

氏 名（本籍） 小 川 英 伸

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 2461 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 9 月 9 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 58 年 3 月 25 日
北海道大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 21水酸化酵素欠損症（先天性副腎皮質過形成）患
児における遺伝子変異と臨床病型との関連

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 多 田 啓 也 教 授 今 野 多 助

教 授 成 澤 邦 明

論文内容要旨

【はじめに】

21水酸化酵素遺伝子には非常に相同性の高いA、B2種類の遺伝子があり、6番染色体短腕に存在している。活性蛋白をコードしているのはB遺伝子であり、A遺伝子は偽遺伝子である。従って、B遺伝子の致命的な異常により21水酸化酵素欠損症(21OHD)が発症する。B遺伝子上の異常としては、不均等交差から生じる欠失の他、A遺伝子との遺伝子変換による変異が重要と考えられている。即ち、21OHD患者では、A遺伝子を偽遺伝子化させている幾つかの塩基配列がB遺伝子上に認められることが知られている。そこで、以下の方法により当科で管理している21OHD患者におけるB遺伝子上の変異を検索し、主として臨床病型との関連について考察した。

【対象】

臨床的に21OHDと診断された患児24例(男児13例、女児11例)。病型の内訳は塩喪失型(SW)20例、単純男性化型(SV)4例である。

【方法及び結果】

(1) ゲノムDNAを用いたサザンブロット法:ゲノムDNAを制限酵素Taq I及びKpn Iにて消化、次いでサザンブロット法を用いナイロンフィルターにDNAを移行させ、B遺伝子を含むプローブでハイブリダイズした後、オートラジオグラフィーにより検出した。12例で検討したところ、1例でB遺伝子に相当するTaq Iでの3.7kb断片、Kpn Iでの2.9kb断片が欠失していた。

(2) PCR-Taq I法: Taq I切断部位を含むようにPCR法にて増幅した後、Taq Iで消化、次いでアガロースゲルに電気泳動し、エチジウムブロマイドで検出した。(1)で3.7kb、2.9kb断片を欠失していた症例では本法でもB遺伝子に相当する211bpの断片を欠失していた。同様の例がさらに一例認められ(24例中2例)、ともにSWであった。これらの症例はB遺伝子のいずれのアリールにも欠失あるいは広範囲な遺伝子変換などの異常があると判定された。本法はRIを用いずに短時間で検索でき、簡便で有用な方法と考えられた。

(3) ASOハイブリダイゼーション法:上記の方法ではB遺伝子上の大きな異常しかとらえられず、ほとんどの症例では小さな異常によりB遺伝子が失活していると考えられた。これまでのところそのような異常のほとんどは遺伝子変換により生じるとされている。そこでA遺伝子か

らの遺伝子変換により生じた B 遺伝子中の変異部位 7 ケ所（第 2 イントロン中の C/A→G 変異：I2g, 第 4 エクソン中の Ile→Asn 置換：E4_{IN}, 第 6 エクソン中の 3 つのアミノ酸置換：E6_{ss}, 第 7 エクソン中の T の挿入：E7_t, 第 7 エクソン中の Val→Leu 置換：E7_{VL}, 第 8 エクソン中のナンセンスミューテーション：E8_{non}, 第 8 エクソン中の Arg→Trp 置換：E8_{RW}）について変異の有無を検討した。PCR 法により B 遺伝子のみを増幅するため、第 3 エクソンの A 遺伝子では 8 塩基が欠損している部位にプライマーを設定した。増幅された B 遺伝子の塩基配列を持つ患者 DNA 中の変異の有無を、A 遺伝子と B 遺伝子の塩基配列に一致したオリゴヌクレオチドプローブ（A プローブ：変異プローブ、B プローブ：正常プローブ）を用い、サザンプロット法により検出した。(2)で異常を認めた 2 例はこのプライマーで増幅されなかったため、残る 22 例で検討した。I2g が病型を問わず最も多く（52%）変異を認めた。次いで、E8_{RW}が多かった（45%）。また、A プローブのみとハイブリダイズした症例は 11 例（50%）であり、E4_{IN}のみ SV でそれ以外は SW であった。

【ま と め】

以上の検索から、以下の結論を得た。

- 1 PCR-Taq I 法はサザンプロット法の代用となりうる簡便な検査法と考えられた。
- 2 24 例中 22 例（92%）で何らかの変異部位が見いだされた。
- 3 今回の方法のみで 21OHD と診断できたのは 13 例（54%）であった。
- 4 残存酵素活性がほぼ完全に障害されていると考えられる変異をもった症例は SW であり、臨床病型と遺伝子変異パターンとは関連があるものと思われた。
- 5 しかし、臨床表現型の異なる同胞例における変異パターンが同一であり、症状の出現に非遺伝的な要因が関与している可能性も否定はできない。

審査結果の要旨

21水酸化酵素遺伝子には非常に相同性の高いA, B2種類の遺伝子があり, 6番染色体短腕に存在している。活性蛋白をコードしているのはB遺伝子であり, A遺伝子は偽遺伝子である。従ってB遺伝子の変異により21水酸化酵素欠損症(先天性副腎過形成症)が発症する。本研究は, 臨床的に21水酸化酵素欠損症と診断された症例24例(塩喪失型20例, 単純男性化型4例)の遺伝子解析を行った成績である。分析方法にはサザンブロット法, PCR-Taq I法, ASOハイブリダイゼーション法が用いられた。その結果24例中22例(92%)に何らかの変異部位が見出された。変異としては12g(第2イントロン中のC/A→G変異)が最も多く(52%)認められ, 次いでE8_{rw}(第8エクソン中のArg→Trp置換)が45%に見出された。また残存酵素活性がほぼ完全に障害されていると考えられる変異もった症例は塩類喪失型であり, 臨床病型と遺伝子変異パターンとは関連があるものと推測された。

以上の研究は, 先天性副腎過形成症の中最も頻度の多い21水酸化酵素欠損症の遺伝子変異に関し有意義な知見を加えたものであり, 医学博士の授与に価するものと評価された。