

# 平成29年度病院医学教育研究助成成果報告書

報告年月日	平成30年 4月 6日
研究・研修課題名	脊髄小脳変性症の遺伝子解析の院内導入
研究・研修組織名 (所属)	検査部
研究・研修責任者名 (所属)	松田親史 (検査部)
共同研究・研修実施者名 (所属)	長井篤 (検査部)、三島清司 (検査部)

## 目的及び方法、成果の内容

### ① 目 的

遺伝性脊髄小脳変性症 (SCA) は、CGC などの3塩基の繰り返し配列が、あるリピート数以上に伸張することによって発症する厚生労働省指定の難病である。脊髄小脳変性症は遺伝性と非遺伝性があり、脊髄小脳変性症の約 1/3 が遺伝性である。遺伝性は遺伝様式により、優性遺伝性と劣性遺伝性に分かれる。

遺伝性と、非遺伝性の区別は、多くは症状や画像検査によって可能である。そのため、症状や画像検査などから特徴がそろっている場合は、両者の区別のための遺伝子検査は必ずしも必要としない。

しかし、一部、両者の区別が難しい場合があり、特に皮質性小脳萎縮症という診断の場合は、症状や画像検査だけでは遺伝性との区別が困難である。また遺伝性脊髄小脳変性症の正確な病型診断には、遺伝子検査が必要な場合がある。

脊髄小脳変性症の症状は運動に関係した脊髄や小脳の神経が変性する難病で、歩行時のふらつき、めまいなどの症状からはじまり、重症になると寝たきりになる。さまざまなタイプがあるため、分類や診断はむずかしいが、厚生労働省の調査によると、10万人に対して5~10人程度の患者がいると推定されている。現在はふらつきの症状を軽くする薬が開発されているものの、発病の仕組みはよくわかっておらず、根本的治療法は見つかっていない。しかしリピート数が多いものほど発症年齢が早く、重症化しやすいため、これらのリピート数を調べることにより、対象患者の発症年齢、重症度、臨床型、患者さんの予後について推定可能となる。疾患の原因となる遺伝子異常が解析できれば、予測される症状に合わせたケアや効果的な治療方法、リハビリテーション、社会的サポートを選択することによって患者さんの症状を改善あるいは消失させ、患者さんのQOL/ADLの向上に寄与できる可能性がある。さらに先進医療として行うことにより病院の増収に寄与できるものと考え。また、技術習得、検査体制を構築することにより遺伝子検査技術の向上ができ、他検査項目の院内導入に発展させる可能性を秘めていると考える。

このような背景から当院において先進医療として検査を実施できる体制を構築することが本研究の目的である。

### ② 方 法

現在、これまで同定されている10の遺伝子 (*ATXN1, ATXN2, ATXN3, CACNA1A, ATXN7, TXN8/ATX8OS, PPP2R2B, TBP, ATN1, BEAN*) については Multiplex PCR 法が報告されており、本法による遺伝子検査の実施について本院医の倫理委員会の承認を得た。Multiplex PCR 法による測定手順を確立したものの、陽性症例がなかったため、既に Multiplex PCR 法による本検査を実施している先進大学とデータの相関をとり、そこから補正值を求めてリピート数を求める方法をとった。また、フラグメント解析技術を習得するために当検査部で所有するシーケンサーのメーカー担当者を病院に招きその手法およびフラグメントの読み方について指導を受けた。

実際の手技は、当院で同意書が得られた6名の患者末梢血からDNAを抽出し、本院と先進大学の双方で解析を行い、結果を比較検討した。

本院での測定はPCRには1.0U LA Taq polymerase (TAKARA)、1X C Buffer I (Mg<sup>2+</sup>plus; TAKARA)、各プライマー、400µM dNTP を使用し、100ng ゲノム DNA を含む最終容量 25µL で行った。SCA7は増幅効率を上げるため、Multiplex A に DMSO を最終濃度 4% となるように加えた。

サーマルサイクラーを用いて、温度条件を初期変性 95°C で 5 分間行い、続いて変性に 95°C で 1 分間、アニーリングは 56°C で 2 分間、伸長反応は、68°C で 1.5 分間を 32 サイクル行い、最後の伸長を 68°C で 10 分間行った。DNA フラグメント解析は 5 倍希釈した 2.0μL の PCR 産物および 0.5μL の GS500-LIZ サイズスタンダード (Applied Biosystems) を 20μL のホルムアミドに加え、95°C で 2 分間変性させた後、直ちに氷冷した。変性後の試料を ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により キャピラリー電気泳動を行った。解析モジュールには“Fragment Analysis36 POP-4”を使用した。得られたスペクトルは GeneMapper software (Applied Biosystems) を用いて DNA フラグメント解析を行った。DNA フラグメント解析では GS500-LIZ サイズスタンダードと比較することにより、各アレルのフラグメントサイズを求めた。

(参考文献 石毛ら Multiplex PCR および Repeat-primed PCR による優性遺伝性脊髄小脳失調症 10 病型の遺伝学的検査)

### ③成 果

先進大学 (A 大学) との比較を下に示す。A 大学のレポート数と、補正を行う前のフラグメントサイズより算出した当院のレポート数である。

表 1 先進 A 大学との比較 (補正前)

	回	1		2		3		4		5		6	
		島根大学	A大学	島根大学	A大学	島根大学	A大学	島根大学	A大学	島根大学	A大学	島根大学	A大学
SCA1	S	23.5	26.0	23.6	26.3	27.4	30.0	23.5	26.3	26.4	29.1	25.4	28.0
	L	37.5	41.0	28.3	30.9	28.3	30.9	27.3	30.0	27.3	30.0	27.4	30.0
SCA2	S	21.0	22.0	21.0	22.0	20.0	21.8	21.1	22.0	21.0	22.0	21.3	22.0
	L	21.0	22.0	21.0	22.0	21.1	21.6	21.1	22.0	21.0	22.0	21.3	22.0
SCA3	S	13.8	14.0	13.8	14.0	26.0	27.1	13.9	14.0	13.8	14.0	18.8	19.0
	L	26.1	27.0	23.3	24.2	28.0	28.9	27.0	28.0	18.4	18.6	18.8	19.0
SCA6	S	7.7	11.0	7.8	13.0	7.7	11.0	7.8	13.0	7.8	13.0	7.8	17.0
	L	10.2	18.0	12.3	21.9	10.2	13.8	12.1	13.8	12.2	13.0	16.5	23.0
SCA7	S	2.8	10.0	0.1	7.1	3.1	10.1	-0.4	7.2	2.9	10.1	3.1	10.0
	L	4.8	12.0	3.1	10.0	5.1	11.9	2.4	10.0	2.9	10.0	3.1	10.0
SCA8	S	22.3	23.0	25.1	25.9	26.1	26.8	17.3	18.2	24.1	25.0	22.3	23.0
	L	24.1	25.0	29.0	29.9	26.1	27.0	28.0	29.0	27.1	28.1	23.2	24.0
SCA12	S	7.2	10.0	8.5	10.0	8.5	10.0	7.2	15.7	8.2	12.9	14.2	16.0
	L	8.5	18.0	11.3	13.1	15.1	16.9	14.1	17.9	9.1	16.0	14.2	16.0
SCA17	S	31.8	36.0	32.1	36.0	32.1	36.0	32.0	35.9	31.8	36.0	32.1	36.0
	L	32.7	37.0	36.5	36.1	36.6	36.1	36.5	36.1	32.7	37.1	36.5	36.0
DRPLA	S	11.6	11.0	11.5	11.3	10.6	10.2	15.6	15.2	18.5	18.1	13.7	13.0
	L	17.6	17.0	15.6	15.2	15.6	15.2	24.4	17.1	19.5	19.1	20.5	20.0

