異同定に伴う技術的あるいは社会的な諸問題を明らかにし、それに対応する方針を明らかにした。

眼および腎形成不全症における、責任遺伝子変異から発症機構の解析

山田 正夫

国立成育医療センター研究所 成育遺伝研究部

(要約) 試験管内反応による転写調節機能と、ニワトリ胚を使用した形態形成における効果評価法を結びつけるべく、PAX6 の機能解析を進めた。

1. 目的

器官・組織の形成不全症(形成異常症、奇形)の多くに、遺伝要因の関与が推定されているが、生化学的要因は不明であり、遺伝子から病理病態の解明を図る遺伝子発見戦略が有効である。これらの疾患について根本的な治療法はほとんど無く、責任遺伝子が同定されて的確な診断が可能となっても、研究成果を患者に直接還元できない。責任遺伝子から発症に至る機構の解明を図り、将来の治療法開発につなげたい。また、責任遺伝子研究の実績に基づき、遺伝子診断にかかわる倫理的な諸問題や技術的な問題に関して関係者等と討議し、取り組む。

2. 方法

各種の眼形成異常症・腎形成異常症などの患者ゲノム DNA について、PCR-SSCP 法等によって変異を検索し、変異を塩基配列レベルで決定した。またクローン化した DNA を大腸菌や培養細胞で発現させ、試験管内で転写調節能を測定し、プロモーターや支配下遺伝子について解析した。また発現ベクターをニワトリ胚に導入し、形態形成に及ぼす効果を解析した。

3. 結果

当初、無虹彩症の責任遺伝子として同定された PAX6 は転写因子をコードし、眼形成に関与することが知られている。これまで我々は、無虹彩症に限らず広範な眼形成不全症患者を検索し、多数の変異を同定した。PAX6 のナンセンス変異などによって一方の対立遺伝子が不活性化すると無虹彩症となり(ハプロ不全 haplo-insufficiency)。一方、ミスセンス変異は白内障、Peter 奇形、黄斑低形成症など様々な病態を呈することを明らかとしてきた。眼形成不全症における PAX6 変異解析を継続し、様々な程度の視神経形成不全症(合計 7 例)でミスセンス変異を見出した。同定した変異は、ホメオドメイン近傍や C 末端の転写活性ドメインに位置し、全 PAX 群を通じてこれまで変異が同定されていない領域にあった。これまでに患者で同定された変異を組み込んだ PAX6 発現ベクター(合計 12 種類にエクソン 5a の有無で合計 24 種類)

を構築し、試験管内反応によって転写調節能を解析し、またニワトリ胚に導入して形態形成に及ぼす効果を解析した。PAX6 蛋白の C 末端領域の転写活性領域はホメオボックスを介する DNA 結合能に大きく影響することを見出した。また、PAX6 のコンセンサス DNA 配列(3 種類)への結合は、DNA 結合ドメイン相互の作用を介するなど複雑であると推定した。PAX6 のエクソン 5a を含むアイソフォームの機能を解析し、網膜の形成に強く係わることを見出した。

これらの結果から、発生分化の時期に作動する転写調節因子は変異によって様々な病態を呈することがわかった。また、PAX2, PAX6, WT1, p53 の転写調節因子間の相互ネットワークがあることを見出した。転写調節能の変化を形態形成における作用に結びつけるために、ニワトリ胚に発現ベクターを導入して形態を観察する実験系の開発を進めた。

いわゆるミレニアム指針、また 3 省合同倫理指針など、関係省庁からヒト遺伝子解析に関する倫理指針が制定された。指針制定の作業部員と討議したり、その他の手段により、従来から考えていた個人的意見がいくつか指針に反映される結果となった。すでに 3 省合同倫理指針のパブリックオピニオン募集時にも意見を提出したが、現在の指針は、本研究班が対象とするような遺伝病(稀少疾患)における検体の移動に必ずしも適しておらず、実態に応じた指針の改定が望まれる。

4. 結論

我々の PAX6 および WT1 変異の解析によって、発生分化時に作動する転写調節因子では、変異により様々な病態を示す形成不全症を示すことが明らかとなり、関連疾患アプローチの有効性が示された。転写調節機構の解明から、病態と病理を一層明らかとし、将来の予防・治療法の開発に結びつけたい。

5. 参考文献

1) Azuma N, et al.: Mutations of the PAX6 gene detected in patients with a variety of optic nerve malformations. Am J Hum Genet (in press).

