

Whole genome amplification 法による希少なヒト死後組織からの ゲノム遺伝子における CAG リピート増加の証明

荒木紀帆^{1)*} 吉田衣智子¹⁾ 三浦由真子¹⁾ 齋藤由扶子²⁾ 饗場郁子²⁾ 小西吉裕¹⁾

1) 国立病院機構鳥取医療センター臨床研究部

2) 国立病院機構東名古屋病院神経内科

Demonstration of a CAG repeat in androgen receptor gene in patients with
Kennedy-Alter-Sung type of familial spinal and bulbar muscular atrophy
from a trace amount of postmortem tissue using whole genome amplification

Kiho Araki^{1)*}, Ichiko Yoshida¹⁾, Yumako Miura¹⁾, Yuko Saito²⁾, Ikuko Aiba²⁾,
Yoshihiro Konishi¹⁾

1) Department of Clinical Research, NHO Tottori Medical Center

2) Department of Neurology, NHO Higashi-Nagoya Hospital

*Correspondence: ykonishi@tottori-iryu.hosp.go.jp

要旨

CAG リピート病の 1 つである伴性劣性球脊髄性筋萎縮症 (SBMA) は, Kennedy, Alter および Sung が 1968 年に記載したことから, Kennedy-Alter-Sung 症候群 (Kennedy 病) とも称されている. 1991 年にアンドロゲン受容体遺伝子の第一エクソンに存在する CAG リピート数が, SBMA 例では通常より増加していることが Spada ら Fischbeck のグループにより発見され, これが本疾患の原因であるとされている. 1991 年以前の症例で死後の剖検組織が全てホルマリン固定されている場合は遺伝子解析が困難であるが, 幸い筋生検や陰嚢部皮膚生検組織が, 厚さが数 μm の未染色切片標本として少しでも残されている場合, また幸い一部の死後剖検組織が凍結保存されている場合でも, 保存スペースや維持費の関係から -80°C の deep freezer で凍結保存できる組織量には限界があり, しかも研究者 1 名当たりが利用できる組織量が極めて少ない場合, このような希少なヒト組織から Spada ら Fischbeck のグループが報告した単なる PCR 法では CAG リピートが証明できないことがある. 希少な組織から有効に遺伝子解析をする方法として, whole genome amplification (WGA) 法が開発されている. この WGA 法により, 数 ng のゲノム DNA から, それを 10^4 から 10^6 倍に増幅して数 μg の高分子量 DNA を得ることが可能である. このような事態を想定し, 本研究では SBMA の 2 剖検例の凍結脳組織の微量の DNA からアンドロゲン受容体遺伝子の CAG リピートの証明を試みた. 凍結大脳後頭葉皮質組織 1~2 mg から, ゲノム DNA の抽出を NucleoSpin Tissue XS (TaKaRa) で行って, GenomiPhi V2 Amplification Kit (GE Healthcare) を用いた WGA 法によってゲノム DNA の複製を行い, 続いて AR 遺伝子第一エクソン内の CAG リピートを含む部分を PCR 増幅し, さらに nested PCR を行った. その産物をアガロース電気泳動した結果, 本研究で用いた SBMA の 2 例のいずれでも約 750 bp の増幅産物が認められ, コントロール脳より約 100 bp 大きい位置に電気泳動上でバンドが確認された. シーケンスの結果, 大脳後頭葉皮質組織での CAG リピートは, SBMA の 2 例でそれぞれ 69, 49 であり, 同時に行ったコントロール脳 (大