

# ファブリー病

# UPDate

責任編集

**衛藤義勝** 東京慈恵会医科大学遺伝病研究講座教授

編集

- 井田博幸** 東京慈恵会医科大学小児科学講座教授  
**遠藤文夫** 熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野教授  
**大橋十也** 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センターDNA医学研究所遺伝子治療研究部/小児科学講座教授  
**奥山虎之** 国立成育医療研究センターライソゾーム病センター長  
**櫻庭均** 明治薬科大学分析化学/臨床遺伝学教授  
**辻省次** 東京大学大学院医学系研究科脳神経病学専攻神経内科学教授  
**鄭忠和** 鹿児島大学大学院医学総合研究科心筋症病態制御講座/循環器・呼吸器・代謝内科学教授  
**成田一衛** 新潟大学大学院医学総合研究科腎・膠原病内科学教授  
**湯澤由紀夫** 藤田保健衛生大学医学部腎内科学教授

 診断と治療社

## 5 遺伝子診断

新潟大学大学院医歯学総合研究科腎臓医学医療センター 丸山弘樹  
大分大学医学部トリツク又医学講座 石井 達

フアラリー病 (Fabry disease) は、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A ( $\alpha$ -galactosidase A) 活性の低下が原因で

全身臓器のライソソーム (lysosome) にグロボトリンアオリセラミド (globotriaosylceramide ; GB3) が蓄積するライソソーム病 (lysosomal storage disease) であり、慢性腎臓病 (chronic kidney disease ; CKD) を含む多臓器障害をきたす X 連鎖遺伝性疾患である。フアラリー病では、酵素補充療法 (enzyme replacement therapy ; ERT) が行われ、シヤペロン療法 (chaparrone therapy) も治療段階にある。

遺伝子診断は、発症者の遺伝子変異の確定、家系調査、確定診断、スクリーニング、シヤペロン療法の適応者の選択と効果の予想などに使われる。2011年2月、日本医学会から「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」が発表された。本項では、フアラリー病の遺伝子診断において必要なガイドラインの内容と  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ A 遺伝子 (GLA) 検査の方法について述べる。

## 1 遺伝学的検査の倫理的対応

## a 遺伝学的検査・診断を実施する際に考慮すべき遺伝情報の特性

遺伝学的検査・診断を実施する際に考慮すべき遺伝情報の特性を表 1<sup>1)</sup>にまとめ示す。表 1<sup>1)</sup>に記載した特性は、フアラリー病においても当てはまる。

## b 遺伝学的検査の留意点

1) すでに発症している患者の診断を目的として行われる対象遺伝学的検査  
遺伝学的検査の事前の説明と同章・了解(成人におけるインフォームドコンセント)の承認は、原則として主治医が行う。また、必要に応じて専門家による遺伝カウンセリングや意思決定のための支援を受けられるように配慮する<sup>1)</sup>。たとえば、透析患者を対象とするフアラリー

病のスクリーニングで遺伝学的検査を行う場合は、これに相当する。

## 2) 発症前診断を目的に行われる

発症前診断を目的に行われる遺伝学的検査は、事前に適切な遺伝カウンセリングを行ったのちに実施する<sup>1)</sup>。

## 3) 未成年者など同意能力がない者を対象とする遺伝学的検査

すでに発症している疾患の診断を目的として、未成年者や知的障害者など同意能力がない患者に対して検査を実施する場合は、本人に代わって検査の実施を承諾することのできる立場にある者の代議を得る必要があるが、その際は、当該被検査者の最善の利益を十分に考慮すべきである。また、被検査者の理解度に応じた説明を行い、本人の了解(インフォームドコンセント)を得ることが望ましい。

未成年期に発症する疾患で発症前診断が健康管理上大きな有用性があることが予測される場合も同様である。

成年期以降に発症する疾患の発症前診断については、原則として本人が成人し自律的に判断できるまで実施を延期すべきで、両親等の代議で検査を実施すべきではない<sup>1)</sup>。

フアラリー病家系では、発症前診断を行うと、早期発見、早期治療へとつなげることができ、フアラリー病の発症時期は、未成年期の症例もあることから、発症前診断の対象は未成年であることもある。したがって、フアラリー病の発症前診断を目的とした遺伝子診断に関しては上記のガイドラインを熟慮して行うことが重要である。

## 2 GLA

GLA は X 染色体の長腕 Xq22.1 に存在する。本遺伝子のサイズは 12,436 bp (base pair (塩基対)) で、エクソン 1 (exon 1) (254 bp) の開始コドン (initiation codon) 以下の領域 194 bp、エクソン 2 (175 bp)、エクソン 3 (178 bp)、エクソン 4 (92 bp)、エクソン 5 (162 bp)、エクソン 6 (198 bp)、

