

Fanconi 貧血の 1 家系における保因者診断

—リンパ芽球様細胞株を用いて—

研究協力者 古 山 順 一
橋 本 知 子
(兵庫医科大学遺伝学)

はじめに

Fanconi 貧血 (Fanconi anemia, FA) は、高発癌性で知られる常染色体性劣性遺伝病である。同一家系内でも FA の発症年齢はさまざまであるのと同時に、FA 保因者 (heterozygote) も発癌率が高いとの報告もあるため¹⁾、FA 患者を診断した際はその家系内の FA 患者の有無や保因者の検索が不可欠である。われわれはこれまで遺伝病患者のリンパ球を Epstein-Barr ウイルスでトランスフォームして、リンパ芽球様細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL) の樹立を行っている。今回は FA の一家系の細胞遺伝学的な解析を、LCL を用いて行った。

症 例

発端者 (FA1NI) は 5 歳 8 ヶ月時に染色体検索で FA と診断された女兒。その家系を図 1 に示す。末梢血 T-cell を用いた検討では、FA の保因者と考えられる両親のベースラインの染色体異常 (chromosomal aberration) 頻度は正常範囲であった²⁾。FA1NI の同胞 2 人も染色体異常頻度は高くなく、FA 患者はこの同胞 3 人のうち FA1NI 以外にはないことが示された。と同時に、FA 保因者はベースラインの染色体異常頻度からは判定できないことが判明した²⁾。

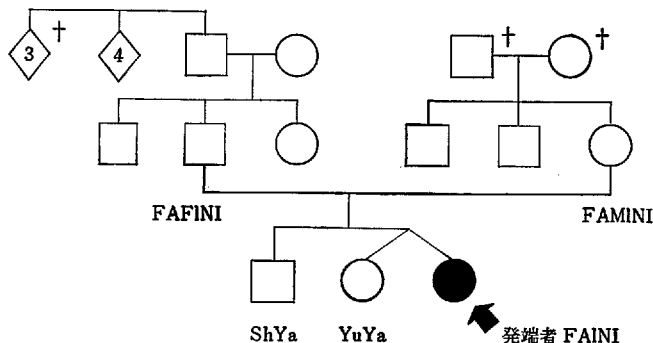


図 1 FA1NI の家系図 近親婚はない。

材料と方法

この FA1NI の家系 5 人と、他の家系の FA 患者 (FA-AmAs)・正常な成人のコントロールから、Epstein-Barr ウイルスを用いて LCL を樹立した (表 1)。この細胞株を用いて、FA 細胞が高感受性を示すことで知られる DNA 鎖間架橋薬剤 (cross-linking agent) に対する感受性を検討した。薬剤は mitomycin C (MMC)・diepoxybutane (DEB) を使用し、細胞生存率・染色体異常誘発によって感受性を観察した。

表 1 Lymphoblastoid cell lines (LCLs)

Case	LCL
Patient FA1NI	EB-FA1NI
Father FAF1NI	EB-FAF1NI
Mother FAM1NI	EB-FAM1NI
Brother ShYa	EB-ShYa
Sister YuYa	EB-YuYa
FA Patient in another family FA-AmAs	EB-FA-AmAs
Normal controls	
NLCh	EB-NLCh
NLSh	EB-NLSh
NLMu	EB-NLMu
NLHa	EB-NLHa

生存率は、12 穴の multiwell dish に well 当り $1\sim 2 \times 10^5$ 細胞を、RPMI 1640 に牛胎児血清 10% とカナマイシン $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた培地に浮遊して播きこみ、24 時間 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 下で培養、薬剤を加えてさらに 72~96 時間培養して、トリパンプルー液を用いて生存細胞数を数えて算出した。

染色体異常誘発は、同じ培地に $3\sim 5 \times 10^5/\text{ml}$ で細胞を播きこみ、同時に薬剤を添加し 72 時間培養して染色体標本を作製、観察した。染色体異常は、切断 (break)・断片 (fragment) は 1 個の break として、二動原体 (dicentric)・染色分体交換 (interchange, 4 放射状配列・多放射状配列を含める)・転座 (translocation) は 2 個の break の結果として集計した。

