



Title	Carrier detection of Werner's syndrome using a microsatellite that exhibits linkage disequilibrium with the Werner's syndrome locus
Author(s)	木原, 幸一
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38982">https://hdl.handle.net/11094/38982</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	木原 幸一
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 11791 号
学位授与年月日	平成7年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	Carrier detection of Werner's syndrome using a microsatellite that exhibits linkage disequilibrium with the Werner's syndrome locus (マイクロサテライト遺伝子を用いたウェルナー症候群患者の保因者診断に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男
	(副査) 教授 高井新一郎 教授 田中亀代次

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

遺伝性早老症の一つであるウェルナー症候群(WS)は、常染色体劣性の遺伝性難病である。WSの病因解明のため分子遺伝学的研究が進められ、原因遺伝子座位は、約2年半前決定されたが、原因遺伝子そのものは、未だ単離されていない。患者の平均寿命は50歳前後であり、死因の大部分は間葉系の悪性腫瘍と動脈硬化による心血管系疾患である。今回、WS座位に近接しているマイクロサテライト多型であるD8S360, D8S339とANK1を利用してWS家系を解析し、WS座位付近の遺伝子地図を詳細に決定するとともに、WS家系における遺伝子診断法の確立を目的として研究を行った。

#### 【方法】

- (1) WS家系と患者：25家系の日本人家系に由来する36名の構成員を対象とした。20家系では、イトコ婚患者とふたイトコ婚患者のみを解析した。2家系は複雑な近親婚家系で、患者のみを解析した。残りの3家系は、患者、健常な同胞と両親を解析した。保因者診断を行ったのは2家系であるが、O家系の両親はイトコ婚で、H家系は近親婚患者であるかどうか不明であった。すべての患者は、WSの診断基準を満足していた。
- (2) DNA抽出とPCR：高分子量DNAは、抹消血白血球より抽出した。マイクロサテライト多型は、第8染色体短腕のANK1, D8S339とD8S360を使用した。この3種の遺伝子座位の順序は、第8染色体動原体-ANK1-6 cM-(D8S339, WS)-11.5cM-D8S360-染色体末端であるが、D8S339とWSの遺伝子順序は不明であった。それぞれの多型に対応するPCR用プライマーを合成し、片方のプライマーを<sup>32</sup>Pで標識した。PCRを行った後、塩基配列決定用のゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィーで出現したバンドの長さを測定し、対立遺伝子の種類を決定した。
- (3)連鎖分析と連鎖不平衡：患者と家系の構成員の遺伝子型をコンピュータープログラム「LINKAGE ver. 5.1」で解析した。イトコ婚患者では、患者のみの遺伝子型を入力した。WS変異遺伝子の一般集団での遺伝子頻度は、0.004とした。3種のマイクロサテライト多型の健常人での対立遺伝子の頻度は、50人の血縁関係のない健常人を解析して算出した。連鎖不平衡の有無は、患者と健常人の対立遺伝子の頻度を $\chi^2$ 検定を用いて統計的な検討を行った。

#### 【成績】

対立遺伝子頻度と二点連鎖分析：25家系の患者の遺伝子型を調べると、D8S339ではイトコ婚患者の1人だけがヘテロ接合性であり、他の全員がホモ接合性であった。25家系中、明かな遺伝子組み換えは1家系に存在したことにな

る。25家系分のロッド値を集計すると、組み換え率 ( $\theta$ ) = 0.001の時、最大のロッド値 = 18.29を示した。以上より、D 8 S339は WS 座位に最も近接した DNA マーカーの一つであることが判明した。連鎖不平衡の検定では、遺伝子型がホモ接合性を示した24人の患者では、1本の染色体を選び出し、ヘテロ接合性を示した1人の患者では2本の染色体を選び出した。D 8 S339の174bp の対立遺伝子 G の遺伝子頻度は、一般集団では13%であるが、WS 患者では50%であった。したがって、D 8 S339は WS 座位と強い連鎖不平衡を示す遺伝子マーカーであることが証明された ( $P < 0.005$ )。

WS 家系のハプロタイプ：WS の 2 家系の 8 人の構成員の各染色体について 3 種の遺伝子マーカーでハプロタイプを作成した。両親がイトコ婚である O 家系では、3 人兄弟の第 1 , 2 子が患者であったが、2 人の患者の共通のハプロタイプ D (D 8 S360) - G (D 8 S339) - A (ANK 1) のホモ接合体であった。第 3 子は、D - G - A のハプロタイプを受け継いでいないが、保因者である可能性は否定できなかった。近親婚の証明されない H 家系では、3 人兄弟の第 1 , 2 子が患者であるが、変異遺伝子と連鎖するハプロタイプは、E - G - D と C - G - D である。ハプロタイプを詳細に検討した結果、第 2 子は D 8 S360 と D 8 S339 の間と、D 8 S339 と ANK 1 の間の間の 2 ケ所で遺伝子組み換えが生じたと考えられた。第 3 子は変異ハプロタイプである C - G - D を母から受け継いでおり、保因者であることが判明した。

#### 【総括】

- (1) WS 家系での連鎖分析の結果、D 8 S339は WS 座位に最も近接した遺伝子マーカーの一つであると考えられた。
- (2) D 8 S339 と WS 座位との間で連鎖不平衡が証明されたことにより、D 8 S339 と WS 座位の物理的距離は数100kb 以内であると考えられた。
- (3) WS 座位に最も近接する D 8 S339 と、WS 座位を挟む D 8 S360 と ANK 1 の 3 種の多型性 DNA マーカーを用いて家系の遺伝子診断を行った結果、WS 保因者の診断が可能であった。この診断法は究めて高い精度であることを確認した。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は遺伝性早老症の一つであるウェルナー症候群 (WS) の遺伝子座位を詳細に決定するとともに、WS 家系における遺伝子診断確立を目的としたものである。常染色体劣性の遺伝性難病である WS の病因解明のため分子遺伝学的研究が進められ、原因遺伝子座位は 2 年半前に第 8 染色体短腕 (8 p11.2-p22) 決定されたが、原因遺伝子そのものは未だ単離されていない。

本研究により組み換え率 ( $\theta$ ) = 0.001の時、最大のロッド値 = 18.29を示した D 8 S339 は今まで報告されたなかで WS 座位に最も近接した DNA マーカーの一つであることが判明した。また連鎖不平衡の検定から患者で多い対立遺伝子 G (174bp) の遺伝子頻度は、一般集団では13%であるが、WS 患者では50%であったことから D 8 S339 は WS 座位と強い連鎖不平衡を示す遺伝子マーカーであることが証明された。このことから D 8 S360 は WS 座位から数100 kb の位置に存在するものと考えられ、さらに我々の研究が WS 座位に近づいたと考えられる。

また保因者の検定ではホモ接合体の WS の患者は容易に臨床診断できるが、ヘテロ接合体の WS 保因者は臨床的に診断困難である。本研究では WS 座位に最も近接する D 8 S360 と、WS 座位をはさむ D 8 S339 と ANK 1 の 3 種の多型性 DNA マーカーでハプロタイプを作成して、受け継いだハプロタイプを考察の結果、保因者かどうかの判定が可能になった。この診断法は極めて高い精度と考えられた。これらの結果は WS 原因遺伝子の解明上重要な手がかりとなることが示唆され、さらに遺伝子診断の端緒をつかめたのは大変重要なことである。したがって、本研究は学位授与に値すると認める。