

DKC の遺伝子診断

研究分担者 山口博樹（日本医科大学血液内科 准教授）

研究要旨：先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita (DKC)）は重症型と考えられる Hoyeraal Hreidarsson syndrome (HHS) から軽症型の不全型 DKC までその病態や臨床像が多彩である。近年、次世代シーケンサーによる変異解析技術が発展したため本邦の先天性骨髄不全症においても遺伝子変異検索が積極的に行われつつあり、診断が明確となった症例も多くある。一方で臨床診断と異なる疾患の遺伝子変異が同定されることもあり、遺伝子変異の結果をどのように判断すればよいのか判断が難しい症例もある。本研究は本邦の DKC 症例で発見された原因遺伝子変異に関して *in vitro* にて機能解析を行い、これらがテロメア長制御を障害し DKC の病態に関与しているのかを明らかにすることが目的である。本邦で発見された *TERT* 遺伝子変異 (DKC: E280K, del334_335, cDKC: G106W, P632R, G682D, T726M)、*TERC* 遺伝子変異 (DKC: c.73G>C, cDKC: c.439_443del) に関して *TERT* を欠損しテロメラーゼ活性を認めない Saos-2 細胞及び *TERC* を欠損しテロメラーゼ活性を認めない VA13-*TERT* 細胞にこれらの遺伝子変異を導入しテロメラーゼ活性を解析した。不全型 DKC で発見された G106W と G682D、c.439443del はテロメラーゼ活性を完全に障害し、P632R と T726M は約 50%の低下が認められた。一方、DKC 症例で発見された E280K と del334_335、c.73G>C はテロメラーゼ活性に障害を与えずこれらの変異が DKC の原因遺伝子であったかは懐疑的であった。DKC の診断において遺伝子変異をその診断の根拠とする場合には注意が必要である。

A . 研究目的

先天性角化不全症（Dyskeratosis congenita (DKC)）は網状色素沈着、爪の萎縮、舌などの粘膜白斑症を伴う骨髄不全症（Bone marrow failure: BMF）で 10 歳前後までに約 80%以上の症例にこれらの特徴的身体所見が付随し BMF を発症する。遺伝型は X 連鎖劣性遺伝が約 35%、常染色体優性遺伝が約 15%、常染色体劣性遺伝が数%に認められるが、残りの約 40%近くが型式不明である。

DKC の責任遺伝子変異として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)*、*NOP10*、*NHP2*、Shelterin 複合体を構成する *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)*、テロメラーゼ複合体を核内の Cajalbody に移行させる *TCAB1* が同定された。また近年、DNA

ヘリカーゼの一つである *Regulator of Telomere Elongation Helicase 1 (RTEL1)* の変異が常染色体劣性遺伝の DKC やその重症型と考えられている Hoyeraal Hreidarsson syndrome (HHS) で発見され、テロメア末端の保護に関わる CST 複合体を構成する *CTC1* の変異も発見されている。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細胞に増殖障害が生じ上記の症候が形成されると考えられている。

また、成人になって特徴的身体所見を伴わず緩徐に発症する不全型の DKC の存在が明らかになった。不全型の DKC は、臨床的には再生不良性貧血 (AA) や骨髄異形成症候群 (MDS) などの BMF と診断されていることが多く、BMF の 2~5%に末梢血単核球のテロメア長が短縮し、上述のテロメア関連遺伝子異常を認める不全型の DKC が報告されている。

DKCの病態形成には テロメア関連遺伝子異常による細胞内の分子生物学的変異、 世代促進、加齢の3つ要因が重要である。不全型DKCで認められた *TERC*、*TERT* 変異は haploinsufficiency 効果を示し、テロメラーゼ活性の減弱の程度が少なく、DKCの表現型となるにはある程度の世代促進や加齢が必要であると考えられる。以上のことから、テロメア関連遺伝子変異のテロメア補正の障害が軽度で、世代促進や加齢が進んでいない場合は、細胞増殖や分裂が盛んな造血器のテロメア長が他の組織に先行して短縮化し、DKCの特徴的身体所見が出現せずに不全型のDKCとなるのではないかと予想する。

