

DNA diagnosis of ten Japanese patients with tuberous sclerosis complex: Development of systematic mutational analysis of TSC genes and certification of sensitivity for clinical application

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9755

日本人結節性硬化症患者10人のTSC遺伝子診断： 臨床応用のための系統的遺伝子変異解析法の開発と検出感度の検定

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管発生発達病態学

(旧講座名：小児科学)

(主任：小泉晶一教授)

脇 坂 晃 子

結節性硬化症は、脳、皮膚、腎臓、心臓を中心に全身のあらゆる臓器に過誤腫を形成する常染色体優性遺伝病である。疾患責任遺伝子 *TSC1*、*TSC2* が同定され既に様々な遺伝子変異が報告されているが、変異のホットスポットがない、微細変異から大欠失まで変異のバリエーションに富む、体細胞モザイク症例が少なからず存在する、などの理由により現実には遺伝子診断は難航する。また変異スクリーニングに多用される1本鎖高次構造多型 (single-strand conformational polymorphism, SSCP) 法、Hetero duplex (HD) 法の変異検出感度に関しても不明である。本研究では日本人結節性硬化症患者10名を対象にSSCP法、HD法、ダイレクトシークエンス法、Long PCR法、定量的サザンブロット法を組み合わせた系統的アルゴリズムに従った遺伝子解析を行った。その結果、2例で *TSC1* 変異 (スプライス変異、大欠失)、6例で *TSC2* 変異 (大欠失、スプライス変異、ミスセンス変異、フレームシフト変異3例) が同定された。*TSC1* の大欠失はモザイクであり、*TSC2* のミスセンス変異は腫瘍のみに認められた。一方で、対象患者の全ての *TSC* 翻訳領域エクソンの塩基配列を決定し、SSCP法、HD法の感度検定を行った。変異検出率は各々6/14 (43%)、5/14 (36%) であったが、互いに相補的な傾向が見られ両者を合わせた感度は9/14 (64%) に上昇した。臨床症状と遺伝子変異との相関では *TSC1* 変異を持つ症例と *TSC2* モザイク例で明らかに軽症の傾向がみられた。今回の結果と過去の報告より本邦においても *TSC* 変異のホットスポットは存在せず、エクソン毎のPCRをベースとしたスクリーニング法では検出し得ない大欠失も存在するため、DNA診断の際には各種検査法を合理的に配置した系統的な解析が必須であると結論された。

Key words tuberous sclerosis, hamartin, tuberin, gene mutation

緒 言

結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex, TSC) は、全身の様々な臓器や組織に種々の過誤腫や腫瘍病変が発生し、これによる様々な臓器障害が認められる疾患である。比較的頻度の高い常染色体優性遺伝病であり約6,000~10,000出生に1人の割合で発症するとされている¹⁾。主要病変としては、大脳皮質結節や上衣下結節、心横紋筋腫、腎臓や肝臓に発生する多発性の血管平滑筋脂肪腫、顔面や爪下などに発生する血管線維腫、網膜に発生する過誤腫などがある²⁾。このうち、特に中枢神経病変は、精神発達遅滞や難治性てんかん、自閉症などを引き起こし臨床的に最も問題となる。約1/3が家族発症で、残りの2/3は孤発例であるが、症状の出現は同一家系内ですら非常に個体差が大きく、全く普通に生活している患者から、発語もなく一生寝たきりの患者の兄弟例まで存在する^{3)~5)}。結節性硬化症の

責任遺伝子として異なる2つの遺伝子 *TSC1* および *TSC2* が、患者の家系を利用したポジショナルクローニングにより同定されている⁶⁾⁷⁾。*TSC1* は、第9番染色体長腕9q34に存在し、21個のコードエクソンと2個のリーダーエクソンで構成され hamartin 蛋白をコードする。Hamartin 蛋白は1164アミノ酸から成り、分子量は約130kDaである。カルボキシ末端には約230アミノ酸から成るコイルド・コイル構造をとる領域が存在し、アミノ末端側には膜貫通領域に似た疎水性の高い領域が存在しているが、その生理的機能についてはよく分かっていない⁶⁾。一方、*TSC2* は第16番染色体短腕16p13.3に存在し、41個のエクソンで構成され tuberin 蛋白をコードする。Tuberin はGTPアーゼ活性化因子 (GTPase-activating protein, GAP) 蛋白と一部相同性があり、rap1やrab5に対するGAP活性を持つ⁸⁾⁹⁾。これまでに、結節性硬化症の腫瘍病変において、9q34および16p13.3におけるヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity, LOH) が認めら

平成18年1月27日受付、平成18年3月7日受理

Abbreviations : dHPLC, denaturing high performance liquid chromatography; GAP, GTPase-activating protein; HD, hetero duplex; LOH, loss of heterozygosity; mTOR, mammalian target of rapamycin; PKD1, polycystic kidney disease type 1; SEGA, subependymal giant cell astrocytoma; SSCP, single-strand conformation polymorphism; TBE, Tris-boric acid EDTA; TSC, tuberous sclerosis complex; RT-PCR, reverse transcriptase PCR

れており, *TSC1*, *TSC2* はともに腫瘍抑制遺伝子としての働きを担っていると考えられる^{6) 10)~13)}. また, 最近になって hamartin 蛋白と tuberin 蛋白が直接結合する事が免疫沈降法によって判明し, さらに, この蛋白複合体が PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) から S6 キナーゼ (S6 kinase, S6K) に至る経路の中間に位置する哺乳類ラパマイシン標的蛋白質 (mammalian target of rapamycin, mTOR) のリン酸化を抑制し, この経路の制御機構に直接関与することが示唆された^{11) 14)}. これまでに多数の *TSC1* 遺伝子の変異および *TSC2* 遺伝子の変異の報告があるが, この中で *TSC1* 遺伝子変異の大部分は, フレームシフト変異による蛋白の早期翻訳終結に至るものである. ミスセンス変異や大欠失の存在はほとんど報告されていない. 一方, *TSC2* 遺伝子の変異は様々で, 2~4% から最大 20% の患者で遺伝子の大きな欠失を認めたと報告されており^{7) 15)}, また一部の症例では隣接する *PKD1* (polycystic kidney disease type 1) 遺伝子の欠失を含むという報告もある^{16) 17)}. *PKD1* は多発性嚢胞腎 1 型の責任遺伝子であり, *TSC2* と *PKD1* を同時に欠失する隣接遺伝子症候群患者では, 結節性硬化症の臨床症状に加え, 乳児期から早発性の多発性嚢胞腎が出現する. 一方で *TSC1*, *TSC2* ともに体細胞モザイク個体の存在が少なからず存在することも知られている. 文献によりその推定頻度はまちまちであるが, 少なくとも 5% 以上, 最大で 20% の結節性硬化症患者が体細胞モザイク症例であるとされている^{18) 19)}.

これまでの TSC 患者における *TSC1* および *TSC2* 遺伝子の変異をまとめた報告では, 変異の検出率は 12~83% と大きなばらつきがある^{20)~23)}. ほとんどの論文で検出率が充分でないのは, *TSC* 遺伝子変異は点変異から大欠失まで多種多様であること, 変異の分布も特定の領域に偏ったホットスポットを作らず広範囲におよぶこと, 変異を体細胞モザイクでもつ個体が少なからず存在すること, 等が原因として考えられる. また, 変異検出のスクリーニング法として多くの論文で一本鎖高次構造多型 (single-strand conformational polymorphism, SSCP) 法や HD (hetero duplex) 法が採用されているが, これらの方法が実際にどの程度 *TSC* 遺伝子変異を検出しようかについて感度が検定されていない.

遺伝子変異型と臨床症状との関係においては, 初期の論文では明らかな相関は認められなかった⁵⁾. しかし, 最近になって, *TSC1* 遺伝子の変異は TSC 患者の少ない集団でのみ認められ (13-34%), 特に孤発例では変異頻度が 9-15% とさらに少ない事^{6) 24)~27)}, また, 表現型においても *TSC1* に変異のある患者

の方が *TSC2* に変異のある患者と比較して臨床症状が軽度である事が報告されている^{24) 25)}. ただし現在までに報告された日本人患者の *TSC* 遺伝子解析例は少なく, 遺伝子型と表現型の相関や遺伝子変異の偏りなどについて民族による差があるかどうかについては不明である.

以上のような事実を踏まえ, 今回, 筆者は結節性硬化症の遺伝子診断を実用化するため, 日本人患者 10 症例を対象に各種遺伝子検査法を合理的に配置した系統的な *TSC* 遺伝子解析を行い, これらの検査結果を検討した.

対象および方法

I. 対象

対象は, 金沢大学医学部付属病院小児科で管理中の結節性硬化症患者 10 例である. 症例 1~9 は結節性硬化症国際診断基準 (表 1)²⁸⁾ に基づき, 臨床的に結節性硬化症と確定診断 (definite TSC) された. 一方, 症例 10 は上衣下巨細胞性星細胞腫

Table 1. Revised Diagnostic Criteria for Tuberous Sclerosis Complex; Roach et al., 1998⁶⁸⁾

Major Features	
1. Facial angiofibromas or forehead plaque	
2. Nontraumatic unguar or periungual fibroma	
3. Hypomelanotic macules (three or more)	
4. Shagreen patch (connective tissue nevus)	
5. Multiple retinal nodular hamartomas	
6. Cortical tuber	
7. Subependymal nodule	
8. Subependymal giant cell astrocytoma	
9. Cardiac rhabdomyoma, single or multiple	
10. Lymphangiomyomatosis	
11. Renal angiomyolipoma	
Minor Features	
1. Multiple, randomly distributed pits in dental enamel	
2. Hamartomatous rectal polyps	
3. Bone cysts	
4. Cerebral white matter radial migration lines	
5. Gingival fibromas	
6. Nonrenal hamartoma	
7. Retinal achromatic patch	
8. "Confetti" skin lesions	
9. Multiple renal cysts	
Definite Tuberous Sclerosis Complex:	
Either two major features or one major feature plus two minor features	
Probable Tuberous Sclerosis Complex:	
One major plus one minor feature	
Possible Tuberous Sclerosis Complex:	
Either one major feature or two minor features	

Table 2. Clinical data of patients

Patient number	F/S	Age at exam	Skin findings				Neurological findings				Cardiac rhabdomyoma	Renal findings	Others	
			AF	UF	HM	SP	CT/MRI	Epilepsy	MR	Autism				Ret. Ham.
1	S	11	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	IS	Severe	(+)	(+)	(+)	PCK	
2	F	9	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	IS	Moderate	(+)	(+)	(+)	AML	
3	S	19	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	CPS,GS	Moderate	(-)	(-)	(+)	AML	
4	S	9	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	IS	Severe	(+)	(-)	(+)	AML	Bedridden
5	S	28	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	GS	Severe	(+)	(-)	(-)	AML	
6	F	13	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	CPS,GS	Severe	(+)	(-)	(-)	AML	
7	S	15	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	CPS	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
8	S	17	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	AML	
9	S	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	CPS	(-)DQ80	(-)	(-)	(+)	(-)	
10	S	20	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	only SEGA

(+), positive in any degree; (-), negative; F/S, familiar or sporadic; AF, facial angio fibroma; UF, unguar fibroma; HM, hypopigmented macule; SP, shagreen patch; CT/MRI, brain CT or MRI lesions compatible to TSC; IS, infantile spasms; CPS, complex partial seizure; GS, generalized seizure; MR, mental retardation; severe, no word; moderate, can speak; DQ, developmental quality; Ret.Ham., retinal hamartoma; PCK, polycystic kidney; AML, renal angiomyolipoma; SEGA, subependymal giant cell astrocytoma.

