

厚生労働省精神・神経疾患研究委託費
筋ジストロフィーの治療と医学的管理に関する臨床研究

〈筋ジス臨床研究川井班〉

<http://www.pmdrinsho.jp/>

平成 16 年度 ワークショップ講演集

Duchenne 型筋ジストロフィーの遺伝子診断
—現況とその問題点—

日時:平成 16 年 9 月 11 日(土) 9:30~12:15

場所:全共連ビル別館1階 コンベンションホール

東京都千代田区平河町2-7-9

TEL 03-5215-9501

Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝子診断 ―現況とその問題点―

座長 石川 幸辰

09:30～09:40

1. Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝子診断

国立病院機構八雲病院小児科
石川 幸辰

09:40～10:55

2. Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝子解析とその現状

1) Multiplex PCR、MAPH法

国立病院機構八雲病院小児科
石川 幸辰

2) 定量サザンブロット、半定量PCR

国立病院機構東埼玉病院小児科
加藤 るみ子

3) RT-nested PCR/direct sequencing、DNA Micro-Array

神戸大学小児科
竹島 泰弘

4) FISH法

三菱化学ビーシーエル
遺伝子検査部染色体グループ
玉垣 誠

5) 総合討議

10:55～11:15 休 憩

座長 川井 充

11:15～12:15

3. Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝相談の実際とその倫理的問題点

東京女子医科大学小児科
大澤 真木子

Duchenne型筋ジストロフィー(DMD)の原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子が、1987年に発見されてからすでに17年が経過した [Koenig et al., 1987, 1988]。現在までに得られたジストロフィン遺伝子異常の知見を概観し、今後のDMD遺伝子診断の指針とすることを本ワークショップの目的とする。

DMD臨床診断のファーストチョイスは、針筋生検、開放筋生検を行ない、生検筋の免疫組織染色やウエスタン・ブロットによりジストロフィン蛋白異常を証明することであった。この侵襲的診断法と異なり、末梢血白血球由来DNAを出発材料とするジストロフィン遺伝子のエクソン欠失診断は、multiplex PCR [Chamberlain et al., 1988; Beggs et al., 1990] の開発により、現時点では60%の症例のエクソン欠失を証明することを可能とした。さらに、サザン・ブロット解析により、10%の希な欠失や重複が検出可能である。残り35%は、塩基置換によるナンセンス変異、フレームシフトを引き起こす微小欠失・挿入、スプライス部位の変異と考えられている。これらの解析を困難にしているのは、ジストロフィン遺伝子がヒト遺伝病原遺伝子では最大のそのサイズにある。ジストロフィンは、X染色体の0.1%を占め、2.4Mbにわたり79個のエクソンがゲノムDNA上に散在している。また、組織特異的な8種類のプロモーターを有している。初期の文献的考察 [Roberts et al., 1994] では、DMDでの変異の内訳は、欠失・重複:65%、ナンセンス変異:18%、微小欠失・挿入(フレームシフト):8%、スプライス部位変異:7%、ミスセンス変異:2%であった。これらのジストロフィン遺伝子異常を解析する方法としては、その解析出発材料により、末梢血白血球由来DNA (DNA-mediated)と末梢血リンパ球または、生検筋由来mRNAを逆転写して得られたcDNA(RNA-mediated)を解析する方法に分けられる。

DNA-mediatedな方法:SSCP (single strand conformation polymorphism) [Nigro et al., 1992; Kneppers et al., 1995]、heteroduplex法 [Prior et al., 1993] が報告されている。これらは、ジストロフィン遺伝子すべてのエクソンを検索しているわけではなく、当然、遺伝子変異の検出率は、10%程度である。一方、最近、全エクソン領域をスキャンし、半および全自動的に解析するシステム (mutation scanning)が報告されている。全自動DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography) [Bennet et al., 2001]、DOVAM-S (detection of virtually all mutation-SSCP) [Mendell et al., 2001]、SCAIP (single condition amplification/internal primer sequencing) [Flanigan et al., 2003]、DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) [Hofstra et al., 2004] などの大規模な解析システムであるが、本邦ではいずれも導入されていない。最近、Yanらは、multiplex PCR/MAPH (multiplex amplifiable probe hybridisation)/DOVAM-Sの3段階からなる解析システムを行うと、遺伝子変異の検出率は96%にもなると報告している [Yan et al., 2004]。内訳は、欠失:59%、点変異:29%、重複:5%、見逃された欠失:3%、変異なし:4%であった。点変異の内訳は、ナンセンス変異:49%、フレームシフト:42%、スプライス部位の変異:9%であった。

RNA-mediatedな方法:基本的には、RT-nested PCRをジストロフィンcDNA全領域で行う方法 [Roberts et al., 1990] ですでに確立されているが、歩行消失後の年長症例では、末梢血リンパ球からは十分なtranscriptが得られず [Whitlock et al., 1997]、10歳までのDMD症例が確実に解析可能な対象となる。また、mRNAを末梢血リンパ球より採取する場合には、数時間以内に処理する必要があるなどの制約もある。cDNAが得られれば、direct-sequencing of entire cDNA、Protein-Truncation-Test (PTT) [Roest et al., 1993] が可能である。

今後の課題:いづれの方法にしても、比較的長いDNA断片の直接シーケンスが必要となるので、外注可能なmultiplex PCR、サザン・ブロット解析を除き、解析は一部の研究施設、機関に限られる。平成14年度の川井班アンケートでは、自施設でmultiplex PCRなど遺伝子診断を行っているのは4施設のみであった。本邦では、未だ全エクソン領域をスキャンし、半および全自動的に解析するシステムは導入されておらず、mRNA由来cDNAの直接シーケンスが主流であることから、今後、これら施設でのシーケンス処理能力を増強、維持する必要がある。

文 献

1. Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G. Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 2000;28:605-9.
2. Beggs AH, Kunkel LM. Improved diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest* 1990;85:613-619.
3. Bennett RR, den Dunnen J, O'Brien KF, Darras BT, Kunkel LM. Detection of mutations in the dystrophin gene via automated DHPLC screening and direct sequencing. *BMC Genet* 2001;2:17.
4. Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 1988;16:11141-56.
5. Flanigan KM, von Niederhausern A, Dunn DM, Alder J, Mendell JR, Weiss RB. Rapid direct sequence analysis of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:931-9.
6. Hofstra RM, Mulder IM, Vossen R, de Koning-Gans PA, Kraak M, Ginjaar IB, van der Hout AH, Bakker E, Buys CH, van Ommen GJ, van Essen AJ, den Dunnen JT. DGGE-based whole-gene mutation scanning of the dystrophin gene in Duchenne and Becker muscular dystrophy patients. *Hum Mutat* 2004;23:57-66.
7. Kneppers AL, Deutz-Terlouw PP, den Dunnen JT, van Ommen GJ, Bakker E. Point mutation screening for 16 exons of the dystrophin gene by multiplex single-strand conformation polymorphism analysis. *Hum Mutat* 1995;5:235-42.
8. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-517.
9. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988;53:219-226.
10. Mendell JR, Buzin CH, Feng J, Yan J, Serrano C, Sangani DS, Wall C, Prior TW, Sommer SS. Diagnosis of Duchenne dystrophy by enhanced detection of small mutations. *Neurology* 2001;57:645-50.
11. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, Kunkel LM. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 1988;2:90-95.
12. Nigro V, Politano L, Nigro G, Romano SC, Molinari AM, Puca GA. Detection of a nonsense mutation in the dystrophin gene by multiple SSCP. *Hum Mol Genet* 1992;1:517-20.
13. Prior TW, Papp AC, Snyder PJ, Burghes AH, Sedra MS, Western LM, Bartello C, Mendell JR. Identification of two point mutations and a one base deletion in exon 19 of the dystrophin gene by heteroduplex formation. *Hum Mol Genet* 1993;2:311-3.
14. Roberts RG, Bentley DR, Barby TF, Manners E, Bobrow M. Direct diagnosis of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA. *Lancet* 1990;336:1523-6.
15. Roberts RG, Gardner RJ, Bobrow M. Searching for the 1 in 2,400,000: a review of dystrophin gene point mutations. *Hum Mutat* 1994;4:1-11.
16. Roest PA, Roberts RG, Sugino S, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 1993;2:1719-21.
17. Roest PA, Roberts RG, van der Tuijn AC, Heikoop JC, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. *Neuromuscul Disord* 1993;3:391-4.

