

DNA 修復異常と考えられる疾患に おける保因者診断の可能性

古 山 順 一
(兵庫医科大学遺伝学)

はじめに

DNA 修復障害をもつと考えられている一連の疾患は、高発癌性の遺伝病としてよく知られている。この疾患群のほとんどは、常染色体性劣性遺伝形式をとるので、患者の頻度は極めて低い。保因者であるヘテロ接合体 (heterozygote) の頻度はこの疾患群の合計で人口の数%におよぶと考えられている¹⁾。保因者の発癌率が一般の集団の数倍以上高いとの報告もあり、発癌の遺伝的な基盤を考える上でも重要である。一方、少数ではあるが常染色体性優性形式をとる疾患もあり、この場合の保因者とは病的遺伝子をもつにもかかわらず種々の要因で発現をまだみていない個体のことを示している。将来症状の発現が見られる可能性があり、正確な保因者診断は将来発現されるかもしれない症状に prospective に対応するため不可欠である。

われわれは今回、常染色体性劣性遺伝病として Bloom 症候群 (BS), Fanconi 貧血 (FA) をとりあげた。また常染色体性優性遺伝病としては基底細胞母斑症候群 (basal cell nevus syndrome, BCNS) をとりあげた。

リンパ芽球様細胞系 (lymphoblastoid cell line, LCL)

DNA 修復障害をもつ遺伝病細胞のうち、とくに Bloom 症候群 (BS) と ataxia telangiectasia (AT) の線維芽細胞は *in vitro* での寿命が短い。また、線維芽細胞は、多量の細胞を一度に得るには大量の培地やプレートを必要とする。これらの欠点を補うためには、永久的に発育をつづけるこれらの疾患の細胞株 (cell line) の樹立が必要であるが、線維芽細胞の樹立は困難で、また株化した細胞の染色体数は diploid をはずれ、複雑な染色体構造異常を伴う。われわれは、Epstein-Barr virus (EB virus) を用いて末梢血の B-cell から LCL を樹立する試みをつづけてきたが、成功率約90%と、比較的容易に株化が可能であった。LCL は浮遊系細胞のため、 $1\sim 1.5\times 10^6$ cells/ml と大量の細胞数が得やすい。(線維芽細胞では、 1×10^6 cells/10 cm plate で、10mlの培地を要する。) このようにして LCL を樹立すると、患者から大量かつ頻回の採血を行う必要がなく、十分量の細胞を必要に応じて得ることが可能となった。また LCL は染色体数が46のものが50~70%みられ、4倍体細胞が数%みられる以外は、染色体数の分布は42~48の間であり、構造異常もほとんどない。この点からも染色体に異常を検出することが診断の確定に重要となる疾患で利用することができる。またこの LCL は B-

cell なので、従来から使用されていた線維芽細胞、PHA 刺激された T-cell と並んで有用な細胞と考えられる。

Bloom 症候群 (BS)

BS では、姉妹染色分体交換 (SCE) が、線維芽細胞・末梢血 T- または B-cell で正常の20倍以上と高頻度に見られることがよく知られている。この高頻度の SCE が診断の重要なポイントとされている。しかし LCL では必ずしもそうではなく、われわれは BS の2症例から3つの株を得たが、いずれも正常細胞の2倍の SCE しか見出されなかった²⁾。SCE の高い LCL の1株の分与をうけ (東北大より)、われわれの樹立した株との比較を試みたところ、SCE が高頻度に出現する株 (EB-BS2KA) では、ethylmethanesulfonate (EMS) による SCE 誘発頻度が高く、BrdU によって細胞周期の遅れが見られたが、同時に染色体の切断頻度が極めて高いことが見出された。一方、われわれの樹立した2株 (EB-BS-NoKi-2, EB-BS-AkSak) を用いて同様の実験を行うと、EMS, BrdU 高感受性は認められず、染色体切断頻度も正常に近い値を示した。このことから、BS には2種の性格の異なった細胞の存在することが明らかとなった³⁾。

表1 Spontaneous SCE Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes and Lymphoblastoid Cell Lines

Blood Donors	SCEs/Metaphase		SCE Rate* (%)
	Peripheral Blood Lymphocytes	Lymphoblastoid Cells	
BS-NoKi-2	77.13	7.70	10.0
BS-AkSak	94.94	8.07	8.5
BS 2 KA	94.71	39.80	42.0
BSF-NoKi	3.44	3.77	109.6
BSM-NoKi	3.36	3.53	105.1
NL-Mu	3.48	3.74	107.5
NL-Ha	3.51	3.43	97.7

* (SCEs in Lymphoblastoid Cells/SCEs in Peripheral Blood Lymphocytes) × 100.

BS の heterozygote では、末梢血 T-cell での SCE 頻度は正常範囲で、heterozygote の検索は現在のところ不可能との発表がほとんどである⁴⁾。われわれは、BS-NoKi の両親 (BSF-NoKi と BSM-NoKi) の末梢血とそれから樹立された LCL で、SCE, EMS で誘発される SCE を検討したがいずれもコントロール細胞と差が見出されず、heterozygote の検索は不可能であることを確認した (表1, 表2)。

表2 Increase in SCE Frequency Induced by EMS in Lymphoblastoid Cell Lines

Cell Lines	SCEs/Metaphase		
	Base Line	+EMS ($\times 10^{-3}M$)	Net Increase*
EB-BS-NoKi-2	8.29	20.48	12.19
EB-BS-AkSak	8.44	22.08	13.64
EB-BS 2 KA	39.80	78.90	39.10
EB-BSF-NoKi	3.77	22.03	18.26
EB-NL-Mu	3.72	19.66	15.94
EB-NL-Ha	3.57	17.06	13.49

* Net Increase of SCEs/Metaphase above the Spontaneous SCE Frequency.

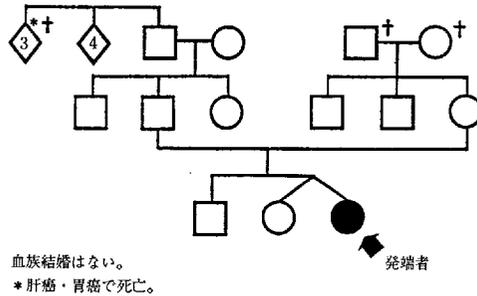


図1 FA1NI の家系図

Fanconi 貧血 (FA)

FA は染色体の切断・四放射状配列などの異常 (chromosomal aberration) が末梢血リンパ球で正常の10倍以上高く, DNA 2本鎖間の架橋剤であるマイトマイシン C (MMC) やジェポキシブタン (DEB) による aberration の誘発も正常細胞より高い。FA の heterozygote では, MMC によっては aberration は誘発されないが, DEB で誘発されることが知られており, DEB で患者, heterozygote, 正常の診断がつくとして, 出生前診断にも利用されている⁵⁾。また, FA の heterozygote は発癌率が高いとされている。

一方, FA は, 同一の家系内でも発症年齢や症状発現の程度に差があることが知られている。そのため, 発端者が“FA”と診断されると, その家族のなかで, 貧血・拇指の異常などがなくても chromosomal aberration が高頻度に認められれば, 将来貧血へと発展する homozygote が存在する可能性が高くなる。常染色体性優性遺伝病で, 病的遺伝子をもっているにもかかわらず発症していないヒトを保因者と呼ぶが, 常染色体性劣性遺伝病の FA でも, まだ発症していない homozygote を保因者と呼ぶことができる。FA の家系をみた場合, 発端者以外

表3 Chromosomal Aberrations
in Peripheral Lymphocytes

Blood Donors	Breaks/Cell
FA1NI	0.146
FAM1NI	0.040
Sh-Yam*	0.025
Yu-Yam**	0.036
NL-Hi	0.015
NL-Ha	0.019
NL-Ot***	0.010
NL-Su***	0.019

* Brother of FA1NI

** Sister of FA1NI

*** Patients with Aplastic Anemia.

Lymphocytes were stimulated with
PHA and cultured for 72 hrs.

表4 Chromosomal Aberrations in
Peripheral Blood Lymphocytes
and Lymphoblastoid Cell Lines

Peripheral Blood Lymphocytes*	Breaks/Cell
Controls	0.01~0.02
FA1NI	0.21
FAM1NI	0.02
Lymphoblastoid Cell Lines**	Breaks/Cell
Controls	0.02~0.06
EB-FA1NI	0.26

* PHA-stimulated for 48 hrs.

** 48 hrs after subcultured.

の“保因者”である，homozygote と heterozygote の両方の診断が必要となる。

われわれの家系では，発端者は10才の女兒，同胞3人の第3子で（図1），まず健康な同胞2人の診断が急がれた。末梢血の PHA 刺激後72時間の T-cell の染色体切断の頻度をみると，患者 FA1NI では0.146/cel と高いが，同胞（Yu-Yam, Sh-Yam）の2人は低く，少くともこの2人は homozygote ではないことが判明した（表3）。また正常では染色体切断を誘発しないとされている， 10^{-9} M の DEB を加えて切断の頻度をみたところ，母・同胞のいずれにも切断の頻度の増加はみられなかった。

