

称号及び氏名 博士（農学）堀西 朝子

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 10 日

論文名 「Study of DNA sequence variants of the human gene in congenital metabolic disease
— Mainly Glycogen Storage Disease (GSD) III—
(先天性代謝異常症における遺伝子多型の研究-糖原病Ⅲ型を中心に-)」

論文審査委員 主査 教授 中野 長久
副査 教授 森田 尚文
副査 教授 宮武 和孝

論文要旨

1. 緒言

先天性代謝異常症は、遺伝子の異常により代謝に重要な酵素の活性が失われる難病である。これらの疾患は通常、常染色体劣性遺伝病であり、異常遺伝子のホモ接合体あるいは異なる異常遺伝子のコンパウンドヘテロ接合体であるときに臨床症状を示す。症状は成長とともに顕著となり、患者の成長や発育に影響を与えることが多い。しかし早期に診断が下せると症状を緩和する治療が可能で、将来的には遺伝子治療の可能性もある。

先天性代謝疾患における従来の診断は、特定の酵素活性の欠損や異常物質の検出によってなされていた。現代でもこれらの生物学的検査は重視されている。近年、分子生物学研究技術の飛躍的な発展により次々と先天性疾患の原因遺伝子が特定され、遺伝子診断の研究と開発は急激に進歩している。しかし、遺伝子診断のための研究が進んでいるのは、比較的患者数が多く、主に特定の遺伝子欠損が疾患をもたらす一部の先天性疾患に限られている。

そこで、遺伝子診断の研究があまり進んでいない先天性代謝疾患について正確で簡便な診断法を見いだすことを目的として本研究を行った。

本研究では、糖原病Ⅲ型の関連遺伝子である glycogen debranching enzyme(AGL) 遺伝子を中心に、家族性脂質代謝異常症に関与する lipoprotein lipase (LPL) 遺伝子、近年骨粗鬆症や糖尿病との関連が注目されている low density lipoprotein receptor related protein 5 (LRP5) 遺伝子を対象に変異部位について検討を加えた。

2. Glycogen debranching enzyme(AGL)遺伝子の変異とハプロタイプ分析

エネルギー代謝に重要な物質であるグリコーゲンは、まず phosphorylase system と glucose-6-phosphatase および debranching enzyme (AGL) によってグルコースに分解されて利用され、肝グリコーゲンは血糖維持に、筋グリコーゲンは局所の運動時のエネルギー源としての役割を担っている。糖原病Ⅲ型はこの AGL の欠損によって肝臓や筋肉に異常グリコーゲンが蓄積する常染色体劣性遺伝疾患で、現在日本には約 50～60 人の患者がいると推定される。AGL は分子質量 160kd の単一タンパクで oligo- 1,4- glucantransferase (EC2.4.1.25)活性と amylo-1,6- glucosidase(EC 3.2.1.33)活性の 2 つの活性を有している。ヒト AGL の遺伝子は 1 番染色体短腕(p21)に座位し、35 個の exon からなる 85kb の大きさをもつ。その cDNA は 1992 年に筋肉の cDNA ライブラリーから単離された。AGL をコードしている mRNA は 7.0kb であり、cDNA の翻訳領域は 4596bp で 1532 個のアミノ酸からなっている。

本研究ではインフォームド・コンセントの得られた 15 家系 17 人の糖原病Ⅲ型患者の遺伝子解析を行った。この結果、15 家系の患者から 11 個の異なる遺伝子変異を明らかにした。また、酵素機能に影響を与えない遺伝子の新しい多型を

16 個見した。さらに変異が明らかになった患者と家族について、既報の多型も含め 22 の多型を利用したハプロタイプ分析を行った。

糖原病 I a 型を起こす Glucose-6-phosphatase 遺伝子の変異は民族特異性があり日本人では 88% が同じ変異である強い創始者効果を示すのに対し、AGL の変異は極めて多様であった。

