

## 4-2-5 成育遺伝研究部（疾患遺伝子構造研究室、遺伝子診断治療研究室）

### 1. 概要

受精・発生分化（胎児）・出産・成長発育（小児期・思春期・成年期）・生殖というヒトのライフサイクル（生活環）にそった総合的な医療が成育医療であり、遺伝 genetics はこのライフサイクルを回す基本的な仕組みである。過去四半世紀、遺伝情報を担う物質である DNA の解析技術が急速に進展し、医学・生物学分野に大きなインパクトを与えてきた。30 億の塩基対から成るヒトゲノムの全配列構造がほぼ決定された。しかし、ゲノムに存在すると推測される 2 万余の遺伝子の機能は未だ多くが不明であり、ゲノムの塩基配列に刻まれた情報を解読（デコード）することこそ、今日の遺伝学の最大課題である。

成育遺伝研究部は DNA 組換えなど分子生物学的手法の医学分野への普及・応用に努め、ヒト遺伝子の構造と機能について研究してきた。遺伝子の異常によって発症する遺伝病や小児腫瘍の責任遺伝子を探求し、患者に生じた変異を同定し、疾患責任遺伝子の機能と発現調節について解析してきた。また、配列情報など、蓄積されてきた膨大なバイオ情報の積極的活用を図り、情報技術（IT）の観点からのアプローチもとってきた。これらの研究成果は診断に役立ち、生化学的要因が明らかでない多くの遺伝病を責任遺伝子研究から解明する遺伝子発見戦略に資するものである。遺伝子情報と遺伝子工学技術に基づいた治療法の開発につながることを期待している。

成育遺伝研究部は疾患遺伝子構造研究室と遺伝子診断治療研究室の 2 研究室からなり、山田正夫部長、宮下俊之室長、田所恵子研究員の 3 名の職員で構成されてきた。宮下室長は北里大学医学部分子遺伝学分野教授に就任するため、平成 19 年 10 月末で退職した。研究分野と研究組織に対する長年の貢献に感謝する。後任の室長として小野寺雅史が遺伝子診断治療室長として平成 20 年 3 月 1 日付けで着任した。従来より、流動研究員や、外部からの医師・研究者・学生を受入れ、研究費による研究補助員の参加を得て研究を進めている。研究課題の多くは内外の研究室との共同研究である。これらの研究の推進に、厚生労働科学研究費補助金、文部科学省科学研究費補助金、国立研究機関原子力試験研究費などから支援をいただいた。感謝の意を表す。

### 2. 研究活動

#### 2.1 変異によるスプライス異常の生成とその是正

##### 2.1.1 従来の経緯

患者に生じた点突然変異がスプライスに影響し、スプライスパターンが変化した転写産物を生じるのは約 15%と言われていたが、最近ではもっと高頻度に影響すると推定され、実際、遺伝子サイズが大きくエクソン数の多い ATM や NF1 では約 50%にも達することが明らかとなっている。我々はこれまでも、遺伝子診断において RNA レベル解析の重要性を指摘し、臨床遺伝子診断に従事する関係者に注意を喚起してきた。一方、研究対象としてきた WT1 や PAX6 はスプライスが病態と関係する教科書例であり、また、DRPLA 研究から微細選択的スプライスの普遍性を導くなど、スプライスおよび選択的スプライスに深く関わってきた。さらには、NBCCS における PTCH 遺伝子解析でも、点突然変異によって異常スプライスを呈する例を見出して報告してきた。このような背景から、変異によるスプライス異常の解析と、その是正について研究を志向してきた。

##### 2.1.2 本年の結果

最近、各種の RNA 技術が注目されてきた。PTCH 変異によってスプライス異常を呈した自験例に加え、文献から抽出した同様の BRCA1 例、および当研究所他研究部の症例 CYP11A 例について、U7snRNA を用いる技法による異常スプライスの是正を検討した。PTCH 例では、第 3 エクソン終端位の G から A への塩基置換によって通常のスプライスドナー部位が使用されなくなり、その 37 塩基下流のクリプティック部位が使用される。BRCA1 例では、エクソン 16 の終端からイントロン側 6 番位の T から C への塩基置換によって通常のスプライスドナー部位が使用されなくなり、65 塩基下流のクリプティック部位が使用される。CYP11A 例では、エクソン 3 の途中の C から A への塩基置換によって、その部位がクリプティックスプライスドナー部位となることが判っている。これら 3 例について、それぞれ使用されるようになったクリプティックドナー部位の相補的配列を、U7snRNA を基本構造とする構築物に組み込み、発現できるプラスミドベクター系を構築した。これを、患者変異を持つミニジーン発現系とともに培養細胞株に導入し、生成する転写産物を解析した。PTCH 例では効率良く、BRCA1 例では一定の効率で、異常スプライスが是正されて通常スプ

ライスに復帰したが、CYP11A 例では当該エクソン全体をスキップする形となった。これらの結果を報告した (Uchikawa et al. 2007)。患者の細胞でこのような方法によって是正を図るには、操作対象細胞と時期の選別という一般的問題に加え、個別の変異ごとに相補鎖領域の設計と効果を評価する必要があり、直ちには実用化できない。しかし、RNA 技術によってスプライスを制御できることを実験系で実証した点に意義があり、エクソニック・イントロニックの各エンハンサー・サイレンサー、エクソン定義・イントロン定義など、スプライスに関与するシスエレメントが多数提唱されている中で、このような実験系を積み重ねることによって、それらの実態が解明されると考える。特に、変異によって破壊されるという「完全または無」的な考えではなく、ポテンシャルという量的な（さらには動的な）応答であることを示した点で重要である。

## 2.2 個体発生と発癌に関わるソニックヘッジホッグシグナル伝達経路とその異常

Sonic hedgehog (Shh) シグナル伝達経路はショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に保存されており、発生や発癌といった生理的、病的な生命現象において重要な役割を演じていることが明らかとなってきた。このシグナル伝達経路の亢進と抑制が原因で発症する以下の 2 疾患を対象に遺伝子解析を進め、遺伝子研究を展開してきた。

### 2.2.1 従来の経緯

母斑基底細胞癌症候群 (NBCCS) (Gorlin 症候群) は常染色体優性遺伝を示す神経皮膚症候群であり、高発癌性遺伝疾患でもある。我々は数年前より NBCCS 患者の遺伝子解析を行い、30 例以上で変異を明らかにしてきた。本疾患の責任遺伝子は Shh の受容体をコードする PTCH である。我々は PTCH 遺伝子研究を進め、ヒトおよびマウスにおける選択的スプライシングによるアイソフォームを解析し、発現パターンと蛋白質アイソフォームの機能について解析し、さらに、エクソン接合部オリゴヌクレオチドを搭載するマイクロアレイを開発して組織特異的スプライシングと NBCCS 患者にあるスプライシング異常の検出に応用した。

### 2.2.2 本年の結果

遺伝子解析症例数を重ね、非典型例について報告した (Tachi et al. *Pediatr Neurol.* 2007)。PTCH 遺伝子に相当程度の範囲の欠失をもつ 3 例について、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイによって欠失範囲を同定し、染色体切断と結合部位を塩基配列レベルで決定し、報告した (Fujii et al. *Hum. Genet.* 2007)。結果的に 3 例はそれぞれ、165kb、5.3Mb、11.0Mb の欠失が一方のアレルに生じていた。NBCCS は、基本的には PTCH 遺伝子のハプロ不全によるとされるが、患者の病態 (経過、応答を含む) は広範であり、遺伝子型と表現型 (病態) との対応付けが求められている。特に、相当範囲の欠失例では、PTCH 遺伝子に加え、隣接する遺伝子の効果も加乗される。実際現在のヒトゲノム地図によれば、165kb 欠失例では PTCH 遺伝子のみ、5.3Mb 欠失例では 62 遺伝子、11.0Mb 欠失例では 115 遺伝子が半量となると推定される。したがって、このように欠失領域を塩基配列レベルで明らかにすることは、遺伝子病態に基づく表現型の区分に貢献するものである。さらに、染色体欠失の形成における分子メカニズムの解明にも貢献するものである。なお、この解析過程で当該領域に 21bp、33bp の微細欠損を見出したが、これらはこれまで明確には記載されることがなかった indel 多型であった。

全前脳症 (Holoprosencephaly; HPE) は大脳の奇形では最も頻度が高く、自然流産の 200 例中 1 例、16,000 出生例中 1 例に認められる。これまでに SHH 等の遺伝子変異が見出されており、Shh シグナル伝達経路の異常が関与していると推定されるが、詳細な発症機構は不明な点が多い。我々は全前脳症の症例を集め、遺伝子解析を行ってきた。その 1 症例は、高密度オリゴヌクレオチドマイクロアレイによってある染色体領域に微小欠失を有していることを見出した。この新規欠失領域に存在する遺伝子をヒトゲノムマップから抽出し、候補の可能性を検討した。最有力候補について遺伝子の機能等を解析し、脳形成への関与、さらには全前脳症との関係を追求している。

## 2.3 疾患責任遺伝子の選択的スプライスと発現・機能解析

### 2.3.1 従来の経緯

ウィルムス腫瘍遺伝子 WT1 の変異、日本人ウィルムス腫瘍における高頻度ヘテロ接合性喪失、WT1 の転写調節機能、さらに WT1 の発現・機能への p53 の密接な関与を見出し、また歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、眼・腎等の形成不全症について責任遺伝子を研究してきた。昨年度は、眼科東医長との共同研究で、PAX2 変異をもつことが多いとされる視神経異常を示す眼疾患で見出した PAX6 変異について、その作用機序を探るべく研究を進めた。各種の眼形成不全症で同定した変異型 PAX6 が PAX2 や WT1 を転写調節すること、また PAX6 と PAX2、WT1 の遺伝子間相互の

転写制御を見出している。PAX6はpaired (NとC)、homeoの3種類のDNA結合部位と転写活性化ドメインをもつが、各種の眼形成不全症患者で同定した11種類の変異型PAX6は、アイソフォームの違いや変異の部位によって、これらDNA結合部位に対する転写調節能が大きく変動し、各ドメインが互いに影響し合うことが分かった。さらにPAX6とPAX2、WT1の遺伝子間相互転写調節について検討した結果、PAX6は内在性のPAX2とWT1の発現を用量依存性に早発誘導し、プロモーター活性も亢進させたが、エクソン5aを含むアイソフォームにはその作用はなく、アイソフォーム特異的な発現制御であることが分かった。PAX2は内在性のPAX6発現やプロモーター活性を遅発抑制し、WT1の発現も抑制した。WT1の各アイソフォームはPAX2やPAX6のプロモーター活性を抑制したが、内在性の発現は各アイソフォームにより遅発あるいは早発誘導されることが分かった。

### 2.3.2 本年の結果

引き続き上記結果の確立を目指すとともに、クロマチン免疫沈降によりPAX6が*in vivo*でアイソフォーム特異的にPAX2プロモーター領域に結合することを証明した。さらにPAX6が転写制御する領域を、欠質変異プロモーターCATレポーター解析により絞り込み、PAX6が結合すると予想されるPAX2プロモーター配列に*in vitro* PCR-mutagenesisにより変異を導入することで、PAX6結合部位のうち少なくとも1ヶ所を同定した。

PAX6は眼や脳の形成に、PAX2は視神経や腎の形成に、WT1は泌尿生殖器系の発生・分化、最近では網膜の発生に関わるとされる。発生・分化時に作動する転写調節因子の変異と多様な病態の関連、形態形成におけるPAX、WT1、p53などの転写調節因子相互の新たなネットワーク、PAX6による網膜神経への分化誘導のメカニズム、さらにアポトーシスや腫瘍発生過程におけるPAX遺伝子群の役割に発展させ、疾患の解明・診断治療の基礎研究として役立てたいと考えている。

## 2.4 バイオ研究における情報技術 Information Technology の活用

医学・生物学の研究分野でもコンピュータに代表される情報技術は必須なツールとなってきた。特に、ゲノム塩基配列情報をはじめとする膨大なバイオ関連情報が蓄積され、インターネットで公開されるようになった。バイオ情報を扱うバイオインフォマティクス分野は実験科学者に様々な手段を提供してくれている。エンドユーザとしては大変有用であるが、それを超えてバイオ情報に直接アクセスすると、蓄積データと現実との間には大きな溝があることに気づかされる。実験科学の立場からバイオインフォマティクスとの密接な相互関係樹立の仲介を図っている。

### 2.4.1 微細選択的スプライス

選択的スプライスは、一定数の遺伝子から多様な蛋白質を生成する機構の1つとして重要である。我々は、報告されたDRPLA cDNA配列間に微細な差異があることを契機とし、近隣に位置する2ヶ所のスプライス部位で二者択一する選択的スプライスは普遍的であることを見出し、報告した(2005)。Hillerらは、バイオインフォマティクス解析からエクソン先頭にNAGNAG構造が多いことを見出し、同様の結論に至った(2004)。NAGNAG、“subtle alternative splicing” “wobble alternative splicing”などと呼ばれるこの現象はホットなトピックスとなり、周辺塩基配列解析、新規例の報告が次ぎ、実験解析も報告されるまで拡大してきた。研究コミュニティーにおける1つのハブとしてこの進展に寄与してきた。この現象はスプライスの分子機構解明に資すると期待されると同時に、患者に生じた突然変異によってスプライス異常を呈する場合の予測の点で、臨床診断に還元できる成果であると考えており、その方面の進展を図っている。研究部における実験的解析については1に記載した。

### 2.4.2 その他のバイオ情報解析

微小な欠失/挿入(indel)やコピー数多型についてのデータの収集・解析、文献の関連付けを進めた。配列情報から機能解析に取り組んだ。

### 2.4.3 科学計量 (scientometry)

科学計量の方法論やその統計量について検討し、実験科学の立場からこの分野の討議に参加している。