

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断基準・重症度分類・診断ガイドラインの確立に関する研究

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：先天性角化不全症 (Dyskeratosis congenita (DKC)) の診断は、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、テロメア長短縮、原因遺伝子変異の同定が重要である。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。しかし、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。不全型 DKC の場合は特徴的身体所見がなく、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異検索でも変異が同定できない症例も少なくない。このことから DKC の診断においてスクリーニング検査としてテロメア長測定は重要である。テロメア長測定は、サザン法や FLOW-FISH 法が一般的ではあるが、これらは解析のために多くの血液細胞が必要であり、特に FLOW-FISH 法は生細胞を扱うため検体の搬送などの問題もある。これらの問題を解決するために q-PCR 法によるテロメア長測定が開発をされてきたが未だ確定した方法が開発されていない。本研究の目的は測定する細胞数が少ない骨髄不全症において有用な q-PCR 法によるテロメア長測定法を開発することである。

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。遺伝型式は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 componen (TERC)*、*telomerase reverse transcriptase (TERT)*、*NOPI10*、*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。

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、BMF以外の明らかな異常を認めない不全型DKCは再生不良性貧血や骨髄異形成症候群などの他のBMFとの鑑別が難しい場合がある。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。

不全型DKCの場合は特徴的身体所見がなく、次世

代シーケンサーを用いた遺伝子変異検索でも変異が同定できない症例も少なくない。

以上のことから、DKCの診断においてスクリーニング検査としてテロメア長測定は重要である。テロメア長測定は、サザン法やFLOW-FISH法が一般的ではあるが、これらは解析のために多くの血液細胞が必要であり、特にFLOW-FISH法は生細胞を扱うため検体の搬送などの問題もある。これらの問題を解決するためにq-PCR法によるテロメア長測定が開発をされてきたが未だ確定した方法がない。本研究の目的は、測定する細胞数が少ないBMFにおいて有用な q-PCR法によるテロメア長測定法を開発することである。

B . 研究方法

ゲノムDNAは、DKC症例と健常人の全血からPBMC（末梢血単核細胞）を分離し、DNA抽出キット（QIAGEN, QIAamp DNA Blood Mini Kit）により抽出した。また、コントロールDNAとして細胞株のgDNAも同様に抽出した。抽出したDNAは、TEバッファー（10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/l EDTA (pH 8.0)）で10 ng/ μ Lに希釈して使用した。

リアルタイムPCRは、Applied Biosystems™ 7500 FastリアルタイムPCRシステムを使用した。Telomere PCRとシングルコピー遺伝子（36B4、酸性リボソームリントタンパク質POをコードする）PCRは同じ96ウェルプレートで行い、各サンプル、各遺伝子で2ウェル使用した。また、一つの96ウェルプレートには必ずコントロールDNAが含まれているウェルを用意した。遺伝子ごとに2種類のPCR Master Mixを準備するが、使用するプライマー以外は同一であった。PCRにおける試薬の最終濃度は、1x PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems™)、各々100 nMプライマー及び0.5 ng/ μ LのgDNAである。プライマー配列やPCR条件は論文化前なので記載はしない。

テロメア長比は、検量線を使用して決定する。基準となるセルラインを段階希釈したサンプルを同じ96ウェルプレートで測定することで、プレートごとの検量線を作成する。テロメア長比と36B4コピー数を算出し、36B4遺伝子1コピーあたりのテロメア長比を求める。検量線に使用するサンプルを同じ

gDNAにすることで、プレート間での誤差を補正することにも使用する。

（倫理面への配慮）

本研究は、以前に日本医科大学にて承認が得られた「先天性角化不全症におけるテロメラーゼ関連遺伝子群の塩基配列変異についての研究」において収集をしたDKC症例や正常ボランティアのDNAを用いた。

C . 研究結果

1. qPCRを用いたテロメアPCR法の検量線の策定

他の研究で用いられたテロメアオリゴDNAはPCR効率が悪く、36B4 遺伝子プラスミドDNAは必要以上にPCR効率が良いためこれらを検量線サンプルとして用いると誤差が大きくなることが明らかとなった。そこで細胞株（1301細胞、HEL、Saos2、U937、HNT-34）から抽出をしたgDNAのテロメア塩基配列と36B4 遺伝子塩基配列を用いて検量線作成を検討した。PCR効率などの検討からHNT-34細胞やU937細胞が検量線を作成するための細胞株として適切であることが明らかになった（図1）。

