

DKCの遺伝子診断

研究分担者 山口博樹（日本医科大学 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、約 40%の症例ははまだ責任遺伝子が明らかになっていない。本研究の目的は DKC の新規の責任遺伝子は発見することである。

既知の責任遺伝子に変異を認めない DKC 症例に関して次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析を行った結果、*TEP1* 遺伝子変異と *ACD* 遺伝子変異が新規の責任遺伝子変異の候補として発見された。*ACD* 遺伝子変異は *TINF2* との結合領域に認められたため *ACD* と *TINF2* の結合阻害によって Shelterin 複合体が不安定化することを予想した。しかし、発見された *ACD* 遺伝子変異は *ACD* と *TINF2* の結合阻害を起こさず、Shelterin 複合体が不安定化することはなかった。発見された *ACD* 遺伝子変異は DKC の責任遺伝子変異ではないと考えられた。現在、*TEP1* 遺伝子変異の機能解析を行っている。

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。遺伝子型は 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

年齢が必要であると考え。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もあり診断に苦慮することが少なくない。

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においても遺伝子変異検索が積極的に行われ、診断が明確となった DKC 症例も多くある。一方で、DKC の約 30%の症例は責任遺伝子が明らかになっていない。本研究の目的は次世代シーケンサーを用いて発見された DKC の責任遺伝子候補に関して機能解析を行い新規の DKC の責任遺伝子を同定することである。

B . 研究方法

野生型の *ACD* 遺伝子をオリゴ合成により作成し、pCI-neo-vector でクローニングした (pCI-neo-*ACD* WT)。更に、pCI-neo-*ACD* WT から、次世代シーケンサーで発見された *ACD* 遺伝子変異 p.F461L を mutagenesis 法により作成した (pCI-neo-*ACD* p.F461L)。また、*TINF2* 遺伝子の C 末端に FLAG タグを付与した配列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 (pCI-neo-*TINF2*)。野生型の *ACD* を発現していない、HEK293 細胞に 1. pCI-neo-*ACD* WT と pCI-neo-FLAG、2. pCI-neo-*ACD* p.F461L と pCI-neo-FLAG、3. pCI-neo-vector をそれぞれ

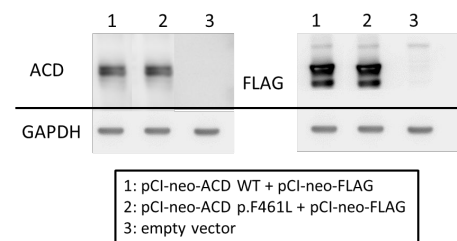
Lipofectamin3000によりトランスフェクションした。48時間後にHEK293細胞のタンパクを抽出し、抗ACD抗体(AA-2): sc-100597, 抗FLAG抗体: A8592を用いてACDタンパク, *TINF2*タンパクの発現を確認した。その後、Protein A/G PLUS-Agaroseを用いて抗ACD抗体(AA-2): sc-100597で免疫沈降を行った。免疫沈降後のタンパクを用い、抗FLAG抗体: A8592でウエスタンブロットを施行した。

(倫理面への配慮)

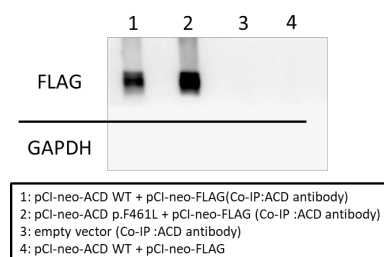
機能解析において遺伝子導入を行うため、日本医科大学組換えDNA実験指針に従う。具体的には組換えDNA実験は、P3レベルの研究室で行い、組換えDNAを導入した細胞などの破棄には所定の指示に従う。

C . 研究結果

それぞれのプラスミドベクターをHEK293細胞にトランスフェクションし、ACD, FLAGを共発現していることを確認した。



ACD抗体を用いて免疫沈降した結果、野生型のACD, ACD p.F461L変異いずれも*TINF2*と結合していることが明らかとなった。



ACD p.F461L変異はACDの*TINF2*結合領域に起きる変異であることから、変異の結果ACDと*TINF2*の結合が阻害されると推察されたが、今回の結果ではACD p.F461L変異は*TINF2*との結合を阻害しないことが明らかとなった。

D . 考察

責任遺伝子が同定されていないDKC症例に対して次世代シーケンサーによる全エクソンシーケンスによってACD遺伝子変異 p.F461Lが発見された。ACD遺伝子変異はTNF2との結合領域に認められたため ACDとTNF2の結合阻害によって Shelterin複合体が不安定化することを予想した。しかし、発見された ACD遺伝子変異はACDとTNF2の結合阻害を起こさず、Shelterin複合体が不安定化することはなかった。

発見されたACD遺伝子変異はDKCの責任遺伝子変異ではないと考えられた。しかし、ACDの機能は Shelterin複合体だけではない。今回発見された遺伝子変異によってShelterin複合体が不安定化とは別の機序でテロメア長を短縮化させてDKCの病態に関与をしている可能性は否定できなかった。

現在、ACD遺伝子変異と同様に発見されたテロメラーゼ複合体を形成するTEPI遺伝子変異の機能解析を行っている。

E . 結論

ACD遺伝子変異 p.F461LはDKCの責任遺伝子変異ではない。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tachiwada T, Oda K, Tahara M, Sennari K, Nemoto K, Noguchi S, Kawanami T, Kido T, Yamaguchi H, Yatera K. Fatal Acute Exacerbation of Familial Interstitial Pneumonia Complicated with Dyskeratosis Congenita after Influenza Virus B Infection. **Inter Med.** (in press)

2. 学会発表

該当なし

G . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