エクソン 7 (291 bp) の 7 個のエクソンから構成される翻訳領域 (coding sequence ; CDS) は、サイズが 1,290 bp で、31 個のアミノ酸からなるシグナルペプチドを含む 429 個のアミノ酸から構成される酵素と終止コドン (termination codon) をコードする<sup>2)</sup>。

## 3 遺伝子診断の方法

## a 検体の採取

フアラリー病の遺伝子変異は、生殖細胞系列変異であることから、個体を形成するすべての細胞に共通して存在し、遺伝情報として子孫に伝えられる変異である。この変異を明らかにするための検体として、人体を構成するどの細胞も用いることが可能であるが、通常、末梢血が使われる。

## b 核酸の単離と遺伝子解析

筆者が行っている方法を述べる。エクソン 1 とエクソン 7 の領域についてはそれぞれゲノム DNA を検体とするポリメラゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) で増幅し、また、すべてのエクソン 1 からエクソン 7 の前半領域までの領域についてはトータル RNA を検体とした逆転写ポリメラゼ連鎖反応 (reverse transcription PCR ; RT-PCR) で増幅し、得られた産物を精製してダイレクトシーケンシングで解析する。これで alternative splicing による変異も検出できる<sup>3)</sup>。

## 1) 採血

DNA 単離には、エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA) は逆転写酵素 (reverse transcriptase) の活性を阻害しないので、EDTA 入り (Na 入り、K 入り、どちらでも構わない) 採血管を用いる。ヘパリンは逆転写酵素の活性を阻害するので、ヘパリン加採血を選択する。

RNA 単離には、採血管 PAXgene<sup>TM</sup> Blood RNA Tube (日本ベクトン・ディッキンソン) と RNA 精製用 PAXgene<sup>TM</sup> Blood RNA Kit (日本ベクトン

表 1 遺伝学的検査・診断を実施する際に考慮すべき遺伝情報の特性

- 1 生涯変化しないこと
- 2 血縁者間で一部共有されていること
- 3 血縁関係にある親族の遺伝型や表現型が比較的正確な確率で予測できること
- 4 非発症保因者 (将来的に発症する可能性はほとんどないが、遺伝子変異を有しており、その変異は次世代に伝える可能性のある者) の診断ができる場合があること
- 5 発症する前に将来の発症をほぼ確実に予測することのできる場合があること
- 6 出生前診断に利用できる場合があること
- 7 不適切に扱われた場合には、被検査者および被検査者の血縁者に社会的不利益がもたらされる可能性があること

(日本医学会: 医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン)

2011 <http://jams.med.or.jp/guideline/genetics-diagnosis.pdf>

ン・デイクキンソン)から構成される PAXgene™ Blood RNA システム(日本ベクトン・デイクキンソン)を用いる。全血 2.5ml を PAXgene™ Blood RNA Tube(日本ベクトン・デイクキンソン)に採血する。

2) ゲノム DNA の単離

QIAamp DNA Blood Midi/Maxi Kit™(株)キアゲン(QIAGEN))で全血 3~7 ml から DNA を単離する。

材料	量
1 KOD-Plus™ (1 U/μL) (東洋紡)	1 μL
2 蒸留水	35-X μL
3 テオキシクロオチドミックス(2 mM)	5 μL
4 KOD-Plus™ 用 10 X バッファー	5 μL
5 硫酸マグネシウム(25 mM)	2 μL
6 *1 センズライマー(50 pmol/μL)	1 μL
7 **アランチセンスプライマー(50 pmol/μL)	1 μL
8 ゲノム DNA (100 ng)	X μL
合計	50 μL

- 工程
- 94℃まで上げてから、以下の2を開始する。
  - 94℃、2分 → 94℃、15秒 → 55℃、30秒 → 68℃、30秒 → 4℃ 30秒インキュベーション
  - QIAquick PCR Purification Kit™(キアゲン)で PCR 産物を精製する。2% NucleoSpin™GTGアカロース(カカラ)で電気泳動し、バンドを切り出して、QIAquick Gel Extraction Kit™(キアゲン)で精製する。

図1 ポリヌラーゼ連鎖反応(PCR)プロトコル

\*1: エクソン1の CDS 領域の増幅用プライマー  
 DNA-P1 センズプライマー: 5'-CGAGTTGCCAGAGAAACA-3'  
 DNA-P2 アランチセンスプライマー: 5'-GAGACTCCAGTCC-3'  
 \*2: エクソン7を含む領域の増幅用プライマー  
 DNA-P3 センズプライマー: 5'-ACAAAGTCTGATAGTTCTGA-3'  
 DNA-P4 アランチセンスプライマー: 5'-CAGGAAAGTAGTAGTTGCCAA-3'

