

濾紙血を用いた糖原病 I a型のDNA診断 ——パイロットスタディ——

(分担研究：マスキング対象疾患一次スクリーニングから
二次スクリーニングのあり方に関する研究)

西垣敏紀*、乾幸治*、岡田伸太郎*

要約：グルコース-6-フォスファターゼ（以下G6Paseと略す）の欠損による糖原病 I a型は、常染色体劣性の疾患で、グリコーゲンの蓄積による肝腫大、腎腫大を認め、著しい低血糖とそれに伴う高乳酸血症、高脂血症、高尿酸血症などを呈する疾患である。

われわれは、日本人糖原病 I a型患者20症例に対してG6Pase遺伝子異常について検討し、Kajiharaら(1995)により報告された日本人患者の主要な病因変異であるスプライシング異常を引き起こす727番目の塩基GからTへの置換が、患者20症例40対立遺伝子のうち93%をしめることを確認した。このことより、g727t変異をスクリーニングすることで日本人糖原病 I a型の患者変異の約93%が同定できることが推測された。

スクリーニングには、濾紙血から抽出したDNAをPCRにて増幅し、ビオチンで標識したallele specific oligonucleotide(ASO)プローブを用いたハイブリダイゼーションでg727t変異を同定する方法を用いた。正常94対立遺伝子のスクリーニングでは変異は同定されなかった。早期診断による早期治療、生活管理のメリット、SIDSの原因となりうる疾患であるという点で、スクリーニングの意義はあると考えられるが、正常集団での遺伝子頻度を算出し、マスキングとしての適応は今後検討すべきであろう。

見出し語：糖原病 I a型、遺伝子変異、スクリーニング

研究目的：日本人患者に同定されたコモンにおける糖原病 I a型のスクリーニング
の遺伝子変異を検索することによる日本人の可能性について検討した。

* 大阪大学医学部小児科学教室

対象：遺伝子変異の同定 生検肝組織を用いて酵素学的に確定診断をされた糖原病 I a型の症例、臨床症状、血液検査、負荷テスト等により臨床的に診断された糖原病 I a型の症例、互いに血縁関係のない計20症例を対象とした。

正常集団における遺伝子変異の同定 現行のマススクリーニングのための濾紙血採取時に、両親に対して説明、同意の上、スクリーニングのための濾紙血採取を行った。

方法：g727t変異の同定 Kajiharaらの報告²⁾にしたがい、allele-specific oligonucleotide(ASO)プローブを用いたドットプロットハイブリダイゼーションにより変異を同定した。患者の変異同定にはP-32にて標識したプローブを用いたが、正常集団のスクリーニングにはビオチンにて標識したプローブを用い、アルカリフォスファターゼをBCIP/NBTにて発色させ同定した。

ダイレクトシーケンス 患者末梢血よりゲノムDNAを抽出し、G6Paseの5個のエキソンをLeit¹⁾にもとづいて、エクソン-イントロン接合部も含めてPCR法にて増幅した後、サイクルシーケンス反応により直接塩基配列を決定した。

R170X変異の同定 エクソン4をPCRにて増幅、制限酵素BspHIにて切断した。

濾紙血からのDNA抽出 血液濾紙をメタノールで処理した後ボイルする Matsubaraらの方法³⁾に従った。

結果：糖原病 I a型20症例の遺伝子解析の結果、g727tのホモ接合体が17症例であった。2症例がg727t/R170Xのヘテロ接合体、1症例がg727t/G122Dのヘテロ接合体であった。このことより、検索した日本人糖原病 I a型患者40対立遺伝子の93%がg727t変異であり、5%がR170X変異であった。

g727t変異については、ビオチン標識したプローブを用いたASOハイブリダイゼーション法にて同定可能であった。またR170X変異は、PCRにて増幅したエクソン2 (259bp)をBspHIにて切断し149、110bpの断片を確認することで、同定可能であった。

正常47名94対立遺伝子を検索した結果、g727t変異は同定されなかった。

考察：今回の日本人糖原病 I a型の遺伝子検索より、g727t変異が、日本人における糖原病 I a型患者の対立遺伝子の93%を占める主要な変異であることが確認され、R170X変異も日本人に比較的多い変異であることが推測された。したがって、g727t

変異をスクリーニングすることによって、日本人糖原病 I a型患者の約85%を占めると考えられるg727tホモ接合体患者を同定することができる。さらにR170X変異の検索も合わせると、患者対立遺伝子の98%の遺伝子変異が同定できることになり、g727t変異のヘテロ接合体と同定された場合は、R170X変異を検索することで糖原病 I a型患者と保因者を高い確率で区別できると考えられた。今回の20症例の遺伝子変異頻度の結果からは、このスクリーニングの方法により日本人糖原病 I a型患者の95%が同定できることになる。

濾紙血からのDNA抽出法、ビオチン標識したプローブによるASOハイブリダイゼーションおよびPCR産物のPFLPによる遺伝子変異の同定方法については、多数の検体を扱うという点で大きな問題はなかった。

糖原病 I a型を早期診断することにより、早期に治療、生活管理を開始することのメリット、またこの疾患がSIDSの原因となりうる⁴⁾という点からも、糖原病 I a型をスクリーニングの意義はあると考えられる。しかし、日本人糖原病 I a型患者における変異遺伝子の頻度および地域による偏り等については症例数を増やして検討を要する。また、正常集団における遺伝子頻度を算出し、マススクリーニングとしての適応も今

後検討すべきであろう。

文献：

- 1) Lei,K-J. et al. Science; 262: 580-583, 1993
- 2) Kajihara,S. et al. Am.J.Hum.Genet.; 57: 549-555, 1995
- 3) Matsubara,Y. et al. B.B.R.C.; 171:498-505, 1990
- 4) Burchell,A. et al. Lancet;291-294, 1989



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: グルコース-6-フォスファターゼ(以下 G6Pase と略す)の欠損による糖原病 Ia 型は、常染色体劣性の疾患で、グリコーゲンの蓄積による肝腫大、腎腫大を認め、著しい低血糖とそれに伴う高乳酸血症、高脂血症、高尿酸血症などを呈する疾患である。

われわれは、日本人糖原病 Ia 型患者 20 症例に対して G6Pase 遺伝子異常について検討し、Kajihara ら(1995)により報告された日本人患者の主要な病因変異であるスプライシング異常を引き起こす 727 番目の塩基 G から T への置換が、患者 20 症例 40 対立遺伝子のうち 93%をしめることを確認した。このことより、g727t 変異をスクリーニングすることで日本人糖原病 Ia 型の患者変異の約 93%が同定できることが推測された。

スクリーニングには、濾紙血から抽出した DNA を PCR にて増幅し、ビオチンで標識した allele specific oligonucleotide(ASO)プローブを用いたハイブリダイゼーションで g727t 変異を同定する方法を用いた。正常 94 対立遺伝子のスクリーニングでは変異は同定されなかった。早期診断による早期治療、生活管理のメリット、SIDS の原因となりうる疾患であるという点で、スクリーニングの意義はあると考えられるが、正常集団での遺伝子頻度を算出し、マススクリーニングとしての適応は今後検討すべきであろう。