(subependymal giant cell astrocytoma, SEGA) のみを認め、臨床的には結節性硬化症可能性あり (possible TSC) の症例であった (表2)。遺伝子検査時年齢は1歳~28歳で、神経学的合併症としては9例にてんかん、6例に自閉性障害を認めた。精神発達遅滞は7例で認められたが、このうち2例では会話可能であった。この10例について、TSC遺伝子解析を行った。なお、この研究は、「結節性硬化症の重症度に関する遺伝的要因の解析」として、平成14年5月28日、金沢大学ヒトゲノム倫理審査第20号の承認を得た。また、検査前に患者およびその保護者に研

究内容を十分説明し、書面で同意を得た上で研究を実施した。

II. 方法

今回試みた系統的 TSC 遺伝子検査法全体の流れを図1に示す。対象10名の末梢EDTA血5~10mlよりDNAを抽出。全症例に対し TSC1, TSC2 各々の全翻訳領域エクソンをPCR法で増幅し、プーリングしておく。得られたPCR産物の一部をSSCP/HD法でスクリーニングし、バンドシフトがみられたPCR産物につきダイレクトシーケンス法で塩基配列を決定した。バンドシフトが認められなかった場合、またはバンドシフトが認められたがシーケンスの結果、DNA多型であると判明した場合は、TSC1, TSC2 双方の全翻訳領域エクソンに関しプーリングしておいたPCR産物を用いてダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。ここまでの経過で翻訳領域エクソンの変異が同定されなかった症例に対しては、TSC1, TSC2 各々の遺伝子内での大きな欠失を検出するため、各々の遺伝子に対する long PCR法によりスクリーニングした。それでも変異が同定されなかった症例に関しては、各々の遺伝子について遺伝子領域全体を含む大欠失を想定し、定量的サザンブロット法にて解析した。上記のアルゴリズムに従い TSC 変異解析を進行したが、SSCP/HD法の検出感度に関しても検討するため、実際には全ての症例の全てのPCR増幅産物に対しダイレクトシーケンシングを行いその塩基配列を決定した。

1. DNA抽出

血液からのDNAの抽出は Lahiriら²⁹⁾の方法に従った。簡単

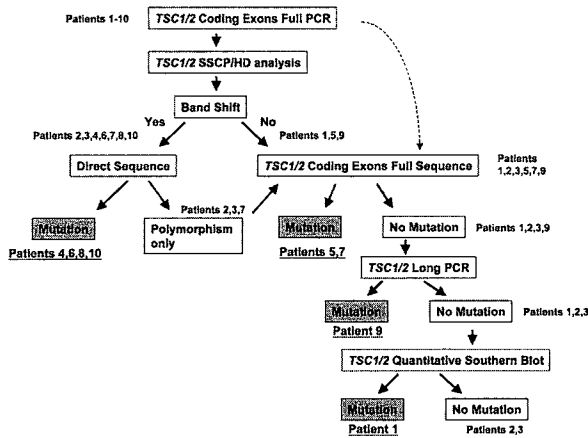


Fig. 1. An algorithmic diagram of TSC mutational analysis.

Table 3. TSC1 exon primers

Forward primer	Sequence	Reverse primer	Sequence	Product size (bp)
Ham-3F	5'-GAACCTTCAGAACCTGTAGC-3'	Ham-3R	5'-CAGCAGGATTCTAGTGGCTC-3'	241
Ham-4F	5'-TGACAGGAAGCTGTGTAAAGG-3'	Ham-4R	5'-GTGCACAGAAGCTGTTGTAC-3'	243
Ham-5F	5'-TCATGTGAGGACTGCCCTTG-3'	Ham-5R	5'-GCTTCCTTGCTTTAAGTTGCC-3'	271
Ham-6F	5'-TACAATGCCGATCCTGGTGC	Ham-6R	5'-AAGCATTCACCTCACAGGGC-3'	255
Ham-7F	5'-CTCCTCAATCTGTCTCCAAC-3'	Ham-7R	5'-CCCTGTCTGCCGTTAAATAC-3'	296
Ham-8F	5'-GGATGTTCCACAAACATTCAGC-3'	Ham-8R	5'-GGGATTACCTCCTAGATCAC-3'	198
Ham-9.1F	5'-GAAGCCTCATATGAAGATGGC-3'	Ham-9.1R	5'-CCTAGGAAGTGAAGTAAAGTC-3'	221
Ham-9.2F	5'-CCCGCTTGTTCTTTGCTATC-3'	Ham-9.2R	5'-CTGTGTGTGTCAGCATAAGGGC-3'	259
Ham-10F	5'-CCTAAAACACACACTAACC-3'	Ham-10R	5'-TCAGCTTACCAGAAAGCAG-3'	215
Ham-11F	5'-CGTGGATGACTTAGCATTC-3'	Ham-11R	5'-AAAAGAGAGCTCCTCCTGCC-3'	239
Ham-12F	5'-TTCTAATAGTTGGGCTCAGTG-3'	Ham-12R	5'-CTTCTCAAAGTGAGGCTTGC-3'	243
Ham-13F	5'-TGCTCGAGAACATGTGCAAC-3'	Ham-13R	5'-CAAGCAAGGCCTGTAGTAAC-3'	163
Ham-14F	5'-ACACTTACAGGGATTACTG-3'	Ham-14R	5'-CCCAGATTATAGCAGAGCG-3'	226
Ham-15.1F	5'-ATTGCCAAAGACAGCCATC-3'	Ham-15.1R	5'-AGGTGGGAGTGTGAAGAATG-3'	267
Ham-15.2F	5'-GAACCCTGAGCCTTACTCTC-3'	Ham-15.2R	5'-GCTCCTCAGTCTTCTGATG-3'	287
Ham-15.3F	5'-CCCAAAGTGCCTAGTCTTTC-3'	Ham-15.3R	5'-AAGGCTTGCTTTGGTGTGT-3'	269
Ham-16F	5'-GACCACAAGGAAGTGATCTAAC-3'	Ham-16R	5'-AACCATGTGGGCTGGATTTG-3'	186
Ham-17F	5'-GGGCTTGATTGAACCATCTG-3'	Ham-17R	5'-GCTATCATGCTGACCCAAAAC-3'	272
Ham-18F	5'-CGCAGTGTGTGTTAAATTGCC-3'	Ham-18R	5'-CTTTGCCCTGGTGTGCTGAGTT-3'	275
Ham-19F	5'-GAAAGTAGAGCCGTTGAGCT-3'	Ham-19R	5'-CCATGACACAGACACTCAAGT-3'	312
Ham-20F	5'-TGCTAGTTTTATGTCGTCGGA-3'	Ham-20R	5'-TCTGGGTCTGAAACGCTTTC-3'	228
Ham-21F	5'-GCCTTCTCAGTCTTCTTAC-3'	Ham-21R	5'-GCCAGAATATAGGAAGTTC-3'	348
Ham-22F	5'-GGAAGTTCCTATATTCTGGC-3'	Ham-22R	5'-CCCAAGGTCATGAATCAGTTC-3'	231
Ham-23.1F	5'-CATCCTCCGAATGTGGACAG-3'	Ham-23.1R	5'-CTCCCACCGACTGTGTAATG-3'	279
Ham-23.2F	5'-GCTTTCTACCCAGAGAAAC-3'	Ham-23.2R	5'-ACACCAAGTCTTTTGCCAG-3'	249
Ham-23.3F	5'-GGCATGACCAGTAGCCTTTC-3'	Ham-23.3R	5'-ACCTCCTGTTCTGTGCCAAC-3'	228

に記すと、対象者の末梢静脈血より採取した EDTA 血 1ml に対し TKM 緩衝液 [10 mM Tris - HCl (pH7.6), 10mM KCl, 2mM EDTA, 4mM MgCl₂] 1ml と Nonidet P-40 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) 25 μ l を加え、転倒混和し赤血球を完全に溶血させた。25 $^{\circ}$ C, 10,000rpm で 1 分間遠心し得た沈殿を 1ml の TKM 緩衝液で再度洗浄、遠心後回収した。沈殿を 0.2ml の TKM 緩衝液に再浮遊させ、20% SDS (Sigma, St. Louis, USA) を 7.5 μ l 加えて 55 $^{\circ}$ C で 5 分間静置後、飽和塩化ナトリウム水溶液 75 μ l を加えてよく混和したのち、25 $^{\circ}$ C, 15,000rpm で 5 分間遠心した。この上清に 2 倍量の 100% エタノール

を加えて DNA を沈殿させ、70% エタノール (4 $^{\circ}$ C) 1ml で洗浄後 1 \times TE [10mM Tris - HCl pH8.0, 1mM EDTA] 0.1 ~ 0.5ml に溶解し、4 $^{\circ}$ C で保存した。