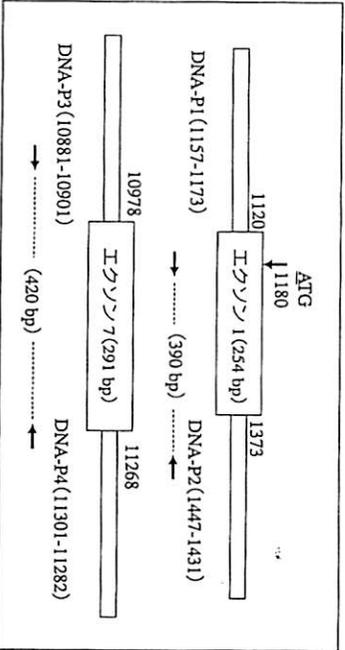


図2 エクソン1(CDS領域)、エクソン7増幅用PCRプライマーセットとPCR産物

3) トータル RNA の単離

PAXgene™ Blood RNA Kit(日本ベクトン・デイクキンソン)でトータル RNA を単離する。

4) ポリヌラーゼ連鎖反応(PCR)

単離したゲノム DNA を用いて、図1に示したプロトコルで、図2に示すエクソン1の CDS 領域、エクソン7を調べる。

5) 逆転写ポリヌラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

単離したトータル RNA を用いて、図3に示したプロトコルで、図4に示す mRNA のエクソン1の後半領域からエクソン7の前半領域とすべでのエクソン-イントロン接合部を含めて調べる。

6) 遺伝子解析

PCR 産物と RT-PCR 産物をダイレクトシーケ

(1) RT-PCR	
(1) RT(-本鎖 cDNA 合成)材料	
1 リボヌクレアーゼフリー水	11-X μL
2 5X バッファー	4 μL
3 テオキシクロオチドミックス(10 mM)	2 μL
4 リボヌクレアーゼインヒビター	1 μL
5 ランダムプライマー(25 pmol/μL)	1 μL
6 トータル RNA(240 ng)	X μL
7 Reverta Ace-a™ (10 U/μL) (東洋紡)	1 μL
合計	20 μL
工程	
1 30℃、10分 → 42℃、20分 → 99℃、5分 → 4℃、5分	
(2) PCR 材料	
1 (1)の RT 反応液	20 μL
2 リボヌクレアーゼフリー水	63 μL
3 KOD-Plus™ 用 10 X バッファー	10 μL
4 硫酸マグネシウム(25 mM)	4 μL
5 RNA-P1 センズプライマー(100 pmol/μL)	0.5 μL
6 RNA-P2 アランチセンスプライマー(100 pmol/μL)	0.5 μL
7 KOD-Plus™ (1 U/μL) (東洋紡)	1 μL
合計	100 μL
工程	
1 94℃まで上げてから、以下を開始する。	
2 94℃、2分 → 94℃、15秒 → 55℃、30秒 → 68℃、1分 30秒 → 4℃ 30秒インキュベーション	
3 RNA-P1 センズプライマー: 5'-TATGCTGCCGGTCACC-3' RNA-P2 アランチセンスプライマー: 5'-TTAAAGTAAGTCTTTTAATGACAT-3' テオキシクロオチドミックスは、(1)RT 反応液に含まれているので、追加は不要である。	
4 RT-PCR産物を QIAquick PCR Purification Kit™(キアゲン)で精製する。この段階で電気泳動すると PCR 産物はヌクレオチドとして認められる。標的配列を拾い出すためにNested PCRを行う。	

図3 逆転写ポリヌラーゼ連鎖反応(RT-PCR)プロトコル①

エンジシングで両鎖解析する。

7) 遺伝子変異の確認

RT-PCRの結果から遺伝子変異が認められた場合、ゲノムDNAを用いたPCR産物をシークエンシングで確認することができる。特に、ヌクレオチド置換の場合、変異はイントロン部分にあることから、変異が予想されるエクソン周辺について解析する必要がある。

遺伝子診断の受付

前述した採血条件で得られた検体を発送して

[2] Nested PCR

材料	量
1 KOD-Plus™ (1 U/μL)	1 μL
2 蒸留水	31 μL
3 デオキシヌクレオチド三リン酸 (2 mM)	5 μL
4 10 × PCR Buffer	5 μL
5 硫酸マグネシウム (25 mM)	2 μL
6 RNA-P3 センズアライマー (100 pmol/μL)	0.5 μL
7 RNA-P4 センズアライマー (100 pmol/μL)	0.5 μL
8 [1] で精製した RT-PCR 産物	5 μL
合計	50 μL

