

DNA多型を用いたDuchenne型及び、Becker型筋ジストロフィーの
保因者診断と出生前診断について

(分担研究：マス・スクリーニング対象疾患に関する研究

「2. マス・スクリーニングの新しい対象疾患」)

岡田 伸太郎 乾 幸治 福島 久雄 塚本 浩子

要約：昨年、本邦においてもそのヘテロ率の高さから有効な保因者診断法であると報告した、pERT87座のPCR-RFLPs分析とジストロフィン遺伝子両端のCAリピート部位のRFLPs分析を組み合わせた方法を用いて、DMD 4家系、BMD 1家系の計5例（男児4例、女児1例）の出生前診断を行った。結果は正常男性胎児2例、DMD胎児1例、非保因者1例と判定不能（new mutation または gonadal mosaicism）1例であった。サザンプロット法で非保因者と診断したDMD遺伝子欠失例（exon 48-54欠失）の母親をSSCPを用いたRFLPs分析でexon48についてヘテロを示したことから、さらに非保因者であると確認できた。欧米でSSCPによる多型が報告されている、exon 17,45,48の遺伝子欠失を示す家系では、保因者診断の1つとして試みるべき方法であると考えられた。

見出し語：出生前診断 保因者診断 PCR-RFLPs分析 CAリピート SSCP

研究方法 A. 出生前診断 対象はDMD 4家系とBMD 1家系（欠失のある家系2家系、ない家系3家系）で、母親が妊娠16週前後に羊水穿刺を行い、羊水細胞を得た。直接または培養後にDNAを抽出し分析に用いた。胎児の性別は染色体分析またはY染色体特異的配列プローブを用いたPCR法によって判定した。発端者や他の家族については、未相

へパリン血より常法にてDNAを抽出した。診断は昨年報告したとおり(1)DMD遺伝子内のpERT 87座の3種のプライマーと制限酵素を組み合わせ、PCR-RFLPs分析 (A; pERT87-15/BamHI B; pERT87-8/TaqI C; pERT87-15/ XmnI) ¹⁾と(2)CAリピート分析 (5'D YSI, II, III, 3'CA) ²⁾³⁾を組み合わせ、計7種のプライマーを用いて多型分析を行った⁴⁾。
B. SSCP 対象はPCR, サザンプロット法にて欠失を認めなかったDMD/BMD症例と欠失のある家系の女性血縁者（母、姉

大阪大学小児科 (Dep. of Pediatrics,
Osaka Univ.)

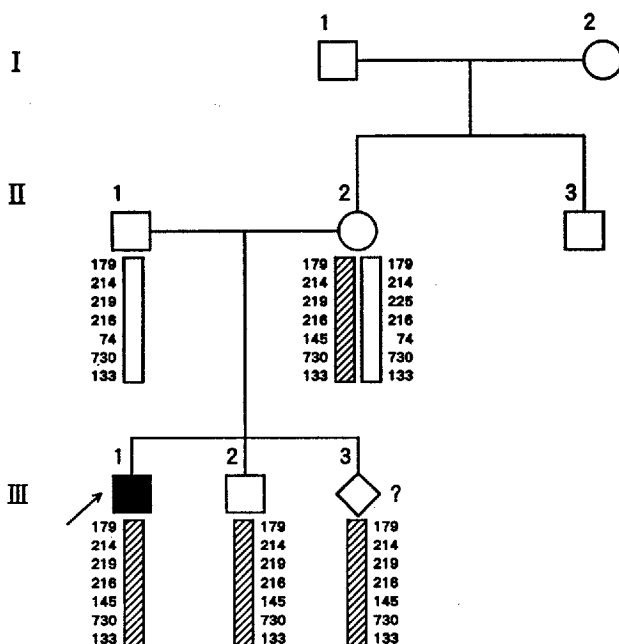
妹、祖母など)である。プライマーはChamberlainの9種のプライマーを使用した。欠失のある家系の女性血縁者については、発端者が欠失を示すプライマーを使用した。各々のアンチセンスプライマーの5'端を ^{32}P dATPでエンドラベルし、DNAを増幅後、非変性アクリルアミドゲルに泳動しそのバンドパターンを分析した。⁴⁾

結果 A. 出生前診断 対象となった胎児の性別は染色体分析、Y特異的配列プローブによるPCR分析にて男児4名、女児1名であった。

家系1：BMD家系(欠失のある家族例)。対象は発端者(BMD, exon45(-))の母方従兄弟を祖母(母方)とする男児胎児。発端者に認めたexon45の欠失を認めなかったこと、多型パターンが母の正常パターン(発端者と異なる)と一致したことから正常男性胎児と判定した。また本家系では5'端の組換えを認めた。

