

令和元年5月30日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09832

研究課題名(和文)先天性角化不全症の新規原因遺伝子変異の同定と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The identification of the novel gene mutation and development of the novel therapy for dyskeratosis congenita

研究代表者

山口 博樹 (Yamaguchi, Hiroki)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90297937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本邦の先天性角化不全症(DKC)で発見されたTERTE280Kとdel1334-335はテロメラーゼ活性に障害を与えずこれらが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診断の根拠とする場合には注意が必要である。また既知の遺伝子変異を認めないDKCに関して網羅的遺伝子変異解析を行い、TEP1遺伝子変異とACD遺伝子変異を発見した。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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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。変異解析技術が発展したため遺伝子変異検索によって診断が明確となった症例も多くある。一方で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。またDKCの約1/3の症例では責任遺伝子変異が同定されていないため遺伝子診断が出来ない場合もある。今回の研究成果で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。

研究成果の概要(英文)：Telomerase activity in TERT carrying mutations detected in DKC patients (p.E280K or p.S334del) did not significantly differ from that in wild-type TERT. This makes it doubtful that the TERT mutations identified in DKC patients are causative for DKC. Next, we conducted a comprehensive analysis for DKC without the known gene mutation, and detected novel TEP1 mutations and ACD mutations. However, this ACD mutation did not cause binding inhibition of ACD and TINF2, and shelterin complexes destabilizes. The detected ACD mutation was not a responsibility in DKC.

研究分野：血液内科学

キーワード：先天性角化不全症 テロメア制御遺伝子異常 テロメラーゼ活性 新規遺伝子変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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的身体所見が付随し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症が認められる。遺伝型は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)*、テロメラーゼ複合体を核内の Cajalbody に移行させる *Telomerase Cajal body protein 1(TCAB1)*、DNAヘリカーゼ遺伝子群の *regulator of telomere elongation helicase 1(RTEL1)* 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前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。

研究代表者の山口博樹は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、特徴的的身体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。

2. 研究の目的

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的身体所見を伴う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。しかし約40%の症例は原因遺伝子が同定されていないことが問題である。そこで研究代表者の山口博樹は原因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を用いて新規原因遺伝子の探索を行った。この結果としてテロメラーゼ複合体遺伝子群の1つである *telomerase-associated protein 1(TEP1)* 変異、Shelterin 複合体遺伝子群の1つである *adrenocortical dysplasia homolog (ACD(TPP1))* 変異、DNAヘリカーゼ遺伝子群である *Bloom syndrome, RecQ helicase-like (BLM)* 変異と *BLM 5'-to-3' DNA helicase(PIF1)* 変異との複合ヘテロ変異、*Werner syndrome, RecQ helicase-like (WRN)* 変異と *RecQ protein-like 4(RECQL4)* との複合ヘテロ変異を発見した。これら新規に発見された遺伝子変異がどのようにして細胞内のテロメア短縮補正を破綻させDKCの病態に関与しているかを解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1. 本邦で発見された既知の責任遺伝子変異の機能解析

本邦で発見された *TERT* 遺伝子変異(DKC: E280K, del1334_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。

2. DKCの新規責任遺伝子変異候補の機能解析

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。

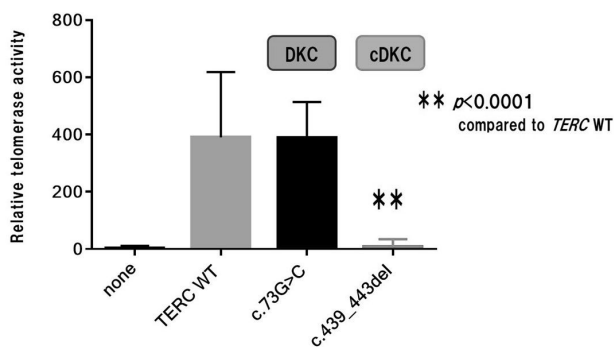
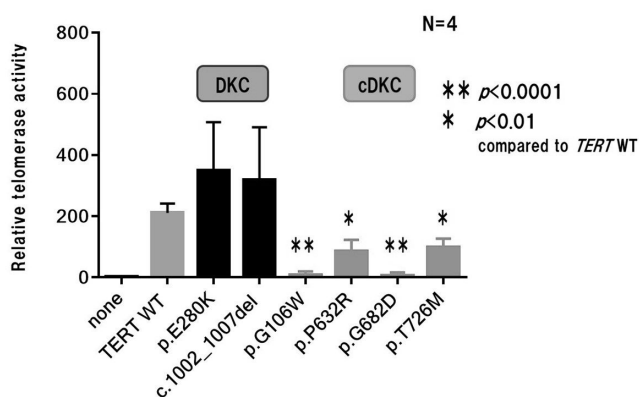
4. 研究成果