DKCは網状色素沈着、爪の萎縮、舌などの粘膜白斑症といった特徴的身体所見、家族歴、テロメア長短縮、上述の原因遺伝子変異の同定などによって診断をする。しかし、その重症型と考えられているHHSにおいては小頭症、小脳低形成、成長発達遅延、顔貌異常、B細胞とNK細胞数の低下、細胞性免疫不全などといった多彩な身体異常や免疫異常を認め、さらにDKCの特徴的身体所見を認めない場合もあり診断が難しい場合がある。一方で、骨髄不全症以外の明らかな異常を認めない不全型DKCは、AAやMDSなどの他の骨髄不全症との鑑別が難しい場合がある。また、臨床的にDKCを考えた症例の中にはテロメア長の短縮の程度が軽度の場合や原因遺伝子が同定されない場合などもあり診断に苦慮することが少なくない。

このようにDKCは重症型と考えられるHHSから軽症型の不全型DKCまでその病態や臨床像が多彩である。近年、次世代シーケンサーによる変異解析技術が発展したため本邦の先天性骨髄不全症においても遺伝子変異検索が積極的に行われつつあり診断が明確となった症例も多くある。一方で、臨床診断と異なる疾患の遺伝子変異が同定されることもあり、遺伝子変異の結果をどのように判断すればよいのか判断が難しい症例もある。特に、不全型DKCの場合は他の骨髄不全症との鑑別を遺伝子変異解析によって行っているが、発見された遺伝子変異が本当にテロメア長制御を障害し、DKCの病態に關与しているのかは不明確である。

本研究は本邦のDKC症例で発見された原因遺伝子変異に関して *in vitro* にて機能解析を行いこれら

がテロメア長制御を障害しDKCの病態に關与しているのかを明らかにすることが目的である。

B. 研究方法

本邦で発見された *TERT* 遺伝子変異 (DKC: E280K, del334_335, cDKC: G106W, P632R, G682D, T726M) 及び *TERC* 遺伝子変異 (DKC: c.73G>C, cDKC: c.439_443del) をオリゴ合成により作成し、pCI-neo-flag vectorでクローニングした。野生型の *TERC* を発現し、*TERT* を発現しておらず、テロメラーゼ活性を持たないSaos-2細胞 (Alternative Lengthening of Telomere (ALT)にてテロメアを補正) に *TERT* 野生型及び各変異を発現するpCI-neo-flag vectorをそれぞれリン酸カルシウム法でtransfectionし、48時間後に各細胞を粗抽出しTeloTAGGG Telomerase PCR ELISAPLUS (Roche)によりRelative telomerase activity (RTA: 相対的テロメラーゼ活性) を測定した。

また、野生型の *TERT* をオリゴ合成により作成し、pDon-neo-vectorでクローニングした。AmphoPack 293細胞を用いてレトロウイルスベクターを作成し、野生型の *TERC*、*TERT* を発現しておらず、テロメラーゼ活性を持たないVA13細胞 (ALTにてテロメアを補正) にtransductionさせ野生型の *TERT* を発現するVA13-*TERT*細胞を作成した。VA13-*TERT*細胞に *TERC* 野生型及び各変異を発現するpCI-neo-flag vectorをそれぞれリン酸カルシウム法でtransfectionし、48時間後に各細胞を粗抽出し同様にRTAを測定した。

(倫理面への配慮)

機能解析において遺伝子導入を行うため、日本医科大学組換えDNA実験指針に従う。具体的には組換えDNA実験はP3レベルの研究室で行い、組換えDNAを導入した細胞などの破棄には所定の指示に従う。

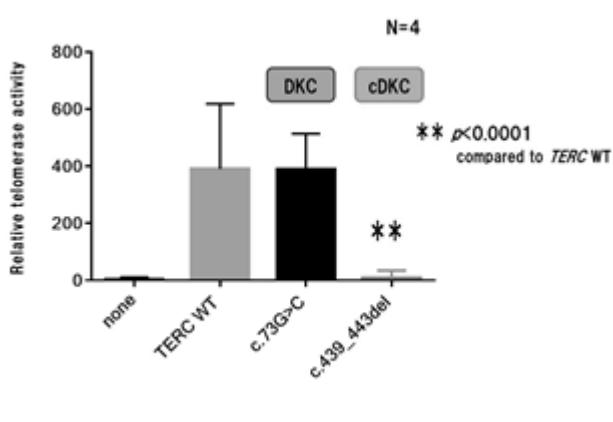
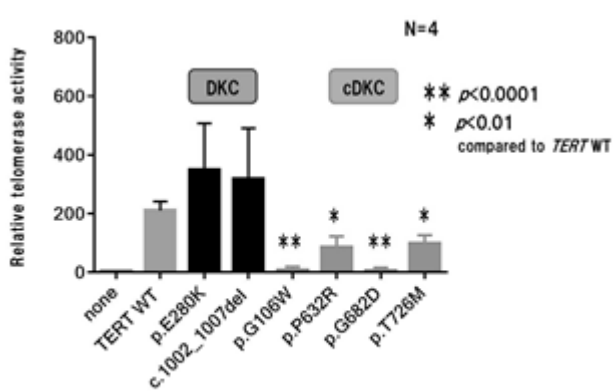
C. 研究結果

