

学位論文題名

Molecular Genetic Study of Japanese Patients
with X-linked α -Thalassemia/Mental
Retardation Syndrome (ATR-X)

(X連鎖性 α サラセミア/精神遅滞症候群の
日本人患者における分子遺伝学的研究)

学位論文内容の要旨

【はじめに】 精神遅滞は非進行性の認知障害であり、その頻度は高いものの、ほとんどが原因不明であり、小児科医や特に小児神経科医にとっては、大きな問題である。人口の2-3%がIQ70以下であり、0.3%がIQ50以下の重度MRを呈しているが、その基礎疾患が確立しているものは、半分にも満たない。そして、MRは遺伝的要因が大きいと考えられ、重度MRの50%は遺伝疾患と考えられている。

近年、X連鎖性精神遅滞(XLMR)の研究が進められている。XLMRは、他に臨床的特徴をもたない、非特異的なMR(MRX)と、他に様々な症状をもち、MRがそのうちの一つである症候性XLMR(syndromal forms of XLMR)に分けられる。前者は現在までX染色体上に70近くのlociが同定され、少なくとも10-12個のX連鎖性遺伝子の存在が想定されており、FMR2, oligophrenin-1, GDI1, PAK3などが同定されている。

一方、症候性XLMRの研究の進展も目覚ましく、Rsk-2(Coffin-Lowry syndrome)、FMR1(Fragile X syndrome)、L1CAM(HSAS, MASA)などが同定され、それらは、細胞内情報伝達、遺伝子転写調節因子、神経遊走因子に関わる因子と考えられている。私たちが、今回研究の対象にしたATR-X遺伝子も、この症候性XLMRの原因遺伝子の一つである。

X連鎖性 α サラセミア/精神遅滞症候群(X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome: ATR-X; MIM 31040)は、重度精神遅滞、特異顔貌、外性器異常、HbHの存在を特徴とするX連鎖性劣性遺伝疾患である。原因遺伝子ATR-XはATR-Xだけでなく、Carpenter-Waziri syndrome, Juberg-Marsidi syndrome,あるいは、X-linked mental retardation without α -thalassemiaなどの原因でもあり、この遺伝子を原因とする臨床型は幅が広く、X連鎖性精神遅滞の原因遺伝子の一つとして重要である。

ATR-XはXq13にあり、350kbに広がり、7kbのORFを持つ、35exonから成り立っている。Zn

finger, DNA ヘリカーゼドメインの2つの領域を有し、後者の特徴から、その産物である ATRX タンパクは SNF2/SWI DNA helicase family に属し、クロマチンリモデリングを介して、複数の遺伝子発現に関与すると考えられている。

現在までに34個の変異が報告されているが、遺伝型と臨床型の関係は明確ではない。

私たちは、ATRX 遺伝子と疾患の関係を明らかにし、さらに、その機能を明らかにすることを目的として、日本人 ATR-X の患者8家系9名を対象として分子遺伝学的検討を行った。

【方法】 ATR-X の診断は特徴的な臨床症状と末梢赤血球における HbH 封入体の存在により行った。ただし、HbH を持たないが臨床的特徴から ATR-X が疑われた1症例も対象に含めた。

ATRX 遺伝子の解析は患者血液からリンパ球細胞株を樹立し、RT-PCR 法により翻訳領域を増幅しシーケンス法により変異の有無を確認した。変異が確認された場合、ゲノム DNA にて確認し、さらに、検体の入手可能な家族、正常女性50名を対象として変異の有無を確認した。

【結果】 8家系9症例において7種類の missense の変異を同定した。8家系中5家系が Zn finger 領域 (N179S, P190L, V194I, R246C)、3家系がヘリカーゼ領域(V1552F, L1645S, Y1847C) に変異を認めた。7個の変異のうち、R246C を除く6個はこれまで報告のない変異であった。母親を検索し得た6家系中4家系は母親が保因者であった。2家系では母親に変異を認めず、*de novo* 変異あるいは母親の性腺モザイクが疑われた。遺伝子異常と臨床症状との間に一定の関係を認めなかった。また、同じ変異 (R246C) を持つ2例中1例は HbH を認めなかった。

