

遺伝カウンセリング第2報； DMD疑い例の保因者診断—DMD 3'側の多型検索

松本 正¹・佐々木規子¹・宮原 春美¹
土井 知巳²・天本なぎさ²・近藤 達郎²

要旨 Duchenne筋ジストロフィー (DMD) 疑いの兄をもつ女性クライアントの遺伝カウンセリングを行った。クライアントは保因者である不安が強いため、遺伝子多型を用いたX染色体親起源検索を行った。クライアントは母親から兄とは異なるX染色体を伝達されており、DMD保因者である可能性は非常に低いと結論した。この過程でDMD遺伝子 (DMD) 3'側では有効な多型が検出されなかったため、新たにDMD 3'側の多型マーカー検索を行い、8種類のマイクロサテライト・マーカーが検出された。今後、これらのマーカーはDMDの保因者・出生前診断の有用なマーカーとなると考えられる。

長崎大学医学部保健学科紀要 16(2): 63-65, 2003

Key Words : 遺伝カウンセリング, Duchenne筋ジストロフィー (DMD), 多型, 保因者診断, 新規マーカー

はじめに

Duchenne筋ジストロフィー (DMD) は男児1/3000人とX連鎖劣性疾患では最も頻度の高い疾患である。根本的治療法は未だなく、患者は20歳代で死亡するため、出生前診断・保因者診断が適応となり得て、その目的で医療機関を訪れる家系も稀ではない。患者の60~70%は遺伝子欠失または重複に起因し、残りは点変異である¹⁾。このように多数を占める遺伝子欠失はmultiplex PCR法で診断されるが²⁾、点変異はDMD遺伝子 (DMD) が巨大であることから遺伝子診断には困難を伴う。保因者診断に関しては、発端者が遺伝子欠失である場合には定量的PCR法が行われるが、厳密な条件設定が必要であり、必ずしも容易ではない。発端者に欠失が認められず、点変異が同定されていない場合には遺伝子診断は困難である。筋生検材料のジストロフィン染色は保因者診断に有効であるが、その侵襲性に難点がある。このような保因者診断のためには多型マーカーを用いた連鎖解析を行い、X染色体の親起源を同定する方法が有用である³⁾。

今回、DMD疑いの兄をもち、妊娠9週であるクライアントが保因者診断を希望して来院され、X染色体親起源検索を行い、DMD保因者である可能性は非常に低いと考えられた。また、この過程でDMD 3'側の多型マーカー検索が必要と考えられたので、新規マーカー検索結果と共に報告する。

クライアント

28歳女性 (妊娠9週)、父親とともに来院。発端者は二人兄妹の兄。発端者は独歩1歳半。4歳時に運動発達

の遅れから某大学病院受診し、筋ジストロフィーと診断された。8歳時に他の大学病院で筋生検施行し、DMDの診断を受けた。12歳で車椅子生活となり、現在、32歳で療養所に入所し、夜間のみ人工呼吸療法を受けている。4年前にmultiplex PCR検査を受け、DMDの欠失・重複はないと診断された。家系内には他にDMDと診断されている家系員はいない。主治医はDMDとしては非特異的と考えているが、筋生検でのジストロフィン染色に関しては、筋萎縮が進行しており、現時点では困難との判断であった。

遺伝カウンセリング

クライアントは夫と相談して、今回の妊娠では胎児の罹患の有無に拘わらず出産するつもりと述べたが、将来のことを考えて保因者診断を希望された。

発端者はDMDではない可能性もあるが、少なくともクライアントがDMDの保因者ではないことを証明するために、X染色体の親起源を調べることとなった。兄妹が同じX染色体を伝達されていればDMD全配列決定、またはジストロフィン染色を考慮することとなった。

方法

発端者、クライアント、両親の抹消血白血球よりDNAを抽出した。PCR反応はdenature 94℃で30秒、annealingはプライマー毎に設定し30秒、extension 72℃で1分とし、PCR産物を電気泳動後、ethidium bromide染色を行った。多型頻度計算の場合はプライマーをTexas Red標識後、日立SQ5500 sequencerで電気泳

1 長崎大学医学部保健学科

2 長崎大学医学部小児科

動を行った。

マーカーはDMDのプロモーター、イントロン、3'側の1カ所で計23カ所、X染色体p11からq28までの計11カ所のmicrosatelliteを使用した。後に、3'側後半部数カ所から非翻訳領域約220kbまでの10カ所を増幅した。

結 果

- 1) X染色体親起源；プロモーター領域1カ所、イントロン49、イントロン60で母親はヘテロ接合であり、クライアントは兄とは異なるalleleを伝達されていた。しかし、3'非翻訳領域のマーカー（3'CA）では母親はホモ接合であった。Xq26のHPR1で母親はヘテロ接合を示し、クライアントはやはり兄とは異なるalleleを伝達されていた。以上の結果より、クライアントはDMDの保因者である可能性は非常に低いと結論したが、二重組み換えの可能性を否定できないので、3'非翻訳領域における本邦での有用なマーカーの検索を行った。
- 2) 新規マーカー；表1にDMD 3'側イントロンから非翻訳領域の新規マーカーおよびプライマー塩基配列を示す。

考 察

今回の例では発端者がDMDと診断されているが、孤発例であり、遺伝子診断では確定されず、ジストロフィン染色も行われていないので、DMDとの診断は確定していない。従って肢帯型筋ジストロフィーのような他の神経筋疾患である可能性もある。このような場合にX染色体親起源を調べることの意義については疑義があるとの考えもあり得る。しかし、発端者は2カ所の大学病院でDMDと診断され、20数年間DMDとして治療されているのであり、クライアントは自分が保因者かもしれないという強い不安を持っている。このクライアントに、兄はDMDではなく他の遺伝性疾患かもしれないと新た

な可能性を告げることだけでは不安は増強こそすれ、軽減することはないと考えられる。

X染色体親起源検索ではDMDを挟み込む4カ所でクライアントは兄とは異なるalleleを伝達されていた。3'非翻訳領域のマーカー3'CA⁴⁾がこの家系ではinformativeではなく、informativeなマーカーはXq28に座位していたので、イントロン60以降の3'側に変異があり、かつイントロン60からXq28までの間で二重組み換えが起こっている可能性は完全には否定できないが、クライアントはDMDの保因者である可能性は非常に低いと結論した。発端者の臨床像に近似する他の疾患としては肢帯型筋ジストロフィーがあり、本症は常染色体優性（AD）と常染色体劣性（AR）の型がある。発端者がAD型の本症であればクライアントは発症しておらず、従って胎児の心配は全くない。AR型の場合はクライアントが保因者である可能性は否定できないが（確率1/2以下）、クライアントの夫も保因者である可能性は低く、従って胎児が罹患する可能性は更に低い。

上記のような二重組み換えの可能性があり得るので多型マーカーを用いた連鎖解析ではDMDを挟み込む形でできるだけ近傍のマーカーの選定が望ましい。DMDではプロモーター領域⁵⁾、5'前半部⁶⁾には多数の有用なマーカーが報告されているが、3'後半部のマーカーは3'CA以外には報告されていない。今回の検討でDMD後半部のイントロンで2カ所、3'非翻訳領域で6カ所の多型マーカーが検出された。特に3'非翻訳領域100~200kb部分に多型頻度（polymorphism information content: PIC）の高いマーカーが存在し、これらのマーカーはDMDの保因者・出生前診断に有用と考えられる。

文 献

- 1) 松本 正, 新川詔夫; 進行性筋ジストロフィー; 分子遺伝学. 新筋肉病学, 南江堂, pp487-501, 1995
- 2) Abbs S, Yau SC, Clark S, Mathew CG, Bobrow

Table 1. Microsatellites identified in intron 62/67 and at the 3' region of DMD, and primers used to amplify them

Name	Position	Repeat Unit	No. of alleles	PIC	Primer sequence (5' to 3')	
					Forward	Reverse
DI623	intron 62	CTT	18	0.91	ACCTGCCTAGTCAAGGTA	CACTGCCATGGTGAATCATC
DI671	intron 67	GA	14	0.81	TCGCCCTTCAGAAGTCACT	GTCCAGCAGATCAATCGTCCAGC
3+3	5.8*	GT	3	0.34	TGGAACGCATTTTGGGTTGT	AACAATGCGCTGCCTCAAAG
3+5	26.7*	GA	1	0	TGCCTTCTGATGGATGAT	CATAGGTGTGTCTCATTGGT
3+7	74.6*	TG	1	0	AAGAGAAGTACAAGTGGGGG	GCCATAATACCCTAGAGGCA
3+9	75.7*	TC	1	0	GGCCATATGCTTCTCGTCAT	ATGACCCAAGCAGAGACTTG
3+11	100.6*	CCT	1	0	AACTTCGGGGACACATTCAA	GATCTTGGACTAGATCCTAG
3+15	102.3*	TG/CA	2	0.04	CAGTGCCAGGTAGCCATAT	ATAGGTATGCTTCCAGCTCT
3+17	152.4*	GA	8	0.76	GCTGTTTGCACATTTGGCTA	TTACGGGGTGTGGCAAGTTC
3+19	156.0*	CA	3	0.18	CAGAGTCACCTATCGTTCAC	GTACCGCACTGAGAATATCC
3+25	200.0*	CA	5	0.64	AAAAACGACTCCCCACTC	TCAGCCCCATTCTGTACATC
3+31	215.8*	TG	5	0.49	AGTAGGCTGTACCATCTGGG	TGATCCCCAAGACTATGAGG

*distance (Kb) in the 3' direction from the stop codon of DMD
PIC, polymorphism information content

- M; A convenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridization shows mistypings by both methods. *J Med Genet* 28: 304-311, 1991
- 3) Van Essen AJ, Kneppers ALJ, van der Hout AH, Scheffer H, Ginjaar IB, ten Kate LP van Ommen GJB, Buys CHCM, Bakker E; The clinical and molecular genetic approach to Duchenne and Becker muscular dystrophy: an updated protocol. *J Med*34: 805-812, 1997
 - 4) Beggs AH, Kunkel LM; A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. *Nucleic Acids Res* 18: 1931, 1990
 - 5) Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM; Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA; applications to the 5' region of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 48: 621-627, 1991
 - 6) Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, Gibbs RA, de Andrade M, Chakraborty R, Caskey CT; Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 49: 951-960, 1991