結 果

1. 薬剤に対する細胞生存率

MMC を最終濃度 $0.1\sim 3 \text{ ng}/\text{ml}$ で培養液中に加えて細胞の生存率を算出した (図 2)。FA 患者の LCL と正常コントロールの LCL・FA 家族の LCL を、細胞の 50% 生存率で比較す

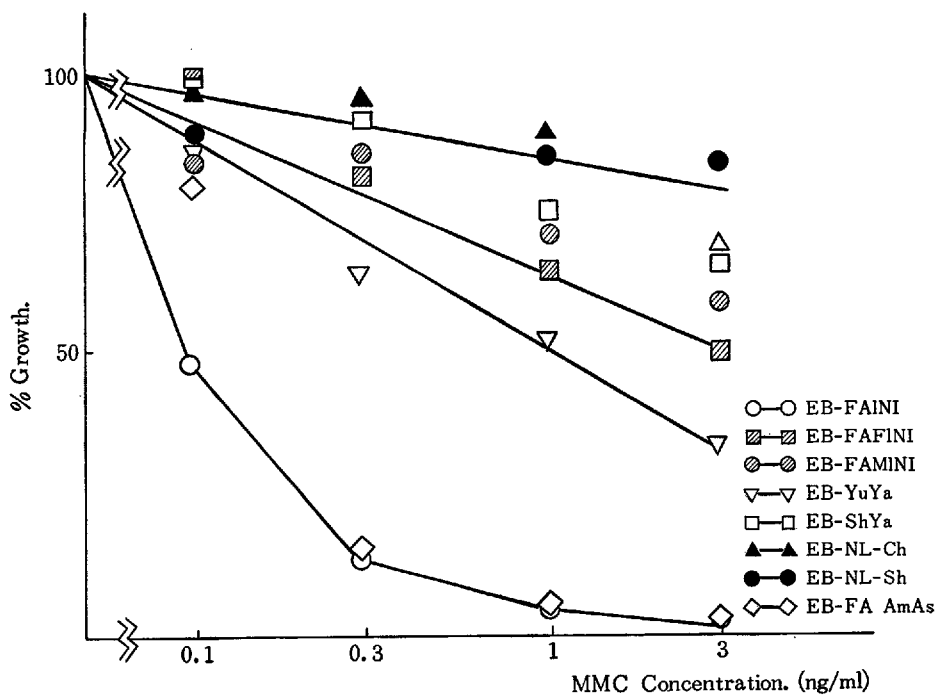


Figure 2 Growth of lymphoblastoid cell lines in the presence of mitomycin C (MMC)

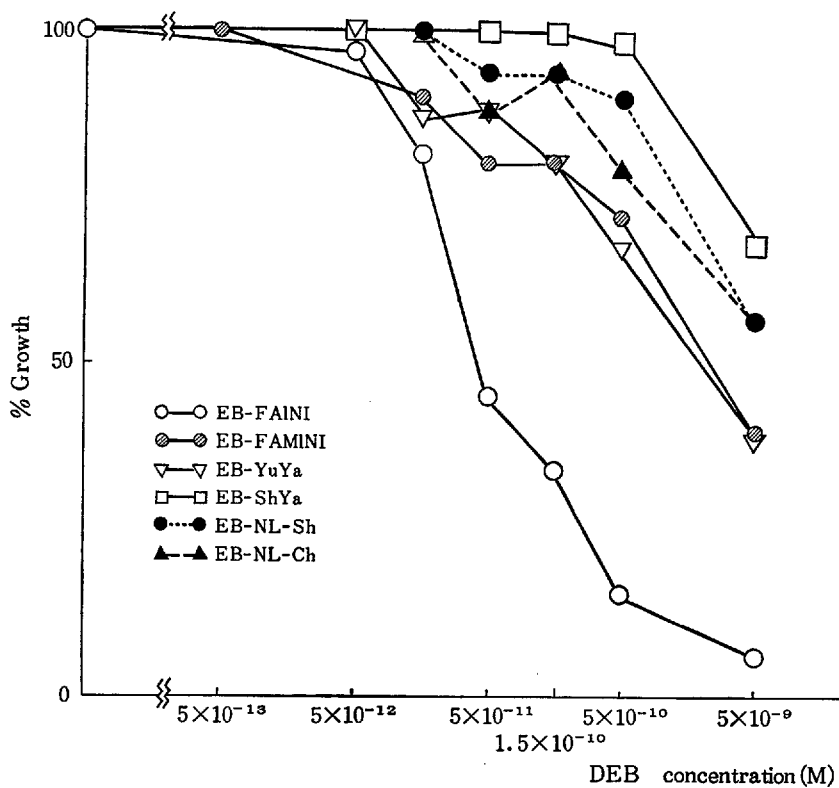


Figure 3 Growth of lymphoblastoid cell lines in the presence of diepoxybutane (DEB)

