

氏名 (本籍)	山田直人 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	甲第 350 号
学位授与日付	平成 9 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Molecular heterogeneity in mucopolysaccharidosis IVA in Australia and Northern Ireland : nine novel mutations including T312S, a common allele that confers a mild phenotype
審査委員	(主査) 教授 近藤直実 (副査) 教授 野澤義則 教授 岡野幸雄

論文内容の要旨

ムコ多糖症 IVA 型 (MPS IVA) は、リソゾーム酵素である N-Acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) の異常による常染色体劣性の遺伝疾患である。本症は全身にケラタン硫酸、コンドロイチン 6 硫酸などの glycosaminoglycan が蓄積することにより、短胴性の低身長、軟骨内骨化障害、特徴的顔貌、肝脾腫、心臓弁膜障害、角膜混濁、X 脚などを呈するが、精神運動発達遅滞を認めない代謝異常症である。MPS IVA は現在までに欠損酵素である GALNS の精製、抗体の調製、cDNA のクローニング、ゲノム構造の解析がなされ、分子レベルでの病因解析が可能となった。更に日本をはじめ、イギリス、コロンビア、イタリア、メキシコの患者の遺伝子解析から病因と考えられる遺伝子変異の同定も進み、遺伝型と表現型の関連や保因者診断に役立てられ、さらに各国の病因遺伝子の集積により共通変異や各民族の特徴が次第に明らかになってきている。

申請者は、GALNS 遺伝子解析における民族性の関与を探る目的で新たにオーストラリア 15 症例と北アイルランド 8 症例の GALNS 遺伝子の変異スクリーニングおよび変異の同定を行い、各民族における変異頻度及びハプロタイプを比較検討した。また共通変異である T312S 変異と I113F 変異を、正常な cDNA に導入した発現ベクターを用いて GALNS 欠損細胞にトランスフェクションし、変異に起因する酵素活性を測定し表現型との関連を検討した。

研究方法

対象はムコ多糖症 IVA 型と診断されたオーストラリアの 15 症例と北アイルランドの 8 症例の合計 23 症例である。対象を症例毎に以下のように重症型、軽症型、中間型に分類した。重症型は 3 歳半以前に短胴性の低身長 (最終身長 125cm 以下)、典型的な頸椎および末節骨の骨変形、15 歳には日常生活が制限され、20~30 歳で亡くなる症例とし、軽症型は 5 歳まで正常に発育し最終身長で 150cm 以上、肝脾腫もしくは骨変形も軽度の変形を残すのみで 20 歳までは日常生活が可能な症例とした。また重症型および軽症型の中間的な症状を示した症例を中間型とし解析を進めた。

1) 変異遺伝子のスクリーニング

患者の白血球もしくは線維芽細胞より核ゲノムを抽出し、cDNA をプローブとした Southern Blot 法によりゲノム構造の変異をスクリーニングした。また核ゲノムを鋳型として GALNS 遺伝子のエクソン 1 から 14 の両端にプライマーを設定し PCR (polymerase chain reaction) 法により DNA を増幅した。その上でアイソトープラベルを行い SSCP (single-strand conformation polymorphism) 法を用い遺伝子変異をスクリーニングした。更に検出された変異断片から T-vector を用いてサブクローニングし塩基配列を同定した。

2) 共通変異 I113F のスクリーニング

共通変異 I113F の存在するエクソン 4 の DNA 断片に PCR 法にて制限酵素 (Bgl II) の変異認識部位を導入し、Bgl II による切断の有無にて I113F 変異をスクリーニングした。

3) ハプロタイプ解析

GALNS 遺伝子内の 6 個の制限酵素多型 (A/a, B/b, H/h, C/c, D/d, E/e) によりハプロタイプを構築し全検体のハプロタイプを検索した。

4) 共通変異I113FおよびT312Sの発現酵素活性

共通変異I113FおよびT312Sを正常cDNAに*in vitro* mutagenesisを用いて導入した。その上で発現ベクターにそれらcDNAをサブクローニングし、得られた発現ベクターと正常cDNAの発現ベクターをGALNS遺伝子の欠損細胞にトランスフェクションした。これらの細胞と正常細胞及び、GALNS欠損細胞との酵素活性を測定し比較検討した。

研究結果

1) 変異遺伝子のスクリーニング

Southern Blot法によるスクリーニングではゲノム構造に変異は見られなかったが、SSCP法によるスクリーニングでは11個の変異を認めた。変異の種類について、10個はエクソン内の点変異であり、あとの1個はスプライスサイト変異であった。また変異のうち9個は今までに報告のない新たな変異であった。

2) 共通変異I113FおよびT312Sの頻度・ハプロタイプ

23症例をスクリーニングし高頻度にみられた共通変異I113FおよびT312Sの相対頻度はI113F変異で18% (8/44allele) であり、T312S変異で14% (6/44allele) であった。またハプロタイプ解析からI113F変異はハプロタイプ2 (A/B/H/c/d/e) と関連しており、T312S変異はハプロタイプ1 (a/b/h/C/D/E) に関連する変異であった。2個の共通変異はオーストラリアと北アイルランド両患者に見られ、さらにオーストラリア患者では患者姓から北アイルランド系であることから共通のファウンダーに起因することが推測された。

3) 共通変異I113FおよびT312Sの発現実験

T312S変異の発現した酵素活性は正常cDNAの発現活性の15%であり、重症型に関連することが報告されているI113F変異の発現酵素活性の4%に比べ高く、T312S変異は軽症型に関連する変異であると考えられた。

考 察

共通変異I113FおよびT312Sが北アイルランドとオーストラリアにおいて認められた。両変異の民族内の相対頻度やハプロタイプの結果からも、19世紀に北アイルランドからオーストラリアへ移民した影響を示唆する結果を得た。

共通変異I113FおよびT312Sのかかわる症例の残存酵素活性や重症度と、発現実験において両変異がかかわる発現酵素活性の結果から、T312S変異が軽症型を、I113F変異は重症型を示す結果となった。T312S変異はGALNS遺伝子の共通変異のなかで軽症化を示す初めてのものである。

また共通変異以外の9個の新しい変異についてオーストラリアに特有に認められ、オーストラリアが西欧のみならずアジア、東欧からの移民も含め、多民族の交配も進みGALNS遺伝子変異の民族的特徴にも融合の影響が示唆された。またこのことはGALNS遺伝子にallelic heterogeneityが存在することを裏づけた。

論文審査の結果の要旨

申請者 山田直人は遺伝性ムコ多糖症において、病因遺伝子内の新しい共通変異を同定した。また共通変異の中で民族的歴史に起因する変異を見出し、さらに表現型との関連を明らかにした。この成果は小児科学特に先天代謝異常学ならびに人類遺伝学の研究の進歩・発展に少なからず寄与するものと認める

[主論文公表雑誌]

Molecular heterogeneity in mucopolysaccharidosis IVA in Australia and Northern Ireland : nine novel mutations including T312S, a common allele that confers a mild phenotype

Human Mutation 印刷中