

氏 名 (本籍) 菅 野 潤 子

学位の種類 博 士 (医 学)

学位記番号 医 博 第 2 5 4 9 号

学位授与年月日 平 成 20 年 3 月 25 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻 東北大学大学院医学系研究科
(博士課程) 医科学専攻

学位論文題目 *Glycine decarboxylase* 遺伝子の欠失は非ケトーシ
ス型高グリシン血症の病因となっている：Multi-
plex ligation-dependent probe amplification 法
による *Glycine decarboxylase* 遺伝子の欠失変異検
出系の確立と欠失スクリーニング

(主 査)

論文審査委員 教授 土 屋 滋 教授 松 原 洋 一

教授 石 岡 千加史 教授 張 替 秀 郎

論文内容要旨

<背景>

非ケトーシス型高グリシン血症 (nonketotic hyperglycinemia, NKH) は、血液や髄液中にグリシンが蓄積し、様々な神経学的症状を呈する先天代謝異常症で、常染色体劣性遺伝形式をとる。NKH の病因は、グリシンの主要な分解経路であるグリシン開裂酵素系 (glycine cleavage system, GCS) の遺伝的欠損である。NKH の臨床型は発症時期により、新生児型、乳児型の2型に分類される。大部分をしめる新生児型は、出生後数日以内に重度の筋緊張低下、呼吸障害などで発症し、その後けいれん重積、神経発達遅滞などを呈する重症型である。現在、NKH の遺伝子診断は、病因遺伝子の各エクソンの直接シーケンス法により行われている。

NKH には、*GLDC*、*AMT*、*GCSH* の3つの責任遺伝子が存在し、*GLDC* 変異によるものが最も多い。これまで、フィンランド人症例の70%に検出されたS564Iや白人の5%に見出されたR515S変異などの高頻度変異の報告があるが、殆どの患者の変異は当該家系にのみに見出される変異で、遺伝的異質性が高い。過去の包括的な変異解析の報告では、新生児型NKH患者の75%、乳児型NKH患者の83%で遺伝子変異が検出されているが、うち約半数は、1本のアレルのみしか変異が検出されていない。この状況から、従来の方法では検出不能な遺伝子変異の存在が示唆されてきた。一方、NKH患者の*GLDC*の複数のエクソンを含む大きな欠失の数症例が報告されている。以上から、*GLDC*の大きな欠失を網羅的に検出することがNKHの変異検出率の改善に有用ではないかと推察し、今回の研究を行った。

<目的>

GLDC 欠失の系統的検出によるNKHの変異検出率の改善。

<方法>

1組の隣接する1本鎖DNAプローブの結合反応を利用し、相対的な遺伝子コピー数を推定する方法であるMultiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法を用いた。*GLDC*のエクソン14を除く24個のエクソン部に特異的なオリゴDNAプローブを設計し、各エクソンの欠失を検出する系を確立した(イントロン13は、175bpと短いためエクソン14のプローブは設計しなかった)。確立したMLPA法を用い、新生児型NKHの2つの患者コホートにおいて*GLDC*の欠失のスクリーニングを行った。

<対 象>

臨床経過と生化学診断から NKH と診断された 65 家系。第一コホートは、過去に *GLDC*, *AMT*, *GCSH* のスクリーニングを従来のエクソン・シーケンス法で行い、*AMT* 陽性例を除いた新生児型 NKH の 45 家系。第二コホートは、バーミンガム小児病院から遺伝子診断が依頼された NKH の 20 家系。

<結 果>

第一コホートにおいて 90 の変異アレル中 16 アレル (18%) に、第二コホートにおいて、40 の変異アレル中 9 アレル (22.5%) に *GLDC* 欠失を検出した。検出した欠失は 14 種類、欠失の長さは様々で、1 個のエクソンのみの欠失から、全 25 個エクソンが欠失しているアレルも存在し、異質性に富んでいた。欠失を検出した 5 家系で欠失断端を同定した。5 家系のうち 2 家系では、断端は *Alu* 配列内に認めた。

<考 察>

GLDC における欠失は NKH の原因の約 20% を占めていた。*GLDC* の MLPA 法による欠失検索は、NKH 患者の遺伝子診断における変異スクリーニングの第一段階として有用で、遺伝子診断率の改善に寄与すると考えられた。また、*Alu* 配列による相同組み換えの促進が欠失の要因であることが示唆された。

審査結果の要旨

遺伝性疾患における遺伝子変異の多くは点突然変異やせいぜい数塩基の変異であり、その変異の検出には各エクソンの直接シーケンス法が広く用いられている。しかし、この方法は、広範囲にわたる遺伝子欠失が疑われる変異には、使用することができない。

非ケトーシス型高グリシン血症 (nonketotic hyperglycinemia, NKH) は、血液や髄液中にグリシンが蓄積し、様々な神経学的症状を呈する先天代謝異常症で、常染色体劣性遺伝形式をとる。NKH の病因は、グリシンの主要な分解経路であるグリシン開裂酵素系 (glycine cleavage system, GCS) の遺伝的欠損である。NKH の臨床型は発症時期により、新生児型、乳児型の 2 型に分類される。大部分をしめる新生児型は、出生後数日以内に重度の筋緊張低下、呼吸障害などで発症し、その後けいれん重積、神経発達遅滞などを呈する重症型である。NKH には、*GLDC*、*AMT*、*GCSH* の 3 つの責任遺伝子が存在し、*GLDC* 変異によるものが最も多い。過去の包括的な変異解析の報告では、新生児型 NKH 患者の 75%、乳児型 NKH 患者の 83% で遺伝子変異が検出されているが、うち約半数は、1 本のアレルのみしか変異が検出されていない。NKH 患者では、*GLDC* の複数のエクソンを含む大きな欠失の数症例が報告されていることから、*GLDC* の大きな欠失を網羅的に検出することが NKH の変異検出率の改善に有用ではないかと推察し、今回の研究を行った。

大きな欠失を検出するために使用した方法は、1 組の隣接する 1 本鎖 DNA プロープの結合反応を利用し、相対的な遺伝子コピー数を推定する Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法である。*GLDC* のエクソン 14 を除く 24 個のエクソン部に特異的なオリゴ DNA プロープを設計し、各エクソンの欠失を検出する系を確立し、臨床経過と生化学診断から NKH と診断された 65 家系について検索した。第一コホートは、過去に *GLDC*、*AMT*、*GCSH* のスクリーニングを従来のエクソン・シーケンス法で行い、*AMT* 陽性例を除いた新生児型 NKH の 45 家系、第二コホートは、パーミンガム小児病院から遺伝子診断が依頼された NKH の 20 家系であった。その結果、第一コホートにおいて 90 の変異アレル中 16 アレル (18%) に、第二コホートにおいて、40 の変異アレル中 9 アレル (22.5%) に *GLDC* 欠失を検出した。検出した欠失は 14 種類、欠失の長さは様々で、1 個のエクソンのみの欠失から、全 25 個のエクソンが欠失しているアレルも存在し、異質性に富んでいた。欠失を検出した 5 家系で欠失断端を同定した。5 家系のうち 2 家系では、断端は *Alu* 配列内に認めた。以上のことから、1) *GLDC* における欠失は NKH の原因の約 20% を占めていた、2) *GLDC* の MLPA 法による欠失検索は、NKH 患者の遺伝子診断における変異スクリーニングの第一段階として有用で、遺伝子診断率の改善に寄与することを明らかにした。MLPA 法は、今後、大きな欠失を伴う種々の遺伝子変異の検索に有効な手段であることが示された。

よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。