また、症例 10 では末梢血の他に、SEGA 腫瘍細胞からも DNA を抽出した。手術摘出された SEGA の一部を迅速に液体窒素で凍結保存した。これを凍結状態のままドライアイスで冷却した乳鉢ですりつぶし粉砕し DNA 抽出用緩衝液 [25mM EDTA, 75mM NaCl, 10mM Tris - HCl (pH 8.0)] 0.5ml に再浮遊させた。20% SDS を 25 μ l, プロテイナーゼ k (和光, 大阪) を最終 0.1mg/ml の濃度になるように添加したのち 37 $^{\circ}$ C の恒温

Table 4. TSC2 exon primers

Forward primer	Sequence	Reverse primer	Sequence	Product size (bp)
Tub-1S	5'-GTCCCAATCCITGTTTCGTT-3'	Tub-1AS	5'-TGCATTTCCCTCTAGCCTAG-3'	238
Tub-2S	5'-AAGTGCAGGATTACAGGCCT-3'	Tub-2AS	5'-GTGCCTCTCTCTAGTAGCTC-3'	305
Tub-3S	5'-GTTCTTGAGAGACATCCTC-3'	Tub-3AS	5'-TAGACCTGTGCCAGCAAC-3'	272
Tub-4S	5'-TGAGTCAGGCTCTGCTGATC-3'	Tub-4AS	5'-TCAAGGCCAGAGAAACCTCC-3'	221
Tub-5S	5'-GGAGATGTAGATTCCGGCGTC-3'	Tub-5AS	5'-ACTGCGGAGCTGAACCTAGG-3'	229
Tub-6S	5'-GACGTCATAGAGTGACTAG-3'	Tub-6AS	5'-CTGTGGGTCATGTATGCTGTC-3'	354
Tub-7S	5'-GAGGTGGGAAGGAAGCCTG-3'	Tub-7AS	5'-TCCCATCCATGTGCTCTCAG-3'	260
Tub-8S	5'-GAGAACCTTGCTGCCTCTGT-3'	Tub-8AS	5'-TGGCAAGGGACACTGGAGCT-3'	304
Tub-9S	5'-GCTCACATTCGGTCTCTCTG-3'	Tub-9AS	5'-CTGCCAGCTCACTGCACAC-3'	194
Tub-10S	5'-GCAGCTCTGACCCCTGTGTGC-3'	Tub-10AS	5'-TGGCCGAGCCTGCCTGTCT-3'	245
Tub-11S	5'-TCTGGTGCCAAGTCCATGT-3'	Tub-11AS	5'-GGTCCAGAAAGCTGCACCTC-3'	265
Tub-12S	5'-CAACACCGGCTCTCTTTTG-3'	Tub-12AS	5'-TGCCAGGCAAGGCTACAGAG-3'	158
Tub-13S	5'-ACCCAGCAGGCTGCCGT-3'	Tub-13AS	5'-CGGAGAAATAGCCCTGAGC-3'	154
Tub-14S	5'-TGGTTGTGTCACGAGATGTG-3'	Tub-14AS	5'-GCTGCCACGGAGCTCTG-3'	261
Tub-15S	5'-TGCTGACTCAGAACCATGAG-3'	Tub-15AS	5'-CTGGTGGACGCTAGCCTATG-3'	226
Tub-16S	5'-GTGCTGTCTTAGGACTGCG-3'	Tub-16AS	5'-GTCTCTGCAGCTTCCAGGAA-3'	276
Tub-17S	5'-CTGCACGAGCTTGGCTCTG-3'	Tub-17AS	5'-TGACGCCCTGAGCCTCATG-3'	194
Tub-18S	5'-GACTTGGCTCAGCTGCTTC-3'	Tub-18AS	5'-GCAGCTCCCTGTCTCCTG-3'	245
Tub-19S	5'-CTCTGTCTCTAGGGTCCAGA-3'	Tub-19AS	5'-CCAAGGCACAATCTGCGCTC-3'	328
Tub-20S	5'-CTGGTACCCCGTGACCTG-3'	Tub-20AS	5'-AGCTCGCCTGCTCTGACCTC-3'	218
Tub-21S	5'-TGTTCTCCCGGTGGAGCACTCG-3'	Tub-21AS	5'-TGGGTGCATGCGCAGGCAAG-3'	316
Tub-22S	5'-CTCCCTGACCACCTCTCCAT-3'	Tub-22AS	5'-CATCCTGGCAGCAGGAAAC-3'	271
Tub-23S	5'-GTTTCCCTGCTGCCAGGAT-3'	Tub-23AS	5'-TCCACCTGCCTGTCACTCTG-3'	245
Tub-24S	5'-TTGCCACCCCTCACTGTCTG-3'	Tub-24AS	5'-AGCCACAGCCCATGTCTTT-3'	199
Tub-25S	5'-CCCTCCACTGGCTGTCTTC-3'	Tub-25AS	5'-GACGATGAGGTCATGCAAGC-3'	301
Tub-26S	5'-CCCTGGTGATAGGTGGCTC-3'	Tub-26AS	5'-GAACTCGCCACAGGAGAC-3'	314
Tub-27S	5'-CAACTTCACGGCTGTCCCG-3'	Tub-27AS	5'-TGTGAGGCTGGCAGGCG-3'	298
Tub-28S	5'-GACTAAGTACCCCTGTGCGT-3'	Tub-28AS	5'-CCAGCAGCAACTGAGGGAG-3'	208
Tub-29S	5'-TGGTGGTTTGCATCAGGTAAG-3'	Tub-29AS	5'-TGACTGGCTAAGAAAGATGGC-3'	312
Tub-30S	5'-AGATGGGTAAGGGGAGGTAC-3'	Tub-30AS	5'-GGAGCAGAGCCCGTGCCAA-3'	296
Tub-31S	5'-TCTCTCTCTGCAGCACGGG-3'	Tub-31AS	5'-GCACCTATGAGGCAGAGTGG-3'	221
Tub-32S	5'-TCAGGAGAAGGCTGGTTCTC-3'	Tub-32AS	5'-GAGCCCTGCCTCCCCTAAG-3'	273
Tub-33S	5'-CTGACAGGGGTCTCTTTGG-3'	Tub-33AS	5'-TCCAGGGTCCCTGACTGTGA-3'	301
Tub-33aS	5'-CTGAGCCCTGAGGTTAAGGC-3'	Tub-33aAS	5'-TCCCAGGAGAGGTTGTCAG-3'	314
Tub-34S	5'-TGCCAGGCCCTCACCTGGGT-3'	Tub-34AS	5'-CCCGAGCCACACAGCTCCAG-3'	169
Tub-35S	5'-CTCAGGCAGGGCTCTGTGT-3'	Tub-35AS	5'-CTGCAGGCTGAGCCCAGCT-3'	177
Tub-36S	5'-TTGTCTGCCTCAGGGATCAG-3'	Tub-36AS	5'-GGGGTAGCAGGACTGGATG-3'	379
Tub-37S	5'-CAGCACTGGCCCCACAAACCC-3'	Tub-37AS	5'-TGCCACCAACCCGGACACAGC-3'	252
Tub-38S	5'-AGTAGCCGAGATCAGCCTTC-3'	Tub-38AS	5'-TCTTGGCGCCCACTGCAG-3'	215
Tub-39S	5'-GCTGCAGTGTGGCGCCAAGA-3'	Tub-39AS	5'-GAGCTCACTATCAGGTGGCA-3'	213
Tub-40S	5'-TGGCCAAGATCGTGTCTGAC-3'	Tub-40AS	5'-GACAGGCAATACCGTCCAAG-3'	583
Tub-41S	5'-TCACAGGTGCATCATAGCCG-3'	Tub-41AS	5'-GACAGGCAATACCGTCCAAG-3'	425

槽中で8時間インキュベーションした。その後フェノール・クロホルム抽出を行い、エタノール沈殿でDNAを回収した。さらに凍結粉碎した腫瘍検体からは、TRIZOL Reagent (Invitrogen Japan, 東京) を用いてRNAも抽出し、ランダムヘキサヌクレオチドプライマー (宝酒造, 滋賀) と ReverTra Ace (東洋紡績, 大阪) を用いてcDNAを作成した。

2. エクソンプライマー-PCRによる *TSC1*, *TSC2* 遺伝子翻訳領域の増幅

TSC1, *TSC2* 遺伝子増幅のためのエクソンプライマーの塩基配列をそれぞれ表3, 表4に示す。上記1. により抽出したDNAを1×TE [10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA] で希釈し0.1 μg/μlの濃度に調整した。この検体DNA 1 μlを鋳型とし、センスプライマー, アンチセンスプライマーを各々0.2 μM, dNTPs mix 200 μM, MgCl₂ 2.0mM, Taq DNA polymerase (Roche, Mannheim, Germany) 0.1Uを加え10 μlの反応液とし, PCR反応を行った。PCRサイクルの条件は, 94℃5分を1サイクル, 続いて95℃10秒, 60℃5秒を1サイクルとして30サイクル, その後, 72℃4分を1サイクルとした。

3. SSCP/HD法

SSCP法とHD法は元来別々に開発された遺伝子変異スクリーニング法であるが, 実際には同時に1枚のゲル上で行うことが出来る³⁰⁾。手技としてはどちらもPCR産物 (2本鎖DNA) を熱変性し, 1本鎖にした後再冷却する。この際, 1本鎖DNAがその鎖内で部分的に自己アニーリングし, 高次構造をとることを利用するのがSSCP法であり, 1本鎖が相補鎖と再会合し, 再び2本鎖に戻った時に野生型と変異型で2本鎖を形成することを利用するのがHD法である。双方とも得られた産物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動, 分離する。これはポリアクリルアミドゲルでは密度の高いDNAほど早く泳動される性質がある事を利用したものである。すなわち, SSCP法では1本鎖が高次構造をとった際の密度が野生型と変異型で異なるために泳動距離に差が出ることを, HD法では同様に野生型アレルと変異型アレルからなる2本鎖DNAでは, 変異部位でミスマッチが生じるためにDNA鎖は当該部位で離れ密度が低くなるため泳動距離が短くなることを利用している。いずれも正常DNAをコントロールとして同時に泳動し, バンドパターンを比較して正常にはない位置にバンドが変位すること (バンドシフト) により遺伝子変異の存在をスクリーニングする。

