



Title	Angelman症候群およびPrader-Willi症候群のDNA診断法開発とその評価
Author(s)	斉藤, 伸治
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第4398号
Issue Date	1993-12-24
DOI	https://doi.org/10.11501/3095197
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50085
Type	doctoral thesis
File Information	000000272796.pdf



①

Angelman症候群およびPrader-Willi症候群の
DNA診断法開発とその評価

北海道大学医学部小児科学教室

斉藤 伸治

Angelman症候群およびPrader-Willi症候群の

DNA診断法開発とその評価

斉藤伸治^{1,2}

¹長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設

先天異常（遺伝学）部門

²北海道大学医学部小児科学教室

連絡先

Dr. Shinji Saitoh,

Department of Neuroscience, University of

Florida College of Medicine, Box 100244,

JHMMC, Gainesville, Florida 32610-0244,

USA

要 旨

Angelman症候群 (AS) 61例、と Prader-Willi症候群 (PWS) 14例に対して分子遺伝学的解析を行った。15q11-q13領域のDNA欠失はAS患者の66.7%、PWS患者の42.8%に認め、欠失の親起源は例外なくASでは母由来、PWSでは父由来であった。DNA欠失と染色体分析で検出した欠失との不一致はAS患者の24.5%、PWS患者の42.8%にみられた。

次に、放射性同位元素 (RI) 標識による二塩基反復多型 (DNRP) および非RI-DNRPを用いた簡便なPCR診断法の有用性をAS患者37名とPWS患者14名とで検討した。結果は両法間に大差を認めず、89.2%のAS患者と85.7%のPWS患者で有用な遺伝的情報を得た。DNRP診断法は両疾患の診断法として有用であると結論した。

見出し語

Prader-Willi症候群、Angelman症候群、DNA診断、ゲノム刷り込み、片親性ダイソミー

はじめに

Angelman症候群 (AS) と Prader-Willi症候群 (PWS) の責任遺伝子は 15番染色体 q11-q13 (以下 15q) 領域に近接して存在する。AS患者の約 60% は母由来の同領域の染色体欠失、または相同 15番染色体両方が父に由来する父性片親性ダイソミー (UPD) を示す^{1) 2)}。PWS患者の約 60% は反対に父由来の染色体欠失、または母性 UPD を示す^{3) 4)}。両疾患共に残りの患者は核型および親起源にも異常がみいだされない。PWSでは、この知見を利用した DNA 診断が多数試みられている^{4) 5) 6)}。しかし、ASでの同様な研究は非常に少なく⁷⁾、診断効率は明らかでない。また、従来の DNA 診断はサザン法で検出する欠失や制限酵素断片長多型 (RFLP) を利用したために、方法の煩雑さや低い多型検出率、欠失検出の再現性などの点で問題があった。

本研究の目的は、① ASにおける DNA レベルでの異常を多数例の検討から明らかにした上で異常を分類・整理し、DNA 診断の有用性を検討

すること、②従来のサザン法に代わる簡便な診断法を開発し、ASおよびPWSにおけるDNA診断法を確立すること、の2点である。

対象と方法

患者

全国から集積したAS患者61名（男28名、女33名、平均年齢10.2歳）とPWS患者14名（男8名、女6名、平均年齢5.5歳）を対象にした。AS患者61名中8名（4家族）は家族例で、残り53名は散发例であった。14名のPWS患者は全て散发例であった。ASおよびPWSの診断はその表現型⁸⁾⁹⁾から臨床的に行った。

染色体分析

染色体高精度GTG分染による染色体分析をASの57例（57家族）中49例、14例全てのPWS患者で行った。大量のチミジン添加による細胞同調後、標本を作成し、次いで標準GTG法を用いた。AS患者49例中23例は商業検査施設での高精度分染分析結果を利用した。

