

PCR法を用いたDuchenne型筋ジストロフィーの保因者診断について
(分担研究：マススクリーニングの新しい対象疾患とその実施年齢
およびスクリーニング法に関する研究(2))

岡田伸太郎 乾 幸治 福島 久雄 塚本 浩子

要約：進行性筋ジストロフィーは近年ジストロフィン蛋白異常症として注目され、その遺伝子レベルでの解析が進んでいる。しかし本邦でもDuchenne型(DMD)の場合、出生男児4600人に1人と頻度の高い疾患であるにもかかわらず、その有効な治療法はいまだなく、症状も進行性であるため、その保因者診断がしばしば問題となる。私達はヘパリン血より抽出したDNAを用い、pERT87座ジストロフィン遺伝子プライマーを作成し、遺伝子増幅法(PCR)を用いたRFLPs分析を行い、その保因者診断及び出生前診断を試みたので報告する。

見出し語：進行性筋ジストロフィー、遺伝子増幅法(PCR)、保因者診断、RFLPs

研究方法 対象：Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)、Becker型筋ジストロフィー(BMD)計5家系(Family1-5)の対象者よりヘパリン血5-10mlを採取し常法よりDNAを得た。またBMD家系(Family3)では、出生前診断のため羊水培養細胞(10cm dish1枚分)を50 μ lのバッファA(50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 8.3), 2.5mM MgCl₂, 0.1mg/ml gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween20 プロテナーゼK 1U)にて、50°C 1時間99°C 3分間処理後、DNA抽出液として使用した。Family 1: 母CK高値、母の弟DMD、probandは第1子、兄弟なし
Family 2: 母CK高値、筋痛あり。第3子(男)は筋生検にてDMD。第1子(男)も同様症状、第2子(女)CK高値、筋痛あり。筋生検にてモザイクパターン。母の妹、CK正常、筋症状なし。

Family 3: proband、BMD。probandの母方いとこを祖母とする胎児(エコー、染色体分析にて男児)が出生前診断の対象。祖母CK高値、母CK正常。母の弟BMDで死亡。BMD家族歴他にもあり。
Family 4: proband、BMDまたはDMD。家族歴なく母CK正常、筋症状なし。
Family 5: proband、BMDまたはDMD。兄はCK正常。筋症状なし。母CK正常、筋症状なし。
プライマーオリゴヌクレオチドの合成：プライマーオリゴヌクレオチドの合成は Applide Biosystem社製のDNA合成装置を利用し、その後ネンソルブ(NEN)により精製した。作成したプライマーは、1989年Robertsらが報告した pERT87座の3組で¹⁾、各々制限酵素と組み合わせて使用した。(A:pERT87-15/BamHI, B:pERT87-8/TaqI, C:pERT87-15/XmnI) 増幅されるDNAは A(226bp) B(155bp) C(740bp)である。

DNAの増幅と制限酵素による消化：アトー社製のザイモクターにより3組のプライマーを用いてDNAを増幅した。PCR条件は、100mM KCl、20mM Tris-HCl(pH 8.3)、3mM MgCl₂、0.2mg/ml gelatin、dNTPs 200μM、プライマー 25μM、DNA 0.2μg、Ampli Taq™ 1.5Uを加え、全容量 50μlとし、流動パラフィン 40μlを重層、95°C 3分後、95°C×0.5分、55°C×0.5分、72°C×3分間のIncubationを30サイクル行った後、72°C7分間処理した。羊水培養細胞を用いた場合、DNA抽出液50μl中20μlを用いて同条件で行った。反応後6μlをとり1.5%アガロースゲル (Nupid使用、エチジウムブロマイド濃度0.75μg/ml) にて電気泳動し、目的とする生成物の増幅を確認した。残りの反応液をフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈澱後、沈澱物を10mM Tris-HCl(pH 7.5) 0.1mM EDTA、20μlに溶解、うち10μlずつを各制限酵素にて3時間ずつ消化 (BamHI、XmnI 37°C、TaqI 65°C) した。消化後、反応液は同じく6μlをとり1.5%アガロースゲル (Nupid使用、エチジウムブロマイド濃度0.75μg/ml) にて電気泳動した。生成物が10bp以外に1本のままの場合 allele(-)、2本にわかれる場合 allele (+)と判定した。(A; allele(+))166+50+10bp, a;(-)216+10bp, B;(+)74+71+10bp, b;(-)145+10 bp, C;(+)52+21+10bp, c;(-)730+10bp) また、出生前診断を行ったFamily3でのdeletion 分析については、昨年報告したChamberlainらの方法²⁾により、9組のプライマーを用いて行った。

結果：①DMD家系 (Family3) での出生前診断と保因者診断

1)deletion分析 probandではe (exon 45) の欠失を認めたが祖母、母、羊水細胞では欠失を認めなかった。

2)RELPs分析 (図1) A;proband allele(+), 羊水細胞allele(-)で祖母、母はヘテロ。B;4例すべてallele(-)。C;proband allele(+), 羊水細胞allele(-)で祖母、母はallele(-)。

以上、1)2)より今回の胎児については、欠失を認めず、RFLP分析の結果もprobandと異なり正常の可能性が高いものと判定した。

②その他の家系でのRELPs (図2)

1)家族歴のある家系 Family1;母のalleleパターンとprobandのパターンが一致していた。

Family2;母のalleleパターンは患児2名のそれと共通しており、祖母のパターンとも一致していたが症状のない母の妹とは異なっていた。

2)家族歴のない家系 Family4;母のパターンがprobandに受け継がれたことは確かだが、母がABCすべてでホモを示すことより保因者の否かの可能性は判定できなかった。Family5;母のパターンの一方はprobandと共通でありもう一方は兄 (正常) と共通であったので母が保因者である可能性が示唆された。

以上よりFamily4を除いた4家系において、今回のPCR法によるRELPs分析から、母親が保因者である可能性が示唆された。

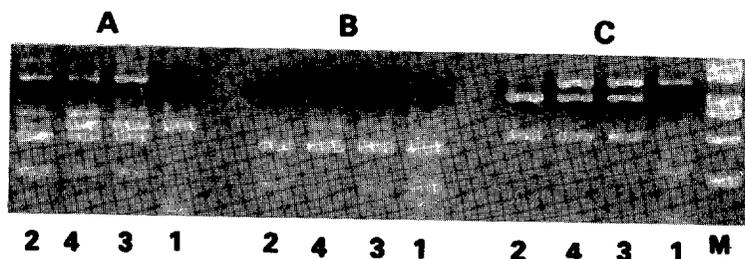
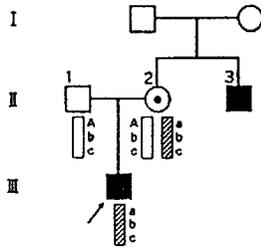
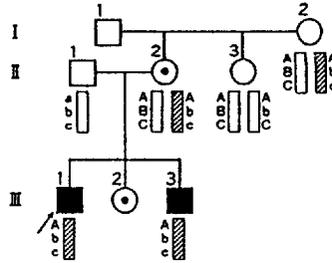


図1 Family3におけるPCRを用いたRFLP分析の実際
1;羊水細胞 2; proband 3; 母 4; 祖母
A;pERT87-15/BamHI RFLP B;pERT87-8/TaqI RFLP
C;pERT87-15/XmnI RFLP

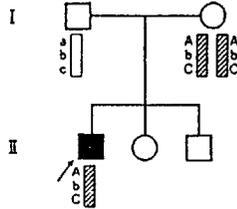
Family 1



Family 2



Family 4



Family 5

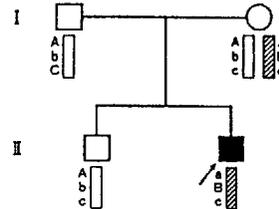


図2 家族歴のある家系 (family1,2) ない家系 (family4,5) での RFLP 分析結果

考察: DMD/BMDの保因者診断としては、1)筋生検組織での抗ジストロフィン抗体染色 2)DNA診断の2つに大きく分けられる。1)については、DMD家系の保因者と考えられる女性の生検筋でのモザイクパターンの証明³⁾により可能であるが、侵襲的であり、BMD家系では不可能である。また2)については、①deletion(+)の場合には、サザンブロット分析や、exon 45付近のdeletion例については、cosmid cloneを用いた in situ hybridization⁴⁾が報告されているが、RIやcosmid cloneの使用、in situ hybridizationといった複雑な操作を必要とする点などが問題点としてあげられる。さらに、③deletion、duplicationとも認めない場合にはRFLPs分析が中心となる。今回、我々が行ったPCR法によるRFLPs分析は、intrinsic marker 3組のみの分析ではあるが、RIを用いず簡便で、短時間で分析可能な点が有用であり、我々の検索した5家系中4家系で、母親が保因者である可能性を示唆することができた。著者Robertsらも、保因者である母の70%以上が、この3つのRFLPのうち少なくとも1つでヘテロを示すと報告している。¹⁾しかしX

染色体上には平均1.5回組み換えが存在しうることから、さらに診断効率を上げるには、flanking markerの使用も考慮すべきであり、欧米人と日本人との各多型でのallele頻度の差を考慮した、primerの選択作製が必要であると考えられる。最近、同じくRobertsらがRNAのprimer用いたPCR法による保因者診断を報告しており⁵⁾、PCR法はさらに幅広く臨床応用され、迅速に診断しうる簡易診断法として活用されていくものと考えられる。今後さらに例数を重ねながら、保因者診断をより確実にし、deletion、duplicationのある家系については、サザンブロット分析との対比についても考察していきたい。

文献

- 1) Roberts, R.G., et al.: Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy: Nucleic Acid Res., 17, 811, 1989
- 2) Chamberlain, J.S., et al.: Multiplex PCR for diagnosis of Duchenne muscular Dystrophy: in PCR protocols. Innis, M., et al.(eds.)Academic Press, pp.2721, 1989

- 3) Arahata, K., et al.: Mosaic expression of dystrophin in symptomatic carriers of Duchenne's muscular dystrophy: *N Engl J Med.*, 321, 398 1989
- 4) Ried, T., et al.: Direct carrier detection by in suppression hybridization with cosmid clones of the Duchenne/Becker muscular dystrophy locus: *Hum Genet.*, 85, 581, 1990
- 5) Roberts, R.G., et al.: Direct diagnosis of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約: 進行性筋ジストロフィーは近年ジストロフィン蛋白異常症として注目され、その遺伝子レベルでの解析が進んでいる。しかし本邦でも Duchenne 型(DMD)の鳩合、出生男児 4600 人に 1 人と頻度の高い疾患であるにもかかわらず、その有効な治療法はいまだなく、症状も進行性であるため、その保因者診断がしばしば問題となる。私達はヘパリン血より抽出した DNA を用い、pERT87 座ジストロフィン遺伝子プライマーを作成し、遺伝子増幅法(PCR)を用いた RFLPs 分析を行い、その保因者診断及び出生前診断を試みたので報告する。