PCR反応終了後, 5 μlはダイレクトシーケンシングのために凍結保存した。残り5 μlに同量のSSCP/HD溶液 (150mM 水酸化ナトリウム, 0.05% SDS, 5mM EDTA, 50%

ホルムアルデヒド, 0.25%キシレンチアノールFF, 0.25%プロムフェノールブルー) を加え, 95℃で5分間熱変性後, すぐに水中で冷却して15~20分間放置した。この過程によりPCR産物の一部は1本鎖の高次構造をとり, 一部は再会合して変異DNAが混在すればHDを形成する。冷却後, 5 μlを12%SSCP/HDゲル [12%アクリルアミド, 8%グリセロール, 1×TBE (89mM Tris, 89mM ホウ酸, 2mM EDTA)] に1×TBEを緩衝液として10ワット, 2時間電気泳動した。泳動終了後は, ゲルを銀染色しバンドを検出した。すなわち, 固定液 (50%メタノール, 10%酢酸混合液) でポリアクリルアミドゲルを15分固定した後, 酸化液 (1%硝酸) で攪拌しながら室温で3分間処理。ゲルを蒸留水で洗浄後, 11.7mM硝酸銀溶液を加え, 室温で15分間処理。再び洗浄後, 発色液 (0.756M Na₂CO₃, 0.0185%ホルムアルデヒド) を加え, バンドが濃い茶色に染まるまで室温で攪拌した (15~25分)。発色完了後はゲルを洗浄し, 停止液 (1%酢酸) を加え室温で3~5分処理した後, ナイロンバッグに密閉して4℃で保存した。

4. ダイレクトシーケンシングと塩基の命名法

TSC1, *TSC2* エクソンプライマーによって増幅された全てのPCR産物は, BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kitおよびABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Forester, USA) を用いたダイレクトシーケンシングによりその塩基配列を決定した。

PCRでは変異型アレルと野生型アレルを同時に増幅する。従ってダイレクトシーケンシングを行うと, *TSC* 変異が点変異ではなく数塩基に及ぶ欠失や挿入の場合, 野生型アレルと変異型アレルが変異部よりずれて重なり正確なシーケンスを判断するのが難しい。このような場合は, PCR産物をpT7Blue T-Vector kit (Novagen, Darmstadt, Germany) を用い, 野生型および変異型アレルを別々にクローニングして塩基配列を決定した。

TSC2 は, alternative splicingによりアイソフォーム1, 2, 3の3種類のmRNAが作られるが, cDNA塩基配列はNCBI Reference sequence NM_000548 (エクソン31を含むすべてのエクソンが含まれる) に従い, 開始コドン (ATG) のAを塩基番号1として表記した。*TSC1* に関しては, cDNA塩基配列は同様に NM_000368 に従ったが, 過去の*TSC1* 変異の報告データと対比するため, 開始コドン (ATG) のAを塩基番号222として表記した。

5. long PCR

Jonesら²⁴⁾の方法に従い*TSC1*, *TSC2* 各々の遺伝子領域ゲノムDNAをlong PCR法で増幅した。このlong PCRは, 各遺伝子

Table 5. *TSC* long PCR primers

Forward primer	Sequence	Reverse primer	Sequence	Product size (bp)
<i>TSC1</i> long PCR				
Long Ham 1-2F	5'-ACATCGTCAGTTATGAGTGGAAGAGCCTC-3'	Long Ham 1-2R	5'-GACTAATCCCTTCATGCCATAGATGGTCC-3'	9884
Long Ham 3-8F	5'-GGATACCTCCCGTAGCCAGTGGTATTG-3'	Long Ham 3-8R	5'-TCAGTCTTACCCTCAGTCCACTCTCCAC-3'	8702
Long Ham 9-15F	5'-CCTTGATAGGAGACCTTAAAGTCAGCCTCAG-3'	Long Ham 9-15R	5'-AGATGCAACAGCCTAGAAGGACATCTGAC-3'	7408
Long Ham 16-23F	5'-CCTCTAACTCTCTGTGGACCTGGAGTTTG-3'	Long Ham 16-23R	5'-GGGGGAAGGAAGAAAGTAAAGCTACTGAG-3'	8673
<i>TSC2</i> long PCR				
Long Tub 1-6S	5'-GCTGTAGTTGAGTTCCTCCAGGGAGTG-3'	Long Tub 1-6AS	5'-GACTCCTGAGGCTCAGAGAGACCCGAG-3'	7941
Long Tub 7-15S	5'-TGAGCCTCAGGAGTCCCCATGTAAG-3'	Long Tub 7-15AS	5'-TGAGACCACCGCACCCCTCAGCAAATC-3'	9406
Long Tub 16-25S	5'-GTCGTGTGTTTTGAAGCAGCACTC-3'	Long Tub 16-25AS	5'-ACGGGCAAGACGATGAGGTCATG-3'	7493
Long Tub 26-41S	5'-ACGCCCTGTGGGGTCTTCCGAG-3'	Long Tub 26-41AS	5'-CGCACCAAGCAGACAAAGTCAATAAAAGAG-3'	9847

につき4つのプライマーセットで全てのエクソンを含むように設計されている(表5)。Expand Long Template PCR system (Roche, Mannheim, Germany) を用い、高分子DNA 20ngを鋳型DNAとして、順方向および逆方向の各プライマー 0.3 μM, dNTPs 0.5 mM, Expand Long Template polymerase 0.35単位, Expand Long Template buffer-3 1 μlに、再滅菌蒸留水を加えて計10 μlとした。95℃2分の熱変性後、94℃10秒、65℃30秒、68℃8分を1サイクルとして繰り返し、10サイクルの反応を行った。さらに、94℃10秒、65℃30秒、68℃8分および自動伸長20秒を1サイクルとして、20~22サイクル繰り返した。得られたサンプルを0.6%アガロースゲル上100Vで電気泳動しエチジウムブロマイド染色で検出した。

6. 定量的サザンプロット解析

末梢血DNA 10 μgを制限酵素 *EcoRI* (フナコシ, 東京) で完全消化後、0.6%アガロースゲル(宝酒造, 滋賀)に電気泳動し、ナイロンメンブレン, プラスチャージ (Roche, Mannheim, Germany) にアルカリトランスファーした。その後メンブレンを120℃30分で熱処理しDNAをメンブレン上に固定した。DIG-ハイプライム DNAラベリング&デテクション スターターキットII (ロシュ・ダイアグノスティックス, 東京) を使用し、ハイブリダイゼーションと検出を行なった。TSC1に対するプローブは、エクソンプライマーHam-23.1FとHam-23.2Rで増幅したPCR産物をジゴキシゲニンで標識したものを、TSC2に対するプローブはエクソンプライマーTub-40SとTub-40ASで増幅したPCR産物をジゴキシゲニンで標識したものをそれぞれ用いた。両プローブを同時にハイブリダイゼーションすると、TSC1に関しては9.0kb, TSC2に関しては16.6kbのバンドが得られる。最終的に得られたバンドの強度をデンシトメトリー (BIO-1D V96.15, エムエス機器株式会社, 東京) で測定し比較した。

成 績

TSC 遺伝子変異は10例中8例で検出された(図1)。SSCP/HD法によるスクリーニングで変異バンドが検出されたのは症例2,

3, 4, 6, 7, 8, 10の7例であった。このうち症例4, 6, 8, 10ではダイレクトシーケンシングにて変異を同定できたが、症例2, 3, 7に関しては多型のみであった。次に症例1, 2, 3, 5, 7, 9に対しTSC1, TSC2両遺伝子の翻訳領域を全てダイレクトシーケンシングした。この結果、症例5, 7で変異が同定された。ここまでの経過で変異が同定されなかった症例1, 2, 3, 9に対しTSC1, TSC2 long PCRにて遺伝子内の大欠失をスクリーニングした。この結果、症例9でTSC1変異が同定された。残った症例1, 2, 3に対し遺伝子領域全体を含む大欠失を想定し定量的サザンプロット解析を施行した。その結果、症例1でTSC2の大欠失が同定された。症例2, 3では如何なる変異も同定されなかった。SSCP/HD解析の結果を図2に、ダイレクトシーケンシングの結果を図3に示す。

TSC1変異は2例で検出され、症例7ではイントロン16のスプライドナー(+1)のグアニンがアデニンへ置換することによるスプライス変異を認めた。また、症例9ではTSC1のlong PCR (Long Ham 16-23F/R)の増幅産物において2つの異なる欠失バンドが同定された(図4A)。欠失の範囲を同定するために、Long Ham 16-23F/R増幅産物を1×TEで100倍に希釈したものを鋳型DNAとし、その内部に含まれるTSC1エクソンプライマーの様々な組合せで再度増幅した。この結果、Ham-17F/20Rの組合せで欠失バンドが一つ、16F/20Rの組合せで欠失バンドが二つ、16F/19Rの組合せで欠失バンドが一つ同定された(図4B)。欠失バンドはアガロースゲルより切り出し、SUPREC-01(宝酒造, 滋賀)にてDNAを回収し、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。以上により、イントロン17~19におよぶ1559bpの欠失1とイントロン16~19におよぶ2204bpの欠失2が確定された(図4C)。TSC1エクソン17~18はhamartin蛋白のコイルド・コイルドメインのN末端側に位置し、TSC2の遺伝子産物であるtuberinとの結合領域を保有する。欠失1, 2はともにこの領域を欠く事となり、たとえ蛋白レベルで安定に発現したとしてもtuberin蛋白とは結合できない。また、欠失1と2は互いに重なり合っているが、一方が他方を含む関係にはなっていない。従って一

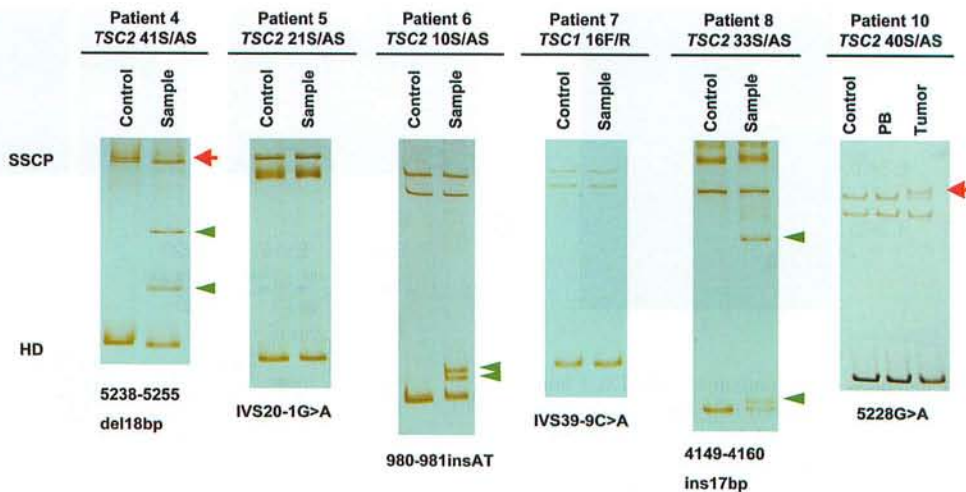


Fig. 2. The single-strand conformational polymorphism and the hetero-duplex (SSCP/HD) analysis of TSC1/TSC2 genes. SSCP and HD analyses were performed on a same polyacrylamide gel simultaneously. SSCP bands appear top portion of the gel and HD bands appear bottom. SSCP band shifts are indicated by red arrows and HD are indicated by green arrow heads.

方の欠失から他方の欠失は誘導されえず、この二つの欠失は独立したイベントによる変異であると考えられる。換言すれば、症例9は2つの異なる *TSC1* 欠失を持つモザイク個体である。

一方、*TSC2* 変異は6例で検出された (表6, 図2, 図3)。症例4ではエクソン40の5238番から始まる18塩基のスクレオチ

ドの欠失を認めた。このインフレーム欠失により *tuberin* の1746番目のアミノ酸ヒスチジンはグルタミンに置換され、1747番から1752番までの6個のアミノ酸が欠失する。症例5ではイントロン20のスプライスアクセプター (-1) のグアニンがアデニンに置換するスプライス変異を認めた。症例6ではエクソン

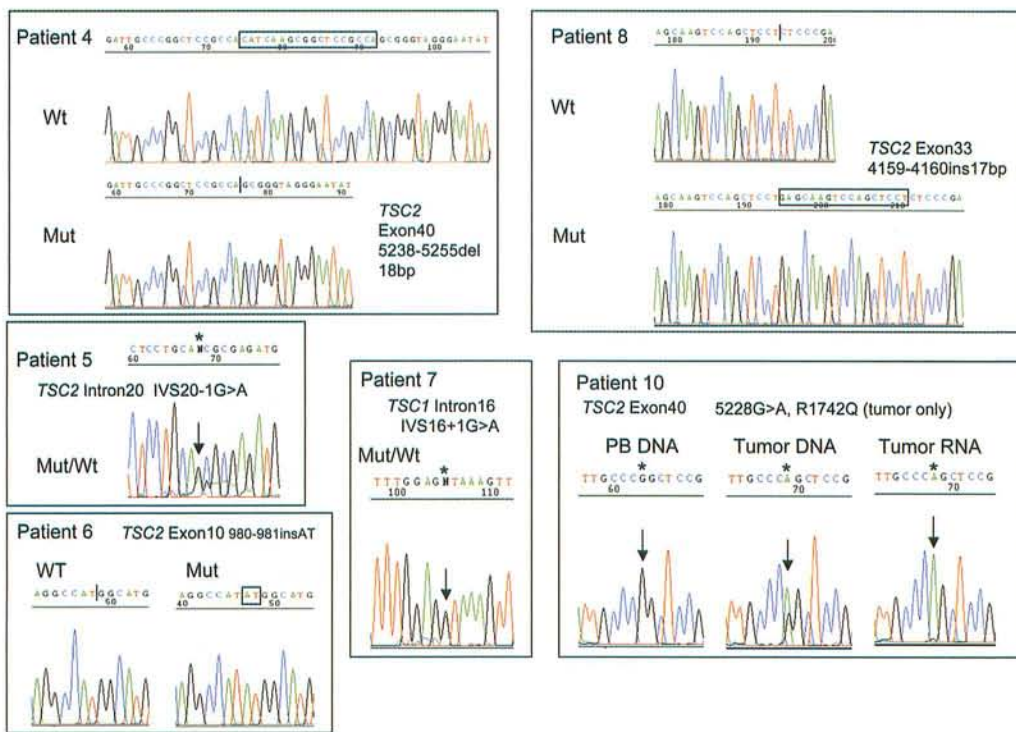


Fig. 3. Direct sequencing results of *TSC1/TSC2* genes. In the case of deletion or insertion mutations, electrophoretograms of wild type allele (WT) and mutation allele (Mut) are shown separately. The diagrams of single base substitutions are shown as mixture of both alleles

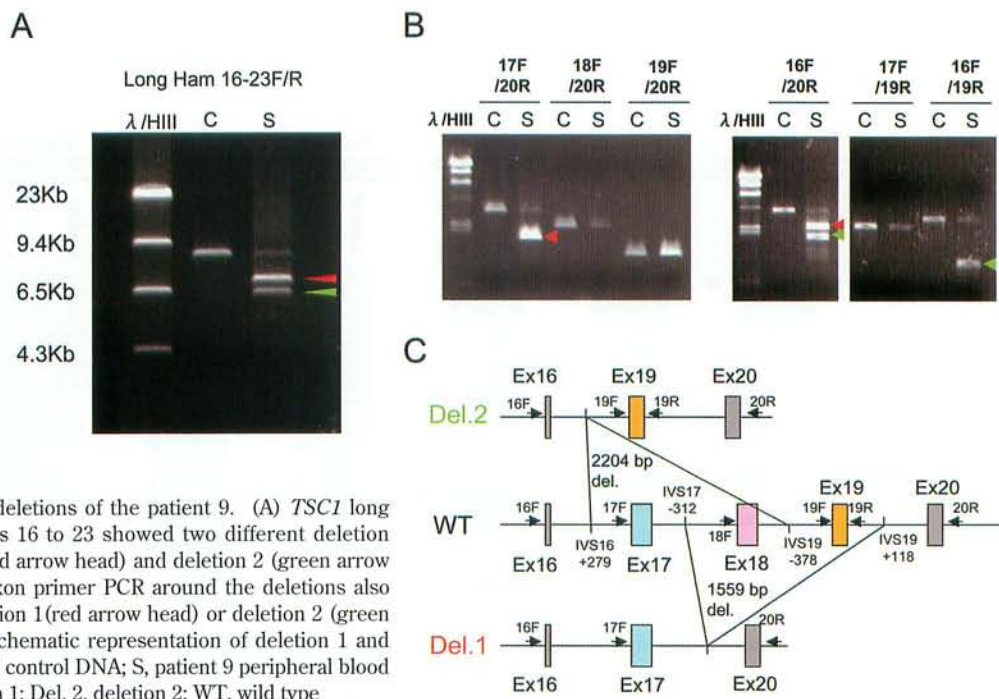


Fig. 4. Large *TSC1* deletions of the patient 9. (A) *TSC1* long PCR spanning exons 16 to 23 showed two different deletion bands, deletion 1 (red arrow head) and deletion 2 (green arrow head). (B) *TSC1* exon primer PCR around the deletions also detected either deletion 1 (red arrow head) or deletion 2 (green arrow head). (C) Schematic representation of deletion 1 and deletion 2. C, normal control DNA; S, patient 9 peripheral blood DNA; Del. 1, deletion 1; Del. 2, deletion 2; WT, wild type

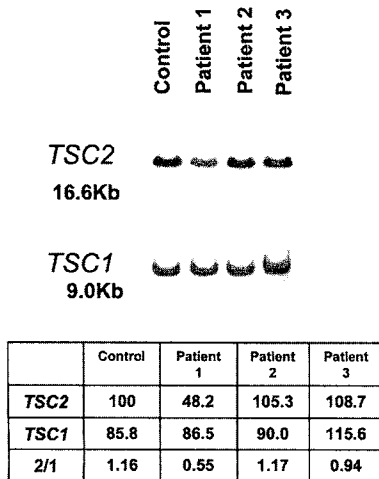


Fig. 5. Quantitative southern blot analysis of *TSC1/TSC2* genes. The table under the blot show optical density of each band indicated as *TSC2* band intensity of control DNA is 100. 2/1, ratio of *TSC2* and *TSC1* bands intensity of each sample.

10の980番と981番のヌクレオチドの間に2塩基(AT)の挿入によるフレームシフト変異を、症例8ではエクソン33の4159番と4160番のヌクレオチドの間に17塩基(CCTGAGCAAGTCCAGCT)の挿入によるフレームシフト変異を認めた。症例10では末梢血DNAには変異が認められなかったが、腫瘍DNAおよびRNAにエクソン40の5228番目のグアニンがアデニンへ置換することによるミスセンス変異が同定された。症例10はSEGA以外に結節性硬化症の症状を全く認めず、極めて限局した領域の体細胞モザイク個体であると考えられた³¹⁾。また、症例1では定量的サザンブロット法により *TSC2* の大欠失が同定された(図5)。得られたバンドの強度をデンストメトリーで測定し、正常コントロールDNAの *TSC2* バンドの強度を100として他のバンドの強度を表記した。症例1では正常コントロール、症例2, 3に比べ *TSC2* のバンド強度、*TSC2/TSC1* バンド強度比の双方において約半分の値を呈しており、*TSC2* 対立遺伝子の一方が欠失していることが示された。症例1は乳児期から早発性の多嚢胞性腎症の合併を認めている。臨床的表現型からは *TSC2* /