【考察】 今回同定された変異はすべて missense 変異であり、2つの領域に集中し、機能上重要であることが確認された。Nonsense 変異や欠失などが同定されないことから、ATRX 遺伝子産物が完全に欠失した場合は致死的であると考えられ、本遺伝子の発現における重要性が示唆される。

遺伝子変異と症状の間には一定の関係を指摘することはできなかった。また、同一の変異においても異なった臨床症状を認めたことは、ATRX 遺伝子の作用には複数の遺伝子産物との相互作用の存在する可能性を伺わせる。ATRX 遺伝子は複数の遺伝子の発現を調節していると考えられているので、本遺伝子と相互作用する遺伝子の同定が中枢神経発生の理解のため重要な課題と考える。

また、最近、ATRX 遺伝子はクロマチンリモデリング、DNA メチル化に関わっていることが明らかにされ、この遺伝子の機能の解明は、精神遅滞のみならず、悪性腫瘍を含めた幅広い医学分野での疾患の解明、及び、治療法の開発に結びつくと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 田 代 邦 雄
副 査 教 授 清 水 宏

学 位 論 文 題 名

Molecular Genetic Study of Japanese Patients with X-linked α -Thalassemia/Mental Retardation Syndrome (ATR-X)

(X連鎖性 α サラセミア/精神遅滞症候群の
日本人患者における分子遺伝学的研究)

精神遅滞 (MR) に含まれる IQ70 以下は人口の 2-3% にあり、IQ 50 以下の重度 MR は 0.3% とされるが、その基礎疾患が確立しているものは、半分にも満たない。また、MR は遺伝的要因が大きいと考えられ、重度 MR の 50% は遺伝疾患と考えられている。近年、X連鎖性精神遅滞 (XLMR) の研究が進められている。XLMR は、他に臨床的特徴をもたない非特異的な MR(MRX) と、他に様々な症状をもち、MR がそのうちの一つである症候性 XLMR (syndromal forms of XLMR) に分けられる。前者は現在まで X 染色体上に 70 近くの loci が同定され、少なくとも 10-12 個の原因遺伝子の存在が想定されており、そのうち *FMR2*, *OPHN-1*, *GDI 1*, *PAK3* などが同定されている。一方、症候性 XLMR の原因遺伝子として、*Rsk-2* (Coffin-Lowry syndrome)、*FMR1* (Fragile X syndrome)、*L1CAM* (HSAS, MASA) などが同定され、それらは、細胞内情報伝達、遺伝子転写調節、神経遊走や細胞接着などに関わる因子と考えられている。今回研究の対象にした *ATRX* 遺伝子も、この症候性 XLMR の原因遺伝子の一つである。

X連鎖性 α サラセミア/精神遅滞症候群 (X-linked α -thalassemia/mental retardation syndrome: ATR-X; MIM 31040) は、重度精神遅滞、特異顔貌、外性器異常、HbH の存在を特徴とする X連鎖性劣性遺伝疾患である。原因遺伝子 *ATRX* は ATR-X だけでなく、Carpenter-Waziri syndrome, Juberg-Marsidi syndrome, あるいは、X-linked mental retardation without α -thalassemia などの原因でもあり、臨床型は幅が広く、X連鎖性精神遅滞の原因遺伝子の一つとして重要である。*ATRX* は Xq13 に位置する 350kb の遺伝子で 35exon からなり、その ORF は 7kb である。推定される遺伝子産物は Zn finger ドメイン、DNA ヘリカーゼドメインの 2 つの領域を有し、後者の特徴から、*ATRX* タンパクは SNF2/SWI DNA helicase family に属し、クロマチンのリモデリングを介して、複数の遺伝子発現に関与すると考えられている。現在までに 34 個の変異が報告されているが、遺伝型と臨床型の関係は明確ではない。

