

遺伝性出血性毛細血管拡張症(HHT)の遺伝子解析
Genetic analysis of Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia
—(副題) いまさら聞けない基礎の基礎から臨床応用まで—

森崎 裕子
Hiroko Morisaki

国立循環器病研究センター研究所分子生物学部
Department of Bioscience and Genetics,
National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute

遺伝性出血性毛細血管拡張症 (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia ; 以下HHT) は、皮膚および粘膜の末梢血管拡張telangiectasiaと、内臓の多発性動静脈奇形 arteriovenous malformation (AVM) を呈する遺伝性疾患 (常染色体優性遺伝) であるが、その本体は、毛細血管の介在を経ずに動脈と静脈が直接吻合している動静脈シャントであり、先天的な血管系の形成異常である。HHTの原因遺伝子としては、これまでにENG (Endoglin)、ACVRL1 (ALK1)、SMAD4 (Smad4)が同定されているが、これらはいずれも、血管形成および維持に重要な働きをしているTGF- β シグナル伝達系の遺伝子である (図1)。実際には、臨床的にHHTと診断された患者の80%以上でENG遺伝子あるいはACVRL1遺伝子のいずれかに生殖細胞系列の遺伝子変異を認める。また、症例数は少ないが若年性大腸ポリポーシス症候群(JPS)を合併したHHT患者ではSMAD4遺伝子変異が報告されている。