この相違は、実際の塩基数とフラグメント解析より得られるサイズ値が異なることが原因である。

上記表を用い、先進大学より得られたレポート数から実際の塩基数を算出し、当院のフラグメント解析値の差より補正值を求めた。

### レポート数の解析結果について

	回	20171120_Adata 患者 A		20171120_Bdata 患者(B/30)		20171120_Cdata control C		Gene Scan 値	レポート以外の 塩基数	コントロール補正				
		数値	レポート	数値	レポート	数値	レポート			補正值	GeneScan値	回数	長さ	
SCA1	S	299.4	29	291.5	22	299.9	29	290	163	9.7	299.2	26	241.9	
	L	299.4	28	296.7	28	248.6	20	290	163	9.5	244.5	30	253	
SCA2	S	149.4	22	149.3	22	149.3	22	215	146.4	96	23	149.9	22	152
	L	149.4	22	149.3	22	149.3	22	197	249.2	193	0.9	249.1	19.0	250
SCA3	S	248.2	19	271.0	27	248.1	19	263	270.9	193	0.9	249.1	19.0	250
	L	270.8	27	276.6	29	248.1	19	11.4	156.5	126	1.5	175.5	17	177
SCA6	S	158.5	12	162.5	13	174.2	17	13.6	164.5	126	2.3	182.7	23	195
	L	164.5	13	181.3	23	191.4	23	8.7	321.5	315	19.7	325.3	10	345
SCA7	S	321.5	9	324.2	10	324.0	10	8.7	321.5	315	19.7	325.3	10	345
	L	321.5	9	324.2	10	324.0	10	18.2	206.0	157	2.5	223.5	23	226
SCA8	S	209.0	18	209.0	18	223.5	23	18.2	206.0	157	2.5	223.5	24	229
	L	209.0	18	232.1	26	226.5	24	10.2	178.2	153	5.5	185.5	16	201
SCA12	S	178.2	10	188.6	7	195.2	15	13.0	186.6	153	5.5	185.5	16	201
	L	186.6	13	186.7	12	185.2	16	35.8	271.7	193	-1.2	272.2	36	271
SCA17	S	271.7	36	272.3	36	272.1	36	15.2	166.7	122	-1.2	166.8	15	167.6
	L	271.7	36	272.3	36	272.1	36	18.0	177.4	122	-1.3	174.7	17	173.3
DRPLA	S	168.7	15	168.7	15	163.0	13	-64						
	L	177.4	18	171.6	18	183.2	20	-64						
HD	S													
	L								193					

図 先進 A 大学とのデータをもとに患者データの補正を行った結果

現在、常染色体優性小脳性運動失調症（ADCA s）は 30 を超える遺伝子変異が報告されており、確定診断には遺伝学的検査が必要となる。今回、我々は臨床検査における ADCAs の 10 病型の遺伝学的検査として、Multiplex PCR を用いた包括的なスクリーニング法の院内導入を果たした。

Multiplex PCR により増幅したトリプレットリピート病 9 病型のフラグメント解析では蛍光色素により各アレルが明確に識別され、そのフラグメントサイズから異常伸長の有無を判断することができた。しかしながらその判読法には経験が必要であるため、また分析器によって異なるため更なるデータの取得、経験が必要と考える。

本法によるリピート回数の算出については、フラグメントサイズからの計算による場合、アレルによっては DNA シーケンシングとわずかながら乖離し測定間差が存在するとの報告がある。また、SCA3、SCA6、DRPLA の 3 アレルについて異常伸長域を含めてリピート回数を比較すると、相関は非常に良好であるが、リピート回数が長くなるに従い、リピート回数が短く見積もられてしまうという結果となったと報告されている。さらに SCA7 アレルや CAG リピートのような GC 含量が多い配列では、電気泳動でより速く泳動されると言われており、これによりリピート回数が少なく見積もられたものと考えられる。このようにリピート回数の乖離がみられる為、本法を行うに当たってはリピート回数既知のコントロール検体を用いて各アレルを補正し、正確なリピート回数を求めてから各病型を判断する必要がある。しかしながら当院でクローニングを行うことができず、先進大学のデータからの補正という手法をとった。

また、本法では SCA2 や SCA7、SCA8 などでもリピート回数が極端に多い場合には検出できない可能性がある。よって、本法で陰性であった場合でも家族歴や発症年齢などにより SCA2 や SCA7、SCA8 が強く疑われる際には、Repeat-primed PCR や PCR-Southern blotting といった方法により検証する必要があるといわれている。現在このような症例に遭遇してはいないがあらゆるケースに対応できるようにさらに本検査の特徴を認識したうえで結果を報告することが大切だと考える。

今回、我々の研究の成果として、最先端機器を用いた Multiplex PCR を利用し、複数の遺伝子異常を同時に増幅し、診断する検査法を確立することができた。この技術で疾患原因遺伝子の繰返し（リピート）数から、10 個の遺伝子異常が少量の血液より短時間で診断可能となる。前述のとおり優性遺伝形式の脊髄小脳変性症の 8 割以上がこの検査で診断できることは朗報となる。診断が確定されても現在のところ治療が対症療法に限られる。しかし、診断確定により病型にあった治療方法、生活設計、ケア、リハビリテーションを進めていける利点がある。

最後に、分子生物学の発展により、本法のように簡便に遺伝学的検査が行うことができるようになったが、遺伝情報は生涯変化せず、血縁者にも影響を与え得るため検査は慎重に行われなければならない。ADCAs の多くは成人発症であり、発症の時点で既に次の世代が生まれており、遺伝的リスクが生じている場合も想定される。検査結果に対する心理的・社会的援助など、検査を行ったことによって生ずる問題点があるため、遺伝学的検査を実施する際には、前述のとおりそれらの問題点に適切に対応できる遺伝カウンセリングの体制も同時に必要である。

今年度は、2 名の患者に対して検査を行った。臨床遺伝診療部との連携により特に問題もなく結果報告できた。