ソトス症候群の発症機構と包括遺伝子医療への応用に関する研究

新川 詔夫
長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設
分子医療部門

(要約)ソトス症候群の責任遺伝子 NSD-1 を単離し、ソトス病が NSD-1 のハプロ不全によることをあきらかにした。

1. 目的

ソトス症候群(SS)は、精神遅滞、脳内・頭部顔面奇形、時に痙攣をみる過成長症候群である。我々は先に NSD1 遺伝子のハプロ不全が SS の原因であることを明らかにしたが、平成 14 年度は、NSD1 変異を生じる機構を明らかにすることを目的とした。

2. 方法と結果

1)塩基配列決定による点変異、及び FISH による 1.8-Mb 欠失の同定戦略で、本邦患者総計 95 例を解析し、49 例 (51.6%) に NSD1 を含む染色体微細欠失、および 11 例 (11.6%) に点突然変異を見出した。同様に、白人患者 17 例における解析では、4 例 (24%) に点変異を同定し、欠失は 1 例 (6%) であった。

2) NSD1-SNP を利用して、欠失をもつ患者の 26 家系を解析し、18 例の患者における欠失は、父の精子形成期、2 例が母の卵子形成期で生じた異常であった。

3) 欠失は、欠失範囲の両端に存在する低頻度反復配列(LCR)が介在している可能性を見いだした。

4) 欠失 21 例と点変異 5 例の表現型解析から、心奇形・泌尿器系異常・痙攣は欠失群にのみ認められた。

5) 5 例の親子例中、2 家系では親子共に点突然変異を認めた。

3. 結論

1) 日本人患者の半数は、父の精子形成期に生じた 1.8-Mb 欠失が原因であるが、白人では点変異が主たる原因であった。この差の原因は現在明らかでない。

2) 欠失は NSD1 領域に存在する LCR が介在した可能性が高い(ゲノム病)。

3) 家族例では点変異が原因であった。

4) 以上の結果は遺伝カウンセリングを含む包括遺伝子医療に役立つ知見である。

4. 研究協力者

松本直通、黒滝直弘、原田直樹 (長崎大学)
他多数。

5. 参考文献

1) Kurotaki N, et al.: Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene* 279: 197-204, 2001.

2) Kurotaki N, et al.: Mutations in the NSD1 gene cause Sotos syndrome. *Nat Genet* 30: 365-366, 2002.

3) Nagai T, et al.: Sotos syndrome and haploinsufficiency of NSD1: Phenotypic comparison between intragenic mutations and submicroscopic deletions. *J Med Genet* 40: 285-289, 2003

4) Hoglund P, et al.: Familial Sotos syndrome is caused by a novel one base pair deletion of the NSD1 gene. *J Med Genet* 40: 51-54, 2003.

5) Miyake N, et al.: Preferential paternal origin of microdeletion as prezygotic chromosome and/or chromatid rearrangements in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* (in press)

性染色体異常症の表現型を招く遺伝的機序の解明とその臨床応用

佐々木 悟郎
東京電力病院小児科

(要約) 性染色体の数的異常に基づくターナー症候群について、その病態を分子的に説明することを旨とした。X染色体の擬常染色体領域に位置するSHOX遺伝子の半量不全により低身長等のターナー骨格徴候を生じること、四肢遠位部のターナー骨格徴候が性腺エストロゲンの骨成熟作用により増悪すること、頭頸部のターナー骨格徴候がリンパ管形成遺伝子の欠失に起因する拡張リンパ管の骨圧迫作用により増悪することを報告した。本年度は、本邦初のSHOXのホモの欠失患者を見だし、その臨床像を明確にした。その成績は、上記の概念を支持する結果であった。

