

成育遺伝研究部（疾患遺伝子構造研究室、遺伝子診断治療研究室）

(1) 研究の概要

受精・発生分化・胎児・出産・成長・生殖というヒトのライフサイクル（生活環）にそった総合的な医療が成育医療であるが、遺伝はこのライフサイクルを回す基本的な仕組みである。この 20 年来、遺伝情報を担う物質である DNA の解析技術が急速に進展し、医学・生物学の分野に大きなインパクトを与えてきた。ヒトゲノムは 30 億の塩基から構成され、最近ほとんど解読されたが、約 3 万種類あるといわれる遺伝子の機能は未だ多くが不明で、遺伝子機能不全による疾病の発症機構の解明が重要な課題である。

成育遺伝研究部は、主として DNA 組換えなど分子生物学的手法を用いて、ヒト遺伝子の構造と機能について研究している。特に、遺伝子の異常によって発症する遺伝病や小児腫瘍の責任遺伝子を探求し、患者に生じた DNA 変異を解析し、疾患責任遺伝子の発現調節と機能について解析している。これらの結果は直ちに診断に役立ち、また、生化学的要因が明らかでない多くの遺伝病に対して、責任遺伝子研究から疾患の病理と病態の解明を図る「遺伝子発見戦略」にも貢献するものである。さらに、遺伝子情報と遺伝子工学の技術に基いた治療法の開発を目指している。

成育遺伝研究部は**疾患遺伝子構造研究室**と**遺伝子診断治療研究室**の 2 研究室からなる。平成 14 年 3 月に国立成育医療センターへと発展的に改組され、国立小児病院小児医療研究センター先天異常研究部は国立成育医療センター研究所成育遺伝研究部となった。山田正夫部長、宮下俊之室長、田所恵子研究員が成育遺伝研究部の初代構成員である。新体制で職員定員は 3 名となったが、流動研究員 1 名、さらには外部からの医師・研究者・学生を受入れ、あるいは研究費による研究補助員の参加を得て研究を進めている。本年度の主要なメンバー：鹿間芳明（流動研究員）、於保祐子、長尾和右（開放的融合研究員）、禹麻美（HS 財団研究支援員）、豊田雅士（ポスドク）、宮原篤（東京医科大学小児科）、山崎麻由（日本大学生物資源科学部応用生物科学科）。その他、病院部門から、東範行医長を初めとする眼科のスタッフ、病理の宮内潤医長、遺伝診療科の奥山虎之医長、小須賀基通医員、産科の佐合治彦医長が当研究部で実験に従事し、また、国立埼玉病院・小島洋子医長、千葉大学小児科・藤井克則、慶應義塾大学・福原康之、金治有彦、およびかつて当研究室で DNA 解析を学んだ何人かが随時参加した。浅香敦子・大塚裕子・開山麻美・西村千寿子が実験補助として、齋藤佳代子が事務補助として研究を支えた。

(2) 研究活動

遺伝性疾患の遺伝子解析とその機能

近年の分子生物学の進展によってヒトのような巨大なゲノムでも遺伝子解析できるようになり、遺伝病や腫瘍（あわせて遺伝子病）の責任遺伝子が同定できるようになった。責任遺伝子が同定されると的確な診断が可能になるが、対象疾患の多くには根本的治療法が無い。したがって、責任遺伝子の機能について解析を進め、遺伝子から病理と病態の解明を進め、将来の治療法開発を目指すことが必要である。

(a) トリプレットリピート伸長病、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）の責任遺伝子

神経変性疾患の 1 つである DRPLA は、小脳失調と、錐体外路系異常による不随意運動の両者が共に認められることに特徴があり、病理学的には小脳歯状核・その遠心路にあたる赤核・大脳基底核である淡蒼球とルイ体に萎縮性病変が認められる。常染色体優性の遺伝様式を示し、日本人に 500 人程度の患者が存在すると推定されているが、欧米人では稀である。当研究部は DRPLA 家系の連鎖解析を進め、可能性の高い領域で候補遺伝子アプローチをとることによって、染色体 12 番短腕に位置する CAG リピートの伸長が発症原因であることを見いだした（1994）。トリプレットリピート伸長は最近の疾患遺伝子研究の中で見いだされた全く新しいタイプの変異であり、表現促進現象が

よく説明できる点で、また重要な疾患群に関係している点からも大きな注目を集めている。当研究部は、DRPLA の cDNA およびゲノムを単離して構造決定し、DRPLA 蛋白質を同定し、伸長リピートの由来と創始者染色体を明らかにするなど、DRPLA 遺伝子研究をリードしてきた。CAG リピート伸長による「ポリグルタミン病」については、疾患ごとに特定の脳組織（あるいは特定の神経細胞群）で神経細胞死が見られるが、神経細胞死の分子機構と、その組織特異性を決定する分子機構、さらには伸長したリピートの不安定性の分子機構が重要な課題である。DRPLA の正常機能とあわせ解析を進めている。

(b) 眼形成不全症と PAX6

PAX 遺伝子群はペアドドメインを DNA 結合部位とする転写因子をコードし、種を超えて保存され、また発生分化に関与する。その内、ヒト PAX6 は無虹彩症 (OMIM106200) の責任遺伝子として 1991 年に単離され、またショウジョウバエやマウスでもそのホモログが眼の形成に関与することが知られている。我々は 1994 年頃から、無虹彩症に限定せず、広範な眼形成異常症について PAX6 変異を解析してきた。孤立性黄斑低形成症 (OMIM136520) 患者家系で、ペアドドメインの C 末側半分にミスセンス変異を見出した(1996)。これは全生物種の PAX 群を通じてペアドドメインの C 末側半分に見出された最初の変異であり、ペアドドメインの C 末側半分は不要とされていた定説を覆すものであった。そのとき、ペアドドメイン N 末側半分を介する DNA 結合によって眼の外側（虹彩など）の形成に関与する遺伝子を、一方、C 末側半分は眼の内側（網膜）の形成に関与する遺伝子を支配するという仮説を提唱した。その後も各種の眼形成不全症で変異（特にミスセンス変異）を見出してきた。世界中でこれまでに約 200 例の PAX6 変異が報告されているが、そのほとんどは欠失・スプライス異常・ナンセンス変異などによって不完全長蛋白質が形成される変異であり、無虹彩症患者で見出されている。同疾患が優性遺伝様式を示すことからハプロ不全によって無虹彩症になり、一方、ミスセンス変異は黄斑低形成症、白内障、Peter 奇形など、さまざまな病態を呈するという基本概念を確立してきた。その後も各種の眼形成不全症の患者で PAX6 変異を解析し、視神経形成不全症 7 例で PAX6 のミスセンス変異を同定した。

PAX6 遺伝子産物は転写調節因子であるが、ペアドドメインの N 末側、C 末側およびホメオドメインの計 3 個の DNA 結合部位を持ち、また選択的スプライスによってエクソン 5a を含む、または含まない 2 種類のアイソフォームが存在するなど複雑である。上記のミスセンスを含む合計 11 種類の PAX6 ミスセンス変異について転写調節能を解析した。また正常型および変異型 PAX6 による PAX2 の発現調節を培養細胞系で解析した。転写調節能は試験管内反応によって解析できるが、その結果を形成能に結びつけるのは困難である。そこで、発現ベクターをニワトリ胚に電気穿孔法で導入して発現させ、その形態形成に及ぼす効果を解析する系を開発した。PAX6 のエクソン 5a を含むアイソフォームは眼の網膜の形成を促進することを見出した。この系を使用して、眼の中心視野の方向を転換させること、色素上皮を水晶体に転換させることにも成功しており、これらの結果は将来の再生医療に役立つものと考え（東医長との共同研究）

(c) 遺伝病の DNA 診断および解析技術の精度向上

(d) DNA 多型と連鎖検定

(e) 小児腫瘍における腫瘍遺伝子の構造異常

神経芽細胞種でしばしば増幅し、予後因子として知られている N-myc 遺伝子について、増幅の程度を簡便に測定する方法を開発し、また国立小児病院（国立成育医療センター病院では申請中）での高度先進医療「固形腫瘍の DNA 診断」に協力している（宮内医長との共同研究）。

(f) 疾患責任遺伝子の発現調節・転写制御

PAX6・WT1・p53 は転写因子であり、これら転写因子間の相互作用を解析してネットワークを明らかにし、それによるアポトーシス関連遺伝子に対する調節を解析している。

アポトーシス機構の解明と臨床応用

アポトーシスは多細胞生物の発生及び恒常性の維持にとって必須の現象であり、それ故に、その制御異常は様々な疾患を生ずる。ヒトの疾患の約 70% においてアポトーシスの異常が直接、あるいは間接的に関与しているという研究者もいる。遺伝性疾患においても、その責任遺伝子産物がアポトーシスの制御に重要な役割を果たす蛋白質である例が次第に明らかになってきている。そこで我々はアポトーシスという現象の機構そのものを研究対象とする一方で、遺伝性疾患の発症にアポトーシスの乱れがどのように関与しているかを、いくつかの疾患を対象として研究している。

(a) アポトーシスのシグナル伝達に関する基礎的研究

Green Fluorescent Protein との融合蛋白質を用いてアポトーシスに関係するヒトカスパーゼ全て(8 種)の細胞内分布を明らかにした。

カスパーゼ 8、10 および Bim のアイソフォームの解析を行った。カスパーゼ 8、10 はカスパーゼの中でも上流に位置する重要な分子であり、自己免疫性リンパ増殖症候群や神経芽細胞腫で、遺伝子の構造異常あるいは発現異常が認められることが明らかとなっている。我々はカスパーゼ 8、10 のある種のアイソフォームがアポトーシスを逆に抑制することを初めて報告した (Shikama et al. 2002)。一方、bim は癌遺伝子 bcl-2 と一部相同性を持つアポトーシス誘導遺伝子であり、特に血球系の細胞で重要な役割を演じていることがノックアウトマウスの解析からわかっている。我々は bim 遺伝子の 6 種のアイソフォームを新たに発見し、機能解析を行って発表した (2001)。またこれらアイソフォームのほとんどがマウスには存在しないと考えられることから、ヒトという生命体の複雑さを示す一例と考えられた。

(b) グルコルチコイド標的遺伝子の解析

グルコルチコイド (GC) は生体内で産生されるステロイドホルモンであるが、白血病、リンパ腫の化学療法に必須の薬剤でもある。GC は幼若なリンパ球や白血病細胞に細胞周期の停止とアポトーシス (細胞死) を誘導することが知られており、これが抗がん剤としての作用機序と考えられるが、その詳細なメカニズムは不明である。これまでに我々は、癌遺伝子 bcl-2 がカスパーゼの上流で GC によるアポトーシスを抑制すること、GC によるアポトーシスの際活性化されるカスパーゼと呼ばれるアポトーシス実行プロテアーゼの活性化経路は特殊なものであることなどを明らかにしてきた。GC でアポトーシスを起こす白血病細胞株を用いて、GC による遺伝子発現プロファイルの変化を DNA マイクロアレイ法で解析し、GC によって発現量の増加する遺伝子 93 個と減少する遺伝子 28 個を同定した (Yoshida et al. 2002)。これらの遺伝子の多くが複数の白血病細胞株で同様の変動を示すことがわかったことから、これらの研究成果は GC の薬効機序の解明に寄与すると思われる。

(c) Gorlin 症候群の遺伝子及び細胞生物学的解析

Gorlin 症候群は母斑基底細胞癌症候群とも呼ばれる常染色体優性遺伝を呈する神経皮膚症候群である。それと同時に、基底細胞癌、髄芽腫等を多発する高発癌性遺伝疾患でもあり、また放射線に高感受性である。これまでに我々は、Gorlin 症候群患者から樹立した不死化リンパ球が、放射線に対する細胞周期の停止とアポトーシスの誘導に異常を示すことを明らかにした。本年度、日本人の Gorlin 症候群患者における PTCH 遺伝子の解析を進めた。現在 8 例について検討しており、うち 6 例に PTCH 遺伝子変異を認めたと (千葉大学・藤井との共同研究)。

遺伝子治療

- (a) リソゾーム蓄積症に対する遺伝子治療法の検討
- (b) 肝臓を標的とした遺伝子治療法の開発と改良

発表論文

研究所年報に記載しているので参照ください。