

## Treacher Collins 症候群本邦 8 症例における

### *TCOF1* 遺伝子解析

#### 学位論文内容の要旨

【緒言】 Treacher Collins 症候群 (TCS, OMIM 154500) は胎生期の第一、第二鰓弓の発育障害によって生じる顎顔面の形態異常を主症状とする先天異常症候群である。主症状は顔面の形成異常で、眼瞼裂斜下、頬部低形成、下眼瞼の部分欠損、下顎低形成、耳介形成異常、外耳道閉鎖、伝音性難聴、不正咬合、口蓋裂などである。知能は大部分が正常であるが、難聴のために二次的な精神発達遅滞をきたす例がある。発症頻度は5万人に1人と言われているが、本邦における発症頻度はさらに低いものと推察される。遺伝形式は常染色体優性遺伝形式をとり、家族歴を有する症例は40%で、残り60%は新生突然変異によるものである。

1993年、連鎖解析により5q32-5q33.1に遺伝子座が決定され、1996年ポジショナルクローニングにより *TCOF1* (Treacher Collins-Franceschetti Syndrome 1) 遺伝子が責任遺伝子として単離された。*TCOF1* 遺伝子は exon1~25 よりなり、1,411個のアミノ酸からなる nucleolar phosphoprotein である treacle をコードする。treacle は他のタンパク質と結合して核と細胞質間を往復していると考えられており、*TCOF1* 遺伝子の変異により生じた treacle は、核小体内に局在できず細胞質に散在することが知られている。

*TCOF1* 遺伝子の変異は、現在まで TCS 68 家系において 51 種類が報告されている。発症機構としては、相同染色体の一方のアレルが変異、欠失することにより、遺伝子産物が半減し病気を引き起こすハプロ不全が考えられている。本邦においては、これまで TCS における責任遺伝子 *TCOF1* の解析を行った報告はない。そこで、本邦における TCS と *TCOF1* 遺伝子の関連を調べる目的で、TCS 患者 8 例の *TCOF1* 遺伝子解析を行った。

【対象と方法】 北海道大学医学部附属病院形成外科および埼玉県立小児医療センターを受診し、TCS と診断された 8 症例を対象とした。内訳は男性患者 4 例、女性患者 4 例で、いずれも家族歴を有さない散发例である。インフォームドコンセントに基づき本人ないし代諾者の同意を得た後、採血を行い末梢血有核細胞より DNA を抽出した。PCR-SSCP 分析によるスクリーニングを行い、健常人の泳動パターンと違いを認めた検体は DNA シークエンス解析を行った。欠失、挿入変異の認められたアレルのうち、塩基配列の解読が困難な症例に対し、TA クローニングを行い、塩基配列を確認した。

【結果】 *TCOF1* 遺伝子、exon1~25 の SSCP 解析を行い泳動パターンの違いよりシークエンス解析を行った結果、疾患の原因となる変異が 8 例中 7 例で検出された。これらはすべて、正常アレルと変異アレルのヘテロ体であった。変異の種類は、欠失変異が 3 例、挿入変異が 2 例、欠失・挿入複合変異が 1 例、exon 領域 3' 末端の一塩基置換 が 1 例であった。欠失、挿入変異例では全例フレームシフトにより早期終止コドンがつくられることが予想された。7 例中 6 例の変異はこれまでに報告のない種類のものであった。また、特定部位への変異の集中は認められなかった。変異の検出されなかった 1 例では exon1~25 すべて

において SSCP 解析およびシーケンス解析を行ったが、exon23 に C3938T (A1313V) の一塩基置換が検出されたのみで、この一塩基置換は健常人においても検出された。したがって、これは一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) であって、本疾患の病因となる変異ではないと考えた。

【考察】現在まで欧米を中心に報告されている *TCOF1* 遺伝子の変異は、欠失変異が 32 種類、挿入変異が 10 種類、ミスセンス変異が 1 種類、ナンセンス変異が 5 種類、スプライシング変異が 3 種類で、欠失変異が全体の 6 割弱をしめている。これらの変異は特定の部位への偏りがなく遺伝子全体にわたって存在しているのが特徴である。欠失、挿入変異はフレームシフトにより早期終始コドンが導かれる。今回の本邦症例で検出された 7 種類の変異の傾向も欠失変異が多く、これまでの報告例と一致し、欠失、挿入変異はフレームシフトにより早期終始コドンへと変化していた。また、exon 領域の 3' 末端における一塩基置換はこれまで 1 症例の報告があり、イントロンがスプライスされず早期終止コドンが出現することが確認されている。今回の症例においても、exon の部位に違いはあるものの、3' 末端における一塩基置換により同様なことが生じていると推測される。

*TCOF1* 遺伝子の変異は、今回の解析を含め家系ごとに異なっていることが多いが、同じ変異が複数の家系で認められているものもある。その中で唯一高頻度に見られるのが、1 例でも検出された exon24 の 5 塩基欠失の変異 (nt4135delGAAAA) である。これはこれまで報告のある変異全体の 16% (13/69 家系) に相当する。この部位の塩基配列は、A の連続配列と AAG の繰り返し配列がみられ、このために replication slippage が起きて欠失が生じたものと推測される。また、他の一塩基および二塩基の欠失、挿入変異に関しても変異近傍の塩基配列の特徴より replication slippage が原因で変異が生じたと考えられる。一方、欠失・挿入複合変異である 25 塩基欠失、3 塩基挿入例については、欠失の前後に CTGGGG と CCCAG の 6 塩基配列が存在する。この 6 塩基が palindromic site となり結合し、その間の部分がループ構造を形成し欠失したと想定され、その欠失部に TTC の 3 塩基が挿入し、変異を持った塩基配列ができ上がったと推測される。