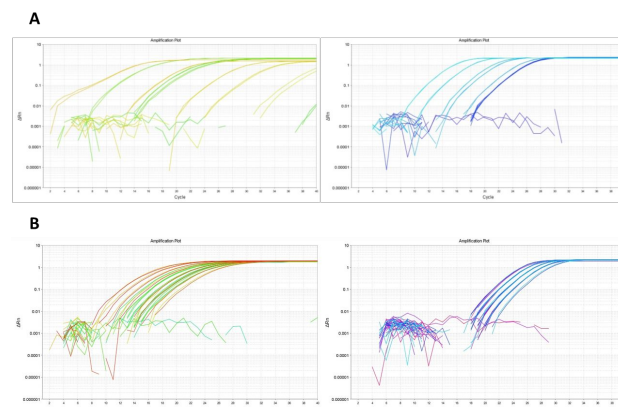


図1 テロメアと36B4遺伝子のqPCRによる検量線

A. 左はテロメアオリゴDNA、右は36B4 遺伝子プラスミドDNAを用いた検量線。テロメアオリゴDNAはPCR効率（1.43）が悪く、36B4 遺伝子プラスミドDNAはPCR効率（2.72）と必要以上に高かったため検量線のばらつきが大きい。

B. 左はU937細胞のgDNAのテロメア塩基、右はU937細胞のgDNAの36B4 遺伝子塩基配列を用いた検量線。テロメア塩基のPCR効率（1.99）、36B4 遺伝子塩基配列のPCR効率（2.08）と理想的な数値を示した。

次に、細胞株の染色体数がテロメアPCR効率に影響を与える可能性を検討するために染色体1倍体の細胞株HAP1、末梢血単核球、NHT-34(染色体数不明)、U937(染色体数不明)のPCR効率を比較した。PCR効率比(Telomre/36B4)はHAP1(80.88%)<U937(83.69%)<PBMC(87.74%)<HNT-34(93.19%)であった。

2. 検量線と健常人サンプルの測定

HNT-34で検量線を作成して、1倍体で36B4 遺伝子数が確定をしているHAP1細胞を基準としてボランティア末梢血単核球のテロメア長比の測定を行った。図2に示すように加齢に伴いテロメア長の短縮化があることを示すことができた。

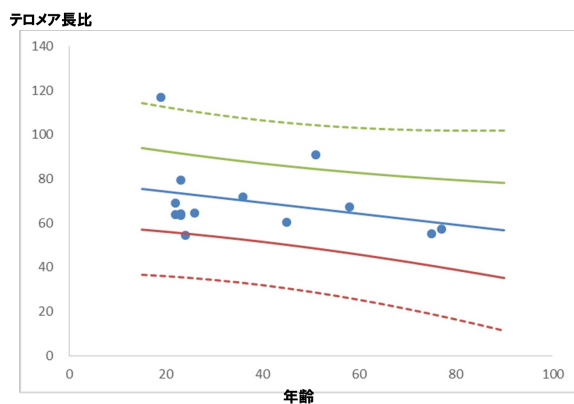


図2 正常末梢血単核球のテロメア長比
サンプルの年齢を横軸、テロメア長比を縦軸にプロットした。
加齢によってテロメアが減少する傾向が見られた。
緑実線：SD、緑点線：2SD、赤実線：-SD、赤点線：-2SD

D. 考察

他の研究で用いられたテロメアオリゴDNAはPCR効率が悪く、36B4 遺伝子プラスミドDNAは必要以上にPCR効率が良いため、これら用いたqPCR法によるテロメア長測定は誤差が大きかった。しかし、今回の検討でPCR効率が安定をしているHNT-34細胞やU937細胞のgDNAを用いることで正確なqPCRの検量線ができることが明らかになった。

今後の課題として、テロメア長の短縮した検体の測定、HAP1細胞を基準にすることでプレート間

での測定誤差がなくなるのかの検証が必要である。

E. 結論

PCR効率が安定をしているHNT-34細胞やU937細胞のgDNAを検量線に用いたテロメアqPCR法はこれまでの方法と比較してより正確にテロメア長の測定が可能となる。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Terada K, Miyake K, Yamaguchi H, Miyake N, Yamanaka K, Kojima S, Ito E, Inokuchi K, Okada T. TERT and TERC mutations detected in cryptic dyskeratosis congenita suppress telomerase activity. **Int J Lab Hematol**. 2020 (in press)
 - 2) 杉山智子, 河瀬成穂, 寺田和樹, 山口博樹, 佐々木なおみ, 堀田尚克. 先天性角化不全症を背景に増悪した間質性肺炎の1剖検例. **日呼吸誌** 2020;9:128-131.
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし