

論 文 要 旨

Identification of a novel variant of the RET proto-oncogene in a novel family with Hirschsprung's disease

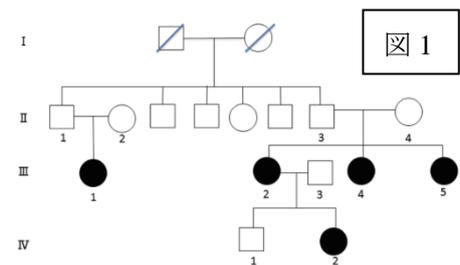
川野 孝文

【序論及び目的】

Hirschsprung's disease (以下 HSCR) は、肛門から連続性に広がる無神経節腸管を特徴とし、機能的腸閉塞を呈する先天性疾患である。約 5000 出生に 1 人の発症とされており、また、家族発症も 5~20% と報告されている。HSCR は、その無神経節腸管の長さが、肛門より S 状結腸までの short segment type(以下 S-HSCR)とそれより長い long segment type(以下 L-HSCR)の大きく 2 つに分類されている。S-HSCR は、男性に多く孤発性であることがほとんどである一方で、L-HSCR は家族性の割合が多い。原因遺伝子としてさまざまな遺伝子変異が報告されている。その中で RET 遺伝子の変異は、HSCR の原因遺伝子として初めて同定された遺伝子変異で、約 50%の家族性 L-HSCR に同定され 10~20%の孤発性の S-HSCR に認められる遺伝子変異である。しかし、すべての HSCR 症例で遺伝子変異が同定され、遺伝子変異での発症として説明されておらず、さらなる検討が必要と考えられている。今回我々は、S-HSCR の 5 人の罹患者を有する家系を経験したので原因遺伝子の検索を行った。

【材料及び方法】

1984年から2016年までに、鹿児島大学小児外科で経験したHSCRは109例であった。家族歴を有する症例が6家系あり、その中のすべての患者がS-HSCRで、女性にのみ発症し、3世代にわたっている家系が1家系あった。通常みられない遺伝形式であるため、今までに報告されていない新しい変異の可能性があり遺伝子検索を行った。検索は罹患者5人 (III: 1、III: 2、III: 4、III: 5、IV: 2)、家系図よりキャリアと判断した 2人 (II: 1、II: 3)、非罹患者3人 (II: 2、II: 4、III: 3)、さらに遺伝学的背景が不明な1人 (IV: 1) を対象とした (図1)。



方法は、末梢血より DNA を抽出した。全エクソン領域の検索は次世代シーケンサーを用いて行った。変異自体は University California Santa Cruz Genome Browser の database を用いて決定した。その後、以下の 4 つの工程を用いて、候補遺伝子を同定した。

- (1) アミノ酸変異を伴わない遺伝子変異を除外。
- (2) HSCR 発症の希少性を考慮し、病因遺伝子の変異頻度は 1%以下であると考え、1000genome project (健常人の遺伝子変異の変異頻度を世界中で調査した臨床研究) の database を用いて選別。
- (3) 家系図 (図 1) より、優性遺伝と考え、heterogenous な遺伝子変異を選別。
- (4) 罹患者とキャリアに共通の変異で、非罹患者とは共通しない変異を選別。

以上の検討工程で候補遺伝子を同定した。

【結果】

上記の工程を経て8つの候補遺伝子変異が同定された(図2)。さらに候補遺伝子を絞り込むために、蛋白機能を反映する3つの予測ツール、GERP score、SIFT scoreとPolyphen2 scoreを用いた。このツールを用いることで、2つの候補遺伝子(RET遺伝子変異とOR5AR1遺伝子変異)に絞り込むことができた。しかし、OR5AR1遺伝子は嗅神経に関わる遺伝子であり腸管の発生とは関係ないため除外した。最終的にRET遺伝子の変異(2765番目のアリルC→Aへの変異により、RET蛋白の922番目のアミノ酸S(セリン)→Y(チロシン)へ変異)が原因遺伝子変異と考えられた。遺伝子変異確認のためSanger sequenceを行ったところ、intron領域のHSCRのリスクファクター遺伝子である変異(rs2435357)もこの家系において同定された。この家系においては、この2つの変異がHSCRの発症に関与していると考えられた。

【結論及び考察】

RET蛋白の922番目のアミノ酸の変異は、現在までHSCRの原因遺伝子としての報告はない。RET蛋白はチロシンキナーゼの一つであり、RET遺伝子、RET蛋白のコンピューター上の解析で、922番目のアミノ酸のS→Yへの変異は、蛋白の大きさと疎水性の増大、電荷を変異させないが極性を減少させRET蛋白の機能に大きく影響すると報告されており、HSCRの原因遺伝子として矛盾しない。

また、HSCRの発生機序として、現在4つの機序が考えられており、それらは以下の、①RET蛋白と、それに結合するGDNF蛋白(グリア細胞株神経栄養因子)との結合障害、②RET蛋白に結合するその他の蛋白の異常により引き起こされる、細胞内signalの障害、③チロシンキナーゼの活性低下、④キナーゼ領域の変異によるホスホリパーゼの活性阻害、とされている。

RETの922番目のアミノ酸はキナーゼ領域のアミノ酸であり、HSCRの発症に寄与していると考えられるが、RETの922番目の変異のみでは無症状であったという報告が、MEN2Bの家系で報告されており、この変異のみではこの家系のHSCRの発生原因とすることはできない。

一方でrs2435357はintron1領域の変異であり、RET遺伝子のenhancer機能を担っている。文献ではS-HSCRで男性、孤発性のHSCRのリスクファクターであることが報告されている。しかしながら日本人においては25%変異を認める領域であり、この変異だけでこの家系のHSCRの発生機序として説明はすることは不可能である。Emisonらは、rs2435357と他の変異の組み合わせでHSCRを発症したことを報告しており、今回も同様にRET蛋白の922番目のアミノ酸の変異とintron1領域(rs2435357)この2つの変異が共存することにより、HSCRを発症していると考えられた。しかしながら、今回の検討ではなぜ女性のみが発症するか明らかにすることができておらず、今後、knock out mouseによる動物モデルを用いた実験など、さらなる研究が必要であると考えられた。

(Pediatric Surgery International (2017) 33(10):1041–1046)