Table 6. Summary of *TSC* mutations and polymorphisms analysis

Patient #	Gene	Mutation type	Exon /Intron	Sequence alteration	Codon change	Previous report
<i>TSC</i> mutations						
1	<i>TSC2</i>	Large deletion		Large deletion (detected by southern blot)		Sampson JR et al ¹⁷⁾
2				No mutation was detected		
3				No mutation was detected		
4	<i>TSC2</i>	Substitution and In-frame deletion	Exon 40	5238-5255delCCACATCAAGCGGCTCCG (18bp deletion)	H1746Q/ 1752del	Jones AC et al ⁸⁾
5	<i>TSC2</i>	Splicing	Intron 20	IVS20-1G>A	Splice acceptor	New
6	<i>TSC2</i>	Frame shift	Exon 10	980-981insAT (Ex10)	N363X	New
7	<i>TSC1</i>	Splicing	Intron 16	IVS16+1G>A	Splice donor	New
8	<i>TSC2</i>	Frame shift	Exon 33	4159-4160insCCTGAGCAAGTCCAGCT (17bp insertion)	S1338X	New
9	<i>TSC1</i>	Large deletion		Large deletion (detected by long PCR)		New
10	<i>TSC2</i>	Missense	Exon 40	5228G>A (tumor only)	R1743Q	Gilbert J et al ⁴⁾
<i>TSC</i> polymorphisms						
6	<i>TSC1</i>		Intron 3	IVS3+15A>G		New
2	<i>TSC1</i>		Intron 15	IVS15+67-68delAG		New
3,5,6	<i>TSC1</i>		Intron 19	IVS19+51A>G		New
3	<i>TSC2</i>		Intron 15	IVS15-15G>A		New
10	<i>TSC2</i>	Silence	Exon 18	2085A>G	Q695Q	New
2	<i>TSC2</i>	Silence	Exon 27	3273C>T	G1091G	New
2,7	<i>TSC2</i>		Intron 39	IVS39-9C>A		Jones AC et al ²⁴⁾
10	<i>TSC2</i>		Intron 39	IVS39-9C>T (blood only)		New

Table 7. Sensitivity of SSCP and HD analysis

Gene	Mutation / Polymorphism	PCR Primers	SSCP	HD
<i>TSC1</i>	IVS3+15A>G	Ham-3F/Ham-3R	×	○
	IVS15+67-68delAG	Ham-15.1F/Ham-15.1R	×	○
	IVS16+1G>A	Ham-16F/Ham-16R	×	×
	IVS19+51A>G	Ham-19F/Ham-19R	×	×
<i>TSC2</i>	980-981insAT	Tub-10S/Tub-10AS	×	○
	IVS15-15G>A	Tub-16S/Tub-16AS	○	×
	2085A>G	Tub-18S/Tub-18AS	×	×
	IVS20-1G>A	Tub-21S/Tub-21AS	×	×
	3273C>T	Tub-27S/Tub-27AS	×	×
	4159-4160insCCTGAGCAAGTCCAGCT	Tub-33S/Tub-33AS	○	○
	5238-5255delCCACATCAAGCGGCTCCG	Tub-41S/Tub-41AS	○	○
	IVS39-9C>A	Tub-40S/Tub-40AS	○	×
	IVS39-9C>T	Tub-40S/Tub-40AS	○	×
	5228G>A, R1743Q	Tub-40S/Tub-40AS	○	×
Detection rate (each)			6/14	5/14
Detection rate (SSCP + HD)			9/14	

○, band shifts are detected; ×, band shifts are not detected.

PKD1隣接遺伝子症候群が疑われ、以上の遺伝子解析結果と一致する。上記、同定された8つのTSC遺伝子変異のうち5例(症例5, 6, 7, 8, 9)に関してはこれまでに報告のない新規の変異であった。その他、遺伝子多型が6例で8種類検出された(表6)。

ダイレクトシーケンシング法により合計14個の遺伝子変異および多型が同定されたが、SSCP, HD単独による検出率は各々6/14(43%), 5/14(36%)であった。しかし、SSCPによる検出と、HDによる検出は、症例4のTSC2, エクソン41の18塩基欠失と、症例8のTSC2, エクソン33の17塩基挿入以外は重複しなかったため、SSCP/HDによる全体の検出率は9/14(64%)となった。さらに14個の変異・多型のうち1塩基置換の10個に限定してみると、各々の検出率はSSCP 4/10(40%), HD 1/10(10%)であり、HDで検出率が低下する傾向が伺えた(表7)。

遺伝子型と臨床型との相関については、TSC1変異が同定された患者2名(症例7, 9)は精神遅滞を伴わず、TSC2変異が同定された患者(症例1, 4, 5, 6, 8)に比べ、明らかに軽症であった(表2)。また血液には変異を認めず腫瘍細胞にのみTSC2遺伝子変異を認めた症例10は、全身検索を行ったがSEGA以外には全くTSCの症状を呈していなかった。TSC2大欠失の症例1は臨床的にはTSC2/PKD1隣接遺伝子症候群に合致した。その他のTSC2患者(症例4, 5, 6, 8)間では臨床症状に明らかな差は認められなかった。

考 察

1993年にTSC2⁷⁾, 1997年にTSC1遺伝子⁹⁾がクローニングされて以来、結節性硬化症患者におけるTSC1/TSC2遺伝子変異解析は急速に進み、欧米では既に大規模な検討が完了している。しかしながら、臨床の現場で個々の症例に対する遺伝子診断としてTSC遺伝子解析を行うには、時間、手間、コスト、検出率の問題があり、未だに実用レベルには達していない。また、現在までに日本人患者の遺伝子変異データの集積は少なく、日本人特有のTSC変異(ホットスポット変異)の存在や、日本人患者に特有な臨床症状との相関があるのかに関しては不明である。SSCPやHDによるスクリーニングのみを用いた初期の検討によると、TSC遺伝子変異の検出率は30~60%とばらつきが大きい²²⁾。最も初期のWilsonら³²⁾によるTSC2遺伝子変異の検討では、TSC患者30例を対象として変異を同定できたのは9例(30%)と検出率は低かった。これは彼らがcDNAを用い逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(reverse transcriptase PCR, RT-PCR)をベースとしたSSCPを行ったことと関係がある。すなわち、多くのTSC2変異はmRNAレベルで不安定となり、細胞内での分解が促進される結果、RT-PCRでは野生型mRNAが優位に増幅されてしまう可能性がある。この点が考慮され、以後の研究ではどれもDNAを鋳型とし、エクソンごとにPCRで増幅し解析する方法が採用されている。SSCPやHDでは、ゲルや泳動用緩衝液の組成、濃度、泳動温度などの条件によって検出できる変異が異なる。しかし一つの条件で一樣に検出感度を上げることは出来ないため、検出率を上昇させるには、同じ検体を何度も異なる条件で泳動しなければならず、手技的には煩雑となり時間のロスも大きい。初期の報告においては泳動条件や泳動回数が一定していなかったことが、各論文で変異検出率に差があることの要因になっている。また、これらの過去の

報告から、TSC遺伝子変異解析におけるSSCPやHDの感度は、条件を調整したとしても60%程度にとどまるものと考えられる。今回の検討では、SSCPとHDを同時にそれぞれの至適条件で行うことで、検出率は64%に達しており初期の論文と照らし合わせても、筆者のアッセイは一応の水準に達していると考えられる。ゲルや泳動の条件を変えたとしてもこれ以上飛躍的な向上は望めないことが予想され、むしろ単独の施行で約6割に簡便に変異を検出できることを評価すべきと考えられる。

近年Jonesら²⁵⁾は、SSCP, HDに加え、サザンプロット、long PCR法を併用することにより150例中120例(80%)で変異を同定した。また、Daboraら²³⁾は、変性高速液体クロマトグラフィー(denaturing high performance liquid chromatography, dHPLC)にlong PCRおよび定量的PCRを加え、224例中186例(83%)に変異を検出した。このあたりが世界的にみたTSC遺伝子変異検出率の限界であると考えられる。また、これらの論文の結果は、SSCPやHDなどの、エクソン毎のPCRをベースとする解析方法では検出できない大きな欠失を伴う症例が少なからず存在することを示している。過去の報告では、TSC2遺伝子ではサザンプロット法あるいはパルスフィールド電気泳動法により数%~最大20%の大欠失が検出されている⁷⁾¹⁵⁾。また、これまでTSC1の大欠失の報告は認められなかったが、最近Longaら³³⁾はイントロン20から3'非翻訳領域に存在するTSC1の遺伝子内大欠失の3例を報告した。今回、我々もlong PCRおよびサザンプロット法を併用する事で、大欠失の2例(サザンプロット法による症例1のTSC2遺伝子の欠失、long PCRによる症例9のTSC1遺伝子の欠失)を同定し、最終的には変異検出率を80%にすることができた。

TSC遺伝子変異の解析は既に研究レベルを離れた感があるとはいえ、このように複数の責任遺伝子が存在し、各々が多数のエクソンを持ち、変異のパターンが多彩で、かつホットスポットがない遺伝性疾患の遺伝子診断を臨床応用として一般的な実験室で行うには時間、コスト、手間など多くの解決すべき問題が残される。すなわち、特殊な装置を使うことなく、安価にしかも短時間に結果を出すことが要求される。現在のところ、患者由来DNAをエクソン毎にPCRで増幅し、そこに含まれる変異を様々な方法で検出するのがスタンダードなスクリーニング方法である。ゲルに電気泳動をした際の泳動度の違いでみる方法としてはSSCPとHDが最も多用されているが、他にも変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、温度勾配ゲル電気泳動(temperature gradient gel electrophoresis, TGGE)、酵素的切断法などの方法がある。これらの方法はいずれもゲルの組成や泳動条件によって検出率が変動することが知られている。複数の条件でゲルを流せばその分検出率は上がるが時間的なロスが大きい。今回の方法ではSSCPとHDを同一のゲルで単一条件で流すことにより、互いに相補的に変異を検出し、変異検出法としては標準的な感度を達成することができた。dHPLCを導入すれば検出感度は向上する可能性があり³⁴⁾、自動解析機器であるため手間も軽減するが、現状では1千万円程度を必要とするため、特殊な施設以外には普及していない。変異の検出感度はどの方法を用いたとしても結局100%には達しないので、スクリーニングにもれた検体に関しては、ダイレクトシーケンシングで塩基配列を決定するしかない。今後、安価で簡便なスクリーニング法の検出感度がもう少し上

昇し、全翻訳領域のシーケエンシングが必要な検体が減ることが望まれる。今回のアルゴリズムでは、SSCP/HD 解析後にダイレクトシーケエンシングを行った。しかし、今回の研究を通して TSC1、TSC2 の大欠失が日本人でも無視し得ない頻度で存在することが示されたため、long PCR と定量的サザンプロットで大欠失を除外し、残った症例に関してダイレクトシーケエンシングを行う方がより合理的であると考えられる。また、症例 10 のように腫瘍細胞にしか変異がみられない体細胞モザイクの場合もありうるため、可能であれば腫瘍由来の検体を検索することも考慮すべきである。