調べた日本人患者の中で複数見つかっている変異、L124X、IVS14+1G>T、4216-7delAG はハプロタイプも同じであり、同じ起源をもつ変異であると考えられる。日本人患者で新しく見出したミスセンス変異 G1448R、スプライシング変異 IVS7+5G>A、IVS29-1G>C、IVS33+5G>A、挿入や欠失による変異 587delC、2072-2073insA、4735-4736insTAT は同家系以外では見られなかった。トルコ人患者からは新規のスプライシング変異 IVS7+5G>A、ドイツ人患者からは新規のナンセンス変異 W255X を見出した。ドイツ人患者に見られた W864X は欧米人に多く報告されている変異であった。

グリコーゲンが肝臓のみに蓄積する糖原病 III b 型患者である香港出身の 9 歳の女兒は、AGL 遺伝子に母由来の変異 R34X と父由来の変異 IVS32-12A>G が存在するコンパウンドヘテロ接合体であった。R34X は新規の変異で、IVS32-12A>G は両親がいとこ婚である日本人糖原病 III b 型の女性のホモ接合体として報告したものと同一変異であった。しかしこの民族の異なる二人の患者ではハプロタイプが異なり、独立に生じた同じ遺伝子変異という稀な例であることが判明した。その後、米国の白人患者にも同じ異常が報告され、IVS32-12A>G は AGL 遺伝子上で頻発する初めての例である。

糖原病 III 型の原因となる AGL 遺伝子の変異は多様で遺伝子診断は困難と考えられていたが、ハプロタイプ分析を併用することで従来の肝や筋肉中の酵素活性を測定する診断法に代わる有用な方法であることを明らかにした。

3. Lipoprotein lipase (LPL) 遺伝子の変異とマイクロサテライトハプロタイプ分析

LPL 欠損症は血清 TG 値が 2000～数万 mg/dl の高カイロミクロン血症を示す常染色体劣性遺伝疾患で、97 例の変異が報告されている。異常に高脂血症状を示す 2 ヶ月の日本人男児の DNA 配列を調べた。その結果、いずれも既知の遺伝子変異である delG916 と G1401A のコンパウンドヘテロ接合体であることを見出した。LPL の遺伝子変異は血族結婚を伴うホモ接合体から見つけられることが多く、血縁関係のない夫婦の子どもの報告は少ない。私はさらに GT マイクロサテライト分析を行い、同じ遺伝子異常を持つ日本人患者と比較したところ、同じハプロタイプであることを確認した。このことは、これらの変異が創始者効果により広がったものと考えられる。また、LPL 欠損症家系の 44 遺伝子について分析を行った結果、G1401A が示すハプロタイプは 23 例でもっとも一般的なものであったが、delG916 のハプロタイプは他にみられない特異的なものであった。本研究の結果は、GT マイクロサテライト分析が LPL 欠損症の遺伝子診断に応用できる可能性を示した。

4. Lipoprotein receptor related protein 5 (LRP5) 遺伝子の多様性

LRP5 は低密度リポタンパク (LDL) レセプターファミリー蛋白に属しているアポタンパク質である。私は、Ⅲ型高脂血症患者の LRP5 の多様性との関連を調べる目的で遺伝子レベルでの解析を行った。この疾患に関連する変異は見つからなかったが、正常な人にも存在する新しい Polymorphism(遺伝子多型)を 7 個発見

した。近年 LRP5 遺伝子の変異と骨密度の関連が報告され、また LRP5 欠損マウスにはコレステロール輸送の欠損と骨粗鬆症を示しただけでなく、著しい耐糖能の低下をも示すことが報告された。LRP5 の役割については今後詳細に研究されていくと思われるが、この知見がその一助になると確信している。