分子遺伝学的解析

患者の末梢白血球またはEBV株化リンパ芽球より標準的手法でゲノムDNAを抽出し、以下の解析に供した。

(1) サザン解析: 5 μ gのゲノムDNAを用いて標準的手法⁴⁾で行った。15q領域にマップされている6種のクローン化DNA^{4), 10)}を³²Pで標識しDNAプローブとした(括弧内は座位である): IR39(D15S18)、ML34(D15S9)、IR4(D15S11)、TD3-21(D15S10)、28 β 3-H3(GABRB3)、IR10(D15S12)。内部対照プローブとして21-4U(D21S110)¹⁰⁾を用いた。DNAコピー数は以下のように判定した。オートラジオグラム上のバンド濃度比(各プローブに相当するバンドの濃度/内部対照バンドの濃度)が正常者で2(2コピー)としたとき、1.5未満の場合に欠失(1コピー)と判定した。

(2) 二塩基反復多形(DNRP): 15q領域にマップされている3種の座位(D15S11、GABRB3、D15S97)^{11), 12), 13)}、およびそれより遠位にマップされる2種の座位(ACTC、D15S87)のDNRP^{13), 1}

4) 15) を用いた。また、11番染色体長腕にマップされる D11S527 の DNRP¹⁶⁾ を親由来追求の際の対照として使用した。患者 DNA 250 ng をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法にて増幅し多型を検出した。プライマー、PCR の条件は文献に従った。D15S11、GABRB3、D15S97 の3種に相当する患者 DNA は同時に PCR 増幅し、ACTC、D15S87、D11S527 に対応する患者 DNA はそれぞれ別に増幅した。

DNRP の検出効率を調べるために、以下の2種類の方法を用い比較した。①放射性同位元素 (RI) 標識法: $[\alpha - ^{32}\text{P}]d\text{CTP}$ を反応液に追加し PCR にて PCR 産物の標識を行い、次いでシーケンズゲル (8M 尿素、6% ポリアクリルアミドゲル) にて電気泳動し、ゲルを乾燥の後にオートラジオグラフィを行った。②非 RI 法: PCR 産物を 6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動の後、エチジウムブロミドにて染色し、紫外線下で発色、写真撮影を行った。

結 果

AS患者およびPWS患者におけるDNA欠失の頻度、
欠失幅、欠失の親起源（表1）

AS患者57例（57家族；家族例は1患者として扱った。）中38例（65.5%）にDNA欠失を検出した。散发例におけるDNA欠失幅はD15S9～D15S12領域の5座位を共通して含み、数例ではD15S18に及んでいた。AS家族例では1家族にのみ欠失を認めしたが、欠失幅は散发例に比べて狭く、D15S10とGABRB3の2座位だけを含んでいた。欠失の親起源は、家族検索が可能であった31家族中26家族（83.9%）全てにおいて例外なく、母由来であった。欠失がなかった家族検索のできた14例全てにUPDは検出されず、そのうち11例（78.6%）の15番相同染色体は両親由来であった。一方、PWS患者14例中6例（42.8%）にDNA欠失を検出した。

ASおよびPWS患者における染色体分析結果とDNA欠失解析結果の比較

染色体分析結果とDNA解析結果との間に不一致があった。不一致は、AS患者49例中12例（

24.5%) と PWS 患者 14 例中 6 例 (42.8%) に認め
た。正常核型と判定したのに DNA 欠失を認め
たのは、AS では 42.1% (8/19)、PWS では 25% (1
/4) であった。一方、染色体欠失と判定した
が DNA 欠失を認めなかった不一致は、AS では 1
3.3% (4/30)、PWS では 50% (5/10) であった。

DNRP による DNA 欠失および UPD の検出

DNRP による欠失検出の効率を調べるために、
両親の検索が可能でかつサザン解析により DN
A 欠失の有無が既知の AS 患者 37 例 (DNA 欠失 28
例; 非欠失 9 例) および PWS 患者 14 例 (DNA 欠
失 6 例; 非欠失 8 例) について、DNRP を用い
た DNA 欠失解析を行った。