1. 目的

我々は、性染色体の短腕擬常染色体領域に存在するSHOX遺伝子の半量不全が、低身長のみならずターナー骨格徴候を招くこと、さらに、四肢遠位部のターナー骨格徴候が性腺エストロゲンの骨成熟作用により増悪し、頭頸部のターナー骨格徴候がリンパ管形成遺伝子の欠失に起因する拡張リンパ管の骨圧迫作用により増悪することを報告した。本年度は、本邦初のSHOXのホモの欠失患者を見だし、その臨床像を明確にした。その成績は、上記の概念を支持するものである。

2. 対象と方法

症例は、互いに血縁関係にない両親から生まれた1歳の男児である。現在1歳7カ月で、身長68.7cm(-4.2SD)、体重10.6kg(-0.2SD)、頭囲48.4cm(+0.4SD)である。臨床的に、重度の中肢骨短縮、手首の変形、境界程度の小顎症を呈したが、外反肘・中手骨短縮は認められなかった。中耳炎の既往もなかった。レントゲン上、重度の中肢骨短縮、橈骨短縮と湾曲、腓骨遠位部の欠損が見いだされた。以上の所見から、患児はLanger型中肢骨短縮症を有すると診断された。家族解析において、父親と姉は低身長を、母親と祖母は低身長とLeri-Weill型軟骨骨異形成症を呈した。これら5例において、染色体分染法解析、SHOXを含むFISH解析、SHOX遺伝子変異解析を行った。

3. 結果

染色体は全例において正常であった。FISH解析では、患児のY染色体と父親のX染色体においてSHOXを含む擬常染色体領域の微小欠失が見いだされた。変異解析では、患児・姉・母・祖母において、ホメオボックス内のミスセンス変異(C502T, R168W)が検出された。したがって、患児はSHOX欠失と変異を有するホモの異

常症を、残る4例はSHOX欠失あるいは変異を有するヘテロの異常症を有していた。

4. 結論

本成績は、SHOXのホモの異常症がLanger型中肢骨短縮症を招くことを示す。この正常核型とSHOX完全欠失の患児において、中肢骨所見は極めて重度であったが、ターナー症候群において高頻度に認められる短径、小顎症、高口蓋、中手骨短縮、外反肘はみられなかった。この成績は、ターナー症候群において稀あるいは存在しない中肢骨の変形が主にSHOXの遺伝子量効果に支配されること、また、ターナー症候群において高頻度に認められる骨格徴候が拡張リンパ管の骨圧迫効果に影響されることに合致した。

5. 参考文献

- 1) Ogata T, et al.: SHOX nullizygosity and haploinsufficiency in a Japanese family: implication for the development of Turner skeletal features. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 1390-1394, 2002.
- 2) Sasaki G, et al.: Novel mutation of TBX3 in a Japanese family with ulnar-mammary syndrome: Implication for impaired sex development. *Am J Med Genet* 110: 365-369, 2002.
- 3) Sasaki G, et al.: Giant seminoma in a patient with 5alpha reductase-2 deficiency. *J Urol* 169: 1080-1081, 2003.
- 4) Ishii T, et al.: Micropenis and the AR Ggene: mutation and CAG repeat-length analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 586: 5372-5378, 2001.

小児期発症腎炎の病因解明と早期診断、出生前診断、遺伝子治療に関する研究

仲里 仁史
熊本大学医学部 小児科

(要約) わが国の巣状分節性糸球体硬化症 6 例の患者で、報告された NPHS2 遺伝子の遺伝子変異は見出さなかったが、その遺伝子産物である Podocin の発現は患者の腎臓で低下していることを認めた。

1. 目的

我国で腹膜または血液透析導入に至る小児は年間約 100 名であるが、うち 2 割はステロイド等の免疫抑制剤抵抗性の巣状分節性糸球体硬化症(FGS)である。FGS には家族性のものがあり、遺伝的異質性が認められる。常染色体優性遺伝の本症には少なくとも 2 つの責任遺伝子が存在することが連鎖解析にて証明され、うち 1 つは腎糸球体上皮細胞に存在する α -actinin-4(ACTN4 遺伝子)の異常であることが報告されている。また常染色体劣性遺伝の本症は、腎糸球体に存在する蛋白 Podocin(NPHS2 遺伝子)の異常であることが報告されている。優性遺伝形式の本症は一般的に成人期に、劣性遺伝形式の本症は小児期に発症する。まず、小児期発症の責任遺伝子と考えられる NPHS2 遺伝子について遺伝子解析を行い、さらに Podocin 蛋白の存在様式や生理機能について検討する。

2. 方法

家族性 FGS と若年発症で末期腎不全へ進行した FGS 患者について、NPHS2 遺伝子の異常の有無を検索する。変異を認めた家系においては、家族解析を行う。なお、遺伝子解析については、患者や家族の承諾を得る。次に、Podocin のアミノ酸配列から既存の蛋白と相同性の少ない部分を選択し、2 個の合成ペプチドを作成する。その合成ペプチドを用いウサギを免疫し、抗体を作成する。正常人腎組織での Podocin の存在様式を蛍光抗体法、酵素抗体法にて検討する。さらに本症患者の腎組織にて Podocin の存在様式を検討する。

3. 結果

1) 6 家系の FGS 患者において NPHS2 遺伝子の解析を行ったが、coding 領域に変異は認められなかった。これらの患者では、NPHS2 遺伝子の調節領域の異常または家族性 FGS をおこす他の遺伝子異常が考えられる。

2) Podocin に対するポリクロナール抗体が得られた。これを用い、正常人腎組織での Podocin の存在様式をみると、Podocin は糸球体に限局し

て染色された。synaptopodin や IV 型コラーゲン α 5 鎖との二重染色にて、Podocin の発現は上皮側に局在すると考えられた。

3) FGS 患者 19 例について免疫染色で検討した。約 7 割の患者に Podocin の染色性の低下または消失がみられた。消失している 7 例のうち 2 例は腎不全へ進行しており、Podocin の染色性消失は予後不良の可能性が考えられた。

4. 研究協力者

服部 新三郎 熊本大学医療技術短期大学部
遠藤 文夫 熊本大学医学部小児科
堀之内 泉 熊本大学医学部小児科

5. 参考文献

1) Boute N, et al.: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. Nature Genet 24: 349-354, 2000.

森尾 友宏

東京医科歯科大学医学部 附属病院総合診療部

(要約) 原発性免疫不全症の責任遺伝子は次々に明らかになってきているが、遺伝子の機能から表現型を説明するには至らず、さらに遺伝子解析を利用してどのように治療方針を決定するかという点についての検討も不十分である。今回 50 名の患者解析によって、WAS/XLT において、WASP タンパクの発現が、疾患の重症度、予後に深く関わっていることを明らかにした。また WAS/XLT においては保因者診断、迅速診断方法を確立した。全学的な遺伝外来の正式な発足を待ち、さらに遺伝子診断、保因者診断、遺伝治療の倫理的側面を研究できる体制が整った。高 IgM 症候群では AID 異常症の責任遺伝子解析とそのタンパク機能解析により、日本人で特徴的な異常を検出し、また新たな責任遺伝子も明らかにしつつある。

1. 目的

原発性免疫不全症の責任遺伝子は次々に明らかになってきているが、遺伝子の機能から表現型を説明するには至っておらず、さらに遺伝子解析を利用してどのように治療方針を決定するかという点についても見当が不十分である。

2. 方法

遺伝子治療の対象となる可能性のある疾患につき、遺伝子異常と表現型・重症度との関係を検討した。また血縁者の保因者診断手法を確立し、さらにそれに伴う倫理的・社会的問題点につき遺伝相談などを通じて探ることを目的として研究を行った。

3. 結果

50 例以上の Wiskott-Aldrich 症候群(WAS)及び X 連鎖血小板減少症(XLT)患者について遺伝子解析及びタンパク発現の検討を行った。その結果、症状の軽いもの(XLT)ではミスセンス変異が多く、タンパクの発現も認められることが判明した。また X 連鎖高 IgM 症候群(HIM-1)の解析に加え、非 X 連鎖 HIM(HIM-2)の遺伝子解析を行った。HIM2 では RNA editing に関与する Activation induced deaminase (AID)に異常があるが、私たちの検討では 16 例のうち 9 例で AID の異常を検出した。R112 に変異を持つ患者が多く(6/9)、日本の HIM-2 における AID 異常のホットスポットと考えた。患者における遺伝子異常が Ig クラススイッチ(CS)異常に関わっていること証明するため、AID^{-/-} マウスの脾臓 B 細胞に retrovirus vector にて患者の変異 AID 遺伝子を導入し、LPS/IL-4 刺激後の CS を検討した。HIM-2 では Ig 可変領域での somatic hypermutation が極めて乏しかった。患者では HIM-1 に比べて免疫不全症状は軽い、リンパ節腫大で腸閉塞をきたすことがある。B 細胞特異的に発現する分子