5. 結語

3種の先天性代謝疾患について、患者の抹消血から抽出した DNA を分析した。その結果、疾患に関連する遺伝子の配列に多くの新しい多型を見出した。これらの多型の中には、疾患の原因と考えられる遺伝子異常と、酵素タンパクの機能に影響を与えない、つまり正常の人にも存在する遺伝子多型が含まれている。疾患の原因となる遺伝子変異を見出したことは、その疾患が発症する機構を明らかにするとともに、診断・治療・予防に役立てることにつながる。また、遺伝子多型には直接的に疾患に関与していないが、疾患関連遺伝子を探す際のマーカーとして利用できるものがある。遺伝子多型を遺伝子診断に用いる研究の一環として、本研究では遺伝子多型の組み合わせを調べるハプロタイプ分析を行った。その結果、疾患の原因となる遺伝子変異が多様である AGL 遺伝子と LPL 遺伝子において、特定の変異とハプロタイプの関連を見出し、この方法が診断に有用であることを示した。

これまで先天性代謝疾患には、遺伝子診断が困難で、診断を下すための検体採取に患者の苦痛を伴う生検を必要とされているものが多かった。本研究で示した簡便な血液検査による遺伝子診断の有用性は大きいと考える。

審査結果の要旨

先天性代謝異常症は、遺伝子の異常により代謝に重要な酵素の活性が失われる難病である。疾患は通常、常染色体劣性遺伝病であり、異常遺伝子のホモ接合体あるいは異なる異常遺伝子のコンパウンドヘテロ接合体であるときに臨床症状を示す。症状は成長とともに顕著となり、患者の成長や発育に影響を与えることが多い。しかし早期に診断が下せると症状を緩和する治療が可能で、将来的には遺伝子治療の可能性もある。

先天性代謝系疾患における従来の診断は、特定の酵素活性の欠損や異常物質の検出によってなされていた。現在でもこれらの生物学的検査は重視され、近年、分子生物学研究技術の飛躍的な発展により先天性疾患の原因遺伝子の特定、遺伝子診断の研究と開発が急激に進んでいる。しかし、遺伝子診断のための研究は比較的患者数が多く、主に特定の遺伝子欠損が疾患をもたらす一部の先天性疾患に限られている。

そこで、遺伝子診断の研究があまり進んでいない先天性代謝系疾患について正確で簡便な診断法を見いだすことを目的として本研究が行い、糖原病Ⅲ型の関連遺伝子である glycogen debranching enzyme (AGL) 遺伝子を中心に、家族性脂質代謝異常症に關与する lipoprotein lipase (LPL) 遺伝子、近年骨粗鬆症や糖尿病との関連が注目されている low density lipoprotein receptor related protein 5 (LRP5) 遺伝子を対象にした。その成果は以下の通りである。

エネルギー代謝に重要なグリコーゲンは、phosphorylase と glucose-6-phosphatase および debranching enzyme (AGL) によってグルコースに分解されて、肝グリコーゲンは血糖維持に、筋グリコーゲンは局所の運動時のエネルギー源として役割を担っている。糖原病Ⅲ型はこの AGL の欠損によって肝臓や筋肉に異常グリコーゲンが蓄積する常染色体劣性遺伝疾患で、現在日本には約 50 から 60 人の患者がいると推定される。AGL は分子質量 160kd の単一タンパク質で oligo-1,4-glucantransferase (EC2.4.1.25) 活性と amylo-1,6-glucosidase (EC3.2.1.33) 活性の 2 つの活性を有する。ヒト AGL の遺伝子は 1 番染色体短腕(p21)に座位し、35 個の exon からなる 85kb の大きさを持つ。その cDNA は筋肉の cDNA ライブラリーから単離された。AGL をコードしている mRNA は 7.0kb で、cDNA の翻訳領域は 4596bp で 1532 個のアミノ酸からなっている。

本研究はインフォームド・コンセントの得られた 15 家系 17 人の糖原病Ⅲ型患者の遺伝子解析を行った。この患者から 11 個の異なる遺伝子変異を明らかにした。また、酵素機能に影響を与えない遺伝子の新しい多型を 16 個見出だした。さらに変異が明らかになった患者と家族について、既報の多型も含め 22 の多型を利用したハプロタイプ分析を行った。