(A) 検出結果の分類: 患者における検出結果は
表 2 と図 1 に示すように 5 群に分類できた。
各群の定義は以下の如くである。① 欠失群 (
De1): 15q11-q13 領域 (以下 PWS/AS 領域) の
3 種の DNRP のうち少なくとも 1 種で片親由来の
対立遺伝子の伝達欠如を示し、かつ 15q13-qt
er (以下遠位) 領域の 2 種中 1 種の DNRP で両親

由来を確認した患者。14名のAS患者と2名のPWS患者であった。②UPD群：PWS/AS領域と遠位領域双方のDNRPで、片親のみからの2コピーの対立遺伝子伝達を確認し、しかし11番染色体上のDNRP(D11S527)では両親由来であった患者。ASではこの群に属する患者はいず、PWSの5名のみであった。この群を更に、UPDの発生機構の観点から、(a)親の片方の15番相同染色体の重複由来であるイソダイソミー(iso UPD)と、(b)1対の15番相同染色体それぞれに由来するヘテロダイソミー(hetero UPD)とに細分した。iso UPDは2名のPWS患者に、hetero UPDは3名のPWS患者に認められた。③両親由来15番染色体をもつ群(BPI)：PWS/AS領域の3種のDNRP中、少なくとも1種で両親由来を確認した患者。8名のAS患者と3名のPWS患者がこの群に属した。④欠失とUPDの区別不能群：PWS/AS領域中の片親由来対立遺伝子を欠くが、遠位領域での情報がなかった患者。11名のAS患者、2名のPWSであった。⑤情報なし群：用

いた DNRP では全く欠失・親由来の情報を得ることができなかった 4 名の AS 患者と 2 名の PWS 患者。

(B) RI 標識 - DNRP 法 と 非 RI - DNRP 法 による 検出率の比較 : RI 標識 - DNRP 法 と 非 RI 法 と の 検出率 を 表 2 に 示 す 。 RI 標 識 法 で は AS 患 者 の 33 (89.2%) / 37、 PWS 患 者 の 12 (85.7%) / 14 に お い て 遺 伝 学 的 情 報 を 得 た 。 非 RI 法 で は そ れ ぞ れ 30 (81.1%) / 37、 12 (85.7%) / 14 で あ っ た 。 RI 標 識 法 で 得 た DNRP 情 報 の 症 例 を 図 2 に 示 す 。

考 察

AS 患 者 に お け る DNA 欠 失 の 頻 度 と 範 囲

AS には 多 数 の 家 族 例 が 知 ら れ て い る の で、 DNA 欠 失 の 有 無 を 診 断 す る こ と は 遺 伝 相 談 の 観 点 か ら 重 要 で あ る 。 本 研 究 に お け る、 多 数 の AS 症 例 で の DNA 欠 失 率 は 66.7% で あ り、 従 来 の 報 告 と よ く 一 致 し た¹⁾⁷⁾。 欠 失 の 範 囲 は 散 発 AS 例 で は、 D15S9 ~ D15S12 の 5 座 位 を 共 通 し て 含 ん で い た 。 AS 家 族 例 で は 1 家 族 の み に DNA 欠 失 を 認 め た が、 そ の 範 囲 は 狭 く、 D15S10 と GA

BRB3の2座位のみであった⁷⁾¹⁰⁾。これらの結果は、AS散发例ではD15S9～D15S12の範囲の適当なマーカーを用いるとDNA欠失の検出は可能であるが、AS家族例の一部ではD15S10もしくはGABRB3座位マーカーの利用が必要になることを示す。なお、PWS患者におけるDNA欠失の頻度・範囲に関しては、Hamabeら⁴⁾が本邦での多数患者におけるDNA欠失診断を報告⁴⁾しており、更に一部の患者はその研究と重複しているため割愛した。

染色体欠失率とDNA欠失率の比較評価

染色体分析結果とDNA解析結果との不一致がAS患者の24.5%、PWS患者の28.6%にみられた。15q11-q13領域の染色体欠失は、しばしば同領域正常変異(normal variant)の過剰診断に由来することがある。PWS患者における不一致は従来からも報告されており⁶⁾、染色体検査の限界と考えられる。本研究での比較結果は、正確な欠失の有無の診断にはDNA解析が必須であることを示す。