染色体切断症候群の1つとして知られる AT は、LCL では染色体切断の頻度は正常由来の LCL と等しくなることが知られているが、FA1NI 由来の EB-FA1NI では、株の樹立後も高頻度の染色体切断などの aberration を示した。その頻度は、末梢血の T-cell の48時間培養時（第1回目の mitosis）の頻度とほぼ一致した（表4）。これらの細胞の MMC, DEB を加えた後の生存細胞数をトリパンブルー液を用いて数え、その生存率をみたところ、heterozygote と正常コントロール細胞との間に差はみられなかった。すなわち末梢血 T-cell, LCL の2つからは、この家系の heterozygote では DEB に対して感受性が高いという結果は得られなかった。このことから、FA にも少なくとも薬剤感受性について差があることが確認された。

基底細胞母斑症候群 (basal cell nevus syndrome, BCNS)

BCNS は常染色体優性遺伝病として知られている。この遺伝形式から、発端者が確定診断されれば、家系内に次々と患者が発見されていくことが多い。われわれは3家系から計7人（うち1人は幼児期にすでに死亡）の患者を診断した。このうち4人（3家系の発端者1人ずつ計3人と、第1家系の発端者の父）について細胞遺伝学的に検討することができた（図2）。4例の症状を表5に示す。BCNS については単発例で末梢血リンパ球の紫外線照射後の DNA 合成の低下が報告されている⁶⁾。今回われわれは、はじめて線維芽細胞を用いたコロニー形成率で紫外線感受性が中等度高いことを見出した⁷⁾（図3）。

この疾患については LCL はまだ1株しか樹立できていないが、今後株の樹立をつづけ BCNS の紫外線感受性について検討を進めたい。

表5 臨床像の比較

	BCNS 1NI	BCNS 2NI	BCNS 3NI	BCNS 4NI
皮膚症状				
母斑	-	-	+	-
小陥凹	+	-	+	+
口腔外科的異常				
唇裂	+	-	+	-
多発性顎嚢胞	+	+	+	+
顎裂	-	-	-	-
レ線所見				
2分肋骨	-	-	-	
中手骨短小	+	+	+	-
大脳鎌の層状石灰化	+	+	-	-
小奇形				
両眼離開	+	+	+	-
内眼角贅皮	+	+	+	+
幅広い鼻	+	+	+	+
母趾球部 A ⁺ -A ⁺	+	+	+	+
発癌の既往	-	-	-	-

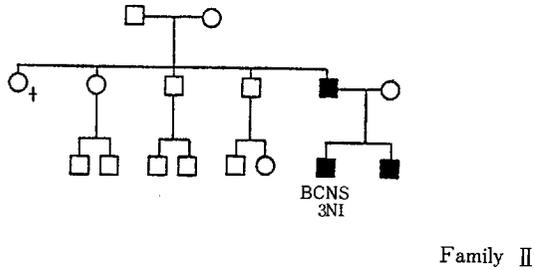
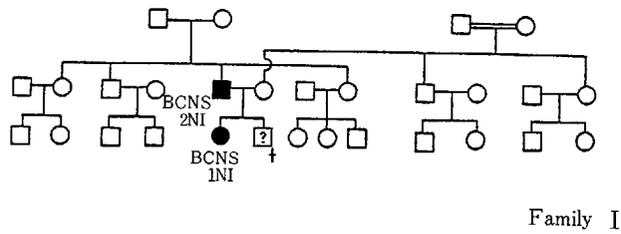


図2 BCNS 家系図

おわりに

DNA 修復障害をもつ遺伝病のなかで最も有名な色素性乾皮症 (xeroderma pigmentosum) できえ、その本態については未解決である点が多く、保因者診断も困難であるとの報告が多い。今回取りあげたような疾患群についても、診断法自体が細胞遺伝学的に確立されていないものもあり、保因者診断にも未解決な点が多い。しかし、BCNS のような常染色体性優性遺伝形式をとるものでは、発端者を確定診断することができれば、家系内の保因者の検索は比較的容易に行えると考えられる。この疾患についてはまだ報告も少なく、とくに日本の家系について診断法を確定することが不可欠と考えられる。

また最近、DNA の restriction fragment length polymorphism (RFLP) を用いて遺伝病との関係を求め、患者と保因者の診断に広く利用されようとしている⁸⁾。このような DNA レベルの診断には多量の細胞を要することが多く、われわれが主として用いている LCL は多量の細胞を得ることが容易で、この目的に最も適している細胞系と考えられる。

文 献

- 1) 武部 啓：代謝，**17**：1487~1497，1980.
- 2) Hashimoto, T., Gamo, S., Furuyama, J. and Chiyo, H. : Hum. Genet., **63** : 75~76,

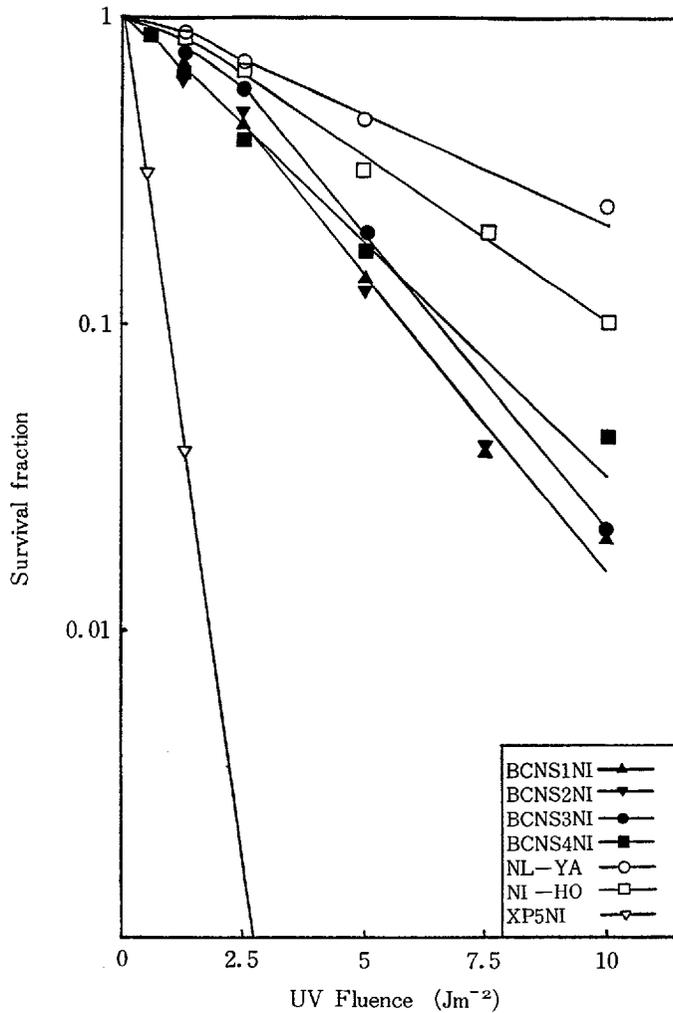
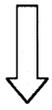


図3 BCNS 線維芽細胞の紫外線照射後のコロニー形成率

1983.

- 3) Hashimoto, T., Sukenaga, T., Lopetegui, P. and Furuyama, J. : In Sister Chromatid Exchange : 25 Years of Experimental Research. ed. by R.R. Tice and A. Hollander, Plenum Press, New York (in press).
- 4) Chaganti, R.S.K., Schonberg, S. and German, J. : Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **71** : 4508~4512, 1974.
- 5) Averbach, A.D., Adler, B. and Chaganti, R.S.K. : Pediatrics, **67** : 128~135, 1981.
- 6) Ringborg, U., Lambert, B., Landegren, J. and Lewensohn, R. : J. Inv. Derm., **76** : 268~270, 1981.
- 7) 橋本知子, 坂本博三, 千代豪昭, 高田千春, パトリシアロペテギ, 古山順一, 助永隆比古, 島岡成和, 森本忠三, 白数力也 : 日本人類遺伝学会第28回大会 (口演).
- 8) in Human Gene Mapping VII : Cytogenet, Cell Genet., **39** : 1~666, 1984.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



はじめに

DNA 修復障害をもつと考えられている一連の疾患は、高発癌性の遺伝病としてよく知られている。この疾患群のほとんどは、常染色体性劣性遺伝形式をとるので、患者の頻度は極めて低い。保因者であるヘテロ接合体(heterozygote)の頻度はこの疾患群の合計で人口の数%におよぶと考えられている。保因者の発癌率が一般の集団の数倍以上高いとの報告もあり、発癌の遺伝的な基盤を考える上でも重要である。一方、少数ではあるが常染色体性優性形式をとる疾患もあり、この場合の保因者とは病的遺伝子をもつにもかかわらず種々の要因で発現をまだみていない個体のことを示している。将来症状の発現が見られる可能性があり、正確な保因者診断は将来発現されるかもしれない症状に prospective に対応するため不可欠である。

われわれは今回、常染色体性劣性遺伝病として Bloom 症候群(BS)、Fanconi 貧血(FA)をとりあげた。また常染色体性優性遺伝病としては基底細胞母斑症候群(basal cell nevus syndrome, BCNS)をとりあげた。