家系2：DMD家系(欠失のない家族例)。発端者(胎児の兄)と母の弟が遺伝子欠失のないDMD。母の妹は以前、出生前診断で正常男児出産の既往があり、非保因者と診断されている。pERT87座のみでは、母は3種すべてでホモを示したため、CAリピートを追加した。DMDである兄のパターンと胎児のパターンが母の一方の染色体パターンと全く一致したため、DMD胎児と診断した。中絶後、胎児大腿筋の抗ジストロフィン抗体染色を行ったところ陰性であり、これを確認することができた。またそのX染色体パターンより、母を保因者、姉を非保因者と診断した。

家系3：DMD家系(欠失のない孤発例)(図)。第1子がDMDで遺伝子欠失を認めなかった。多型パターンが第1子DMD、正常第2子、今回対象となった男性胎児で全く一致したため判定不能であった。new mutation または gonadal mosaicismの可能性が考えられた。



家系4：DMD家系（欠失のある孤発例）。母の弟がDMDでPCR法でexon4, 8, 12, 17の欠失を認めた。胎児はPCR法で男児と診断されたが、発端者に認めた欠失はなく、正常男性胎児と判定した。

家系5：DMD家系（欠失のない孤発例）。胎児は女児で兄DMDには欠失を認めなかった。pERT87座のパターンが発端者の兄と異なったため、姉と同様に非保因者と判定した。以上より、結果は正常男性胎児2例（欠失のある2家系）、DMD胎児1例（欠失のない家族例）、非保因者1例（欠失のない孤発例）、判定不能例1例（欠失のない孤発例）であった。

B. SSCP 欠失のないDMD/BMD症例で、現在のところSSCPにより新たな点突然変異を示したものはない。女性血縁者についての保因者診断に関しては、遺伝子欠失（exon48-54）を示したDMD家系において、サザンプロット法で非保因者と判定した母親が、発端者が欠失を示すexon48（exon48については欧米で多型が報告されている）についてヘテロのバンドパターンを示し、SSCPによっても非保因者であると判定できた。

考察 DMD/BMDは現在もなお有効な治療法がない進行性疾患であり、とくにDMDは、本邦においても新生男児4900人に1人と非常に頻度の高い疾患である。そのため、発生の予防が大切であり、日常しばしばその出生前診断が問題となる。欠失のある家系では比較的その診断は容易であるが、欠失のない家系ではしばしば困難であることが多い。我々はこれまでに保因者診断におけるpERT87座のPCR-RFLPs分析とCAリピート分

析の組み合わせの有用性について報告してきた。今回の結果から、new mutation が全体の約30%、遺伝子欠失を示す例が全体の60-70%のみで孤発例が多いため、判定困難な症例もあった。DMD/BMDの保因者診断において、PCR-RFLP法とCAリピート法を組み合わせたこの方法は非常に有効な方法であった。しかしながら家系3のように欠失がなく、new mutation やgonadal mosaicism が示唆されな判定不能な症例もある。このように欠失のない場合では、発端者自身の点突然変異の検索が出生前診断の糸口となると思われる、SSCPやChemical cleavage法などの新しい方法による検索がさらに重要になるものと考えられる。また、SSCPを用いた保因者診断は、特に多型の報告のあるexon17, 45, 48の欠失を示す家系においては有用な診断であると考えられ、保因者診断の1手段として活用していきたい。

文献

- 1) Roberts R.G., et al.: rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy: Nucleic Acids Res., 17, 811, 1989
- 2) Oudet, C., et al.: An informative polymorphism detected by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene: Hum Genet., 84, 283, 1990
- 3) Feener C.A., et al.: Rapid detection of CA polymorphism in cloned DNA: Application to the 5' region of the dystrophin gene: Am J Hum Genet., 48, 621, 1991

4) Zietkiewicz E., et al.: Single-strand
conformation polymorphism (SSCP):
detection of useful polymorphism at
the dystrophin locus: Hum Genet., 89,
453, 1992



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:昨年、本邦においてもそのヘテロ率の高さから有効な保因者診断法であると報告した、pERT87 座の PCR-RFLPs 分析とジストロフィン遺伝子両端の CA リピート部位の RFLPs 分析を組み合わせた方法を用いて、DMD4 家系、BMD1 家系の計 5 例(男児 4 例、女児 1 例)の出生前診断を行った。結果は正常男性胎児 2 例、DMD 胎児 1 例、非保因者 1 例と判定不能(newmutation または gonadal mosaicism)1 例であった。サザンプロット法で非保因者と診断した DMD 遺伝子欠失例(exon48-54 欠失)の母親を SSCP を用いた RFLPs 分析で exon48 についてヘテロを示したことから、さらに非保因者であると確認できた。欧米で SSCP による多型が報告されている、exon17,45,48 の遺伝子欠失を示す家系では、保因者診断の 1 つとして試みるべき方法であると考えられた。