ASにおける15番染色体の親起源

DNA欠失をもつAS患者14例全例において、その欠失は母由来15番染色体上で起こっていた。この結果は従来の親起源研究結果と完全に一致した。父性UPDは過去3例のAS患者に発見されているが、本研究での非欠失14例中にはみいだされなかった。逆に、これらの大部分(11/14)には15番染色体のBPIが証明された。この結果は、AS患者におけるUPDの頻度は非常に低いことを示唆する。現時点では、これらのBPIの患者に対するDNA診断は不可能である。

DNRP診断法の評価

DNRPは非常に多型性に富み、従来のRFLPなどのDNA多型と比べて遺伝的情報量が多い。また、PCR法を用いて検出するので比較的簡便に行い得る。本研究は、15q11-q13領域では複数のDNRPを組み合わせることにより、通常の電気泳動でも高率に多型情報が得られることを示した。近年、新しいDNRPの報告が急増しているから¹³⁾、今後更に診断効率は高くなる

と考えられる。

RI標識によるDNRP法と非RI法では、欠失検出率自体をみると大差はないが、診断の正確さを問えば、前者が優っている。一方、簡便さを重視すれば当然後者を選択すべきである。いずれにしても、サザン法による欠失診断効率とは大差がないから、DNRPを用いた診断法が第一選択であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を御指導賜りました北海道大学医学部小児科学講座 松本脩三教授および長崎大学医学部原爆後障害医療研究施設先天異常部門 新川詔夫教授に深謝いたします。また、貴重な症例を御紹介いただいた諸先生に深謝いたします。

本論文の要旨は第34回日本小児神経学会（1992年大宮）で発表した。

図の説明

図 1 : PWS/AS患者における4種のDNRPパターン (非RI法)。

Cは患者、Pは父、Mは母。写真左に座位を示す。

Maternal del, Paternal del, Del/UPD, iso

UPD, hetero UPD, BPIはそれぞれAS患者にお

ける母由来DNAの欠失、PWS患者における父由

来DNAの欠失、AS患者での欠失もしくは片親性

ダイソミー、AS患者での両親由来15番染色体、

PWSでの母性片親性イソダイソミー、PWS患者

での母性片親性ヘテロダイソミーをしめす。

図 2 : AS患者におけるGABRB3座位でのDNRPの検出。

非RI法 (a) では患者における対立遺伝子の親由来は同定できないが、RI標識法 (b) では両親における2塩基の反復数の差が同定でき、患者は母由来の対立遺伝子を欠いているのが判る。

参考文献

- 1) Malcolm S, Clayton-Smith J, Nichols M, et al. Uniparental paternal disomy in Angelman's syndrome. Lancet 1991;337:694-7.
- 2) Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Graham Jr. JM, Lalande M, Latt SA. Angelman and Prader-Willi syndrome share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. Am J Med Genet 1989;32:285-90.
- 3) Nicholls RD, Knoll JHM, Butler MG, Karam S, Lalande M. Genomic imprinting suggested by maternal heterodisomy in non-deletion Prader-Willi syndrome. Nature 1989;342:281-5.
- 4) Hamabe J-i, Fukushima Y, Harada N, et al. Molecular study of the Prader-Willi syndrome: deletion, RFLP, and phenotype analysis of 50 patients. Am J Med Genet 1991;41:64-8.
- 5) Robinson WP, Bottani A, Yagang X, et al. Molecular, cytogenetic, and clinical investigation of Prader-Willi syndrome patients. Am J Hum Genet 1991;49:1219-34.
- 6) Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, et al. The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome: implication for molecular diagnosis. N Eng J Med 1992;326:1599-607.
- 7) Hamabe J-i, Kyroki Y, Imaizumi K, et al. DNA deletion and its parental origin in Angelman syndrome patients. Am J Med Genet 1991;41:64-8.
- 8) Butler MG. Prader-Willi syndrome: current understanding of cause and diagnosis. Am J Med Genet 1990;35:319-32.
- 9) Angelman H. "Puppet" children: a case report on three cases. Dev Med Child Neurol 1965;7:681-3.
- 10) Saitoh S, Kubota T, Ohta T, et al. Familial Angelman syndrome caused by imprinted submicroscopic deletion encompassing GABAA receptor $\beta 3$ -subunit gene. Lancet 1992;339:366-7.
- 11) Mutirangura A, Ledbetter SA, Kuwano A, Chinault AC, Ledbetter DH. Dinucleotide repeat polymorphism at the GABAA receptor $\beta 3$ (GABRB3) locus in the Angelman/Prader-Willi region (AS/PWS) of chromosome 15. Hum Mol Genet 1992;1:67.
- 12) Mutirangura A, Kuwano A, Ledbetter SA, Chinault AC, Ledbetter DH. Dinucleotide repeat polymorphism at the D15S11 locus in the Angelman/Prader-Willi region (AS/PWS) of chromosome 15. Hum Mol Genet 1992;1:139.
- 13) NIH/CEPH collaborative mapping group. A comprehensive genetic linkage map of the human genome. Science 1992;258:67-86.
- 14) Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet 1989;44:397-401.
- 15) Weber JL, Kwitek AE, May PE. Dinucleotide repeat polymorphism at the D15S87 locus. Nucleic Acids Res 1990;18:4640.
- 16) Browne DL, Gault J, Thompson MB, Hauge XY, Evans GA, Litt M. Dinucleotide repeat polymorphism at the D11S527 locus. Nucleic Acids Res 1991;19:4790.

表1 AS患者61例における染色体分析およびDNA解析結果

家族/ 散発例	症例番号 AS-	核型	DNA欠失/ 親起源	各座位のコピー数					
				D15S18	D15S9	D15S11	D15S10	GABRB3	D15S12
家族例	1,2	normal	no	2	2	2	2		2
	3-5	normal	no	2	2	2	2	2	2
	6-8	normal	Del/Mat	2	2	2	1	1	2
DNA欠失 をもつ 散発例	9,10,24	del(15)	Del	2	1		1	1	1
	11,25,38,41	del(15)	Del/Mat	2	1	1	1	1	1
	12	del(15)	Del/Mat	2	1		1	1	
	13	del(15)	Del/Mat	1	1	1	1	1	1
	14	del(15)	Del/Mat	1	1	1	1	1	
	15	del(15)	Del/Mat	2	1		1	1	
	16,17	del(15)	Del/Mat				1	1	
	18,33	del(15)	Del	1	1		1	1	1
	19	del(15)	Del/Mat	2		1	1	1	
	20	normal	Del/Mat	1			1	1	1
	21		Del/Mat	1	1		1	1	1
	22,23	del(15)	Del/Mat	2	1	1	1	1	
	26,28	del(15)	Del/Mat	2	1		1	1	1
	27	del(15)	Del		1		1	1	1
	29	normal	Del/Mat	2	1		1	1	1
	30,40	del(15)	Del	1	1		1	1	1
	31	normal	Del/Mat	2		1	1	1	
	32	del(15)	Del/Mat	1			1	1	1
	34	del(15)	Del	1			1	1	
	35	normal	Del/Mat	2				1	1
	36		Del/Mat	2	1	1	1	1	1
	37		Del/Mat	2	1		1	1	1
	39	normal	Del/Mat	2			1	1	
	42	del(15)	Del/Mat	2	1	1		1	1
	43	del(15)	Del/Mat	1	1			1	1
44	normal	Del/Mat	1	1	1	1	1	1	
45		Del	2	1		1	1		
DNA欠失の 証拠 がない 散発例	46	del(15)	no	2	2		2	2	2
	47	normal	no/BPI	2	2	2	2		2
	48	normal	no	2	2	2	2		2
	49	normal	no/BPI	2	2	2	2	2	2
	50	del(15)	no/BPI	2	2	2	2		2
	51	del(15)	no/BPI	2	2		2	2	2
	52	normal	no/BPI			2		2	
	53	del(15)	no	2	2		2	2	
	54	normal	no	2	2	2	2	2	
	55		no	2	2		2	2	2
	56	normal	no/BPI	2	2		2	2	2
	57		no/BPI		2	2	2	2	
	58		no/BPI			2	2	2	

59	normal	no/BPI		2	2	2	2
60	normal	no/BPI	2		2	2	2
61		no/BPI	2			2	2

AS1-2, 4-5, and 6-8 are sib cases. AS1-2, 4-5, 7, 10, 11-14, 16-18, 20, 25-26, 29-30, 32, 34, 41, 43, 45, 47-49, 51-53, 55-56, 58, and 61 are females. del(15): del(15)(q11.1q12); Del: DNA deletion; BPI: biparental inheritance; Mat: maternal deletion.

表2：RI標識法と非RI法によるDNRP解析結果

群	RI標識法 患者数				非RI法 患者数			
	AS		PWS		AS		PWS	
	DNA欠失	非欠失	DNA欠失	非欠失	DNA欠失	非欠失	DNA欠失	非欠失
1 母由来欠失	14	0	0	0	13	0	0	0
父由来欠失	0	0	2	0	0	0	2	0
2 母性UPD	0	0	0	5	0	0	0	5
父性UPD	0	0	0	0	0	0	0	0
3 両親由来	0	8	0	3	0	7	0	3
4 欠失/UPD	11	0	2	0	10	0	2	0
5 情報なし	3	1	2	0	5	2	2	0
計	28	9	6	8	28	9	6	8

DNA-based Diagnosis of Angelman Syndrome and Prader-Willi Syndrome

Shinji Saitoh, MD

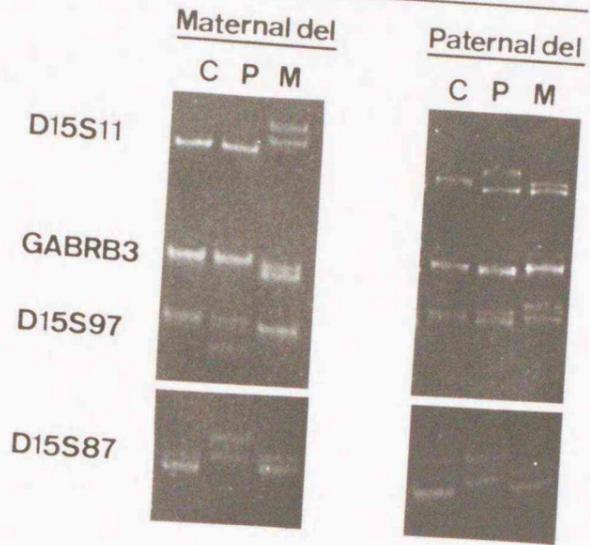
Department of Human Genetics, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki;
Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo.

A molecular-genetic study was performed on 61 patients with Angelman syndrome (AS) and 14 patients with Prader-Willi syndrome (PWS). Southern blot analyses and/or PCR-mediated dinucleotide repeat polymorphism (DNRP) analyses revealed that 67% of AS patients have DNA deletions ranging from D15S9 to D15S12 loci. An exception was 3 sib cases whose deletion involved only 2 loci, D15S10 and GABRB3. The parental origin of the deletions in AS patients were exclusively maternal. No uniparental disomy (UPD) was found in our AS patient series, suggesting that UPD in AS is infrequent than that in PWS. Molecular deletions were observed in 6 of the 14 PWS patients.

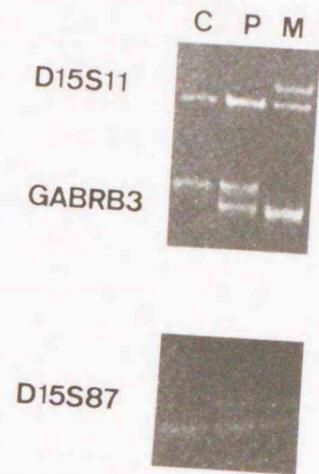
In order to develop a simple, reliable DNA-based diagnostic method, I adopted PCR-mediated DNRPs as genetic markers for the detection of deletions and/or parental origin of chromosomes 15 in AS and/or PWS patients. This method gave useful diagnostic information in 33 (89%) of 37 AS patients and 12 (86%) of 14 PWS patients, indicating no big difference from the information obtained with Southern blot analysis. Furthermore, since this DNRP method does not require radioisotopes, it may be a first-choice, alternative way when diagnosing AS or PWS patients.

11

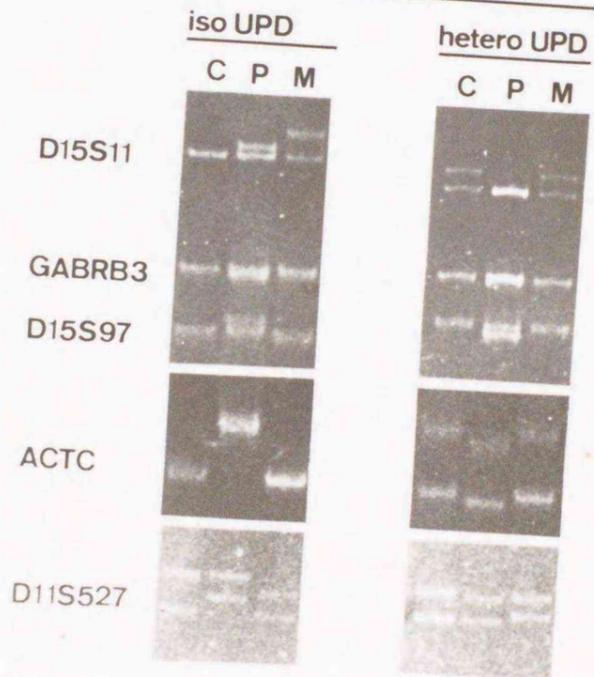
1. Deletion



3. Del/UPD

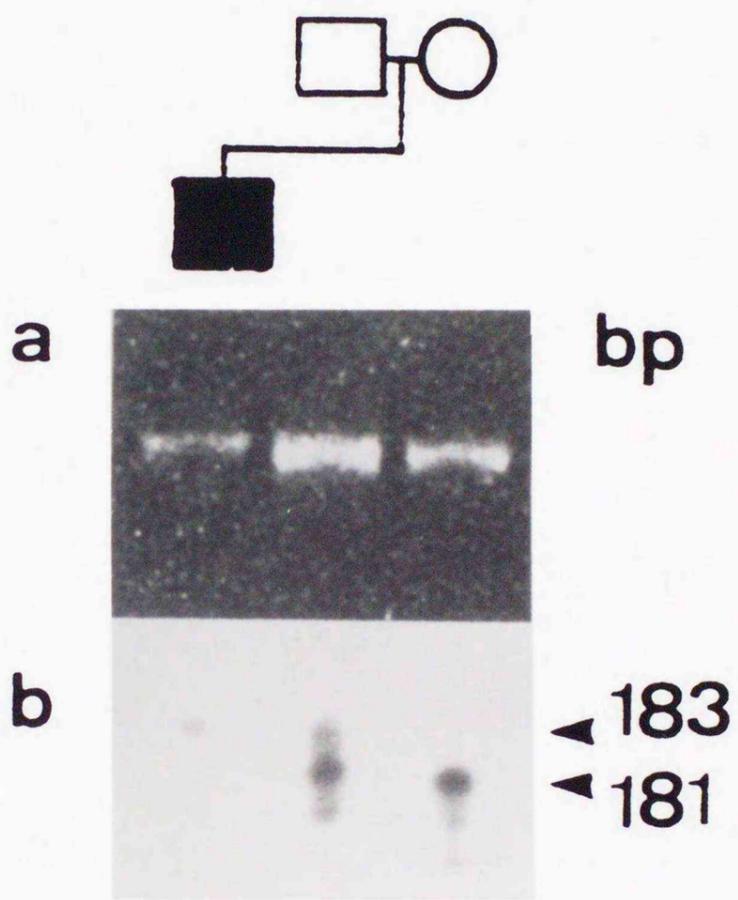


