

4-2-6 成育遺伝部（疾患遺伝子構造研究室、遺伝子診断治療研究室）

1. 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 2 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づ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 研究室からなり、山田正夫部長、宮下俊之室長、田所恵子研究員の 3 名の職員で構成されおり、さらに、流動研究員や、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。平成 16 年度の参加者について記す。平成 15 年度より流動研究員となった、豊田雅士、長尾和右が引き続き参加している。従来から早稲田大学理工学部電気・情報生命工学科山元大輔教授と共同研究を進めていたが、同教室の柳澤比呂子講師が 4 月から 8 月の間、また卒業実験生の吉田瞳は 1 年間、当研究部で実験に従事した。井上佳織、山崎麻由、西村千寿子（移転まで）は研究補助員として、齋藤佳代子が事務補助として研究を支えた。本年度の 9 月に、太子堂の旧小児医療研究センター時代の建物から、旧大蔵病院跡地に建設された新研究棟へ引越した。引越し作業を担ってくれた研究部構成員に感謝する。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（5 月に東京歯科大学教授として転出）、遺伝診療科の奥山虎之医長、産科の佐合治彦医長ら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、慶應義塾大学医学部・岡田明子、福原康之、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。研究課題の多くは研究所内外の研究室との共同研究であり、以下に課題ごとに記載した。他に多くの研究課題が進行中である。またこれらの研究にあたって、厚生労働省成育医療研究委託費、厚生労働科学研究費補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業、感覚器障害研究事業、また文部科学省科学研究費補助金、国立研究機関原子力試験研究費などにより御援助をいただいております。感謝の意を表す。

2. 研究活動

2.1 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。

2.1.1 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で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。最近、ショウジョウバエの DRPLA/RERE ホモログ (Atro/Grunge) が単離され、それは発生分化時に作動する転写調節因子であり、分節あるいはパターン化に係わることが報告された。そこでヒト DRPLA/RERE の転写調節能について検討している。

2.1.2 微細選択的スプライス

この課題の契機は以下のものである。我々は1994年にDRPLA遺伝子のcDNA配列を報告したが、1995-7年にかけて他研究室からもヒトあるいは他哺乳動物のDRPLA cDNA配列が報告された。これらの配列を比較すると、伸長するCAGリピートとは別の部位で、我々の配列にある3塩基(CAG)が一部の配列に無いことに気づいた。当時、このような微細な差異は、他研究室における人為的あるいは技術的ミスとして軽視していた。しかし、1999年頃、同様の現象を別の遺伝子GHRHRでも経験したことから、次第に選択的スプライスの可能性を考えた。そこで、ミニジーンを用いた実験系で解析し、実際、エクソン4と5の間で生じ、3塩基離れた2ヶ所のスプライス受容部位が使用される選択的スプライスに起因することを明らかにした。この差異によって、我々の配列の94Qという1アミノ酸残基の有無という微細な差を生じる。

ヒトの各組織、および詳細に解剖したラットの脳の各部位における両アイソフォームのmRNA発現比率を解析し、CAGを含むアイソフォームが各組織で主産物であることを確認した。両アイソフォームそれぞれに、伸長程度の異なるCAGリピートを持つDRPLAと、緑蛍光蛋白質(GFP)との融合蛋白の発現ベクターを作製し、HeLa細胞で発現させ、細胞内局在を解析した。グルタミン1残基を有するアイソフォームはほとんど細胞核に存在するのに対し、グルタミン1残基の無いアイソフォームは、相当数が細胞質に流出していた。JNKによるリン酸化に対しては、グルタミン残基の有無による効果の差はほとんど無かった。

3塩基離れた2箇所のスプライス受容部位の使用による選択的スプライスはこれまで、レプチンなど、我々の文献調査では、5遺伝子について報告がある。しかし、このような微細な差は一般的には無視されたり、ミスとして処理されていることが多いと思われる。実際、蛋白データベースの中で不一致とされていた3例でこの現象を確認した。また、ある選択的スプライスデータベースのソースが公開されており、そのソースを独自に解析したところ、選択的スプライスの受容部位は(供与部位も同様に)互いに近接している例が多いことを示唆する結果を得た。選択的スプライスデータベースはEST(Expression Sequence Tags)に基づいており、その精度には問題があるため、別の方法によってこの結果を検証している。3塩基離れた2箇所のスプライス受容部位を使用した選択的スプライスが翻訳領域に生じた場合、その3塩基が翻訳枠と外れていても、結果的には1アミノ酸残基の挿入となることが極めて多いことなど、本現象に伴う特徴を明らかとした。最近ヒトゲノムの塩基配列の解読がほぼ完了したが、そこに存在する遺伝子総数は2万程度であり、予想よりはるかに少ないことが明らかにされた。ヒトのような高度に組織化された生命体を構築維持していくにはそれ以上の多数種類の蛋白質が必要であると考えられる。選択的スプライスは一定数の遺伝子から多数種の蛋白質を生じる最も重要な機構であり、特に、時間的空間的に割合が変化する選択的スプライスの調節機構は今後最も重要な課題となると考える。

2.1.3 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、また発生分化に關与する。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關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)の形成に關与する遺伝子を、一方、C 末側半分は眼の内側(網膜)の形成に關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 末側およびホモドメインの計 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発現ベクターを構築し、転写調節能を解析している。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も併用して解析を進めている。(東医長との共同研究)