1. 本邦で発見された既知の責任遺伝子変異の機能解析

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。

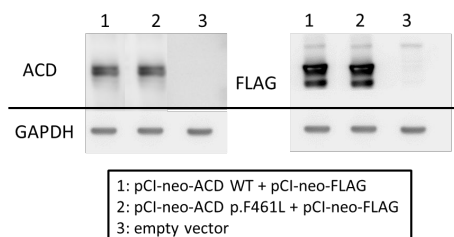
DKC で発見された TERT E280K, del1334_335 は野生型と比較してテロメラーゼ活性の低下は認められなかった (RTA 210.8 ± 17.8 vs. 350.0 ± 78.9 , 319.3 ± 85.8 $p=0.2010$, $p=0.3389$)。一方不全型 DKC で認められた TERT G106W, G682D は野生型と比較し有意にテロメラーゼ活性が低下していた。(RTA 210.8 ± 17.8 vs. 7.4 ± 6.3 , 5.9 ± 5.3 $p<0.0001$, $p<0.0001$)。また不全型 DKC で認められた TERT P632R, T726M は野生型と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 は野生型と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 $p<0.0001$)。

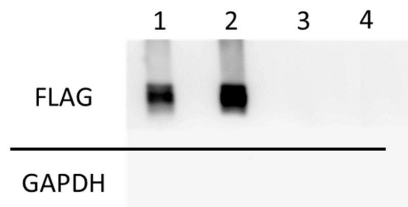


2. DKC の新規責任遺伝子変異候補の機能解析

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。



1: pCI-neo-ACD WT + pCI-neo-FLAG (Co-IP:ACD antibody)
 2: pCI-neo-ACD p.F461L + pCI-neo-FLAG (Co-IP:ACD antibody)
 3: empty vector (Co-IP:ACD antibody)
 4: pCI-neo-ACD WT + pCI-neo-FLAG

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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Moriya K, Suzuki T, Watanabe Y, Saito-Nanjo Y, Niizuma H, Onuma M, Rikiishi T, Kakuta F, Abukawa D, Yamaguchi H, Sasahara Y, Kure S. Hoyerall-Hreidarsson syndrome in a patient with novel compound heterozygous RTEL1 gene mutations. *Pediatric Blood & Cancer*. 2016 Sep;63(9):1683-4.

2. 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 Jul;19(7):796-802.

3. 山口博樹. 骨髄不全症におけるテロメア制御異常. *血液フロンティア*. 2017, 27(1), 5-9

4. 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.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. Kazuki Terada, Hiroki Yamaguchi, Koichi Miyake, Noriko Miyake, Yoshiki Osaki, Takashi Okada, Seiji Kojima, Etsuro Ito, Koiti Inokuchi. Importance of functional analysis of TERT gene mutations in the diagnosis of dyskeratosis congenita.

(ア) 第 79 回 日本血液学会学術集会 2017 年 10 月東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：猪口孝一

ローマ字氏名：Koiti Inokuchi

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：10203267

研究分担者氏名：三宅弘一

ローマ字氏名：Koichi Miyake

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：90267211

(2)研究協力者

研究協力者氏名：寺田和樹

ローマ字氏名：Kazuki Terada

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。