

血液免疫系細胞分化障害による疾患の 診断と治療に関する調査研究

研究分担者 山口 博樹 (日本医科大学 血液内科 講師)

研究要旨

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)の約 40%の症例は原因遺伝子変異が同定されていない。我々は次世代シーケンサーを用いてDKCや不全型DKCにおける新規の原因遺伝子変異の探索を行った。現在既知の遺伝子変異を認めないHoyeraal-Hreidarsson syndrome 1 症例、DKC4 症例、不全型DKC13 症例に対して検討を行った。DNAヘリカーゼ遺伝子群では *RTEL1* 変異などが、テロメラーゼ複合体遺伝子群では *TEP1* 変異が、Shelterin 複合体遺伝子群では *ACD(TPP1)*変異が新規の原因遺伝子変異の候補として発見された。今後これらの遺伝子変異の機能解析を行う予定である。

A. 研究の目的

先天性角化不全症(Dyskeratosis congenita: DKC)は網状色素沈着、爪の萎縮、舌の粘膜白斑症などといった特徴的身体的所見を伴う先天性の骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)である。10歳前後までに約80%以上の症例にこれらの特徴的身体的所見が付随しBMFを発症する。また約8%の症例に皮膚、上咽頭、消化管の扁平上皮癌や腺癌などの悪性腫瘍や、急性白血病などの造血器腫瘍の発生が認められる。遺伝型式はX連鎖劣性遺伝が35%、常染色体優性遺伝が5%、常染色体劣勢遺伝が数%に認められるが、残りの約60%近くが型式不明である。DKCの約60%の症例において原因遺伝子が同定され、テロメラーゼ複合体を構成する遺伝子群である、

DKC1、*telomerase RNA component (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*などや、Shelterin複合体を構成する蛋白である *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*に変異が認められている。

テロメラーゼ複合体は細胞分裂によるテロメアの短縮化に対しテロメアの複製、安定の役割をもち、Shelterin複合体はテロメアの先端部位の特異的な構造形成や保護などを行っている。DKCはこれらの遺伝子の変異によりテロメアが短縮化し、その結果造血幹細胞などの増殖能に障害が起き上記の症候が形成されると考えられている。

これまでに我々はDKCの原因遺伝子である上述のテロメア制御遺伝子の変異が、一部の再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic

syndrome: MDS)に認められ、特徴的所見を伴わず緩徐に発症する不全型 DKC の存在が明らかにした (Lancet 2003;362:1628, Blood 2003;102:916, N Engl J Med. 2005 352: 1413)。不全型 DKC は臨床的に AA や MDS と診断され、効果が得られない免疫抑制療法 (immunosuppressive therapy: IST)が行われることがある。以上より BMF の臨床診断において不全型 DKC を鑑別することは重要である。

現在のところ DKC や不全型 DKC の診断基準は定まっておらず、臨床的には上述の特徴的所見を伴う BMF、テロメア長の短縮、テロメア関連遺伝子の変異の同定によって診断を下している。しかしテロメア関連遺伝子の変異の同定に関しては原因遺伝子だけでも 7 種類存在し、その変異も一塩基変異から大欠失変異や片アレル欠失まで多彩で従来のサンガ法による変異のスクリーニングは効率的ではない。また約 40%の症例は原因遺伝子が同定されていないことも問題である。

近年次世代高速シーケンサーが登場し、これまでのサンガ法による直接塩基決定法よりより早く効率的に塩基配列の決定が可能となった。本研究は原因遺伝子が同定されていない症例に関して、次世代シーケンサーを用いて全 exon シーケンスを行い、新規原因遺伝子変異を同定することを目標としている。

B. 研究方法

研究対象は、原因遺伝子が同定されていない特徴的所見を伴う Hoyeraal-Hreidarsson syndrome(HHS)症例、

DKC 症例、もしくはテロメア長の短縮が認められた不全型 DKC 症例。目標症例数は 20 症例。

これらの症例に対して *DKC1*, *TERC*, *TERT*, *NOP10*, *NHP2*, *TINF2*, *TCAB1* といった既知の遺伝子変異のスクリーニングを日本医科大学生命科学センターの ABI Ion PGM™ シークエンサーもしくは、従来の direct sequence 法にて遺伝子解析を行う。

新規遺伝子変異の探索は、上記のスクリーニングにおいて変異が同定出来なかった症例に対して、東京大学医学部附属病院・キャンサーボードの次世代シーケンサー-Illumina 社 GAI, GAIx, HiSeq2000 を用いて全 exon シーケンスを行う(2013 年 7 月より京都大学腫瘍生物学講座)。新規遺伝子が同定された場合は、そのバリデーションや機能解析を日本医科大学生命科学センターにて行う。

(倫理面への配慮)

本研究は当施設遺伝子倫理審査委員会において承認が得られており以下の配慮を予定している。生命倫理上の配慮に関しては、患者、及び健康ボランティアの人権、利益の保護について文書にて十分説明をしたうえで同意を得る。また研究への協力に同意した後であってもその同意を取り消すことができること、更に本研究への同意が得られない場合においても今後の治療などにはなんら不利益を被らないことを説明する。個人情報漏洩に対する取り組みとして研究組織とは別に個人情報管理者をおき連結可能匿名化をはかったうえで解析をおこなう。同意が撤回された場合は、検体、診療情報、遺伝情報はすべて匿名化

されたまま焼却により破棄する。得られた結果は学会や論文として発表するが個人情報が出ることはない。遺伝子結果の開示を研究対象者が要求する場合は、倫理的問題を考慮し遺伝子カウンセリングを施行し、結果の告知は臨床遺伝専門医(遺伝カウンセラー)により行う。