これらの結果より、*TCOF1* 遺伝子の一方のアレルに変異が存在すると、全く機能を有しない遺伝子産物が作られ、このことが TCS の病因になると考えられる。

【結語】今回の報告は本邦における初めてのものであると同時に、検出された 7 種類中 6 種類の変異はこれまで欧米で報告されている 51 種類とは別な新奇変異であった。また、本邦における TCS の発症には欧米人同様、*TCOF1* 遺伝子が関与していることが解明された。今後、*TCOF1* 遺伝子のコードする treacle の機能の解明や、*TCOF1* 遺伝子に関わるその他の遺伝子との相互関係を明らかにすることが、TCS 発症の病因や表現型の違いなどを解決するために必要な研究課題である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 杉 原 平 樹

副 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

## Treacher Collins 症候群本邦 8 症例における *TCOF1* 遺伝子解析

Treacher Collins 症候群 (TCS) は胎生期の第一、第二鰓弓の発育障害によって生じる顎顔面の形態異常を主症状とする先天異常症候群であり、症状は眼瞼裂斜下、頬部低形成、下眼瞼の部分欠損、下顎低形成、耳介形成異常、外耳道閉鎖、伝音性難聴、不正咬合、口蓋裂などである。発症頻度は5万人に1人とされているが、本邦における発症頻度はさらに低いものと推察される。遺伝形式は常染色体優性遺伝形式をとり、家族歴を有する症例は40%で、残り60%は新生突然変異によるものである。TCSの責任遺伝子である *TCOF1* 遺伝子の変異は、現在まで TCS 68 家系において 51 種類が報告されている。発症機構としては、相同染色体の一方のアレルが変異、欠失することにより、遺伝子産生物が半減し病気を引き起こすハプロ不全が考えられている。本邦においては、これまで TCS における責任遺伝子 *TCOF1* の解析を行った報告はなく、本邦における TCS と *TCOF1* 遺伝子の関連を調べる目的で、TCS 患者 8 例の *TCOF1* 遺伝子解析を行った。解析にあたり、インフォームドコンセントに基づき本人ないし代諾者の同意を得た。対象とした 8 例の内訳は男性患者 4 例、女性患者 4 例で、いずれも家族歴を有さない散发例であった。解析の結果、疾患の原因となる変異が 8 例中 7 例で検出され、変異の種類は、欠失変異が 3 例、挿入変異が 2 例、欠失・挿入複合変異が 1 例、exon 領域 3'末端の一塩基置換が 1 例であった。欠失、挿入変異例では全例フレームシフトにより早期終止コドンがつくられることが予想された。また、7 例中 6 例の変異はこれまでに報告のない新奇のものであった。変異の検出できなかった 1 例では exon1~25 すべてにおいて SSCP 解析およびシーケンス解析を行ったが、exon23 に C3938T(A1313V)の一塩基置換が検出されたのみで、この一塩基置換は健常人においても検出された。したがって、これは一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism; SNP) であって、本疾患の病因となる変異ではないと考えた。*TCOF1* 遺伝子の変異は、今回の解析を含め家系ごとに異なっていることが多いが、同じ変異が複数の家系で認められているものもある。その中で唯一高頻度に見られるのが、7 例中 1 例に検出された exon24 の 5 塩基欠失の変異(nt4135delGAAAA)であり、これはこれまで報告のある変異全体の 16% (13/69 家系) に相当する。この部位の塩基配列は、A の連続配列と AAG

の繰り返し配列がみられ、このためにスリップ複製が起きて欠失が生じたものと推測される。また、他の一塩基および二塩基の欠失、挿入変異に関しても変異近傍の塩基配列の特徴よりスリップ複製が原因で変異が生じたと考えられる。一方、欠失・挿入複合変異である 25 塩基欠失、3 塩基挿入例については、欠失の前後に CTGGGG と CCCCAG の 6 塩基配列が存在する。この 6 塩基が palindromic site となり結合し、その間の部分がループ構造を形成し欠失したと想定され、その欠失部に TTC の 3 塩基が挿入し、変異を持った塩基配列ができ上がったと推測される。これらの結果より、TCOF1 遺伝子の一方のアレルに変異が存在すると、全く機能を有しない遺伝子産物が作られ、このことが TCS の病因になると考えられた。

公開発表にあたり、副査三浪明男教授より、1) TCOF1 遺伝子の変異に variation が多い理由、2) 変異の起きる原因、3) 研究の臨床的意義について質問があり、次いで、副査小林邦彦教授より、1) 発生段階での遺伝子産物の発現部位、2) 変異をもった患者での mRNA の発現の有無、3) 変異が検出できなかった症例におけるその他の解析手段、4) TCOF1 遺伝子に多いと言われている SNPs の意義、5) ビタミン A とこの遺伝子との関係について質問およびコメントがあった。次に主査杉原平樹教授より、1) 疾患の表現型と遺伝子変異の関連性について、2) 患者に遺伝子異常が見つかった後に両親の遺伝子異常が判明するケースの有無について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究内容と文献を引用し、妥当な回答をした。最後に、遺伝子治療講座の崎山幸雄教授より、今回はすべての症例が典型的なものであったが、今後、非定型例を解析していくことにより疾患の表現型と遺伝子との関連、および遺伝子診断の意義などが明らかになっていくだろうとのコメントがあった。

この論文は、本邦における TCS の TCOF1 遺伝子解析を初めて行い、本邦の TCS の発症に欧米人同様 TCOF1 遺伝子が関与していることを明らかにした点で高く評価され、今後、TCS の発症原因や TCOF1 遺伝子機能の解明につながることを期待される。

審査員一同、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併せ申請者が博士（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。