ると、その時の MMC 濃度には10倍以上の差がある。しかし正常コントロールの LCL と FA 家族の LCL の生存率を比較すると、FA 家族の4つの LCL は、やや感受性が高い傾向を示している。

DEB は最終濃度 $5 \times 10^{-13} \sim 5 \times 10^{-9}$ M を用いた。FA の LCL のみ高感受性で、他の LCL の50%生存率で比較すると、やはり10倍以上の差がみられる (図3)。FA の家族の LCL と正常コントロールの LCL 間での感受性の差ははっきりしない。

2. ベースラインの染色体異常と、薬剤による染色体異常誘発

ベースラインの染色体異常は、FA の LCL で約70%の細胞に見出され、染色体異常の頻度を合計すると、1~1.8 breaks/cell となる。この値は正常コントロールの LCL の0.02~0.05 breaks/cell に対して少なくとも20倍以上の高値である (表2)。染色体異常の種類も FA LCL では多種認められる。

表2 Chromosomal aberrations in lymphoblastoid cell lines

Cell line	Cell with aberrations	Aberrations/cell						Total breaks/cell*
		SB	DB	Frag	Dic	Int	Trans	
EB-FA1NI	69.44 %	0.694	0.139	0.056	0.056	0	0	1.001
EB-FA-AmAs	68.96	0.852	0.185	0.037	0.074	0	0	1.814
EB-FAM1NI	2.90	0.015	0	0	0.015	0	0	0.045
EB-FAF1NI	4.00	0.020	0	0	0.020	0	0	0.060
EB-ShYa	2.67	0.027	0	0	0	0	0	0.027
EB-YuYa	4.00	0.020	0.020	0	0	0	0	0.040
EB-NL-Ch	2.00	0	0	0.020	0	0	0	0.020
EB-NL-MU	5.00	0.030	0.020	0	0	0	0	0.050
EB-NL-Ha	3.70	0.018	0.018	0	0	0	0	0.037

SB=chromatid break, DB=chromosome break, Frag=fragment,
Dic=dicentric chromosome, Int=interchange, Trans=translocation

* One Dic., Int., or Trans. was counted as two breaks.

MMC は、末梢血 T-cell の染色体異常誘発時に一般的に用いられる50 ng/mlの濃度で添加した (表3)。FA の LCL は、この濃度では細胞生存率は極端に下がり、分裂中期像に多種類の染色体異常がみられた。多放射状配列も複雑となり、それらはすべて2 break として集計されているので、実際に生じている染色体頻度は2 break 以上と考えられる。FA 家族の4株の LCL では、染色体異常は50~100%の細胞に認められる。染色体異常の頻度も1.1~3.4 breaks/cell と、正常コントロールに比べて2倍以上高い。

DEB での染色体異常誘発は、やはり末梢血 T-cell で用いられる 10^{-9} M の濃度を用いた (表4)。これは、Auerbach ら⁴⁾⁵⁾が、FA・FA 保因者・正常で染色体異常誘発の頻度がそれ

表3 Chromosomal aberrations in lymphoblastoid cell lines induced by MMC (50 ng/ml)

Cell line	Cell with aberrations (%)	Total breaks/cell
EB-FA1NI	100	4.80
EB-FA-AmAs	100	8.00
EB-FAM1NI	58.6	1.5806
EB-FAF1NI	66.7	1.1515
EB-ShYa	86.7	2.5333
EB-YuYa	100	3.3750
EB-NL-Ch	28.8	0.5151

表4 Chromosomal aberrations in lymphoblastoid cell lines induced by DEB (1nM)

Cell line	Cell with aberrations (%)	Total breaks/cell
EB-FA1NI	100	20.0
EB-FA-AmAs	100	12.0
EB-FAM1NI	10.8	0.2000
EB-FAF1NI	22.2	0.2778
EB-ShYa	20.2	0.2600
EB-YuYa	33.8	0.4706
EB-NL-Ch	54.4	1.1087

それぞれ異なるとしている濃度である。FA の LCL では、100%の細胞に染色体異常が認められ、その頻度も12~20 breaks/cell と高値である。FA 家族の LCL では、正常コントロールの LCL と比較して、染色体異常の頻度は高くない。

考 察

FA 以外の染色体切断症候群にふくまれている Bloom 症候群・ataxia telangiectasia では、末梢血 T-cell で染色体異常の頻度が高くても、LCL では正常範囲を示すことが多い³⁾。すなわち、LCL を樹立すると、もともと末梢血リンパ球で見られていた細胞遺伝学的に重要な特徴を一部失ったように見える。しかしFA では、高頻度でかつ多種類の染色体異常は、樹立された LCL でも見出される。このことから他の染色体切断症候群とFA では、ベースラインの染色体異常の出現機構が異なることが示唆される。

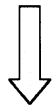
FA 保因者診断に関して、Auerbach らは DEB で誘発される染色体異常の頻度は、FA・FA 保因者・正常コントロールの順となり、FA の正確な保因者診断は DEB で必ずできると

報告している⁴⁾⁵⁾。しかし、われわれの症例についてはこの方法では保因者診断は不可能であった。すなわち同じ濃度の DEB を用いて、末梢血 T-cell では FA 保因者であるはずの両親でも正常コントロールと比して特に高頻度の染色体異常は認められていない²⁾。LCL でも DEB を用いた場合、生存率・染色体異常誘発のいずれからも FA の両親の LCL は正常コントロールの LCL と区別ができない (図 3・表 4)。しかし MMC を用いると、FA の両親の LCL で生存率の軽度の低下と染色体異常の中等度の誘発が認められる (図 2・表 3)。この傾向は、FA1NI の同胞 2 人の LCL にも認められた。

以上からこの FA 家系では、DEB を用いての保因者診断は困難であり、MMC では可能であると考えられる。すなわち、この家系の両親 2 人と同胞 2 人はともに FA 保因者で、MMC による DNA 損傷の修復が正常コントロール細胞ほど十分にはできないことが示唆される。MMC を用いての保因者診断が可能であったとの報告はこれまで見出されない。色素性乾皮症や ataxia telangiectasia では細胞融合を用いて相補性テストがなされ、それぞれ相補性群が決定されている。FA についても染色体異常の出現を指標として相補性が見出されたと報告されている⁶⁾。相補性群と薬剤などに対する感受性の差について、報告はないが、家系によって cross-linking agent に対する感受性や反応に差があり、この点でも遺伝的異質性が存在する可能性がある。

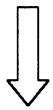
文 献

- 1) Swift, M. : Nature, **230** : 370~373, 1971.
- 2) 古山順一 : 厚生省心身障害研究 : 先天異常のモニタリングに関する研究, 昭和 58 年度研究報告書, 98~104.
- 3) Hashimoto, T., Sukenaga, T., Lopetegui, P. and Furuyama, J. : In Sister Chromatid Exchange : 25 Years of Experimental Research. ed. by Tice, R.R. and Hollander, A., Plenum Press, New York (in Press).
- 4) Auerbach, A.D. and Wolman, S.R. : Nature, **271** : 70~71, 1978.
- 5) Auerbach, A.D., Adler, B. and Chaganti, R.S.K. : Pediatrics, **87** : 128~135, 1981.
- 6) Zakrzewski, S. and Sperling, K. : Hum. Genet., **56** : 81~84, 1980.



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

Fanconi 貧血(Fanconi anemia,FA)は,高発癌性で知られる常染色体性劣性遺伝病である。同一家系内でも FA の発症年齢はさまざまであるのと同時に,FA 保因者(heterozygote)も発癌率が高いとの報告もあるため¹⁾,FA患者を診断した際はその家系内のFA患者の有無や保因者の検索が不可欠である。われわれはこれまで遺伝病患者のリンパ球をEpste-in・Barrウイルスでトランスフォームして・リンパ芽球様細胞株(lymphoblastoid cell line,LCL)の樹立を行っている。今回はFAの一家系の細胞遺伝学的な解析を,LCLを用いて行った。