C. 研究結果

次世代高速シーケンサーを用いた新規遺伝子変異の探索

既知の遺伝子変異がサンガ法や次世代高速シーケンサーにて同定されなかった症例に関して現在新規の遺伝子変異の探索を行っている。現時点では表1に示す新規遺伝子変異の候補が抽出されている。

1. DNAヘリカーゼ遺伝子群の変異

DNAヘリカーゼ遺伝子である *WRN* 変異を1症例に、*RECQL4* 変異を3症例に、*PIF1* 変異を2症例に、*BLM* 変異を2症例に、*RTEL1* 変異を3症例に認めた。*RTEL1* 変異の2症例(症例14, 15)は、母に *RTEL1* 102+1G>A のヘテロ変異が認められ、症例においては102+1G>AとF709Lの両アレルに変異があると考えた。その他の変異はすべてヘテロ変異であった。しかし症例6に関してはヘテロの *BLM* 変異と *PIF1* 変異を、症例11に関してはヘテロの *WRN* 変異と *RECQL4* 変異を認めている。

2. テロメラーゼ複合体遺伝子群の変異

テロメラーゼ複合体遺伝子群のひとつである *TEP1* 変異を2症例に認めた。1症例は nonsense mutation で1症例は frameshift mutation であった。

3. Shelterin 複合体遺伝子群の変異

Shelterin 複合体遺伝子群のひとつである *ACD(TPP1)* に変異を認めた。変異部位は Shelterin 複合体を形成し DKC の原因遺伝子変異である *TINF2* との結合ドメインであった。

4. その他

毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子で DNA 損傷修復反応の重要な機能を有する *ATM* のヘテロ変異を1症例に、顔面の奇形、免疫不全、網状皮斑、低身長を症候とする *FILS syndrome* の原因遺伝子として同定された DNA ポリメラーゼの機能をもつ *POLE* のヘテロ変異を1症例に認めた。

表1 次世代高速シーケンサーによって抽出された新規遺伝子変異候補

	Clinical Daiganosis	Mutation 1	Mutation 2	Mutation 3
1	HHS	PIF1 P109S		
2	DKC			
3	DKC	ACD F461L	RECQL4 G1105R	
4	DKC			
5	DKC			
6	cryptic DKC	BLM G1129R	PIF1 P109S	ATM V1260M
7	cryptic DKC	BLM L716F		
8	cryptic DKC			
9	cryptic DKC	TEP1W1079fs		
10	cryptic DKC			
11	cryptic DKC	WRN 3139-1G>C	RECQL4 T465M	
12	cryptic DKC		RECQL4 A72V	
13	cryptic DKC	TEP1 R1237X		
14	cryptic DKC	RTEL1 102+1G>A	RTEL1 F709L	
15	cryptic DKC	RTEL1 102+1G>A	RTEL1 F709L	
16	cryptic DKC	POLE R266X		
17	cryptic DKC			
18	cryptic DKC	RTEL1 V643G		

D. 考察

次世代高速シーケンサーによる新規遺伝子変異探索は、DNAヘリカーゼ遺伝子群、テロメラーゼ複合体遺伝子群、Shelterin 複合体遺伝子群に新規の遺伝子変異の候補が発見された。

その中でも DNA ヘリカーゼ遺伝子群の *RTEL1* 変異は、我々と同様に次世代シーケンサーを用いた新規遺伝子変異探索によって2013年にいくつかのグループからDKCの重症型であるHHSの原因遺伝子として報告がなされたばかりである。これらの報告では *RTEL1* 変異は常染色体劣性遺伝形式のHHS症候群の原因遺伝子と考えられている。今回の我々が発見した2症例(症例14、15)に関しては102+1G>AとF709Lの両アレルに変異があり原因遺伝子の可能性が高い。しかしこれまでの *RTEL1* 変異を認めた症例の大多数はDKCの重症型であるHHSであるのに対して、今回我々が発見した症例14、15はともに不全型DKCの臨床像を示している。現時点では明らかになっていないが、*RTEL1* の変異部位による機能差が臨床像の違いに関与をしている可能性があり今後の機能解析の結果が待たれるところである。

また9/18症例(50%)にDNAヘリカーゼ遺伝子群の変異が認められ、症例6や11に関しては異なるDNAヘリカーゼ遺伝子群のヘテロ変異を2つ認めている。これらがDKCの病態にどのように関与をしているのかは明らかではないが、大変興味深い結果であると考えられる。

新規の原因遺伝子として有望と考えられるテロメラーゼ複合体遺伝子群の *TEP1* 変異、Shelterin複合体遺伝子群の *ACD(TPP1)* 変異が発見された。今後機能解析を行い原因遺伝子変異として確定をする予定である。

E. 結論

現在既知の遺伝子変異を認めないHHS、DKC、や不全型DKCに対して次世代高速シーケンサーを用いて新規遺伝子変異探索を行い、DNAヘリカーゼ遺伝子群、テロメラーゼ複合体遺伝子群、Shelterin複合体遺伝子群に新規の遺伝子変異の候補を発見した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuhara A, Tanino Y, Ishii T, Inokoshi Y, Saito K, Fukuhara N, Sato S, Saito J, Ishida T, Yamaguchi H, Munakata M. Pulmonary fibrosis in dyskeratosis congenita with TINF2 gene mutation. *Eur Respir J.* 2013; 42: 1757–1759.
- 2) 山口博樹. テロメア病. *血液フロンティア.* 2013; 23(6): 816-820.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし