

# Novel mutations in two Japanese cases of glycogen storage disease type IIIa and a review of the literature of the molecular basis of glycogen storage disease type III

メタデータ	言語: en 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 福田, 冬季子 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1613">http://hdl.handle.net/10271/1613</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 336号	学位授与年月日	平成13年 2月23日
氏名	福田 冬季子		
論文題目	Novel mutations in two Japanese cases of glycogen storage disease type IIIa and a review of the literature of the molecular basis of glycogen storage disease type III (日本人糖原病Ⅲa型における2つの新しい遺伝子変異及び糖原病Ⅲ型における分子遺伝学的検討に基づく文献的展望)		

博士(医学) 福田 冬季子

## 論文題目

Novel mutations in two Japanese cases of glycogen storage disease type IIIa and a review of the literature of the molecular basis of glycogen storage disease type III

(日本人糖原病Ⅲa型における2つの新しい遺伝子変異及び糖原病Ⅲ型における分子遺伝学的検討に基づく文献的展望)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

グリコーゲン脱分枝酵素(Glycogen debranching enzyme、以下GDE)は2つの触媒部位を持つ複合酵素(4- $\alpha$ -glucantransferase, amylo-1, 6-glucosidase)である。その酵素の欠損症である糖原病Ⅲ型は、限界デキストリンが肝、筋、心などに蓄積し、肝腫大、低血糖、病型によっては筋症状や心肥大を示す疾患であり、欠損酵素の種類及び臓器特異性により病型分類されている。遺伝子は1992年に単離されたが、発現の組織特異性や選択的な欠損については不明な点が多い。糖原病Ⅲ型の分子遺伝学的な病態をより明確にするため、日本人の糖原病Ⅲa型(肝・筋に2つの酵素が欠損する病型)2例の遺伝子変異を同定し、糖原病Ⅲ型の表現型と遺伝子型の関連について本研究も含め文献例について検討した。

### [患者ならびに方法]

患者：肝腫大及び進行性筋力低下を示す2症例(病例1は43歳女性、症例2は39歳男性)。各々の両親はいとこ婚であるが、2家系は無関係である。2症例とも血清クレアチニンキナーゼ高値、心電図にて左室肥大を認めた。生検筋の組織化学検査でPAS(periodic acid Schiff)陽性物質が著明に蓄積していた。筋組織のGDE活性は、①限界デキストリンを基質とする方法、②標識グリコーゲンをを用いた方法ともに活性を認めず、罹患臓器の分布から糖原病Ⅲa型と診断した。

cDNAの分析：総RNAを患者及び対照生検筋より抽出した。GDE遺伝子の全翻訳領域を増幅するプライマーを作成しRT-PCRを行った。RT-PCR産物をアガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイド染色した。各断片をサブクローニングし、精製した各断片の6-7クローンの塩基配列を決定した。

ゲノムDNAの分析：ゲノムDNAを患者及び対照生検筋より抽出した。cDNAの分析で異常を認めた領域と近縁領域を増幅するPCRを行った。PCR産物の電気泳動と塩基配列の決定をcDNAの分析と同様の方法で行った。

制限酵素による分析：ゲノムDNAを用い、各々の変異部位を含む領域を増幅するPCRを行った。各々のPCR産物を精製後制限酵素NaeI(症例1)及びBssKI(症例2)で消化し、電気泳動と染色をcDNAの分析と同様の方法で行った。

### [結果]

症例1：cDNAの分析で、exon6(204塩基対)が欠損していた。ゲノムDNAの分析でイントロン5のアクセプター部位のAからCへの異変(IVS5-2A>C)を認めた。制限酵素分析の結果、遺伝子変異はホモ接合のIVS5-2A>Cであり、exon6をスキッピングさせていた。

症例2：cDNA分析とゲノムDNAの分析で4234番目の塩基Aの欠失(4234delA)を認めた。制限酵素分析

の結果、遺伝子変異はホモ接合の4234delAであった。

糖原病Ⅲ型の表現型、遺伝子系に関する文献的検討：糖原病Ⅲa型では、23症例中15例で、GDE遺伝子のグリコーゲン結合領域と仮定されている部位を含むカルボキシル(carboxyl、以下C)末端領域に変異を認める。糖原病Ⅲb型(肝のみに2つの酵素が欠損する型)では特異的にexon3に変異が局在していると考えられている。人種特異性については、北アフリカのユダヤ人にて特異的な遺伝子変異の集積を認めるが、日本人に特異的な変異は現在のところ認めない。

#### [考察]

症例1ではホモ接合のIVS5-2A>Cがスプライシングの異常を引き起こし、exon6がスキッピングしていた。変異蛋白は正常より68アミノ酸が短いと予想される。GDE遺伝子の活性部位は、exon6, 13, 14, 15にあると仮定されている。症例1ではexon6の仮定された活性残基に一致する塩基配列が消失していた。exon6をスキッピングさせるインフレームなホモ接合の変異がGDE活性を消失させており、症例1はexon6がGDE活性に重要であることを示唆する初めての症例である。

