

## 肺サーファクタントタンパク質B遺伝子変異診断法の確立 慢性肺障害と先天性SP-B欠損症

(分担研究：新生児の慢性肺疾患の予防と治療に関する研究)

研究協力者：清水 浩

共同研究者：川崎浩司

要約：先天性サーファクタントタンパク質B (SP-B) 欠損症は、1993年新生児の先天性肺胞蛋白症において初めて報告され、その後SP-B遺伝子の異常によることが明らかにされた。遺伝子変異121ins2は、コドン121におけるフレームシフト変異であり、その後別家系の121ins2変異のヘテロ接合体において新たな遺伝子変異R236C (コドン236における点変異) が同定された。遺伝子型121ins2/121ins2のホモ接合体では、早期に終止コドンが発現されて、SP-Bは完全欠損するため、出生後早期から重篤な呼吸障害 (先天性肺胞蛋白症) を発症し、その生命予後はきわめて悪い。一方、遺伝子型121ins2/R236Cのヘテロ接合体においては、SP-Bは部分欠損慢性肺障害の臨床像を呈する例が報告されている。慢性肺障害児のうち、特にその成因が明らかでないものについては、SP-B欠損の可能性も念頭に置いてSP-B遺伝子の検索を行うことも必要である。今回新生児の微量全血からのゲノムDNA抽出法を確立し、polymerase chain reactionによる121ins2変異とR236C変異の診断法を確立した。

見出し語：慢性肺障害、サーファクタントタンパク質B、肺胞蛋白症、PCR

緒言：肺サーファクタントは、肺胞腔の気液界面において表面活性を発現し、呼吸時の肺胞虚脱を防ぐ脂質タンパク質複合体である。SP-Bは、第2番染色体上に位置する9.5kbの遺伝子がコードするきわめて疎水性の高い分子量8kDのサーファクタントタンパク質である。SP-Bは肺胞型細胞によって合成・分泌され、肺胞腔における肺サーファクタントの表面活性の発現に必須の機能を有している。1993年新生児の先天性肺胞蛋白症において初めてSP-Bの欠損が報告され<sup>1)</sup>、さらにこのSP-B欠損がSP-B遺伝子の異常によることが明らかにされた<sup>2)</sup>。その遺伝子変異はコドン121におけるフレームシフト変異：C→GAAであり、「121ins2」と名付けられた。121ins2変異のホモ接合体 (遺伝子型121ins2/121ins2) では、早期に終止コドンが発現されるために、SP-Bは完全欠損し、出生後早期から重篤な呼吸障害 (先天性肺胞蛋白症) を発症し、その生命予後はきわめて悪い。一方、SP-Bが部分欠損する121ins2変異のヘテロ接合体においては、呼吸障害の程度は無症状のキャリアから、慢性肺障害の臨床像を呈するものまでさまざまである。121ins2変異のヘテロ接合体においてその後新たな遺伝子変異が同定され、コドン236の点変異：CGC→TGCで、236位のアルギニンがシステインに変異していることから、「R236C」と名付けられた (遺伝子型121ins2/R236C)<sup>3)</sup>。今回polymerase chain reaction (PCR) による121ins2変異とR236C変異の診断法を確立したので報告する。

### 方法：

1) 全血からのゲノムDNA抽出：全血120 $\mu$ lをEDTA採血し、Nagabhushanらの方法<sup>4)</sup>を一部修正して、Sephaglas BandPrep Kit (Pharmacia Biotech) を用いてゲノムDNAを抽出した。

2) 121ins2変異のコントロールDNAの作製：コドン121におけるフレームシフト変異によって新たに生じる制限酵素部位 (SfuI) を診断に利用するため、overlap extension法を用いたsite-directed mutagenesisによって、C→GAAのフレームシフト変異を有するSP-B遺伝子のPCR産物を作製し、さらにTAクローニング法でベクターに導入して121ins2変異のコントロールとなる鋳型を作製した。

3) R236C変異のコントロールDNAの作製：コドン236における点変異によって欠損する制限酵素部位 (BstUI) を診断に利用する。R236C変異のコントロールDNAは、2)と同様に、overlap extension法を用いたsite-directed mutagenesisによって、CGC→TGCの点変異をPCR産物に導入した。