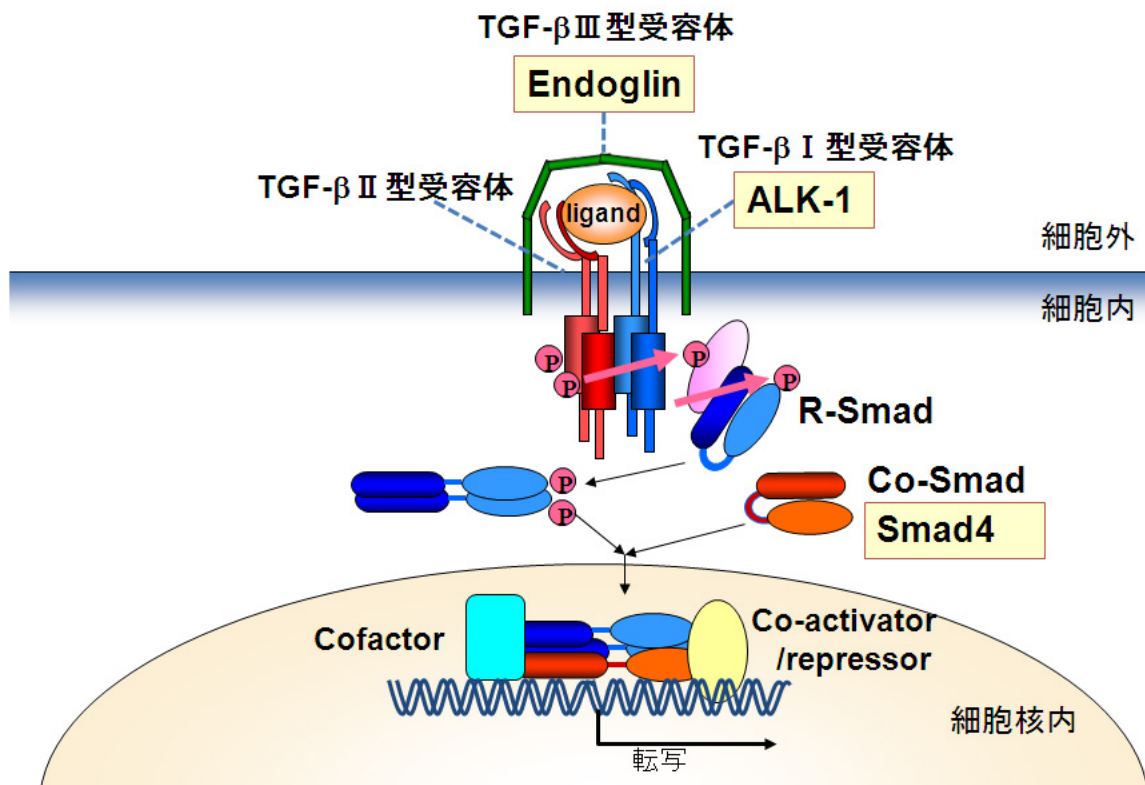


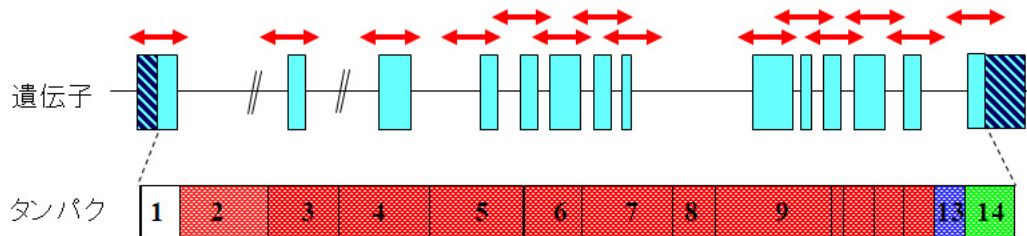
図1

演者の所属する研究室では、2005年よりHHTの遺伝子解析を施行しており、これまでに、19家系30症例でENG遺伝子変異、4家系6症例でACVRL1遺伝子変異、1症例でSMAD4遺伝子変異を同定している。このセッションでは、HHTの遺伝子解析の具体的な方法や解析結果の解釈など、遺伝子解析の基本的事項を中心に紹介する。

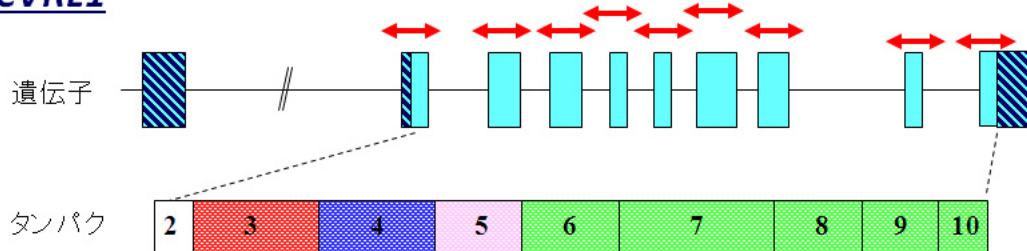
1) 遺伝子解析の方法

生殖細胞系列の遺伝子を解析するための検体材料としては、基本的には有核細胞であれば何でも可能であるが、末梢血液を用いる方法が一般的である。具体的には、EDTAあるいはヘパリン加条件で採血したのち、赤血球を除いた末梢血リンパ球画分を分取してここからゲノムDNAを抽出する。ゲノムより得られる遺伝子情報は、エクソン部とイントロン部の両方の情報を含んでいるため、ここからタンパク合成に関わる翻訳領域に該当するエクソンおよびその周辺領域の情報のみをPCR法にて増幅したのち、直接シーケンス法、あるいはDHPLC法にて、遺伝子変異を解析するという手法が一般的である（図2）。この方法により、臨床的にHHTと診断された症例の80%以上でENG遺伝子あるいはACVRL1遺伝子の変異が検出されている。一方、大きな遺伝子構造異常によるものは上記の方法では検出することは難しいため、MLPA法などの特殊解析を併用して解析している。これらの方法で変異の検出されない症例については、上記の3遺伝子以外の原因遺伝子変異が存在する可能性もあるが、一方、解析技術の限界による可能性も否定できない。すなわち、ゲノムDNAより得られる情報は、あくまで遺伝情報つまり遺伝的設計図の情報に限られており、必ずしも組織での遺伝子機能の状態を反映しているとは限らないからである。実際の組織での遺伝子の挙動をみるためには、個々の組織におけるmRNAの解析が必要であるが、そのためには、遺伝子を発現している血管(内皮)組織を必要とするため、現実的にはあまり行われていない。