Saos-2細胞及びVA13-*TERT*細胞はテロメラーゼ活性が認められずALTにてテロメア長を補正している。

DKCで発見された *TERT* E280K, del334_335は、野生型と比較してテロメラーゼ活性の低下は認めら

れなかった (RTA 210.8 ± 17.8 vs. 350.0 ± 78.9 , 319.3 ± 85.8 $p=0.2010$, $p=0.3389$)。一方、不全型DKCで認められた *TERT* G106W, G682Dは野生型に比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた。(RTA 210.8 ± 17.8 vs. 7.4 ± 6.3 , 5.9 ± 5.3 $p<0.0001$, $p<0.0001$)。また、不全型DKCで認められた *TERT* P632R, T726Mは野生型に比較し有意にテロメラーゼ活性が低下しているものの (RTA 210.8 ± 17.8 vs. 84.6 ± 19.4 , 97.6 ± 14.7 $p<0.0001$, $p<0.0001$) *TERT* G106W, G682Dと比較してテロメラーゼ活性の低下の程度が小さかった (RTA 7.4 ± 6.3 vs. 84.6 ± 19.4 , 97.6 ± 14.7 $p<0.01$, $p<0.01$)。

DKCで発見された *TERC* c.73 G>Cは野生型と比較してテロメラーゼ活性の低下は認められなかった (RTA 390.2 ± 113.9 vs. 388.2 ± 62.80 , $p=0.9881$)。一方、不全型DKCで認められた *TERC* c.439_443delは野生型に比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた (RTA 390.2 ± 113.9 vs. 6.780 ± 13.88 $p<0.0001$)。



D. 考察

本邦のDKC症例で発見された *TERT* 変異及び *TERC* 変異のテロメラーゼ活性の障害を *in vitro* で確認をした。不全型DKCで発見された *TERT* G106WとG682D, *TERC* c.439_443delはテロメラーゼ活性を完全に障害し原因遺伝子変異として間違いないと考えられた。また、不全型DKCで認められた *TERT* P632RとT726Mはテロメラーゼ活性が有意に低下をしているが、その障害の程度は野生型の約50%程度で臨床的に不全型DKCの表現型となった原因をよく示していた。一方、DKC症例で発見された *TERT* E280Kとdel334_335, *TERC* c.73G>Cはテロメラーゼ活性に障害を与えず、これらの変異がDKCの原因遺伝子であったかは懐疑的である。しかし、Saos-2細胞、VA13細胞がテロメラーゼ活性を介さずALTにてテロメア長補正をしているようにテロメア長制御はテロメラーゼ活性だけが全てではない。これらの遺伝子変異が別のテロメア制御機構を障害してDKCの病態に関与をしている可能性は完全には否定できない。

今回の機能解析結果より症例によっては遺伝子変異のみでDKCを診断するのは難しいことが明らかになった。

E. 結論

DKCや不全型DKCで発見された *TERT* 変異、*TERC* 変異の中には、テロメラーゼ活性に障害を与えず、DKCの原因遺伝子でない変異が認められることがある。DKCの診断において、遺伝子変異をその診断の根拠とする場合には注意が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Muramatsu H, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Doisaki S, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Takahashi Y, Kanno H, Yamaguchi H, Ohga S, Manabe A, Harigae H, Kunishima S, Ishii E, Kobayashi M, Koike K, Watanabe K, Ito E, Takata M, Yabe M, Ogawa S, Miyano S, Kojima S. Clinical utility of next-generation sequencing

for inherited bone marrow failure syndromes.
Genetics in Medicine 2017;19(7):796-802.

2. 学会発表

- 1) Terada K, Yamaguchi H, Miyake K, Miyake N, Osaki Y, Okada T, Kojima S, Ito E, Inokuchi K. Importance of functional analysis of TERT gene mutations in the diagnosis of dyskeratosis congenital. **第79回日本血液学会総会**（平成29年10月20-22日，東京）。

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし