

平成21年12月15日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591141  
 研究課題名（和文）：テロメラーゼ複合体遺伝子異常で発症する骨髄不全症の病態解明と新規治療の開発  
 研究課題名（英文）：Analysis of pathogenesis mechanism and development of new treatment in bone marrow failure due to mutation of telomere regulated genes.  
 研究代表者：山口 博樹（YAMAGUCHI・HIROKI）  
 日本医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：90297937

研究成果の概要：テロメラーゼ複合体を構成する *TERC* や *TERT* などの変異が再生不良性貧血(AA)などの骨髄不全症(BMF)の約3%に存在する。これらの変異の多くは、haploinsufficiency 効果によりテロメラーゼ活性を障害し BMF を発症させる。そこで本邦の成人 BMF120 人におけるテロメア制御遺伝子変異の検索を行った。結果は *TERC* の変異を1例、Shelterin 複合体を構成する *TINF2* の変異を3例発見した。本邦におけるテロメア制御遺伝子変異をもつ BMF の存在を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、血液内科学

キーワード：(1)Dyskeratosis congenita (2)human telomerase RNA gene (3)Telomerase reverse transcriptase subunit gene (4)SBDS gene (5)TINF2 gene (6)Mutation (7)Telomere length (8)Bone marrow failure

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄不全症(Bone marrow failure: BMF)は造血幹細胞の減少に基づく骨髄機能低下によって発症する疾患の総称である。BMFには先天性疾患である Fanconi 貧血(FA)や Dyskeratosis congenita(DKC)などと、後天性疾患である再生不良性貧血(aplastic anemia: AA)や骨髄異形成症候群

(myelodysplastic syndrome: MDS)などが含まれる。典型的な AA は免疫抑制療法 (immunosuppressive therapy: IST) が有効であることから、免疫機序を介した病態により発症すると考えられている。またこれ以外の BMF は、造血幹細胞における分化や増殖の異常によって発症すると考えられている。

これらの疾患の診断や鑑別において、家族

歴、付随する特徴的な身体所見、骨髄の形態、染色体分析の異常などは重要である。しかし BMF は白血病の様な腫瘍性疾患と異なり、病態の対象である血球が「消失」してしまうことから臨床的診断が難しい場合がある。例えば臨床的に MDS と診断された中に、IST が有効な症例が認められことから骨髄の形態や染色体分析の異常だけでは鑑別には限界が生じている。また近年遺伝性 BMF の原因遺伝子変異が一部の AA に認められ、その発症に関与していることが明らかになった。これらの異常をもつ BMF は臨床的に AA と診断されても IST の効果は得られない。以上のことから AA を含めた BMF において病態の解明による正確な診断が求められている。

研究代表者の山口博樹は、これまでに BMF におけるテロメラーゼ複合体遺伝子変異に関して研究をおこなってきた。テロメラーゼ複合体は、テロメア配列を伸長、補修することによりテロメアを介した細胞分裂能および染色体の安定性を維持している。これまでの研究で、BMF において *telomerase RNA component (TERC)* の変異 (Lancet.2003;362:1628, Blood.2003;102(3):916)、*telomerase reverse transcriptase (TERT)* の変異 (N Engl J Med.2005;352:1413) をもつ症例が約 3% 存在することを明らかにした。そしてこれらの変異の多くは haploinsufficiency 効果によりテロメラーゼ活性を障害し、造血幹細胞の細胞分裂能を低下させ BMF を発症させることを示した (N Engl J Med. 2005; 352: 1413)。

しかし BMF の約 1/3 の症例はテロメアの短縮化を認めるが、上記の異常だけでは説明がつかない。

Shwachman-Bodian-Diamond (SBDS) 症候群において造血系の細胞のテロメア長の短縮化が認められている (Br J Haematol. 2002; 117: 189)。このことは DKC の様に SBDS においてテロメアの短縮化が病態の一つの要因である可能性がある。近年 SBDS の原因遺伝子である *SBDS* 遺伝子の変異がテロメアの短縮化した AA において認められた (Blood. 2007; 110: 1141)。また Shelterin 複合体はテロメラーゼ複合体と同様にテロメアに局在する蛋白質複合体で、テロメアの特異的な構造形成や保護、テロメア長の調節を行っている。この Shelterin 複合体を構成する蛋白の一つである *TRF-interacting nuclear protein (TINF2)* の変異が、テロメアの短縮化した BMF において発見された (Blood. 2008; 112: 3594)。

こうしたテロメア制御遺伝子変異を有する BMF に対して IST は無効であり、造血幹細胞移植が有効な治療法として考えられている。またテロメアが短縮化した BMF は IST に対して不応性であることも示唆されてい

る (Blood. 2001; 97(4): 895)。しかしテロメアの短縮化した BMF の中でテロメア制御遺伝子変異が明らかになった症例は約 10% 程度でしかない。このことはこれまで発見されていない遺伝子変異の存在を予想させる。テロメアの短縮化した BMF における原因遺伝子変異の解明は、その診断をより明確なものとし、造血幹細胞移植の適応やその家族ドナーの選択などにおいても重要であると考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究は、本邦における BMF におけるテロメア制御遺伝子変異の検索と機能解析を行い、将来の BMF の診断におけるテロメア制御遺伝子変異の意義を明らかにすることを目的としている。