症例 2, 3 に関しては、臨床的には結節性硬化症確実例でありながら変異が同定できなかった。その理由としてはいくつかの可能性が考えられる。第 1 に、症例 10 と同様モザイク個体であり、血液細胞に変異がないか、変異を持つ細胞が少ない可能性である。この場合は、皮膚血管線維腫など比較的容易に採取できる腫瘍検体が利用できれば変異が同定できる可能性が高い。また、腫瘍由来の検体で LOH 解析を行えば、少なくとも TSC1 と TSC2 のどちらに変異があるのかを同定できる可能性がある。第 2 は、翻訳領域エクソンには変異はなく、遺伝子調節領域に変異が存在する可能性がある。しかし未だに TSC 遺伝子調節領域の変異例の報告はない。最後に、TSC1、TSC2 以外に結節性硬化症の責任遺伝子が存在する可能性がある。現在のところどのような解析手段を用いても患者集団における変異の検出率は 80% 程度にとどまることから、第 3 の遺伝子座が存在する可能性も否定は出来ない。TSC1 と TSC2 はその遺伝子産物が直接結合することによって働くため、どちらの遺伝子変異であっても臨床症状は同じになる。この考え方に沿うならば、第 3 の遺伝子産物もまた TSC1 や TSC2 産物と直接会合するか、少なくとも同一のパスウェイに存在する遺伝子であると推定される。

臨床症状と遺伝子変化との相関関係についてこれまでの報告をみると、Dabora²³⁾は TSC1 変異のある症例は、TSC2 変異のある症例に比べ、大脳皮質結節や上下下結節の数が少なく、精神発達遅滞やてんかんの合併頻度が低い事、また腎病変や顔面の血管線維腫も少なく臨床症状が軽度であったと述べている。また、家族例では TSC1 変異が多く、弧発例では TSC2 変異が多いとの報告がみられる。^{22) 35)}これは TSC1 変異のある患者集団では臨床症状がより軽度である事の反映と思われる。なぜなら臨床症状が軽度なほど生殖適応度は高くなるためである。今回の我々の検討でも TSC1 の変異が同定された 2 例は、明らかな精神発達遅滞や自閉性障害がなく、TSC2 の変異が同定された症例に比べて臨床症状が軽度であった。一方で、Niida²²⁾は TSC126 家系の解析を行い、16 の TSC1 変異と 58 の TSC2 変異を同定した。彼らは個々の症例に関して詳細に臨床症状を比較しているが、TSC1 患者が TSC2 患者に比べて明らかに軽症であるという証拠は得られなかった。すなわち個々の症例に関してみれば、極めて重症な TSC1 患者もいれば、極めて軽症な TSC2 患者も存在することから、臨床症状の違いはきれいに分かれるのではなく、多分に大きく重なり合っているものと考えられる。また個々の変異のタイプと臨床症状の相関性も認められず、ミスセンス変異やインフレーム変異がフレームシフト変異や大欠失よりも軽症であるとも言えなかった。家族例の結節性硬化症では、同一家系内(従って遺伝子変異は同じ)であっても臨床症状にばらつきがある。親子間の差異は親が体

細胞モザイクであり軽症であった可能性も考えられるが、兄弟間や一卵性双生児であっても症例ごとに臨床症状のばらつきが存在する^{25) 36)}。すなわち、TSC 遺伝子変異だけでは重症度は決定されず、他の遺伝子の影響や環境要因が症状発現に大きく関与しているものと推察される。以上により、個々の変異の同定は個々の患者の臨床症状や予後の予測には繋がらない。集団のレベルで TSC1 患者は TSC2 患者よりも軽症傾向を示すが、個々の患者による個人差も大きい。

日本人の結節性硬化症患者を対象とした TSC 遺伝子変異の検討はこれまでに 3 つの報告がある。Zhang³⁷⁾は 38 例について検討し、SSCP とダイレクトシーケエンシング法を用いて 18 個の新規の変異と、すでに報告のある 4 個の変異を 5 例の患者に同定した(検出率 60%)。彼らの分析の結果、いずれの遺伝子においても特定のエクソンへの変異の集中はなく、TSC1 および TSC2 変異の分布が広範囲にわたることが簡便な遺伝子診断方法の確立を妨げていること、また、TSC1 変異が同定された患者は、TSC2 変異が同定された患者に比べ精神発達遅滞の程度が軽症であるものの、個々の変異を同定しても臨床的な予後の予測には繋がらない事を示した。また、Yamashita³⁸⁾は日本人 TSC 患者弧発例 23 例、家族例 4 例を、SSCP とダイレクトシーケエンシング法を用いて検討し、4 個の TSC1 変異と 6 個の TSC2 変異を同定し(検出率 37%) た。彼らは、ヨーロッパやアメリカでの報告と同様に日本人でも TSC1 変異は家族例で多い事、逆に弧発例の多くは TSC2 変異であると報告した。Yamamoto³⁹⁾は SSCP 法とダイレクトシーケエンシング法により変異を同定した 9 例(TSC1 2 例、TSC2 7 例)を報告している。このうち、1 例の TSC1 変異と 5 例の TSC2 変異は新規のものであった。また、これまでの報告と同様に、TSC1 変異例では TSC2 変異例と比較して臨床症状が軽微であることを示した。今回の我々の検討を含め、これまでの日本人 TSC 患者における遺伝子変異の報告の中で同一の変異はわずかに 1 個のみであることから、アメリカやヨーロッパでの大規模な検討の結果^{7) 22) 23) 25)}と同様に、日本人においても TSC 遺伝子変異の分布は広範で多種多様であり、変異のホットスポットは存在しないことが示された。また、TSC1 症例は TSC2 症例に比べて軽症である傾向が認められるが、変異の種類が個々の症例の症状予測にまでは利用できないことも欧米の結果と同様と考えられた。

結 論

日本人結節性硬化症 10 例について系統的な TSC 遺伝子解析を行い以下の結果を得た。

1. 10 例中 8 例に変異 (TSC1 変異 2 例、TSC2 変異 6 例) が同定された。日本人における TSC 遺伝子変異は欧米と同様に多岐に渡り、過去の報告と合わせても日本人に特有なものは存在しないと考えられた。
2. TSC1 症例は TSC2 症例に比べて軽症である傾向が認められたが、これまでの欧米の結果と同様、それぞれの変異が個々の症例の症状予測にまでは利用できないと思われた。
3. 今回用いた SSCP/HD 解析による変異検出率は 64% であった。単一条件での電気泳動としては、ほぼ期待通りの水準を満たす結果であった。
4. TSC 遺伝子変異のパターンには大欠失やモザイクなどのバリエーションがあり、全翻訳領域エクソンのダイレクトシーケエンシングではなお不十分であることが判明した。今回の解析

では, long PCR, 定量的サザンプロット法, またモザイク個体における腫瘍細胞の遺伝子解析を系統的に組み合わせて実施することにより最終的な検出率を80%に上げることが出来た。

5. 以上より, 実際の臨床場におけるTSC遺伝子診断の戦略としては, 本研究に用いたような, 多種類の遺伝子検査方法を合理的に組合せた系統的アプローチが必須であると結論された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御高閣を賜りました恩師 小泉晶一教授に深甚なる謝意を表します。また, 本研究を当初より直接御指導, 御教示頂きました金沢大学医学部医学科小児科の新井田要博士に心から謝意を表します。

文 献

- 1) Cheadle J, Reeve M, Sampson J, Kwiatkowski D. Molecular genetic advances in tuberous sclerosis. *Hum Genet* 107: 97-104, 2000.
- 2) Kwiatkowski DJ, Short MP. Tuberous sclerosis. *Arch Dermatol* 130: 348-354, 1994.
- 3) Osborne JP, Fryer A, Webb D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 615: 125-127, 1991.
- 4) Webb DW, Osborne JP. Non-penetrance in tuberous sclerosis. *J Med Genet* 28: 417-419, 1991.
- 5) Povey S, Burley MW, Attwood J, Benham F, Hunt D, Jeremiah S, Franklin D, Gillett G, Tippett P, Edwards J, Kwiatkowski DJ, Super M, Mueller R, Fryer A, Webb D, Osborne J. Two loci for tuberous sclerosis: one on 9q34 and one on 16p13. *Ann Hum Genet* 58: 107-127, 1994.
- 6) van Slechtenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Wolfe J, Povey S, Osborne J, Snell RG, Cheadle JP, Reeve MP, Richardson P, Wilmer F, Munro C, Hawkins TL, Sepp T, All JBM, Ward S, Green AJ, Yates JRW, Short MP, Haines JH, Jozwiak S, Kwiatkowska J, Henske EP, Kwiatkowski DJ. Identification of the tuberous sclerosis gene *TSC1* on chromosome 9q34. *Science* 277: 805-808, 1997.
- 7) European Chromosome 16 Tuberous Sclerosis Consortium, The Identification and characterization of the tuberous sclerosis gene on chromosome 16. *Cell* 75: 1305-1315, 1993.
- 8) Wienecke R, Konig A, DeClue J. Identification of tuberin, the tuberous sclerosis 2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity. *J Biol Chem* 270: 16409-16414, 1995.
- 9) Xiao GH, Shoarinejad F, Jin F, Golemis EA, Yeung RS. The tuberous sclerosis 2 gene product, tuberin, functions as a Rab5 GTPase activating protein (GAP) in modulating endocytosis. *J Biol Chem* 272: 6097-6100, 1997.
- 10) Carbonara C, Longa L, Grosso E, Borrone C, Garre MG, Brisigotti M, Migone N. 9q34 loss of heterozygosity in a tuberous sclerosis astrocytoma suggests a growth suppressor-like activity also for the *TSC1* gene. *Hum Mol Genet* 3: 1829-1832, 1994.
- 11) Green AJ, Sepp T, Yates JR. Clonality of tuberous sclerosis hamartomas shown by non-random X-chromosome inactivation. *Hum Genet* 97: 240-243, 1996.
- 12) Henske EP, Scheithauer BW, Short MP, Wollmann R, Nahmias J, Hornigold N, Slegtenhorst Mv, Welsh CT, Kwiatkowski DJ. Allelic loss is frequent in tuberous sclerosis kidney lesions but rare in brain lesions. *Am J Hum Genet* 59: 400-406, 1996.
- 13) Sepp T, Yates JR, Green AJ. Loss of heterozygosity in tuberous sclerosis hamartomas. *J Med Genet* 33: 962-964, 1996.
- 14) Gilbert JR, Guy V, Kumar A, Wolpert C, Kandt R, Aylesworth A, Roses AD, Pericak-Vance MA. Mutation and polymorphism analysis in the tuberous sclerosis 2 (*TSC2*) gene. *Neurogenetics* 1: 267-272, 1998.
- 15) Au KS, Rodriguez JA, Rodriguez E, Dobyns WB, Delgado MR, Northrup H. Mutations and polymorphisms in the tuberous sclerosis complex gene on chromosome 16. *Hum Mutat* 9:23-29, 1997.
- 16) Brook Carter PT, Peral B, Ward CJ, Thompson P, Hughes J, Maheshwar sMM, Nellist M, Gamble V, Harris PC, Sampson JR. Deletion of the *TSC2* and *PKD1* genes associated with severe infantile polycystic kidney disease-a contiguous gene syndrome. *Nat Genet* 8: 328-332, 1994.
- 17) Sampson JR, Maheshwar MM, Aspinwall R, Thompson P, Cheadle JP, Ravine D, Roy S, Haan E, Bernstein J, Harris PC. Renal cystic disease in tuberous sclerosis: role of the polycystic kidney disease 1 gene. *Am J Hum Genet* 61: 843-851, 1997.
- 18) Rose VM, Au KS, Pollom G, Roach S, Prashner HR, Northrup H. Germline mosaicism in tuberous sclerosis: how common? *Am J Hum Genet* 64: 986-992, 1999.
- 19) Verhoef S, Bakker L, Tempelaars AM, Hesseling-Janssen AL, Mazurczak T, Jozwiak S, Fois A, Bartalini G, Zonnenberg BA, van Essen AJ, Lindhout D, Halley DJ, van den Ouweland AM. High rate of mosaicism in tuberous sclerosis complex. *Am J Hum Genet* 64: 1632-1637, 1999.
- 20) van Slechtenhorst M, Verhoef S, Tempelaars A, Bakker L, Wang Q, Wessels M, Bakker R, Nellist M, Lindhout D, Halley D, van den Ouweland A. Mutational spectrum of the *TSC1* gene in a cohort of 225 tuberous sclerosis complex patients: no evidence for genotype phenotype correlation. *J Med Genet* 36: 285-289, 1999.
- 21) Kwiatkowska J, Jozwiak S, Hall F, Henske P, Haines JL, McNamara P, Braiser J, Wigowska Sowinska J, Kasprzyk Obara J, Short MP, Kwiatkowski DJ. Comprehensive mutational analysis of the *TSC1* gene: observations on frequency of mutation, associated features, and nonpenetrance. *Ann Hum Genet* 62: 277-285, 1998.
- 22) Niida Y, Lawrence-Smith N, Banwell A, Hammer E, Lewis J, Beauchamp R, Sims K, Ramesh V, Ozelius L. Analysis of both *TSC1* and *TSC2* for germline mutations in 126 unrelated patients with tuberous sclerosis. *Hum Mutat* 14: 412-422, 1999.
- 23) Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, Roberts PS, Nieto A, Chung J, Choy YS, Reeve MP, Thiele E, Egelhoff JC, Kasprzyk-Obara J, Domanska-Pakiela D, Kwiatkowski DJ. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of *TSC2*, compared with *TSC1*, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet* 68: 64-80, 2001.

- 24) Jones AC, Daniells CE, Snell RG, Tachataki M, Idziaszcz SA, Krawczak M, Sampson JR, Cheadle JP. Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between *TSC1* and *TSC2* associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 2155-2161, 1997.
- 25) Jones AC, Shyamsundar MM, Thomas MW, Maynard J, Idziaszczyk S, Tomkins S, Sampson JR, Cheadle JP. Comprehensive mutation analysis of *TSC1* and *TSC2* and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet* 64: 1305-1315, 1999.
- 26) Ali JB, Sleep T, Ward S, Green AJ, Yates JRW. Mutations in the *TSC1* gene account for a minority of patients with tuberous sclerosis. *J Med Genet* 35:969-972, 1998.
- 27) Young JM, Burley MW, Jeremiah SJ, Jeganathan D, Ekong R, Osborne JP, Povey S. A mutation screen of the *TSC1* gene reveals 26 protein truncating mutations and 1 splice site mutation in a panel of 79 tuberous sclerosis patients. *Ann Hum Genet* 62: 203-213, 1998.
- 28) Roach ES, Gomez MR, Northrup H. Tuberous sclerosis complex consensus conference: revised clinical diagnostic criteria. *J Child Neurol* 13: 624-628, 1998.
- 29) Lahiri DK, Schnabel B. DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂ EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochemi Genet* 31: 321-328, 1993.
- 30) Liechti-Gallati S, Schneider V, Neeser D, Kraemer R. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur J Hum Genet* 7: 590-598, 1999.
- 31) Ichikawa T, Wakisaka A, Daido S, Takao S, Tamiya T, Date I, Koizumi S, Niida Y. A case of solitary subependymal giant cell astrocytoma. *J Mol Diagn* 7: 544-549, 2005.
- 32) Wilson PJ, Ramesh V, Kristiansen A, Bove C, Jozwiak S, Kwiatkowski DJ, Short MP, Haines JL. Novel mutations detected in the *TSC2* gene from both sporadic and familial TSC patients. *Hum Mol Genet* 5: 249-256, 1996.
- 33) Longa L, Saluto A, Brusco A, Polidoro S, Padovan S, Allavena A, Carbonara C, Grosso E, Migone N. *TSC1* and *TSC2* deletions differ in size, preference for recombinatorial sequences, and location within the gene. *Hum Genet* 108: 156-66. 2001.
- 34) Choy YS, Dabora SL, Hall F, Ramesh V, Niida Y, Franz D, Kasprzyk-Obara J, Reeve MP, Kwiatkowski DJ. Superiority of denaturing high performance liquid chromatography over single-stranded conformation and conformation-sensitive gel electrophoresis for mutation detection in *TSC2*. *Ann Hum Genet* 63: 383-391, 1999.
- 35) Beauchamp RL, Banwell A, McNamara P, Jacobsen M, Higgins E, Northrup H, Short P, Sims K, Ozelius L, Ramesh V. Exon scanning of the entire *TSC2* gene for germline mutations in 40 unrelated patients with tuberous sclerosis. *Hum Mutat* 12: 408-416, 1998.
- 36) Au KS, Rodriguez JA, Finch JL, Volcik KA, Roach ES, Delgado MR, Rodriguez E, Northrup H. Germ-Line mutation analysis of the *TSC2* gene in 90 tuberous sclerosis patients. *Am J Hum Genet* 62: 286-294, 1998.
- 37) Zhang H, Nanba E, Yamamoto T, Ninomiya H, Ohno K, Mizuguchi M, Takeshita K. Mutational analysis of *TSC1* and *TSC2* genes in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *J Hum Genet* 44: 391-396, 1999.
- 38) Yamashita Y, Ono J, Okada S, Wataya M, Yoshikawa K, Nishizawa M, Hirayama Y, Kobayashi E, Seyama K, Hino O. Analysis of all exon of *TSC1* and *TSC2* genes for germline mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis. *Am J Med Genet* 90: 123-126, 2000.
- 39) Yamamoto T, Pipo J, Feng J, Takeda H, Nanba E, Ninomiya H, Ohno K. Novel *TSC1* and *TSC2* mutations in Japanese patients with tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 24: 227-230, 2002.

DNA diagnosis of ten Japanese patients with tuberous sclerosis complex: Development of systematic mutational analysis of TSC genes and certification of sensitivity for clinical application Akiko Wakisaka, Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640— J. Juzen Med. Soc., **115**, 62 – 74 (2006)

Key words tuberous sclerosis complex, hamartin, tuberin, gene mutation

Abstract

Tuberous sclerosis complex (TSC) is an autosomal dominant disorder characterized by the development of multiple hamartomas mainly in the central nervous system, skin, kidney, heart and virtually involving in any other organs of entire body. Two disease causative genes, *TSC1* and *TSC2*, were cloned and many mutations have been reported in United States and Europe. However, it is still challenging to detect the individual mutation in each patient with TSC, because, 1) there is no mutational hot spot in both *TSC1* and *TSC2*, 2) there is a wide mutational diversity from the point mutation to the large deletion of entire genes, 3) a significant population of the patients has mutations with somatic mosaicism. Furthermore, the sensitivity of two major screening methods, the single-strand conformational polymorphism (SSCP) and the hetero-duplex (HD) analyses was not yet been certificated. In this study, I developed an algorithmic TSC mutational analysis system, including SSCP/HD, direct sequencing, long PCR and quantitative southern blotting, and applied it to ten Japanese patients with TSC. *TSC1* mutations including splicing mutation and large deletion were detected in two patients and *TSC2* mutations including large deletion, splicing mutation, missense mutation and three frame shift mutations were detected in 6 patients. Patient 9 had two different *TSC1* large deletions as the somatic mosaicism, and patient 10 had *TSC2* missense mutation only in the brain tumor. The sensitivity of SSCP and HD were also examined. Through the direct sequencing of whole coding exons for all patients, fourteen DNA rearrangements were detected. SSCP and HD detected 6/14 (43%) and 5/14 (36%) of these rearrangements as band shifts respectively. Nine out of 14 (64%) rearrangements were detected either SSCP or HD. Two *TSC1* patients and one *TSC2* mosaic patient showed less severe manifestations compared to other *TSC2* patients. Taking these findings together with previously reported TSC mutations among Japanese patients, it is concluded that there is no TSC mutational hot spot in Japanese population and there is a considerable number patients showing large deletion of *TSC1* or *TSC2* which is undetectable using screening with SSCP/HD and sequencing of each exon. An algorithmic approach of mutation analysis, which includes several different methods and is arranged systematically as shown in this study, is indispensable to perform DNA diagnosis of TSC aiming for clinical application.