

Unverricht-Lundborg 病検体を使用した PCR による CSTB (Cystatin B) 遺伝子の異常リピートの検討

藤岡 竜太¹⁾ 三浦 史郎²⁾ 青木 浩介³⁾
本岡 大道⁴⁾ 柴田 弘紀³⁾

Unverricht-Lundborg disease with repeat variants in the PCR-based analysis of the CSTB (Cystatin B) gene finding

Ryuta FUJIOKA Shiroh MIURA Kousuke AOKI
Hiromichi MOTOOKA Hiroki SHIBATA

【要 旨】

進行性ミオクローヌステんかんの一病型であり、染色体21q22.3上にある CSTB (Cystatin B) 遺伝子の異常リピートにより引き起こされるウンフェルリヒト・ルントボルク病 (Unverricht-Lundborg disease: ULD) 検体の遺伝子解析研究である。

進行性ミオクローヌステんかんの中で CSTB 遺伝子のリピート異常が原因の疾患は ULD として知られている。ULD を調べるために放射性同位体 (Radioisotope:RI) を使用したサザンブロッティングによる解析が行われる。そこで本研究では、簡便なポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction: PCR) を使用して CSTB 遺伝子の異常リピートの検出を試み、診断手法の確立および ULD の診断に寄与できないか検討した。PCR の結果、健常者と比較して患者では異常リピートと考えられる DNA 増幅を確認したがサンガーシークエンスによる配列確認により異常リピートではなく、別の配列の挿入が示唆される結論に至った。

【キーワード】

ミオクローヌステんかん Unverricht-Lundborg 病 CSTB PCR

1. はじめに

進行性ミオクローヌステんかんの一病型であるウンフェルリヒト・ルントボルク病(Unverricht-

Lundborg disease: ULD) は主に学童期や思春期に発症する常染色体劣性の遺伝性疾患である¹⁾²⁾。軽度のでんかん発作やミオクローヌスの症状をきたし、典型的な進行性ミオクローヌステんかんである³⁾。国内では遺伝子診断で確

¹⁾ 別府大学短期大学部食物栄養科 ²⁾ 久留米大学医学部内科学講座

³⁾ 九州大学生体防御医学研究所ゲノミクス分野 ⁴⁾ 久留米大学医学部精神神経医学講座

定したULD患者が数例報告されている⁴⁾⁵⁾。また、欧州からの報告もされており、フィンランドでは25000人に1人程度の発症があるとの報告もされている¹⁾。

本研究では、進行性ミオクローヌスてんかんの患者および母親の検体を使用し、責任候補遺伝子を特定することを目的として研究を開始した。その過程で、次世代シーケンサーのデータをもとにした遺伝子の絞り込みを実施する前に、ULDの発症に関与するとされ、以前から報告されている⁶⁾⁷⁾CSTB遺伝子の12塩基リピート配列(5'-CCCCGCCCGCG-3')のリピート異常を確かめた。通常はサザンブロッティングによる解析が行われ、PCRでは検出しにくいとの報告⁵⁾⁷⁾がある。そこでPCRによるDNAの増幅の違いから異常リピートを検出できないか検討した。検出できれば簡便に異常リピートを特定できるため分子生物学的手法による診断が可能となり新たな実験手法として期待できる。

2. 症例

両親いとこ婚の48歳男性の症例である。思春期に、物をとろうとすると手がけいれんし、物

を取り落とす症状が現れた。中1の時に初めて大発作が出現し、17歳時に構語障害をきたした。20代前半でミオクローヌスてんかんと診断されている。現在までに大発作は消失しているが、ミオクローヌスはほぼ日単位で出現している。発作間欠時脳波を図1に示す。

3. 試料と方法

○PCRとリアルタイムPCRのプライマー

以下のForwardとReverseのプライマーを使用し、PCRおよびリアルタイムPCRを実施した。

Forward Primer 5'-ctactccgactgccccttc-3'

Reverse Primer 5'-ggctcctcagcccaagtag-3'

○PCRに使用した試料の組成と反応条件

Long Range PCR Kit (LONG RANGE PCR : Taq plus DNA polymerase (Bio Basic Inc.)) を使用し以下の組成でPCRを実施した。

10×long range PCR buffer 1.0 μl

dNTP Mixture (10 mM) 0.5 μl

Forward Primer (10 μM) 0.4 μl (final conc.)