症例2では、ホモ接合の4234delAによりフレームシフトが生じ、exon30に終止コドン(1276X)が発生した。グリコーゲン結合ドメインはexon31、32に存在すると仮定されているが、症例2では、exon31、32を欠く。症例2はGDE遺伝子のC末端がGDE活性に重要であり、グリコーゲン結合領域がC末端に存在するという仮説を支持している。

#### [結論]

同定した新しい2つの遺伝子変異はGDE遺伝子のexon6及びC末端がGDE活性に重要であることを示唆していた。糖原病Ⅲ型の遺伝子変異は多様なため、診断には生化学的分析が必要となるが、症例の遺伝子変異の集積が、分子遺伝学的病態を解明するために重要であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

糖原病には現在9種類の型が知られている。そのうち、Ⅲ型はⅠ型に似て低血糖だが、Ⅰ型ほど重くない。肝臓と筋肉に再外層の枝が極端に短いグリコーゲンが蓄積する。この原因遺伝子はグリコーゲン脱分枝酵素(glycogen debranching enzyme、以下GDE)である。この酵素は2つの触媒部位を持つ複合酵素であり、4- $\alpha$ -glucantransferaseと amylo-1,6-glucosidaseの両活性を持つ。糖原病Ⅲ型は酵素活性の種類および臓器特異性によりⅢaからⅢdの4つに分類されている。Ⅲa型は肝、筋肉の2つの酵素が欠損するもの、Ⅲb型は肝の2つの酵素が欠損するが筋肉の2つの酵素は正常なもの、Ⅲc型はtransferaseは正常だがglucosidaseが肝、筋肉において欠損するもの、Ⅲd型はglucosidaseは正常だがtransferaseが肝、筋肉で欠損するものである。遺伝子は1992年に単離されたが、病型の組織特異性や酵素活性欠損について分子遺伝学的に不明な点も多かった。本研究は、本人が医師として関わった患者ではなく、他の医師により糖原病として疑われた患者の確定診断および分子遺伝学的な解析を行ったものである。福田氏は日本人の糖原病Ⅲの78%を占めるⅢa型患者2例の遺伝子変異を同定し、今までの報告も合わせて糖原病Ⅲ型の症状と遺伝子型の関係について考察を行った。

今回詳細に検討した2症例は肝腫大と進行性筋力低下を示す40歳前後の男女各1名であり、いずれもいとこ結婚をしていた。いずれも、血清クレアチニンキナーゼ高値、左室肥大を示し、筋生検の組織化学

検査、筋組織の酵素活性、罹患臓器の分析から糖原病Ⅲa型と診断しているが、病型判断については疑問がない。

患者生検筋より抽出した全RNAを用いてRT-PCRを行ない、遺伝子変異を検索している。mRNA全域を10組のプライマーセットでカバーしており、症例1では1つのPCR産物のみ正常より小さく、症例2では全PCR産物とも正常と差がなかった。そこで、全PCR産物をサブクローニングしてそれぞれの塩基配列を決定した。その結果、症例1ではエクソン5が直接エクソン7に連結しており、症例2ではエクソン30に1塩基の欠失があることが判明した。患者ゲノムの対応する領域の塩基配列を決定したところ、症例1ではイントロン5のアクセプター部位のAGがCGに変異しており、症例2では遺伝子にも同じ1塩基の欠失があることが明らかになった。また、この2つの突然変異によりそれぞれ制限酵素Nae I, BssKIにより新たに切断されるので、2つの症例ともそれぞれの突然変異のホモ接合体であることが証明された。

糖原病Ⅲa型におけるGDE遺伝子の変異の報告はすでいくつかあるが、本研究では新しく、エクソン6が欠失する例と4234番目の1塩基が欠失する例を見いだした点が高く評価できる。また、突然変異の場所と病型の遺伝子診断の可能性について本研究および今までの研究から総合的展望を行い、特定の部位の遺伝子変異を同定するだけでは2つの酵素活性の予測ができないゆえに、病型診断における生検サンプルの酵素活性測定的重要性を改めて明らかにしたことも評価できる。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) 生検筋の大きさはどれくらいか
- 2) どの筋肉からとるのか
- 3) 対照の筋はどのようにして得たか
- 4) 2症例の患者のクレアチンキナーゼ値の差が大きいのはなぜか
- 5) 低血糖の既往はあるか
- 6) 両親の遺伝子型はどうであったか
- 7) 糖原病9例のうち、2例を選んだ理由は何か
- 8) 他の症例ではどのような変異が見つかったか
- 9) 糖原病Ⅲの4型の患者の頻度はどのようになっているか
- 10) 糖原病Ⅲc型がないのはどう考えるか

これらの質問に対し申請者の解答はほぼ適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三浦直行  
副査 長野 昭 副査 宮嶋裕明