

#### 4-2-5 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. 概要

受精・発生分化（胎児）・出産・成長発育（小児期・思春期・成年期）・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り、遺伝 genetics はこのライフサイクルを回す基本的な仕組みである。過去四半世紀、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・生物学分野に大きなインパクトを与えてきた。30 億の塩基対から成るヒトゲノムはほぼ全配列が決定された。しかし、ゲノムに存在すると推測される 2 万余の遺伝子の機能は未だ多くが不明であり、ゲノムの塩基配列に刻まれた情報を解読（デコード）することこそ、今日の遺伝学の最大課題である。

成育遺伝研究部は DNA 組換えなど分子生物学的手法の医学分野への普及・応用に努め、ヒト遺伝子の構造と機能について研究してきた。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、患者に生じた変異を同定し、疾患責任遺伝子の機能と発現調節について解析してきた。また、配列情報など、蓄積されてきた膨大なバイオ情報の積極的活用を図っている。これらの研究成果は診断に役立ち、生化学的要因が明らかでない多くの遺伝病を責任遺伝子研究から解明する遺伝子発見戦略に資するものである。遺伝子情報と遺伝子工学技術に基づいた治療法の開発につながることを期待している。

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、流動研究員や、外部からの医師・研究者・学生を受入れ、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。研究課題の多くは内外の研究室との共同研究である。これらの研究の推進に、厚生労働科学研究費補助金、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から支援をいただいた。感謝の意を表す。

##### 2. 研究活動

###### 2.1 バイオ研究における情報技術 Information Technology の活用

医学・生物学の研究分野でもコンピュータに代表される情報技術は必須なツールとなってきている。特に、ゲノム塩基配列情報をはじめとする膨大なバイオ関連情報が蓄積され、インターネットで公開されるようになった。バイオ情報を扱うバイオインフォマティクス分野は実験科学者に様々な手段を提供してくれている。エンドユーザとしては大変有用であるが、それを超えてバイオ情報に直接アクセスすると、蓄積データと現実との間には大きな溝があることに気づかされる。実験科学の立場からバイオインフォマティクスとの密接な相互関係樹立の仲介を図っている。

###### 2.1.1 微細選択的スプライス

ヒトのような高度に複雑な生命体を形成・維持するためには 10 万種程度の遺伝子が必要であると予想されていたが、ヒトゲノムの塩基配列がほぼ決定され、わずか 2 万余しか存在しないことが明らかになった。一定数の遺伝子から多様な機能を持つ蛋白質群を生じさせるには、mRNA の選択的スプライスと翻訳後修飾が重要な役割を果たしている。スプライスに関与する因子が単離され、その分子機構が次第に明らかになっているが、選択的スプライス、特に組織や発生分化段階に応じて転写産物の割合が変化するような時間的・空間的な制御機構は不明である。また、患者に生じた微小変異がスプライスに影響する例は従来の知見以上に大きな割合を占め、スプライスは遺伝子研究の重要課題である。

我々は DRPLA の機能解析過程で、報告された DRPLAcDNA 配列間に微細な差異があることに気づいたことを契機に、公開データベースのソースを独自に解析し、スプライス受容部位・供与部位を異にする選択的スプライスでは近隣に位置する 2 ヶ所の部位を二者択一する例が著しく多いこ

とを見出し、実験的に確認した(Tadokoro et al. J Hum Genet. 2005)。Hiller らはバイオインフォマティクス解析からエクソン先頭に NAGNAG 構造が多いことを見出し、そこで選択的スプライスが普遍的に生じていることを報告した (Nature Genet. 2004 年 12 月)。我々の報告は少し遅れ、普遍性についてプライオリティーは得られなかったが、個別例の追加と、広範な遺伝子について実験的検証をした点など評価を受けている。

(詳細は <http://www.nch.go.jp/genetics/subtlealtsp/subaltsp01.htm> に記載)

結果を公開してスプライス制御機構解明に資し、また、4, 5, 6 塩基の離れた例などの実験的検証を進めている。

### 2.1.2 その他のバイオ情報解析

選択的スプライスの頻度がゲノムサイズとエクソン数と相関することを事例で解析している。蛋白質の機能はその形状で規定されるが、最近の蛋白構造分野で本質的無秩序 intrinsic disorder という概念が提唱されており、ポリグルタミンとの関係で解析している。

### 2.1.3 ウェブサイトによる情報発信

(旧) 小児医療研究センターは 1995 年春に LAN (nch-net) を構築し、インターネットに接続した。接続開始当初からウェブサイト (ホームページ) を構築し、組織紹介情報などを業者に依頼して掲載してきたが、アクセスは極少数に留まった。1998 年から組織内有志も自主的自立的にコンテンツを掲載する体制とし、様々な工夫によってアクセスを伸ばしてきた。2002 年の成育改組以後アクセス数はほぼプラトーであったが、研究所移転後の 2005 年春にサーバが更新されたのを機にコンテンツの充実に努めた。当研究部は以下の点 (専門家から一般向けに配列) を特に留意している。