### 成績：

1) ゲノムDNAの収量：全血120 $\mu$ lからゲノムDNA5～6 $\mu$ gを抽出することができた。

2) 121ins2変異の診断：全血から得られたゲノムDNA、あるいは121ins2変異の陽性コントロールを鋳型にして、121ins2変異部分を挟むセンスプライマーとアンチセンスプライマーを用いてPCR (変性温度95℃60秒、アニーリング温度64℃30秒、伸長温度72℃45秒、35サイクル) を行った。このPCR産物を制限酵素SfuIで切断した後に、アガロース

電気泳動 (4% NuSieve 3:1 agarose) を行って変異の有無を確認した。正常の場合に相当する陰性コントロールのPCR産物は、SfuI処理によっても切断されず778bpであったが、121ins2変異のホモ接合体に相当する陽性コントロールのPCR産物は、SfuI処理によって614bp、166bpの2本のバンドに切断された。

3) R236C変異の診断：全血から得られたゲノムDNA、あるいはR236C変異の陽性コントロールを鋳型にして、R236C変異部分を挟むプライマーを用いてPCRを行い、674bpのPCR産物を得た。このPCR産物を制限酵素BstUIで切断した後に、アガロース電気泳動を行って変異の有無を確認した。正常の場合に相当する陰性コントロールのPCR産物は、BstUI処理によって347bp、224bp、103bpの3本のバンドに切断されたが、R236C変異のホモ接合体に相当する陽性コントロールのPCR産物は、BstUI処理によって450bp、224bpの2本のバンドに切断された。

考察：121ins2/121ins2においては、病理学的に肺胞蛋白症を認める。出生後早期から重篤な呼吸障害があり、その生命予後はきわめて不良であり、米国では肺移植が適応される。SP-B mRNAの発現は全く認められず、SP-Bは完全に欠損する。一方、121ins2/R236Cの場合は、SP-B mRNAの発現量は正常の50%が認められるが、SP-B蛋白量は正常の6～7%しか認められず、R236C変異がSP-Bのプロセッシングを障害している可能性がある。ヘテロ接合体では、SP-Bが部分欠損しているにも関わらずまったく症状のないキャリアから、慢性肺障害を呈するものまでSP-Bの発現量によって様々な表現型を示す可能性がある。慢性肺障害児のうち、特にその成因が明らかでないものについては、SP-B欠損の可能性も念頭に置いてSP-B遺伝子の検索を行うことも必要であろう。

### 結論：

- 1) 微量全血からのゲノムDNA抽出法を確立した。
- 2) 先天性SP-B欠損症において報告されている遺伝子変異121ins2、R236Cの遺伝子診断法を確立した。

### 参考文献：

- 1) Noguee LM et al. Deficiency of pulmonary surfactant protein B in congenital alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 328: 406-410, 1993.
- 2) Noguee LM et al. A mutation in the surfactant protein B gene responsible for fatal neonatal respiratory disease in multiple kindreds. *J Clin Invest* 93: 1860-1863, 1994.
- 3) Ballard PL et al. Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease. *Pediatrics* 96: 1046-1052, 1995.
- 4) Nagabhushan M et al. A rapid procedure for microextraction of genomic DNA from whole blood for clinical diagnostic tests.



## 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



要約:先天性サーファクタントタンパク質 B (SP-B)欠損症は,1993 年新生児の先天性肺胞蛋白症において初めて報告され,その後 SP-B 遺伝子の異常によることが明らかにされた。遺伝子変異 121ins2 は,コドン 121 におけるフレームシフト変異であり,その後別家系の 121ins2 変異のヘテロ接合体において新たな遺伝子変異 R236C (コドン 236 における点変異) が同定された。遺伝子型 121ins2/121ins2 のホモ接合体では,早期に終止コドンが発現されて, SP-B は完全欠損するため,出生後早期から重篤な呼吸障害(先天性肺胞蛋白症)を発症し,その生命予後はきわめて悪い。一方,遺伝子型 121ins2/R236C のヘテロ接合体においては, SP-B は部分欠損し慢性肺障害の臨床像を呈する例が報告されている。慢性肺障害児のうち,特にその成因が明らかでないものについては, SP-B 欠損の可能性も念頭に置いて SP-B 遺伝子の検索を行うことも必要である。今回新生児の微量全血からのゲノム DNA 抽出法を確立し, polymerase chain reaction による 121ins2 変異と R236C 変異の診断法を確立した。