2.1.4 遺伝病の DNA 診断および解析技術の精度向上

2.1.5 DNA 多型と連鎖検定

2.1.6 小児腫瘍における腫瘍遺伝子の構造異常

2.1.7 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。

2.2 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、あるいは間接的に關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關与しているかを、いくつかの疾患を対象として研究している。

2.2.1 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、グルコルチコイド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を明らかにし、また、GC によってアポトーシスを生じる白血病細胞株の遺伝子発現プロファイルを

DNA マイクロアレイ法によって解析し、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。最近では、DNA マイクロアレイ法によって同定した遺伝子の内から、発現量の増加する遺伝子 3 個 (GranzymeA, FKBP5, DSCR1) に注目して詳細に解析した。これらの遺伝子は、GC が直接作用する標的遺伝子であることを確認し、さらに発現量増加の分子機序を明らかにした (U et al. Leukemia 2004)。さらに、FKBP5, DSCR1 の増加が生理的意義を持つことを示した。一方で、siRNA を用いて発現量を抑制しても単一遺伝子の抑制のみではアポトーシスへの影響は認められなかったことから、複数の遺伝子の発現変化が必要である可能性を明らかにした。この研究は白血病の分類、予後予測、新たな抗白血病ステロイド剤のスクリーニング等に貢献すると考える。

2.2.2 アポトーシスのシグナル伝達に関する基礎的研究

2.2.2.1 典型的なアポトーシスとは異なる細胞死を誘導する Spin1 の機能解析

元々 Spin1 はショウジョウバエのメスで性行動異常を示す変異体から発見された遺伝子であるが、ヒト Spin1 は細胞株で高発現させると細胞死を誘導した。この細胞死は、カスパーゼと呼ばれるアポトーシス過程で活性化されるプロテアーゼを介さない細胞死であること、Bcl-2, Bcl-xL といった抗アポトーシス蛋白質が結合すると抑制されること等を明らかにした (Yanagisawa et al. Cell Death Differ. 2003)。この研究はオートファジーをとまなう細胞死、たとえば神経変性疾患 (セロイドリポフスチノーシス等) などの病態の解明に貢献すると考える。(早稲田大学理工学部との共同研究)

2.2.2.2 アポトーシスと炎症、免疫反応を起こすシグナル伝達とのクロストーク

カスパーゼ 8 および 10 の、プロドメインのみからなるアイソフォームは Fas 等の Death 受容体を介するアポトーシスを特異的に阻害することを以前に報告した (Shikama et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002)。その後我々は、これらのアイソフォームが炎症や免疫反応に関連する転写因子 NF- κ B を活性化することを見出し、その詳細なメカニズムの解析を行った。その結果、これらのアイソフォームは NF- κ B の上流のキナーゼである NIK と RIP に結合すること、NF- κ B の活性化には RIP と IKK α が必要であることを見出した (Shikama et al. Eur. J. Immunol. 2003)。

2.2.2.3 アポトーシスメディエーターである ASK1 の 14-3-3 蛋白質による機能制御

様々なアポトーシス誘導において重要な役割を演じる ASK1 キナーゼに、リン酸化蛋白質に結合する 14-3-3 蛋白質ファミリーが結合してその機能を負に調節していることを見出した。その機序のひとつとして、ASK1 の細胞内分布を 14-3-3 蛋白質ファミリーが制御していることを明らかにした (Subramanian et al. Exp. Cell Res. 2004)。(米国エモリー大学との共同研究)

2.2.3 個体発生と発癌の接点に位置する PTCH 遺伝子の解析

PTCH 遺伝子の変異は母斑基底細胞癌症候群 (NBCCS) (常染色体優性遺伝をする神経皮膚症候群、高発癌性遺伝疾患でもある) や遺伝性全前脳症 (大脳の左右の半球への分裂不全) の原因となる。また基底細胞癌、髄芽細胞腫などでヘテロ接合性の消失 (LOH) がみられることなどから、癌抑制遺伝子としても作動していると考えられる。我々は引き続き NBCCS の遺伝子解析を行い、症例数が蓄積されて 14 例となった。新たな PTCH 遺伝子変異を報告するとともに遺伝子診断の感度を従来の報告より格段と高めることができた (Fujii et al. Hum. Mutat. 2003; Fujii et al. Am. J. Med. Genet. 2003)。本研究は NBCCS 患者の診断および経過観察に大きく貢献するものである。また翻訳領域の直上に存在する 3 塩基繰り返し配列の多型の解析を行った (Nagao et al. J. Hum. Genet. 2004)。ヒトおよびマウスの PTCH 遺伝子できわめて複雑な選択的スプライシングが起こっていることを明らかにし、その結果生じる蛋白質のアイソフォームの発現機能解析を行い、PTCH が発生と癌抑制において複雑な役割を果たす分子機序に迫ることができた (Nagao et al. Genomics, in press)。(一部千葉大学小児科との共同研究)

2.3 遺伝子治療

2.3.1 リソゾーム蓄積症に対する遺伝子治療法の検討

2.3.2 肝臓を標的とした遺伝子治療法の開発と改良

3. 発表論文、教育活動など

研究所年報に記載しているので参照ください。