

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

先天性角化不全症（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)）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、いま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。

また、我々の次世代シーケンサーによる DKC の新規原因遺伝子の探索によって新規に *TEP1* 遺伝子変異が候補にあがった。*TEP1* 変異がテロメラーゼ活性の障害やテロメア長短縮をさせ DKC の発症の原因遺伝子であるかの機能解析を行った。さらに、新規 DKC の原因遺伝子変異であり主に核小体に局在し、リボソーム生合成の制御にかかわる *NPM1* の変異に関して原因遺伝子が同定されていない DKC や BMF に関して検索を行った。

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 component* (*TERC*)、*telomerase reverse transcriptase* (*TERT*)、*NOPI0*、*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 へ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 *CTCI* 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、いま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。

また、我々の次世代シーケンサーによるDKCの新規原因遺伝子の探索によって新規にTEPI遺伝子変異が候補にあがった。TEPI変異がテロメラーゼ活性の障害やテロメア長短縮をさせDKCの発症の原因遺伝子であるかの機能解析を行った。

さらに、DKCの臨床像が多彩であることから原因遺伝子変異による診断が重要となるが、DKCの約1/3の症例ではこれらの原因遺伝子が認められない。近年リボソーム生合成に関与をするNPM1遺伝子の変異(D178H、D180del)がDKC症例で発見された。本研究は、本邦における原因遺伝子が明らかになっていないDKCを含む骨髄不全症に対してDKCの新規原因遺伝子変異であるNPM1変異を検索した。

B. 研究方法

1) q-PCR法によるテロメア長測定法

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/μL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、1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/μLのgDNAである。プライマー配列やPCR条件は論文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。

2) 新規DKC原因遺伝子であるNPM1変異の変異解析

原因遺伝子が明らかになっていないDKC 5症例、不全型DKC 13症例、免疫抑制療法の効果がなかった再生不良性貧血91症例、家族歴がある骨髄形成症候群8症例に対してNPM1遺伝子の全exonをdirect sequence法にて解析をした。

(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）。

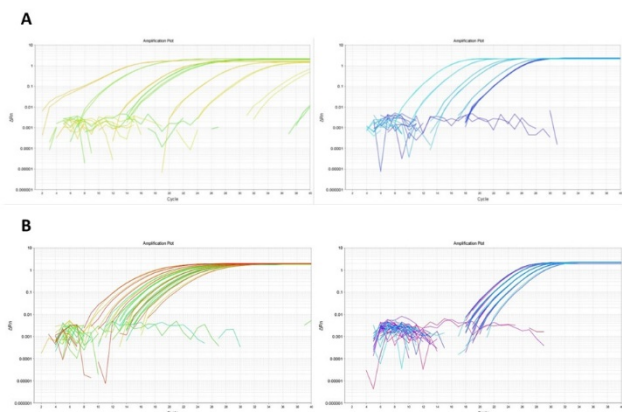


図1. テロメアと36B4遺伝子のqPCRによる検量線
 A. 左はテロメアオリゴDNA、右は36B4 遺伝子プラスミドDNAを用いた検量線。テロメアオリゴDNAはPCR効率 (1.43) が悪く、36B4 遺伝子プラスミドDNAはPDR効率 (2.72) と必要以上に高かったため検量線のばらつきが大きい。
 B. 左はU937細胞のgDNAのテロメア塩基、右はU937細胞のgDNAの36B4遺伝子塩基配列を用いた検量線。テロメア塩基のPCR効率 (1.99) 、36B4遺伝子塩基配列のPCR効率 (2.08) と理想的な数値を示した。

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、HNT-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出来た。

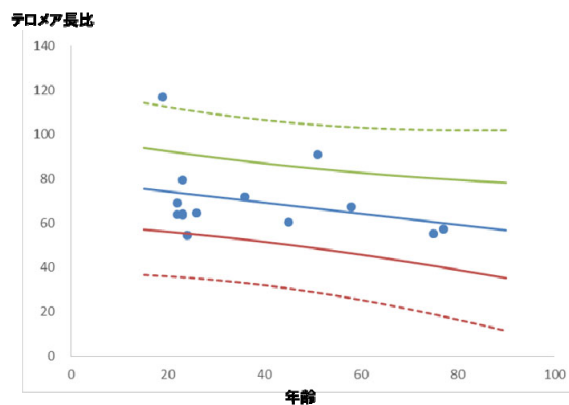


図2. 正常末梢血単核球のテロメア長比
 サンプルの年齢を横軸、テロメア長比を縦軸にプロットした。
 加齢によってテロメアが減少する傾向が見られた。
 緑実線：SD、緑点線：2SD、赤実線：-SD、赤点線：-2SD

3) DKCを含む骨髄不全症に対してNPM1変異の検索

DKC 5症例、不全型DKC 13症例、免疫抑制療法の効果がなかった再生不良性貧血 91症例、家族歴がある骨髄形成症候群 8症例に対してNPM1変異を検索したが、変異は認められなかった。

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効率が良かったためこれら用いた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。

DKCの新規原因遺伝子変異であるNPM1変異に関して昨年引き続き症例数を増やして解析をしたが、本邦の原因遺伝子が同定されていないDKC症例では認められなかった。

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。

DKCの新規原因遺伝子変異である*NPM1*変異は、本邦の原因遺伝子が同定されていないDKC症例では認められなかった。

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 Jun;42(3):316-321. doi: 10.1111/ijlh.13176.
- 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

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし