



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Characteristics of dynamic mutation in Japanese myotonic dystrophy                                                                              |
| Author(s)    | 山縣, 英久                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1995, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39649">https://hdl.handle.net/11094/39649</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           | 山 縣 英 久                                                                                              |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 ( 医 学 )                                                                                          |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 2 0 1 1 号                                                                                        |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 7 年 5 月 1 6 日                                                                                    |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第2項該当                                                                                         |
| 学 位 論 文 名     | Characteristics of dynamic mutation in Japanese myotonic dystrophy<br>(日本人筋緊張性ジストロフィー症における動的突然変異の特徴) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 荻原 俊男<br>(副査)<br>教 授 柳原 武彦      教 授 高井新一郎                                                |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目 的】

筋緊張性ジストロフィー症 (myotonic dystrophy 以下MyD) は、筋緊張、筋萎縮を主症状とする常染色体優性の遺伝病である。最近、ポジショナルクローニングの手法により第19染色体長腕19q13.3 に存在するMyDの原因遺伝子 cDNAが単離同定された。白人では、この遺伝子 (DMPK) の3' 側にある非翻訳部に存在する (CTG) 反復配列がMyD患者において異常に伸張している。家系についてみると、世代を経る毎に (CTG) が長くなり、症状は重症化し、発症年齢も早まる傾向がみられ、臨床所見から説明されていた表現促進 (anticipation) の間接証明となった。今回われわれは、日本人MyD患者における実態を調べるために、多数家系を使ってこの領域を遺伝子解析し、臨床所見と比較検討した。

### 【方 法】

#### (1) サザンハイブリダイゼーション法

日本人MyD家系 (西日本を中心として収集した93家系 構成員 312名, うち患者 196名) の白血球由来の高分子量DNAをEcoRI, BglII, PstI により消化した後、アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロンフィルターにサザンブロッティングした。次に原因遺伝子の cDNAであるp5B1.4 (cDNA25) を用いて、ハイブリダイゼーションを行い、出現したバンドから (CTG) 反復配列の伸張した長さを算出した。さらに84組の親子例 (父子間: 44組, 母子間: 40組) で、親子間の (CTG) の長さを比較した。

#### (2) PCR法

(CTG) 反復配列部分の長さを測定するために、5' 側プライマーDM101 (CTTCCCAGGCCTGCAGTTTGCCC ATC) 及び3' 側プライマーDM102 (GAACGGGGCTCGAAGGGTCCTTG TAGC) を用いてPCR法にて増幅した。反応条件は、95℃ 1.5分: 62℃ 1分: 72℃ 2分を1サイクルとして、サイクル行った。ゲノムDNAは約20ng, 各プライマーは50pmol, DM101 の5' 末端を [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATPで標識したプライマー 0.5pmol, Tth DNA polymerase (TOYOBO) を1U使用し、反応容積を25  $\mu$  lとした。6%変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動

し、オートラジオグラフィーを行って (CTG) 反復配列数を決定した。

#### 【成績】

サザン法の結果、MyD 患者のみに (CTG) 反復配列の異常な伸張がみられ、そのサイズは 0.15 – 8.7kb (反復数 50 – 2900 回) であり、健常者は反復数 5 – 35 回であった。(CTG) のサイズと発病年齢の間には強い負の相関関係が認められた ( $r = 0.587$ ,  $p = 0.0001$ )。また、発病年齢を先天型、若年型、成人型、軽症型の 4 つに分けて各群間のサイズを比較したところいずれも有意差があり、これまで白人で報告されているように、日本人においても伸張した長さが長い程、症状は重症で発症年齢も早いことが確認された。しかし、軽症型を除いてばらつきが多く、サイズから発病年齢を予測することは困難であった。親子間のサイズを比較すると、親に比べ子供では長さが増加する傾向にあり分子レベルにおいて anticipation を支持する結果となった。例外的に 2 組の父子間で長さの短縮が認められたが、その内 1 組は長さの縮小にもかかわらず発病年齢は子供の方が早かった。父子間と母子間で拡大の比率を比較すると、母子間の方が反復配列の長さが長くなる傾向が強かった。新しい突然変異に及ぼす両親の加齢の影響 (parental age effect) をみるため、伸張した反復配列の長さで出生時の親の年齢との間の相関を調べたが、有意な相関関係は見出せなかった。

#### 【総括】

MyD は、プロテインキナーゼ (DMPK) 遺伝子の (CTG) 反復配列の異常な伸張と関係している。多数の日本人 MyD 患者を遺伝子解析し、白人での報告と同様の傾向を確認した。MyD 患者の出生前診断、発症前診断、確定診断はサザン法と PCR 法により確実に行えるため、DNA 診断は今後普及し、また MyD の診断基準の 1 つとして重要となってくるものと思われる。今回示したデータは、遺伝相談や疾患の進行の将来予測に対して資料となる基礎的なデータとなるものと期待される。

### 論文検査の結果の要旨

筋緊張性ジストロフィー症 (DM) は、プロテインキナーゼ (DMPK) 遺伝子の (CTG) 反復配列の異常な増幅と関係している。本研究者は、93 家系構成員 312 名 (内、患者 196 名) の日本人 DM 家系を全国レベルで収集し、発病年齢や臨床症状をもとに (CTG) 反復配列を遺伝子解析し、臨床型と遺伝子型の関係を比較検討した。その結果、(CTG) のサイズと発病年齢との間に強い負の相関関係が認められること、ばらつきのためサイズから発病年齢を予測することは困難なことが確認された。また、親子間のサイズを比較すると、親に比べ子供では長さが増加する傾向にあり、母子間の方が父子間より増加の程度が顕著であること、増加の程度は親の加齢とは相関しないことが見出された。

本研究は、本邦における DM の DNA 診断、特に出生前診断、発症前診断、確定診断などの基礎的データを提供するとともに、遺伝相談や疾患の将来予測に対して資料となるという点で貴重な研究であり、学位の授与に値すると考えられる。