申請者は、*ATRX* 遺伝子と疾患の関係を明らかにし、さらに、その機能を明らかにすることを目的として、日本人 *ATR-X* の患者 8 家系 9 名を対象として分子遺伝学的検討を行った。

【方法】*ATR-X* の診断は特徴的な臨床症状と末梢赤血球における HbH 封入体の存在により行った。ただし、HbH を持たないが臨床的特徴から *ATR-X* が疑われた 1 症例も対象に含めた。*ATRX* 遺伝子の解析は患者血液からリンパ球細胞株を樹立し、RT-PCR 法により翻訳領域を増幅しシークエンス法により変異の有無を確認した。変異が確認された場合、ゲノム DNA にて確認し、さらに、検体の入手可能な家族、正常女性 50 名を対象として変異の有無を確認した。

【結果】8 家系 9 症例において 7 種類の missense の変異を同定した。8 家系中 5 家系が Zn finger 領域 (N179S, P190L, V194I, R246C)、3 家系がヘリカーゼ領域 (V1552F, L1645S, Y1847C) に変異を認めた。7 個の変異のうち、R246C を除く 6 変異はこれまで報告のないものであった。母親を検索し得た 7 家系中 5 家系は母親が保因者であった。2 家系では母親に変異を認めず、*de novo* 変異あるいは母親の性腺モザイクが疑われた。遺伝子異常と臨床症状との間に一定の関係を認めなかった。また、同じ変異 (R246C) を持つ 2 例中 1 例は HbH を認めなかった。

【考察】今回同定された変異はすべて missense 変異であり、2 つの領域に集中し、機能上重要であることが確認された。Nonsense 変異や欠失などが同定されないことから、*ATRX* 遺伝子産物が完全に欠失した場合は致死的であると考えられ、本遺伝子の個体発生における重要性が示唆される。遺伝子変異と症状の間には一定の関係を指摘することはできなかった。また、同一の変異においても異なった臨床症状を認めたことから、*ATRX* 遺伝子の作用には複数の遺伝子産物との相互作用が存在する可能性を伺わせる。一方、*ATRX* 遺伝子は複数の遺伝子の発現を調節していると考えられていることから、これらの遺伝子の同定が中枢神経発生の理解のための重要な課題と考える。また、最近、*ATRX* 遺伝子はクロマチンリモデリング、DNA メチル化に関わっていることが明らかにされ、この遺伝子の機能の解明は、精神遅滞のみならず、悪性腫瘍を含めた幅広い医学分野での疾患の解明および治療法の開発に結びつくと考えられる。

公開発表に際し、副査の田代教授から、いわゆる HbH 病との異同、典型例と非典型例を含めた解析の必要性、脳 MRI 所見、*ATRX* 遺伝子の他の遺伝子発現に及ぼす機序、*ATRX* 遺伝子内の glutamine repeat の存否、遺伝子解析と治療法開発の可能性などについて、副査の清水教授から、自ら全国の症例を集め解析したことへの評価、*ATRX* 蛋白の機能検索への今後の研究方向、missense mutation が多い理由、HbH 異常で精神遅滞のない本症の存在の可能性などについて、主査の小林教授から、同一変異でありながら異なる臨床像を示す場合の理由、16 番染色体異常と *ATRX* 遺伝子産物機能との関連性などについての質問があった。申請者は、自らの実験結果と文献を引用し適切に回答した。

この論文は、*ATR-X* 症候群を全国から集め、我が国における本症の遺伝子解析を行い新しい変異を同定するとともに、詳細な臨床症状の解析を行い、遺伝子変異との関連性を検討したこと、また、その検討から遺伝子変異のみでは説明の出来ない事実があることなどから、この遺伝子産物の機能発現には何らかの他の機能蛋白との相互作用を介する可能性が示唆され、研究の新しい方向性を示した点が高く評価され、今後の研究の発展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども合わせ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。