図1：発作間欠時脳波
棘徐波複合がびまん性に出現していた。図内に示している横軸のスケールが1秒、縦軸のスケールが50 μVである。

Reverse Primer (10 μ M) 0.4 μ l (final conc.)
 Long range PCR enzyme (5.0U/ μ l) 0.08 μ l
 Template DNA 5.0 ng
 Distilled water up to 10 μ l

PCRは、増幅させるDNAを93℃、3分の熱変性処理後、サイクル数を35として、93℃、15秒の熱変性、58℃、30秒のアニーリング、68℃、1分30秒の伸張反応の条件で実施した。

○アガロースゲル電気泳動

PCR後のDNA増幅試料はアガロースLE(低電気浸透)の粉末(ナカライテスク)と0.5% TBEバッファーを用いて2%のアガロースゲルを調整し135V、25分電気泳動した。

○リアルタイムPCR

健常者および患者の母親の末梢血から抽出したDNA検体を鋳型としてSYBR Green法によるリアルタイムPCRを行った。ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を使用し、CSTBにおけるコピー数

を確認した。

○サンガーシークエンス

アガロースゲル電気泳動により検出したCSTB遺伝子の12塩基リピート異常の伸張アレルと思われるバンドを切り出し、エタノール沈殿によって精製した。DNA断片を上記のPCR条件のサイクル数を10にして再度PCRを行った後、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用してサンガーシークエンスにより塩基配列を確認した。

4. 結果

アガロースゲル電気泳動の結果を図2に示した。健常者の検体と比較して患者の検体は約1000 bpの場所に異常リピートと考えられるバンドが確認された。約200 bpにもバンドが確認できるが非特異的増幅の可能性が考えられる。一方で、母親の検体も健常者と同様の結果であった。ULDは常染色体劣性遺伝であることが知られているため母親にも約1000 bpの場

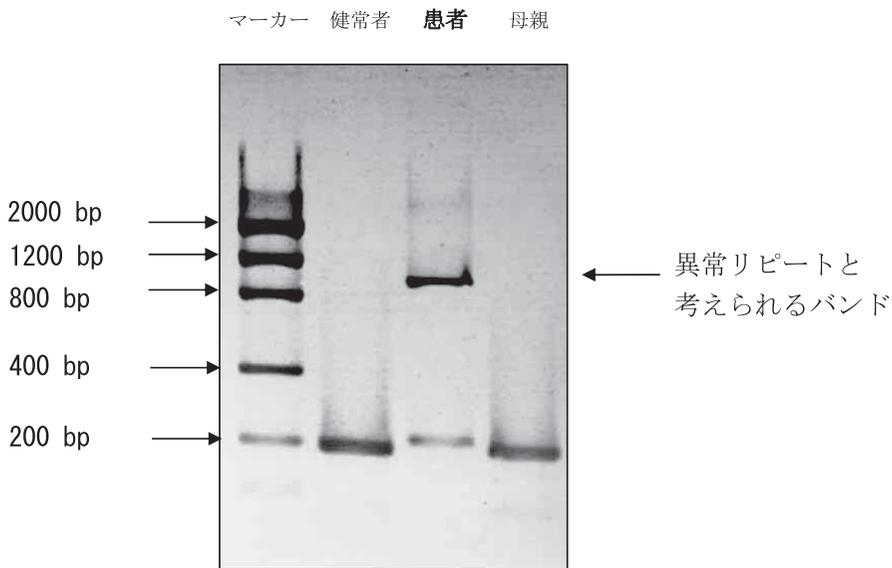


図2：アガロースゲル電気泳動

135Vの電圧で25分間電気泳動したアガロースゲルの写真である。Low mass ladderのマーカを使用し、長さは図に矢印で示した。健常者は20代の一般男性の検体を使用している。患者の異常リピートと考えられるバンド(右から2番目のレーン)は約1000 bpと約200 bpの箇所に認められた。一方、健常者と母親のバンドは約200 bpの箇所で検出された。