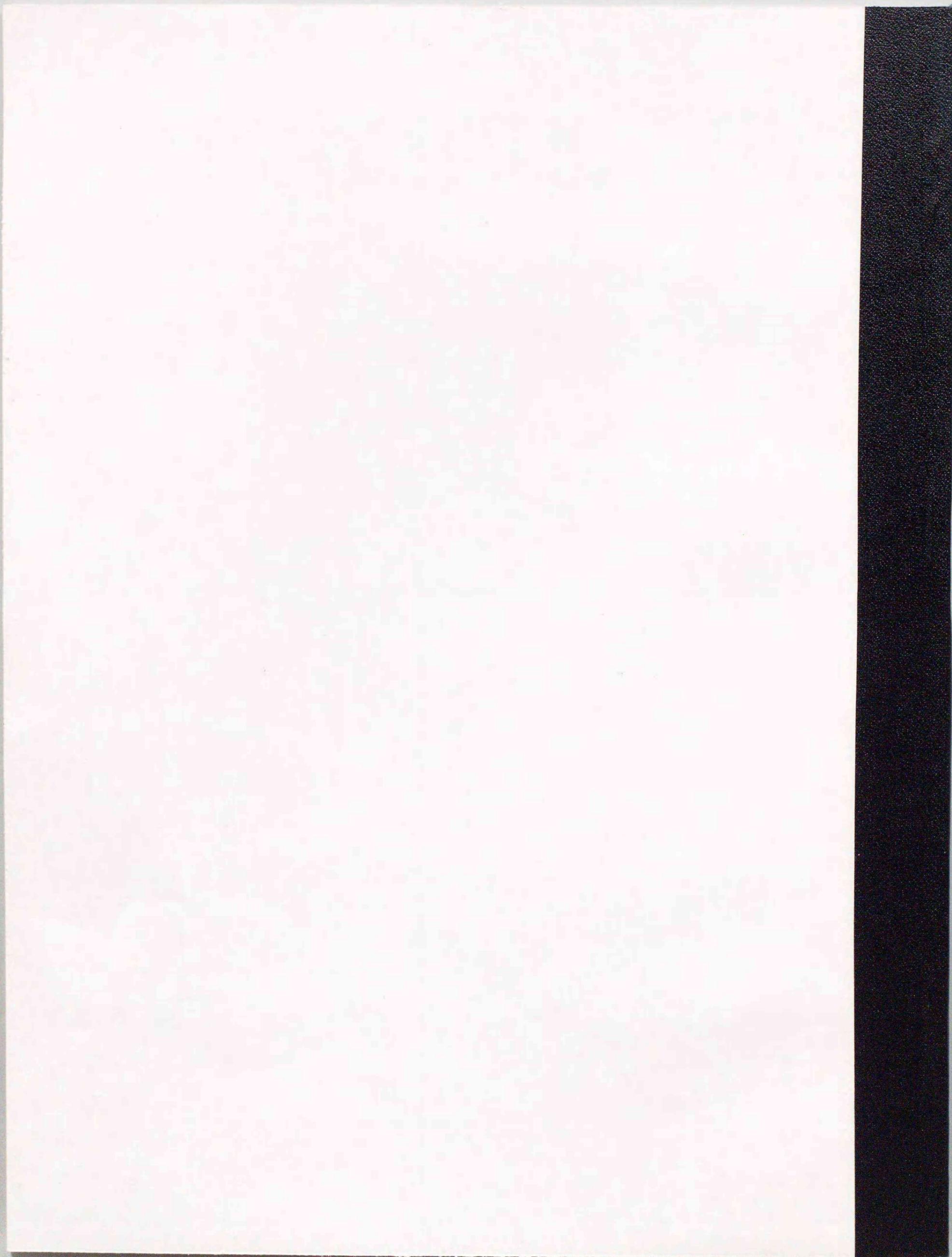
2. Uniparental disomy



4. BPI







Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