- (1) 学術専門雑誌のオープンアクセス化動向に賛同し、著作権を考慮しつつ、論文別刷・セルフアーカイブ・投稿原稿等を掲載している。
- (2) 発表論文に含めきれなかった付随・関連・生データを自己サイトに掲示し、追加・修正などに応じている。
- (3) 各種研究報告書等の冊子体は関係部局に配布されているが、一般の人がアクセスするのは難しい。公開を前提に作成してきた研究報告等資料を積極的に公開している。
- (4) インターネットで必要な情報を探し求める時に、検索サイトを使用することが一般的になった。検索サイトで上位に表示されるようにコンテンツを作成することを、E-コマースでは SEO (search engine optimization) と呼ぶ。SEO 手法を考慮しつつ、コンテンツを整備している。また検索を念頭に、専門用語の解説・説明を充実させてきた。
- (5) 当研究部が冠する「遺伝」は、わが国では特に遺伝病との関係からマイナスイメージを伴いがちである。科学的に正しい知識を持ってもらうことによって、遺伝に伴う誤解と偏見を解消できるように努めている。

NCH サイトでは、成育遺伝・成育政策科学・免疫アレルギーの 3 研究部が組織紹介レベルを超えて情報発信している。最近の NCH サイトは (規模等を基準に相対的に) 極めて多くのアクセスを受けようになり、信頼されるサイトに成長してきたことは喜ばしい。

## 2.2. p53 標的遺伝子の解析

p53 は小児の腫瘍を含めてヒト癌の発症において最も重要な役割を演ずる癌抑制遺伝子である。p53 が癌抑制遺伝子として働く機序のひとつにアポトーシスと呼ばれる細胞死の誘導が挙げられる。p53 は転写因子であり、標的遺伝子を活性化することでアポトーシスを誘導すると考えられている。現在までに少なくとも 15 種類以上の遺伝子が p53 の下流でアポトーシス誘導に関与する候補遺伝子として報告されているが、総合的に見て、どの遺伝子がどれほど重要か解釈は大変難しい。その理由のひとつは、従来の報告では複数の標的遺伝子を同じ実験系で比較検討したものが皆無である点である。我々は p53 の下流でアポトーシス誘導に関与すると考えられる多種類の候補遺伝子に対する siRNA を作製し比較検討することによって、放射線によって誘導される細胞死のメカニズム

を詳細に解析している。

### 2.3. 個体発生と発癌で重要な役割を演じるソニックヘッジホッグシグナル伝達経路の異常で発症する疾患の研究

Sonic hedgehog (Shh) シグナル伝達経路はショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に保存されており、発生や発癌といった生理的、病的な生命現象において重要な役割を演じていることが明らかとなってきた。我々はこのシグナル伝達経路の亢進と抑制が原因で発症する以下の2疾患の遺伝子解析と発症機序の研究を行なっている。

#### 2.3.1 母斑基底細胞癌症候群 (NBCCS) (Gorlin 症候群)

NBCCS は常染色体優性遺伝をする神経皮膚症候群であり高発癌性遺伝疾患でもある。米国では56,000人に一人の発症という報告がある。我々は数年来 NBCCS の遺伝子解析を行い、30例近い症例数が蓄積されている。我々は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、この成果は NBCCS の総説でも紹介された (Kimonis et al. Genet Med. 6:495-502, 2004)。また成人患者の子供で無症状のケースの遺伝子解析を行ない、正常であることを2家系において診断できた。

本疾患の責任遺伝子は Shh の受容体をコードする PTCH である。我々は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生じていることを明らかにし、その結果産生され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, Miyashita et al. Genomics. 2005)。さらに PTCH 遺伝子の複雑な選択的スプライシングを解析するエクソン接合部オリゴヌクレオチドを搭載するマイクロアレイの開発を行い、組織特異的スプライシングと NBCCS 患者で認められた異常スプライシングの検出に応用可能であることを示した (Nagao, Miyashita et al. Hum Mol Genet. 2005)。更に脳と心臓特異的に発現する特殊なアイソフォームを報告し、これによって生ずる PTCH タンパク質がドミナントネガティブに機能することも証明した (Uchikawa, Miyashita et al. Biochem Biophys Res Commun. 2006)。また最近、PTCH 遺伝子の欠失をもつ NBCCS の3例を経験し、その欠損範囲を高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイで決定した後、全例で染色体切断点を決定した (投稿準備中)。この研究は症例の経過観察や治療に直接貢献するだけでなく、染色体欠失の分子メカニズムの解明にも貢献するものである。

