



Title	Genetic Association between Chromosome 8 Microsatellite (MS8-134) and Werner Syndrome (WRN) : Chromosome Microdissection and Homozygosity Mapping
Author(s)	叶, 林
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40051">https://hdl.handle.net/11094/40051</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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	葉 林
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 13026 号
学位授与年月日	平成9年3月25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	Genetic Association between Chromosome 8 Microsatellite (MS8-134) and Werner Syndrome (WRN) : Chromosome Microdissection and Homozygosity Mapping (第8染色体のマイクロサテライト遺伝子であるMS8-134とウェルナー症候群原因遺伝子の遺伝的関連：染色体顕微切断法とホモ接合性マッピング)
論文審査委員	(主査) 教授 荻原 俊男  (副査) 教授 田中亀代次 教授 高井新一郎

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ウェルナー症候群(WRN)は、成人期に老化症状を呈する常染色体性劣性の遺伝病である。患者は30歳代に白内障、動脈硬化、白髪、性腺機能低下、糖尿病などの症状で診断され、40歳代後半に悪性腫瘍や動脈硬化性疾患が原因で死亡する。患者の皮膚線維芽細胞の増殖は遅延し、継代寿命も短い。原因遺伝子が不明であるが、原因遺伝子座位は、家系の連鎖分析の結果、第8染色体短腕に決定された。本研究で、WRN領域の詳細な遺伝子地図を作成するために、染色体顕微切断法で目的とするWRN領域を切り出し、8個のマイクロサテライト遺伝子を単離した。次に主として近親婚患者の遺伝子型を決定し、WRN座位に近接する遺伝子を見つけだした。

#### 【対象】

厚生省特定疾患「ホルモン受容体機構調査」研究班作成の診断基準を満たす患者30名を解析した。うち29名は、イトコ婚を中心とした近親婚患者であった。近親婚である27家系については患者である発端者のみを解析した。残りの3家系については、患者を含めた家系の構成員も解析した。

#### 【方法】

(1)DNA抽出とPCR：高分子量DNAは末梢血白血球より抽出した。PCRでは、DNAサンプルを毛細ガラス管に封入し、温風を循環させる装置を使用したため、全反応時間は40分以内であった。遺伝子型の決定は、8×7cmのミニサイズのポリアクリルアミドゲル電気泳動を用い、エチジウムブロマイドによりゲルを染色し出現したバンドを解析した。PCR産物の長さを100bp前後とすると、2bpの長さの相違が確認できた。

(2)マイクロサテライトマーカーの単離：8p11.2-p12付近のWRN領域を染色体顕微切断法で切り出し、プラスミドライブラリーを作成した。このライブラリーから(CA)反復配列をもつマイクロサテライト多型を単離し、合計160個のクローンの塩基配列を決定したが、うち30個のクローンでプライマーの塩基配列が決定できた。PCRの条件を決定後、血縁関係のない50名の健常な日本人と、CEPH家系の54名の両親を白人の健常者として解析に用いた。最終的に、24個のクローンが遺伝的多型性を示した。これらのクローンについては、多型性の有無と、対立遺伝子の長さとの頻度を決定した。さらに、ヒト・マウスの雑種細胞で染色体座位を決定し、CEPH家系を用いて連鎖分析することにより連鎖地図を完成させた。連鎖分析には、コンピュータプログラム「LINKAGE」を使用した。24個のうち8個のクローンが第8染色体に存在することを確認した。

(3)遺伝子型の決定：上記の方法で決定された第8染色体のWRN遺伝子座位近傍のマイクロサテライト多型はD8S360 (MS8-8), D8S1053 (MS8-109), D8S1054 (MS8-156), D8S1055 (MS8-134), D8S1180 (MS8-2), D8S1181 (MS8-10), D8S1182 (MS8-11), D8S1183 (MS8-171), であった。この遺伝子マーカーを用いて, WRN家系の遺伝子型を決定した。近親婚患者で, ホモ接合性となる頻度の高い遺伝子マーカーについては, 32Pで標識したプライマーを用いてPCRを行い, 塩基配列決定用のゲルでPCR産物の長さを正確に決定した。

#### 【研究結果, 考察】

MS8-2, 8, 10, 11, 109, 134, 156, 171の計8個のマイクロサテライト多型のヘテロ接合性となる率を健常人と近親婚患者の間で比較した。MS8-134においては, 健常人群ではヘテロ接合性となる率が0.67であったが, 患者群では0.00であった。そこで, このマーカーについて, 健常人の50名で各対立遺伝子の遺伝子頻度を算出し, 30家系の患者での遺伝子型を決定した。その結果, 30家系の患者全員はホモ接合性を示し, 明らかな遺伝子組み換えは認めなかった。ロッド値は, 組み換え率( $\theta$ )=0.00において, 最大のロッド値( $Z_{max}$ )=20.28を示した。さらに, 対立遺伝子C (99bp)は, 健常人群での遺伝子頻度は0.22であったが, 患者群では0.50であり, 統計学的に有意差( $P<0.01$ )が証明された。創始者効果の存在が示唆された。次に, このマーカーを中心にして, YACクローンとP1ファージで詳細な遺伝子地図を作成した。

イトコ婚患者は, 曾祖父母のどちらの一方が, WRN変異遺伝子をヘテロ接合体を持つ。このWRN変異遺伝子は母方と父方を經由して,  $1/16$ の確率でホモ接合体となる。ホモ接合体となれば必ず発症することになる。したがって, WRN遺伝子の近傍の遺伝子は, 他の領域に比べホモ接合性となる確率が高い。原因疾患が不明である遺伝病の解析法は, まず連鎖分析で遺伝子座位を決定することにより数cMの領域まで原因遺伝子座位を狭め, さらに連鎖不平衡の原理を利用して数100kbの領域まで狭めるポジショナルクローニングの手法を用いる。今回の解析では, MS8-134のハプロタイプで, 強い連鎖不平衡を認めた。したがって, これらの遺伝子領域から数100kbの範囲にWRN遺伝子が存在する可能性が高い。

#### 【総括】

(1)WRN家系での連鎖分析の結果, MS8-134はWRN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)MS8-134とWRN座位との間で連鎖不平衡が証明されたことより, MS8-134とWRN座位の物理的距離は数100kb以内であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

ウェルナー症候群(WRN)は, 20歳代より老化症状が出現し, 50歳以前に動脈硬化, 悪性腫瘍などを合併して死亡する代表的な遺伝性早老化症の一つである。この疾患の原因遺伝子を単離同定すれば, 老化機構や発癌機構が明らかになると考えられる。

本研究では, 分子遺伝学的手法であるポジショナルクローニングの手法を用いて, WRN患者を詳細に解析し, WRN症候群遺伝子領域に近接する遺伝子マーカーを見出し, 正確なWRN領域の遺伝子地図を作製した。今回の研究で, 特定の領域の染色体顕微切断法, ホモ接合性マッピング, マイクロサテライト多型の利用は, ポジショナルクローニングにとって有用な方法であることを証明した。本研究は学位の授与に値すると認める。