工程

- 94 °C まで上げてから、以下を開始する。
- 94 °C, 2分 → 94 °C, 15秒 → 55 °C, 30秒 → 68 °C, 1分 → 4 °C 30秒サイクル
- RNA-P3 センズアライマー: 5'-TTGGCAAGGACCGCTAC-3'
- RNA-P4 センズアライマー: 5'-TGGCGATGTAAGAAGCGC-3'
- QIAquick PCR Purification Kit™ (キアゲン) で PCR 産物を精製する。2% NucleoSpin™ GTCGアカローヌ (タカラバイオ) で電気泳動し、バンドを切り出して、QIAquick Gel Extraction Kit™ (キアゲン) で精製する。

図3 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) プロトコル②

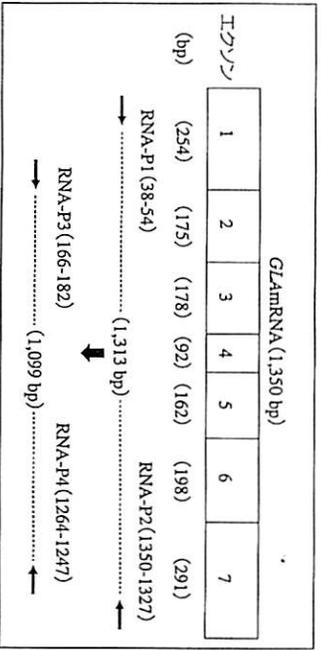


図4 エンジンI後半からエンジンI前半までのエンジンI-イントロン接合部解析用 RT-PCR のプライマーセットと RT-PCR 産物

もらう。

おわりに

フテブリー病の遺伝学的検査は、診療報酬点数区分 D006-4 で 4,000 点の保険点数が認められている。検査は、酵素活性測定法、DNA シークエンズ法または培養法による、とされて

いる。フテブリー病の遺伝子診断を 4,000 点の保険点数で行う検査会社はない。フテブリー病の遺伝子診断は、大学などの研究機関がカービスで行っているのが現状である。検査費用の負担という課題がある。活用できる遺伝子診断の体制を構築する必要がある。

文献

- 1) 日本医学会：医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン。2011 <http://jams.med.or.jp/guideline/genetics-diagnosis.pdf>
- 2) Konecny R, Desnick RJ, Bishop DF: Nucleotide sequence of the human α-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 3301-3302
- 3) Shimotori M, Maruyama H, Nakamura G, et al.: Novel Mutations of the GLA Gene in Japanese Patients with Fabry disease and their functional characterization by active site specific chaperone. *Hum Mutat* 2008; 29: 331
- 4) Ishii S, Nakano S, Minamikawa-Tachino R, et al.: Alternative splicing in the α-galactosidase A gene: increased exon inclusion results in the Fabry cardiac phenotype. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 994-1002

- ・本書の複製権・翻訳権・上映権・譲渡権・公衆送信権（送信可能化権を含む）は株式会社診断と治療社が保有します。
- ・**JCOPY**（財団法人著作権管理機構 委託出版物）  
本書の無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。  
複写される場合は、そのつと事前に、財団法人著作権管理機構  
（電話 03-3513-6969, FAX03-3513-6979, e-mail: info@jcopy.or.jp）  
の許諾を得てください。

P329

ファミリー病<sup>びょう</sup> UpDate

ISBN978-4-7878-1930-7

2013年1月4日 初版第1刷発行

---

責任編集 衛藤義勝<sup>えとうよしかつ</sup>  
編集者 井田博幸<sup>い だひろゆき</sup>, 遠藤丈夫<sup>えんどうちゆうお</sup>, 大橋十也<sup>おおはしとうや</sup>, 奥山虎之<sup>おくやまとらゆき</sup>, 櫻庭均<sup>さくらばひとし</sup>,  
辻省次<sup>つじしやうじ</sup>, 鄭忠和<sup>ていちゆうわ</sup>, 成田一衛<sup>なりたいちえい</sup>, 湯澤由紀夫<sup>ゆざわゆきお</sup>  
発行者 藤実彰一  
発行所 株式会社 診断と治療社  
〒100-0014 東京都千代田区永田町 2-14-2 山王グランドビル 4階  
TEL: 03-3580-2750(編集)  
03-3580-2770(営業)  
FAX: 03-3580-2776  
E-mail: hen@shindan.co.jp(編集)  
eigyobu@shindan.co.jp(営業)  
URL: http://www.shindan.co.jp/  
振替: 00170-9-30203  
表紙デザイン ジェイアイ  
印刷・製本 株式会社 加藤文明社

---

©Yoshikatsu ETO, 2013. Printed in Japan.  
乱丁・落丁の場合はお取り替えいたします。

[検印省略]