所にバンドが確認できると期待していたが、条件検討をしてもバンドは確認できなかった。

そこでリアルタイム PCR により、コピー数のチェックを行った (図3)。すると、健常者と比較してコピー数が半減していることが確認できた。これらの結果より、母親の伸長アレル

が PCR の条件では増えないことが示唆された。そこで、患者の異常リピートと考えられるバンドをサンガーシーケンスを使用して配列確認を試みた (図4)。結果として、12塩基リピート配列のリピート数は患者と母親ともに2であり、健常者では3であった。このため異常リ

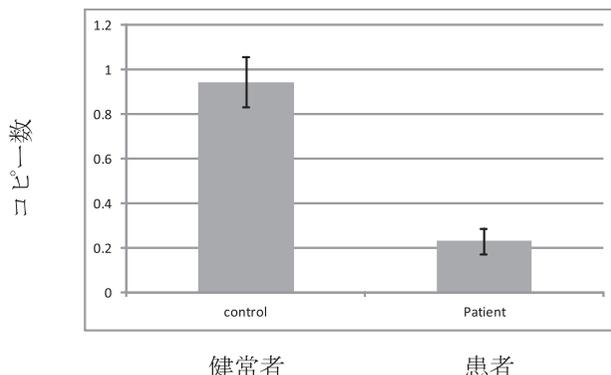


図3：リアルタイム PCR によるコピー数

縦軸はコピー数を示している。健常者のコピー数と比較して、患者は CSTB 遺伝子の当該領域のコピー数が低下していた。

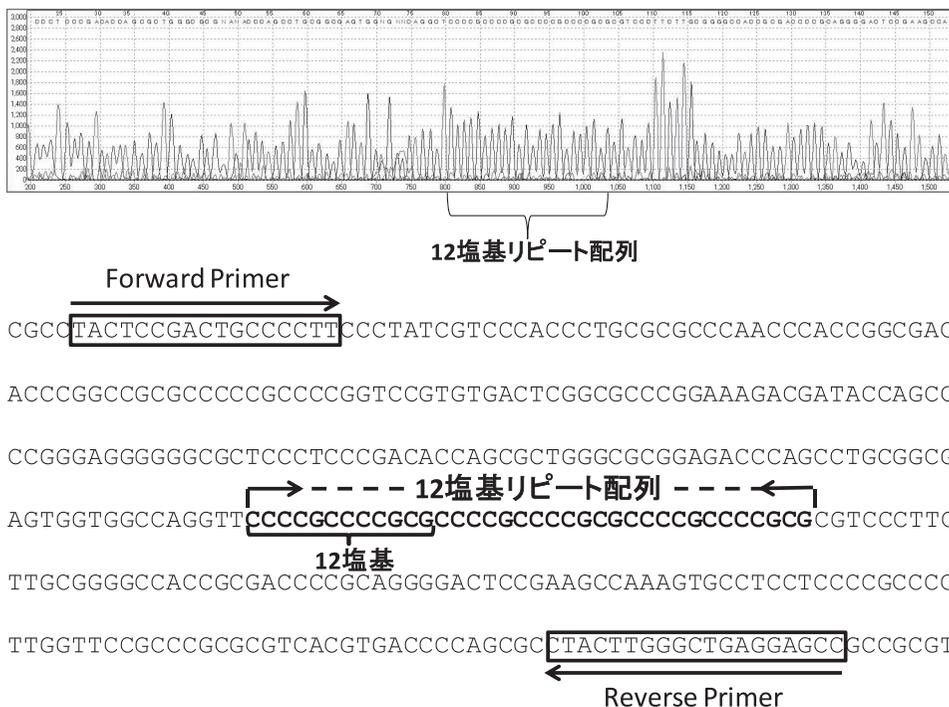


図4：患者検体のシーケンス波形とプライマー設計

サンガーシーケンスの波形と12塩基リピート配列およびプライマーの設計箇所を示した。12塩基リピート配列を図のように挟む形で Forward および Reverse のプライマーを設計し、PCR、リアルタイム PCR に使用した。

ピートは確認することができなかった。

5. 考察

リアルタイム PCRにより、母親の検体では健常者と比較してコピー数が半減していることが確認できたので、アガロースゲル電気泳動により、約1000 bpに確認されたバンドはCSTBの異常リピート伸張によるものと考えた。しかし、サンガーシークエンスの結果より否定されたため、12塩基リピート配列を含め読むことができた範囲より下流の領域に別の配列が挿入されているのではないかと推測している。下流の領域にもULDに関連のある変異は多数報告されている⁸⁾。そのために、CSTB遺伝子の12塩基リピート配列の下流領域をターゲットにして解析を進めたいと考えている。

6. 生命倫理に対する取り組み

この研究は久留米大学「生命に関する倫理委員会」および九州大学医学研究院「ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会」において承認を得た後に実施している。

謝辞

本研究は、九州大学生体防御医学研究所共同利用のサポートで行いました。

参考文献

- 1) Lehesjoki AE, Kälviäinen R. Unverricht-Lundborg Disease. *Gene Review* [Internet]
- 2) Kälviäinen R, Khyuppenen J, Koskenkorva P, Eriksson K, Vanninen R, Mervaala E. Clinical picture of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia*. 2008; 49 (4): 549-56.
- 3) Crespel A, Ferlazzo E, Franceschetti S, Genton P, Gouider R, Kälviäinen R, Korja M, Lehtinen MK, Mervaala E, Simonato M, Vaarmann A. Unverricht-Lundborg disease. *Epileptic Disord*. 2016; 1 : 18 (S2): 28-37.
- 4) 和知学, 笹川睦男, 長谷川精一, 金澤治, 遠藤耕太郎, 内藤明彦, 大沼悌一, 長嶺憲太郎, 工藤純, 清水信義: シスタチンB 遺伝子の変異が確認された Unverricht-Lundborg 病の2症例, てんかん研究 1998; 16: 100-108.
- 5) 近藤孝之, 山門穂高, 川又純, 富本秀和, 人見健文, 高橋良輔, 池田昭夫: 振戦様ミオクローヌスと稀発大発作とをみとめた Unverricht-Lundborg 病の成人例. 臨床神経学 2009; 49: 43-47.
- 6) Laloti MD, Scott HS, Genton P, Grid D, Ouazzani R, M'Rabet A, Ibrahim S, Gouider R, Dravet C, Chkili T, Bottani A, Buresi C, Malafosse A, Antonarakis SE. A PCR amplification method reveals instability of the dodecamer repeat in progressive myoclonus epilepsy (EPM1) and no correlation between the size of the repeat and age at onset. *Am J Hum Genet* 1998; 62 (4): 842-847.
- 7) Lafrenière RG, Rochefort DL, Chrétien N, Rommens JM, Cochiu JI, Kälviäinen R, Nousiainen U, Patry G, Farrell K, Söderfeldt B, Federico A, Hale BR, Cossio OH, Sørensen T, Pouliot MA, Kmiec T, Uldall P, Janszky J, Pranzatelli MR, Andermann F, Andermann E, Rouleau GA. Unstable insertion in the 5' flanking region of the cystatin B gene is the most common mutation in progressive myoclonus epilepsy type 1, EPM1. *Nat Genet*. 1997; 15(3): 298-302.
- 8) Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia*. 2008; 49 (4): 557-63.