糖原病 I a 型を起こす Glucose-6-phosphatase 遺伝子の変異は民族特異性があり日本人では 88% が同じ変異を持つ強い創始者効果を示すのに対し、AGL の変異は極めて多様であった。日本人患者の中で複数見つかった変異、L124X、IVS14+1G>T、4216-7delAG はハプロタイプも同じであり、同じ起源の変異であると考えられ、日本人患者で新しく見出したミスセンス変異 G1448R、スプライシング変異 IVS7+5G>A、IVS29-1G>C、IVS33+5G>A、挿入や

欠失による変異 587delC、2072-2073insA、4735-4736insTAT は同家系以外では見られなかった。トルコ人患者からは新規のスプライシング変異 IVS7+5G>A、ドイツ人患者からは新規のナンセンス変異 W255X を見出した。ドイツ人患者に見られた W864X は欧米人に多く報告されている変異であった。

グリコーゲンが肝臓のみに蓄積する糖原病Ⅲ b 型患者である香港出身の 9 歳の女兒は、AGL 遺伝子に母由来の変異 R34X と父由来の変異 IVS32-12A>G が存在するコンパウンドヘテロ接合体で、R34X は新規の変異で、IVS32-12A>G は両親がいとこ婚である日本人糖原病Ⅲ b 型の女性のホモ接合体として報告したものと同一であった。しかしこの民族の異なる二人の患者ではハプロタイプが異なり、独立に生じた同じ遺伝子変異という稀な例であることが判明した。その後、米国の白人患者にも同じ異常が報告され、IVS32-12A>G は AGL 遺伝子上で頻発する初めての例である。糖原病Ⅲ型の原因となる AGL 遺伝子の変異は多様で遺伝子診断は困難と考えられていたが、ハプロタイプ分析を併用することで従来の肝や筋肉中の酵素活性を測定する診断法に代わる有用な方法であることを明らかにした。

LPL 欠損症は血清 TG 値が 2000～数万 mg/dl の高カイロミクロン血症を示す常染色体劣性遺伝疾患で、97 の変異が報告されている。異常に高脂血症を示す 2 ヶ月の日本人男児の DNA 配列を調べた。その結果、いずれも既知の遺伝子変異である delG916 と G1401A のコンパウンドヘテロ接合体であることを見だした。LPL の遺伝子変異は血縁結婚を伴うホモ接合体から見つけられることが多く、血縁関係のない夫婦の子どもの報告は少ない。さらに GT マイクロサテライト分析を行い、同じ遺伝子異常をもつ日本人患者と比較したところ、同じハプロタイプであることを確認した。このことは、これらの変異が創始者効果により広がったものと考えられる。また、LPL 欠損症家系の 44 遺伝子について分析を行った結果、G1401A が示すハプロタイプは 23 例でもっとも一般的なものであったが、delG916 のハプロタイプは他にみられない特異なものであった。これらの結果は、GT マイクロサテライト分析が LPL 欠損症の遺伝子診断に応用できる可能性を示した。

LRP5 は低密度リポタンパク (LDL) レセプターファミリー蛋白に属しているアポタンパク質である。そこでⅢ型高脂血症患者の LRP5 の多様性との関連を調べる目的で遺伝子レベルでの解析を行った。この疾患に関連する変異は見つからなかったが、正常な人にも存在する新しい polymorphism を 7 個発見した。近年 LRP5 遺伝子の変異と骨密度の関連が報告され、また LRP5 欠損マウスにはコレステロール輸送の欠損と骨粗鬆症を示しただけでなく、著しい耐糖能の低下をも示すことが報告された。LRP5 の役割については今後詳細に研究されていくと思われるが、この知見がその一助になると考える。

審査委員会の所見

以上の成果は、生化学、分子生物学、医学、酵素化学および栄養分子生物学の分野に大きく貢献するものであり、本論文の審査並びに、学力確認の結果と併せて、博士 (農学) の学位を授与することを適当と認める。