#### 2.3.2 全前脳症 (Holoprosencephaly; HPE)

HPE は大脳の奇形では最も頻度が高く、自然流産の200例中1例、16,000出生例中1例に認められる。発症の根底には Shh シグナル伝達経路の抑制があると考えられているが、詳細なメカニズムは不明な点が多い。我々は全前脳症の遺伝子解析と発症に影響を与える多型について研究を開始した。そのうち1例から、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイを用いて、未報告の染色体領域に微小欠失をもつ症例を見出した。この領域に存在する遺伝子のなかに HPE の責任遺伝子の一つがあると考え現在解析中である。

### 2.4. 選択的スプライシングの解析と異常スプライシング是正の試み

選択的スプライシングはタンパク質の多様性を可能にするメカニズムのひとつであるが、疾患との関わりも重要である。遺伝病の原因となる点変異の少なくとも15% (疾患によっては50%) が選択的スプライシングに影響を与えるといわれている。我々はその中でも、変異によってスプライス供与部位が不完全に破壊されたため、その先のイントロンにある潜在性スプライス供与部位が相対的に活性化されて異常スプライシングが生じるタイプに注目し、改変 U7 small nuclear RNA を用いて活性化されている潜在性スプライス供与部位を抑制することで、異常スプライシングを是正することに成功した (投稿準備中)。この方法は異常 mRNA の構造を修飾するという点で、正常の遺伝子を導入するという従来の遺伝子治療とは異なり新規性がある。

### 2.5. 疾患責任遺伝子の選択的スプライスと発現・機能解析

ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 の変異、日本人ウィルムス腫瘍における高頻度ヘテロ接合性喪失、WT1 の転写調節機能、さらに WT1 の発現・機能への p53 の密接な関与を見出してきた。また歯状

核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、眼・腎等の形成不全症について責任遺伝子を研究し、昨年度は、DRPLAを始め3塩基の選択的スプライスにより1アミノ酸残基の有無を生じるアイソフォーム260例以上の組織発現を実証し、nagNAG構造が1アミノ酸残基のスプライスサイトとして普遍的であることを見出した結果、組織によって各アイソフォームの発現比率が変動し、マウス・ラットに比べヒトで組織多様性が高い可能性を示唆する結果を報告した(Tadokoro et al. J Hum Genet. 2005)。さらに眼科東医長との共同研究で、PAX2変異をもつことが多いとされる視神経異常を示す眼疾患でPAX6変異を見出し、昨年度はPAX6のエクソン5aを含むアイソフォームが眼の網膜の形成を促進し(Azuma et al. Hum Mol Genet. 2005a)、網膜色素上皮がPAX6により網膜神経へと分化誘導されること(Azuma et al. Hum Mol Genet. 2005b)を報告した。さらにその作用機序を探るべく研究を進め、各種の眼形成不全症で同定した変異型PAX6がPAX2やWT1を転写調節すること、またPAX6とPAX2、WT1の遺伝子間相互のプロモーター転写制御を見出している。

今年度は、引き続き上記結果の確立を目指した。その結果、PAX6はpaired(NとC)、homeoの3種類のDNA結合部位と転写活性化ドメインをもつが、各種の眼形成不全症患者で同定した11種類の変異型PAX6はアイソフォームの違いや変異の部位によって、これらDNA結合部位に対する転写調節能が大きく変動し、各ドメインが互いに影響し合うことが分った。PAX6とPAX2、WT1の遺伝子間相互転写調節については、内因性遺伝子の相互発現調節、各遺伝子のプロモーター活性の相互制御を検討した。PAX6は内因性のPAX2とWT1の発現を用量依存性に早発誘導し、プロモーター活性も亢進させたが、エクソン5aを含むアイソフォームにはその効果はなかった。PAX2は内因性のPAX6発現やプロモーター活性を遅発抑制し、WT1の発現も抑制した。WT1はエクソン5の有無とエクソン9のKTSの有無による4つのアイソフォームともPAX2やPAX6のプロモーター活性を抑制したが、内因性の発現は各アイソフォームにより遅発あるいは早発誘導された。PAX6は眼や脳の形成に、PAX2は視神経や腎の形成に、WT1は泌尿生殖器系の発生・分化、最近では網膜の発生に関わるとされる。発生・分化時に作動する転写調節因子の変異と多様な病態の関連、形態形成におけるPAX、WT1、p53などの転写調節因子相互の新たなネットワーク、PAX6による網膜神経への分化誘導のメカニズム、さらにアポトーシスや腫瘍発生過程におけるPAX遺伝子群の役割に発展させたいと考えている。

### 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。