## 3. 研究の方法

対象は臨床的に AA、MDS の不応性貧血 (RA) と診断された症例。テロメラーゼ複合体遺伝子である *DKC1*、*TERC*、*TERT* と、Shelterin 複合体遺伝子である *TINF2* 各遺伝子に関して direct sequence 法にて遺伝子配列を決定し変異を検索した。さらに *DKC1*、*TERC* においてその promoter 領域の遺伝子変異が病態に関与しているとの報告があるので、promotor 領域の検索も行った。また変異症例においては、Southern blot 法にてテロメア長を測定し、テロメアの短縮化の検討を行った。さらに in vitro の機能解析として、wild type より mutagenesis 法にて変異発現ベクターを作成し、*TERC(-)*、*TERT(-)* のテロメラーゼ活性を持たない VA13 細胞に各遺伝子を導入し (例えば *TERC* mutation+*TERT* wild type) テロメラーゼ活性の回復を検討した。また変異の機能が dominant negative なのか haploinsufficiency なのかを明らかにするために VA13 細胞に変異と wild type を共発現させ (例えば *TERC* mutation/wild+*TERT* wild type) テロメラーゼ活性の回復を検討した。

## 4. 研究成果

本邦の成人 BMF 120 人 (免疫抑制療法不応性の AA 45 人、MDS RA 75 人) に対して遺伝子変異を検索し、*TERC* 変異 1 例 (0.8%)、*TINF2* の変異を 3 例 (2.5%) 発見した。

*TERC* では promoter 領域に遺伝子多型である n-771A/G と n-714C insertion を、*TERT* では 11 種類の遺伝子多型を認めた。この中で *TERT* の IVSE6-93G/A、codon837CTC/CTG、codon840CTG/CTA はこれまでに報告にない新規のものであった。遺伝子多型は正常コントロールにおいても同様の頻度で認められ、病態への関与は否定

的であった(Blood Cells Mol Dis. 2008;40(2):185)。

*TERC*変異(n323C/T)の症例は、72歳・男性で、MDS RAの臨床診断であった。BMFの家族歴やDKCに認められる爪の変形などの特徴的な身体的所見や染色体異常は認められなかった。保存検体のDNA量不足のためテロメア長の評価は出来なかった。

*TERC*は自身で二次構造を形成し、テロメラーゼ複合体がテロメアを複製、延長する際に鋳型の役割を担う。n323C/Tは、*TERC*のn246との結合を障害し、*TERT*との結合部位であるCR4-5ドメインの構造を変化させ、テロメラーゼ活性を減弱させると考えられた。そこでn323C/Tの*TERC*変異をもつ*TERC*発現ベクター(pcDNA3)を作成した。そして*TERC*、*TERT*の発現がなくテロメラーゼ活性を認めないVA13細胞に、*TERT*を導入し、変異*TERC*を発現させテロメラーゼ活性の測定を行った。VA13細胞に*TERT*とwild type *TERC*を導入するといずれもテロメラーゼ活性の回復を認めた。しかしVA13細胞に*TERT*と変異*TERC*を導入すると、テロメラーゼ活性の回復は認められなかった。次にwild type *TERC*と変異*TERC*を共発現させると、テロメラーゼ活性の回復を認めたことから、n323C/T *TERC*変異はhaploinsufficiency効果によってテロメラーゼ活性を減弱させていると考えられた。最後にn323C/Tが*TERT*との結合を障害することを解析するために、FLAG発現TERT蛋白と*TERC*CR4-5 fragment(wild typeとn323C/Tなどの変異)を用いたbinding assayを行った。両者を反応させ、FLAGを用いた免疫沈降法で精製し、*TERC*CR4-5ドメインに対するNorthern blot法を行うと、n323C/Tなどの変異をもつ*TERC*CR4-5 fragmentは、*TERT*と結合が障害されることが示された。

今回新たに発見されたn323C/T *TERC*変異は、これまでに発見されたn322G/Aやn305G/Aの近傍で、*TERC*のCR4-5ドメインの構造に重要なP5領域に位置している。今回の解析により、この領域の変異は、*TERC*のCR4-5ドメインの二次構造を不安定にし、*TERT*との結合を障害することでテロメラーゼ活性を低下させBMFを発症させると考えられた(Blood Cells Mol Dis. 2008;40(2):185)。

*TINF2*変異(P283H(22歳男性), deln865-866(29歳男性), deln871-874(43歳女性))の症例は、すべて重症AAの臨床診断であったが、ISTに対して不応性であった。deln871-874を有する症例はBMFの家族歴(父がAA)を認めたが、このこと以外は*TINF2*変異を有する症例においてDKCに認められる爪の変形などの特徴的な身体的所見や染色体異常は認められなかった。また

P283Hとdeln871-874の症例は、テロメア長の短縮化が認められた。これまでにDKCにおいて*TINF2*変異で最も多く報告されている変異はR282Cであったが、今回の検索では認められなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Takeuchi J, Ly H, Yamaguchi H, Carroll KA, Kosaka F, Sawaguchi K, Mitamura Y, Watanabe A, Gomi S, Inokuchi K, Dan K. Identification and functional characterization of novel telomerase variant alleles in Japanese patients with bone-marrow failure syndromes. Blood Cells Mol Dis. 2008;40(2):185-91.
2. 山口博樹. テロメア異常と骨髄不全症. 日本臨床. 2008; 66: 483-489.
3. 山口博樹、猪口孝一. 再生不良性貧血の分子病態.血液・腫瘍科. 2008; 56: 155-161.
4. Yamaguchi H. Mutations of telomerase complex genes linked to bone marrow failures. J Nippon Med Sch. 2007 Jun;74(3):202-9.
5. 山口博樹. 再生不良性貧血のゲノム解析. 分子細胞治療. 2007; 6: 467-471.

[学会発表] (計1件)

1. 山口博樹、竹内純子、玉井勇人、三田村佳勇、小坂文子、長谷川節雄、檀和夫、猪口孝一：本邦の骨髄不全症におけるSBDS遺伝子異常の検索；第70回日本血液学会、2008年10月10日～12日、京都。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山口 博樹 (YAMAGUCHI・HIROKI)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：90297937

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者