であり、将来的に遺伝子治療の対象となる可能性がある。

WAS 患者の保因者診断においては、genomic DNA の直接塩基配列決定が今のところ最も信頼のおける方法であり、24 時間以内に結果を出せるシステムを確立した。WAS タンパクの FACS 解析の併用により、確実かつ迅速な検査ができるものと考えている。

これらの結果が確実な遺伝子診断、遺伝子治療実現に向けての基礎的データとなるように研究を進めている。実際に医療の枠組みの中で実現していくためには、倫理的・社会的な問題を明らかにし、問題点を解決していく必要があるため、遺伝相談・カウンセリングなどを整備し、小児科を中心にまず遺伝外来を立ち上げた。約 1 年間の準備期間を経て 2003 年 4 月からは全学的規模で遺伝外来が開設される予定である。遺伝子治療は患者、親権者が興味をもち、期待を抱いている治療であり、どの患者に対して現行の治療を用い、どの患者を遺伝子治療の対象とするか、明確に示せる基準の確立も必要と考える。

4. 研究協力者

野々山恵章 防衛医科大学医学部小児科

5. 参考文献

- 1) Jo EK, et al.: Characterization of mutations, including a novel regulatory defect in the first intron, in Bruton's tyrosine kinase gene from seven Korean X-linked agammaglobulinemia families. *J Immunol* 167: 4038-4045, 2001.
- 2) Shim JH, et al.: Immunosuppressive effects of tautomycin in vivo and in vitro via T cell-specific apoptosis induction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 10617-10622, 2002.
- 3) Imai K, et al.: The pleckstrin homology domain of the Wiskott-Aldrich syndrome protein is involved in the organization of actin cytoskeleton. *Clin. Immunol.* 92: 128-137, 1999.

先天性無痛無汗症をモデルとした遺伝子医療の対応策と将来像

犬童 康弘

熊本大学医学部 小児科教室

(要約)先天性無痛無汗症の責任遺伝子が TRKA であることを以前に報告している。患者で同定された変異を持つ TRKA 産物の機能解析を進めた。また、先天性無痛無汗症の非典型例、また先天性無痛無汗症に類似する遺伝性感覚自律神経性ニューロパチーIV型について遺伝子変異解析を進めた。これまでの解析によって、遺伝性疾患の合併、非メンデル遺伝による発症メカニズム、遺伝的異質性など、遺伝性疾患の遺伝子解析における問題点を明らかにした。

1. 目的

先天性無痛無汗症(CIPA)は遺伝性感覚自律神経性ニューロパチーIV型(HSAN-IV)に分類され、温・痛覚欠如、発汗障害、精神遅滞を特徴とする常染色体劣性遺伝の疾患である。我々はCIPAの責任遺伝子が1番染色体に位置するチロシンキナーゼ型神経成長因子受容体遺伝子TRKA(NTRK1)であることを報告した。今回、CIPAとピルビン酸キナーゼ(PK)欠損症による貧血を合併した症例や、遺伝子解析によりメンデル遺伝に一致しない症例を経験した。また、最近英国からHSAN-V型の症例においてもTRKAの遺伝子異常が報告されたが疑問な点も多い。これらの症例における問題点、すなわち遺伝性疾患の合併、非メンデル遺伝による発症メカニズム、遺伝的異質性などを明らかにすることは、CIPAだけでなく他の遺伝性稀少難病全般について遺伝子医療を行う場合にもモデルとなる可能性がある。

2. 方法

CIPAとPK欠損症の合併例は米国から、メンデル遺伝に一致しない症例はクウェートから解析を依頼された。HSAN-Vはイタリアの症例である。TRKA遺伝子の変異および多型解析は、以前に我々が報告した方法で行った。

3. 結果

TRKAとPK遺伝子(PKLR)はいずれも1q21-22領域に位置するので、CIPAとPK欠損症の合併例については、当初は隣接遺伝子症候群の可能性を考えた。しかし実際は、両遺伝子にそれぞれ点変異を有するホモ接合体であり、遺伝子座が近傍に位置する稀な常染色体劣性遺伝性疾患を合併していることが判明した。また、メンデル遺伝に一致しない症例については、父性片親性ダイソミーにより発症している可能性を強く示唆する結果を得た。さらに、HSAN-V症例では、TRKA遺伝子変異は検出されず、責任遺伝

子はではないとする結果を得た。HSAN-VとCIPAではいずれも温・痛覚が欠如するが、両者は遺伝的には異なる疾患であると考えられる。

4. 結論

遺伝子医療を行う際は、非常にまれな機序による発症病態にも配慮する必要がある。この研究で得られた結果は、遺伝性稀少難病全般に関わる遺伝子医療における技術的な問題点の具体例となるだけでなく、将来的には診断結果を患者家族に伝える際や遺伝相談において配慮すべき問題点を示している。

5. 参考文献

- 1) Indo Y, et al.: Mutations in the TRKA/NGF receptor gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Nature Genet* 13: 485-488, 1996.
- 2) Mardy S, et al: Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: novel mutations in the TRKA (NTRK1) gene encoding a high-affinity receptor for nerve growth factor. *Am J Hum Genet* 64: 1570-1579, 1999.
- 3) Mardy S, et al: Congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA): effect of TRKA (NTRK1) missense mutations on autophosphorylation of the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. *Hum Mol Genet* 10: 179-188, 2001.
- 4) Indo Y: Genetics of congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA) or hereditary sensory and autonomic neuropathy type IV. *Clinical, biological and molecular aspects of mutations in TRKA (NTRK1) gene encoding the receptor tyrosine kinase for nerve growth factor. Clin Auton Res* 12 (Supple 1), I/20-I/32, 2002.
- 5) Toscano E, et al: No mutation in the TRKA (NTRK1) gene encoding a receptor tyrosine kinase for nerve growth factor in a patient with hereditary sensory and autonomic neuropathy type V. *Ann Neurol* 52: 224-227, 2002.

変異 γ_c 鎖を細胞表面に発現する X-SCID 患者に対する遺伝子治療の試み

久間木 悟
東北大学 加齢医学研究所

(要約) γ_c 鎖の変異に基づく、X 染色体性複合免疫不全症に対する遺伝子治療を実施すべく準備した。先行していたフランスにおける実施例に重篤な副作用の発生が報告され、実施を留保することになった。代替法について検討した。

1. 目的

X-SCIDは γ_c 鎖の変異によって発症する先天性の免疫不全症であり、重症感染症により幼児期までに死亡する致死的疾患である。最近X-SCIDに対する造血幹細胞を用いた遺伝子治療が開始された¹⁾。本邦ではこのような遺伝子治療は未だ行われていない。遺伝子治療を施行する場合、特に変異 γ_c 鎖が細胞表面に発現している患者では、新たに遺伝子導入された正常な γ_c 鎖が同じ細胞上でリガンドとの結合を競合しあう可能性が考えられる。このため、これらの患者に対する遺伝子治療の安全性の評価は重要な課題である。

2. 方法

X-SCID 患者の同定を行い、変異 γ_c 鎖機能解析を行う。さらに細胞表面に発現する変異 γ_c 鎖が遺伝子治療に際してドミナントネガティブに作用しないかどうかを検討できる簡易アッセイ系を確立する。また、X-SCID に対する遺伝子治療臨床計画資料を作成し、学内の遺伝子医療倫理委員会の承認を受け、厚生労働省に申請する。

3. 結果

これまでに本邦X-SCID患者32例と外国症例5例の計37例について γ_c 鎖の変異を同定した²⁾。この中で、変異 γ_c 鎖を細胞表面に発現している症例は6例あり、部分的に機能が保持された変異 γ_c 鎖も存在した。これらの解析を通してIL-21がX-SCID発症に関わっている可能性を示した³⁾。また、遺伝子治療実施に向けて臍帯血CD34陽性細胞を用いた遺伝子治療の予備実験を行い、細胞表面に変異 γ_c 鎖を発現するX-SCID患者に遺伝子治療を施行した場合の簡易アッセイ系を確立した。

一方、我々は X-SCID に対する遺伝子治療臨床研究を計画し、平成14年2月28日に学内の遺伝子医療倫理委員会の承認を、さらに平成14年6月17日には厚生労働省の認可を受けている。しかし、フランスで同様の遺伝子治療を受けた患者に白血病発生の報告があったため、本遺伝

子治療臨床研究は現在保留中である。

本症に対して、骨髄移植法の有効性は確立している。しかしHLA 適合ドナーを見出すことは大変に困難である。そこで、HLA 半適合のドナーから骨髄移植する可能性を検討している。

4. 結論

本邦で発症した大多数の X-SCID 患者の診断を行い、遺伝子治療の安全性を評価し、倫理問題を多方面から検討した。本研究は先端医療である造血幹細胞を用いた遺伝子治療を安全に施行するための研究であり、厚生行政に貢献する研究である。

5. 参考文献

- 1) Hacein-Bey-Abina S, et al.: Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Eng J Med* 346: 1185-1193, 2002..
- 2) Kumaki S, et al.: Characterization of the γ_c chain among 27 unrelated Japanese patients with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID). *Hum Genet* 107: 406-408, 2000.
- 3) Asao H, et al.: The common γ_c -chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 167: 1-5, 2001.

RESEARCHES FOR PUTTING MOLECULAR TECHNIQUES INTO
MEDICAL PRACTICE IN THE "SEIIKU" FIELD

Masao Yamada, Ph. D.
Principal Investigator

National Children's Medical Research Center
Tokyo, JAPAN

Molecular biology has a great impact on current medicine. In the past decade, a lot of human genes have been identified as a causative agent for disorders, and techniques for expression of cloned genes in target cells have been extensively progressed. With respect to "Seiiku medicine," a medical field for child health and human development, once a gene responsible for genetic disorders has been identified, mutation analyses of patient's genome could correctly diagnose patients. Moreover, diagnosis in a preclinical stage, even in a prenatal stage as well as a carrier state could be also conducted. Information thus obtained can be used for better medical treatments in several diseases for which an intrinsic treatment has been established, and for adjustment of ones living environment. However, there are still many disorders for which only symptomatic treatments are currently available. Thus, the progress in molecular medicine brings up social issues like application of preclinical diagnoses in relation of the right not to know, and discrimination on the basis of genetic background. Thus, ethical and social issues should be considered before molecular medicine widely brings in medical practice.

The members of this research program survey and trace these social issues as well as technical issues associated with molecular medicine through one's own researches, and would make clear the points through discussion with other members and the third party concerned.

This group consists of seven researchers who are actively working in molecular medical field. M. Yamada has identified triplet repeat expansion associated with dentatorubral-pallidoluyasian atrophy, a neurodegenerative disorder, and is currently studying on mutations and functions of PAX6 and WT1 involved in the morphogenesis of the eye and urogenital organs. N. Niikawa (Nagasaki University School of Medicine) identified TGF- β 1 responsible for the Camurati-Engelmann disease, and recently NSD1 for Sotos syndrome. T. Ogata and G. Sasaki (Keio University School of Medicine & Tokyo Denryoku Hospital) are approaching mainly with cytogenetic methods to genes involving in sexual determination and differentiation, and is currently focusing on the SHOX gene. H. Nakazato (Kumamoto University School of Medicine) is interested in patients with nephrotic syndrome, and tries to find the involvement of podocin in the disease. T. Morio (Tokyo Medical and Dental University School) is conducting on molecular diagnosis for several types of congenital immunodeficiency patients, including Wiskott-Aldrich syndrome and high IgM syndromes. Y. Indo (Kumamoto University School of Medicine) has identified the TRKA gene for congenital insensitivity to pain with anhidrosis of swanson, and is currently studying on the molecular mechanism for development of disease phenotype with identified missense mutations. S. Kumaki has been surveying patients with immunodeficiency, and is preparing gene therapy for patients with the defect of γ c-chain.

Key Words:

genetic disorders, prenatal diagnosis, gene therapy, ethical issues, molecular medicine