ENG



ACVRL1



| | | |
|---|---|-------------|
| 細胞外領域 | GSDメイン | 遺伝子解析領域 |
| 膜貫通領域 | 細胞内領域 | |

図2

2) 遺伝子解析結果の解釈

遺伝情報はゲノムDNAの配列に刻まれており、DNA配列の情報がDNA→pre mRNA→mRNAと伝えら

れて、最終的にはmRNAでの配列情報が最終産物であるタンパク質のアミノ酸配列を決定することになる(図3)。mRNAの配列は、塩基3個(コドン)がアミノ酸1個に対応しているため、最初のDNA配列が変化した場合、それが、コドンの変化をもたらす場合にはアミノ酸配列が変わりうる。実際、アミノ酸配列が変化するような場合には、一部の特例を除き対応する遺伝子情報が変化していると考えてよい。遺伝子変異は、大きく分けて、点変異と欠失/挿入変異に分類されるが、機能面から見ると、①サイレント変異、②ミスセンス変異、③ナンセンス変異、④フレームシフト変異、⑥欠失/挿入変異、⑦スプライシング変異、に分類される。①~③は一塩基置換によるもので、①はコドンが変わっても対応するアミノ酸は変わらないもの、②はコドン変化が他のアミノ酸への置換をもたらすもの、③はコドン変化が終始コドンに変わりタンパク合成が止まってしまうものである。④フレームシフト変異では、3の倍数以外の数の塩基の欠失あるいは挿入により、コドンの読み枠がずれてしまうもので、多くの場合、その後終始コドンを生じることになる。一方、欠失/挿入の塩基数が3の倍数の場合は⑥欠失/挿入変異となる。⑦スプライシング変異は、エクソン/イントロン境界部の変異によりエクソン認識にエラーが生じるために、エクソンの一部が欠失したり逆にイントロンの一部がmRNAに組み込まれたりするもので、入れ替わる配列の長さや情報により、フレームシフト変異や欠失/挿入変異になり得る。これらのうち、①は病的意義のない変異と考えられ、一方、③~⑦の多くはタンパク構造を変化させることが多いため通常は病的意義のある変異と考えられるが、②ミスセンス変異、あるいは非常に小さな欠失/挿入変異については、変異の病的意義がしばしば問題となる。その場合、類似機能を持つ分子において変化したアミノ酸がどの程度保存されているかを統計的に解析するとともに、家系内で同じ変異を持つ個人がどのような臨床所見を呈しているのか、正常コントロールには存在しない変異であるのか、などから総合的に判断する。

なお、ナンセンス変異やフレームシフト変異を生じたmRNAは、結果的に終始コドンを生じるが、こうした異常mRNAは、NMD (nonsense mediated decay)という機構により選択的分解を受けるため、これらの変異では、正常mRNA由来のタンパク合成のみが起こる。結果的に、異常mRNA由来の短いペプチドは合成されずタンパクの合成量そのものが半減することになる。

3) HHTの遺伝子変異：遺伝子型と表現型 (Genotype-Phenotype correlation)

HHTの原因遺伝子としては、これまでにENG (Endoglin)、ACVRL1 (ALK1)、SMAD4 (SMAD4)が同定されており、そのほかにもいくつかの原因遺伝子があると予測されているが、実際には臨床的にHHTと診断された患者の80%以上でENGと ACVRL1のいずれかに遺伝子変異が検出されている。文献的にはこの2つの遺伝子変異はほぼ同程度とされているが、自験例ではENG遺伝子変異を有する症例の方がはるかに多い。また、ENG変異では、ナンセンス変異、フレームシフト変異や、フレームシフトを伴うスプライシング変異など、結果的にNMDによるハプロ不全を引き起こすと考えられる変異が相対的に多いのに対し、ACVRL1変異ではミスセンス変異が多いという傾向がある。ENG遺伝子変異によるHHT(HHT1)と、ACVRL1変異によるHHT(HHT2)との間の臨床像の違いはしばしば問題となり、肺AVMや脳AVMはHHT1、肝AVMはHHT2に多いとされているが、遺伝子型により臨床像を明確に分類することはできない。一方、SMAD4変異によるHHTは全体の1-3%で、若年性大腸ポリポーシス(JP)に合併するとされているが、自験例ではJPは現在のところ認められていない。しかしSMAD4変異を認めたHHT症例では、JPについての評価も勧められる。

4) HHTの遺伝

これまでにHHTの原因遺伝子として同定されたENG (Endoglin)、ACVRL1 (ALK1)、SMAD4 (Smad4)は、いずれも、血管形成および維持に重要な働きをしているTGF- β シグナル伝達系分子の遺伝子である(図3)。ENGは9番染色体長腕(9q34)、ACVRL1は12番染色体長腕(12q11)、SMAD4は18番染色体長腕(18q21)に存在し、遺伝形式はすべて常染色体優性遺伝形式に従い、罹患した親から子へは、子の性別に関係なく50%の確率で遺伝する。遺伝した場合の浸透率(疾患を発症する確率)は、鼻出血などの軽微な症状も含めると最終的には95%にもものぼるとされる。しかし、同一家系内に

においても、臨床症状の個人差は、重症度や経過もふくめて非常に大きい。このことは、年齢による臨床像の現れ方の違いも含めて、患者管理の際に留意する必要がある。遺伝子変異を有していても治療の対象となるような臨床症状を呈さない場合もあり、遺伝子診断により家族の解析が可能となるにつれ、こうしたキャリアに対してどのような管理指導を行っていくのかもこれからの重要な課題である。遺伝子検査の同意取得やその結果説明の際には、こうした点にも十分配慮して行う必要がある。

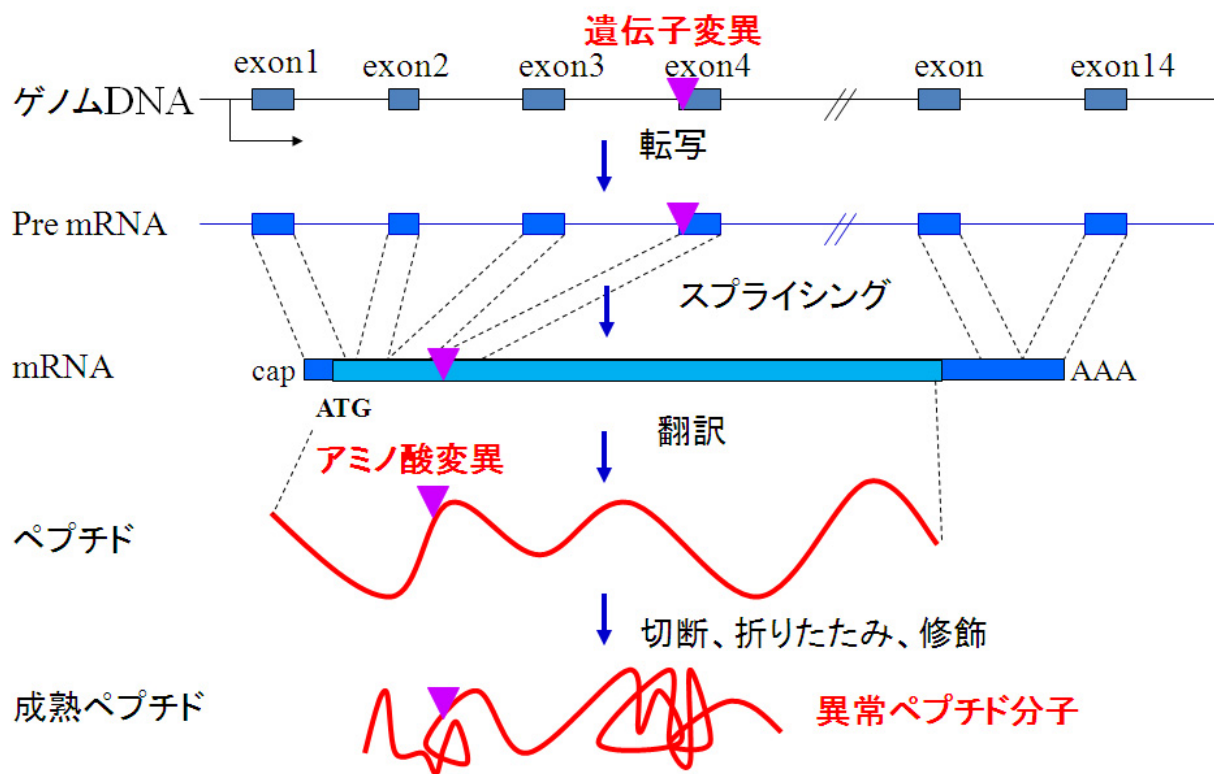


図3