

水口 剛 論文内容の要旨

主 論 文

Heterozygous *TGFBR2* mutations in Marfan syndrome.
マルファン症候群におけるヘテロ接合性 *TGFBR2* 変異

水口剛, Gwenaëlle Collod-Beroud, 秋山卓士, Marianne Abifadel, 原田直樹, 森崎隆幸, Delphine Allard, Mathilde Varret, Mireille Claustres, 森崎裕子, 井原誠, 木下晃, 吉浦孝一郎, Claudine Junien, 梶井正, Guillaume Jondeau, 太田亨, 木住野達也, 古川洋一, 中村祐輔,
新川詔夫, Catherine Boileau, 松本直通

Nature Genetics 36 巻 8 号:855 860, 2004.

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
放射線医療科学専攻
主任指導教員：新川詔夫 教授

緒 言

マルファン症候群 (MFS) は全身の結合織の脆弱性に起因する骨格系、心血管系、眼症状を主徴とする常染色体優性遺伝病である。これまでに細胞外マトリックス (ECM) の構成蛋白の一つであるフィブリリン 1 をコードする *FBN1* 遺伝子の変異が原因で生じることが知られているが、典型的 MFS における *FBN1* 変異検出率は 42% 程度である。一方、第 2 の疾患座 (*MFS2*) が、フランス人大家系を用いた連鎖解析により、3 番染色体短腕 p24.2-p25 にマップされたが MFS の遺伝的異質性については未解決であった。本研究は 6 ヶ所の切断点をもつ複雑な染色体異常 46,XY,t(1;5;4)(p35;q33.2;q35),ins(3)(q11.2;p24.1p14.2) を伴う MFS 患者の 3p24.1 切断点が *MFS2* 座と合致することに注目し、新規の MFS 原因遺伝子の単離・同定を目的として、切断点付近のゲノム解析および多数の MFS 患者の変異解析を行ったものである。

対象と方法

- (1) 3p24.1 切断点のゲノム解析：長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の承認を受けた後、インフォームド・コンセントを得て採取した染色体異常を合併した MFS 患者の血液試料から核 DNA 抽出及びリンパ芽球の不死化を行い、染色体標本を作製した。ゲノムデータベース上から 3p24.1 切断点付近に局在する BAC クローンを選択し、次いで各クローンを用いた FISH 解析を患者染色体上で行った。さらに切断点をカバーすることが同定された BAC クローンからコスミドサブクローンを作製し、詳細な FISH 解析を行った。
- (2) *TGFBR2* 変異解析：連鎖解析でマッピングに用いたフランス人 *MFS2* 大家系、*FBN1* と連鎖しないフランス人 MFS の 9 例、*FBN1* 変異がない日本人 MFS 10 例、家族性胸部大動脈瘤/解離 (TAAD) 10 例を *TGFBR2* 変異解析の対象とした。対象者の試料において、*TGFBR2* の 7 個のエキソンを PCR 増幅後、ABI3100 シーケンサにて塩基配列決定し、変異解析を行った。また、既に *TGFBR2* の germline 変異として遺伝性非腺腫性大腸腺癌 (HNPCC) で報告されていた c.944C>T (T315M) 置換を一般集団 492 名および大腸癌弧発例 228 例で検証した。*TGFBR2* 変異 c.1524G>A (Q508Q) をもつ患者由来線維芽細胞を用いて RT-PCR を行いスプライシング異常の有無を調べた。
- (3) 変異 *TGFBR2* の機能解析：同定した変異 *TGFBR2* を HEK293 細胞および DR26 細胞にそれぞれ一過性に発現させ、ルシフェラ・ゼレポータ活性を指標として TGF- β シグナル伝達の増減を野生型と比較した。

結 果

- (1) 3p24.1 切断点からの *TGFBR2* の単離 : FISH により 3 個の BAC クローン RP11-775G14, RP11-479I10, RP11-1056A20 が切断点を含むことを明らかにした。この 3 個のクローンすべてに共通して局在する遺伝子は *TGFBR2* のみであった。さらにコスミドサブクローンをを用いた FISH により *TGFBR2* が切断点で断裂していることを確認した。
- (2) *TGFBR2* 変異解析 : 連鎖解析で 3p24.2-p25 に連鎖した MFS2 大家系において、罹患あるいは罹患が疑われる患者のみに *TGFBR2* の変異 c.1524G>A (Q508Q) を確認した。この塩基置換はエキソン 6 の最終塩基で、スプライシング異常を引き起こし、エキソン 6 にイントロン 6 の 23 塩基が余分に付加された異常な転写産物を産生していた。更に *FBN1* と連鎖しないフランス人 MFS 9 名と *FBN1* 変異がない日本人 MFS 10 例を解析し、4 例に 3 種のみスセンス変異 [c.923T>C (L308P); c.1346C>T (S449F); c.1609C>T (R537C)] を同定した。そのうち 1 例は新生変異であった。4 種類の塩基置換はいずれも 359 人の対照群には認めなかった。TAAD 患者 10 症例には変異は認めなかった。一般日本人集団 7/492 例と大腸癌罹患患者 6/228 例に、HNPCC で同定されていた塩基置換 [c.944C>T (T315M)] を認めた。
- (3) 変異 *TGFBR2* に認めた TGF- β シグナル伝達の減弱 : 変異 *TGFBR2* の導入細胞によるルシフェラ・ゼアッセイで、3 種のみスセンス変異はいずれも TGF- β シグナル伝達の減弱をひき起こした。

考 察

以上の結果から *TGFBR2* が MFS の原因遺伝子であると結論した。したがって、*TGFBR2* 変異による MFS はマルファン症候群 2 型 (MFS2) というべきである。MFS で同定された 5 種類の異なる *TGFBR2* 異常 (染色体異常による *TGFBR2* 断裂 1 例、スプライシング異常 1 例、TGF- β シグナル伝達の減弱をきたす 3 種のみスセンス変異) は、MFS2 における *TGFBR2* 変異が機能喪失型であることを支持するものである。

HNPCC において *TGFBR2* の germline 変異 c.944C>T が日本人 1 家族で報告されているが、今回の解析によって、この塩基置換は一般集団中に 0.71% のアレル頻度で存在し、大腸癌罹患患者中においてもその頻度は、統計学的に有意差はないことから多型だと考えられる。

従来、全身結合組織疾患の原因として細胞外マトリックス (ECM) の構成蛋白に焦点が当てられていたが、最近、マウス *Fbn1* が latent TGF- β binding protein1 (LTBP1) との結合を介し、TGF- β シグナル伝達を調節する可能性が示されており、本研究は *FBN1* 変異が TGF- β シグナル伝達異常を起し、MFS 発症に関わるとする仮説を支持するものである。*FBN1* と *TGFBR2* 及び TGF- β シグナル伝達に関わる遺伝子が互いに修飾遺伝子として、MFS の家族内、家族間の多様な表現型を規定している可能性がある。本研究では、変異は同定されなかったが、MFS2 座と TAAD2 座が重なっており、今後の遺伝的異質性を含めた解析が必要である。