＜原 著＞

Werner 症候群の一家系における遺伝子解析

森島 淳之 満田 憲昭 名倉 潤 紙野 晃人
里 直行 三木 哲郎 荻原 俊男

＜要 約＞ Werner 症候群 (WRN) は、常染色体性劣性の遺伝性早老症であり、原因遺伝子座位は第 8 染色体短腕に存在することが知られているが、原因遺伝子そのものは未だ単離同定されていない。本邦での有病率は約 20 万人に 1 人で、発症頻度が白人集団に比べて高い疾患の一つである。今回、甲状腺乳頭状腺癌と骨髄異形成症候群を合併し、39 歳にて死亡した患者の 3 人の同胞（当患者を含めて 2 人が発症）と、イトコ婚である両親に対して遺伝子解析を行った。

WRN 領域に存在する 4 種のマイクロサテライト多型、D8S360, D8S1055, D8S339, ANK1 を用いて遺伝子型を決定し、ハプロタイプを作成した。患者の同胞のうち長女と次女の 2 人は、臨床診断では健常者である。長女は正常のハプロタイプを受け継いでいたが、次女は WRN 変異遺伝子をもつハプロタイプを受け継いでいた。しかし、この 2 人は臨床的に異常はなかった。この結果は、WRN が劣性遺伝であることを裏付けた。

本症候群の発症機序は、未だ不明であるが、老化の機序を探る手立てとして有力視されており、将来単離同定されるであろう WRN 遺伝子の機能を解明すれば、老化機序解明の糸口になると考えられる。

Key words : Werner 症候群, マイクロサテライト多型, 遺伝子診断, ホモ接合性マッピング

緒 言

Werner 症候群 (以下 WRN と略す) は、常染色体性劣性の遺伝性早老症であるが、その原因遺伝子は未だ単離同定されていない。本邦での有病率は 20 万人に 1 人で、白人集団に比べ発症頻度の高い疾患の一つである。患者は、20 歳代より、白内障、性腺機能低下、皮膚の角化などの老化症状で発症し、50 歳前後に間葉系の悪性腫瘍や動脈硬化による虚血性心疾患が原因で死亡する。細胞生物学的には、血小板由来増殖因子 (PDGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF) に対する増殖反応性の低下¹⁾が報告されている。皮膚線維芽細胞を用いた研究では、細胞の継代寿命が短く²⁾、自然突然変異率の増加する³⁾ことが報告されている。DNA 複製の遅延、複製単位の減少が認められるため、DNA 複製過程の異常によって発症する可能性が高い⁴⁾。以上の細胞生物学的特徴を手がかりとして、原因遺伝子の単離同定が試みられたが、今のところ成功していない。最近のヒト・ゲノム解析研究の一手法であるポジショナ

ルクローニングにより、原因遺伝子座位の第 8 染色体短腕へのマッピング、さらに原因遺伝子そのものの単離も可能となってきた⁵⁾⁶⁾。将来、単離同定されるであろう WRN 遺伝子の機能の解明は、老化機序解明の糸口となると考えられる。今回、染色体顕微切断法 (microdissection) で独自に単離したマイクロサテライト多型の 1 種 (D8S1055) と、既報告のマイクロサテライト多型の 3 種 (D8S360, D8S339, ANK1) を使って近親婚家系の遺伝子型を決定し、ハプロタイプを作成し保因者診断を行った。

対象及び方法

家系

患者：39 歳、女性

主訴：左眼球突出

既往歴：特記すべき事なし

家族歴 (図 1 参照)：両親がイトコ婚。II-3 (三女) が発端者で、II-4 (四女) も WRN 患者である。両親 (I-1, I-2)、長女 (II-1) と次女 (II-2) は臨床的には、全く健常者である。

現病歴：27 歳頃より、左足底鶏眼を認め、左下腿痛が出現するが放置していた。31 歳時、歩行困難を主訴に当院皮膚科を受診し、精査の結果、WRN と診断され

A. Morishima, N. Mitsuda, J. Nakura, K. Kamino, N. Sato, T. Miki, T. Ogiwara : 大阪大学医学部老年病医学講座

受付日：1995. 7. 25, 採用日：1995. 10. 24

図1 発端者の家系の構成員について、D8S339を利用して決定した遺伝子型。

た。内科的精査を目的として、当科共観となったが、前頭骨と肺への転移を伴う甲状腺乳頭状腺癌を発見された。脳神経外科にて前頭骨切除術施行し、次に第二外科にて甲状腺全摘術施行した。以後、年1回の割合で、残存する肺に転移した甲状腺乳頭状腺癌に対し、アイソトープ治療 (^{131}I 100mCi) を行った。平成4年10月 (39歳時)、左眼痛と眼球突出をきたし、頭部CTにて、左眼窩に骨融解を伴う陰影を認めたため、甲状腺乳頭状腺癌の眼窩への転移であると診断した。同年12月、同量の ^{131}I 治療を行い、外科的処置施行目的にて入院となった。平成5年1月、当院脳神経外科にて、左眼窩形成術を行った。術後より、末血における汎血球減少をみとめ、G-CSFを用いて経過観察するが、血液像の悪化を認め、末梢血に骨髓芽球が出現するようになり、骨髓穿刺、白血球の染色体検査より、骨髓異形成症候群と診断した。その後も骨髓芽球の増加が続く、同年6月の時点で骨髓芽球の割合が全白血球の50%を越え、急性骨髓性白血病へ移行した。同年8月、左下肺野へ転移した甲状腺癌による肺炎により死亡した。

入院時現症：身長147.5cm、体重46.0kg、血圧130/80mmHg、上下肢左右差なし、脈拍80/分、体温35.5°C、鳥様顔貌、頭髮に白髪が混じる。両眼とも白内障手術後。皮膚は萎縮乾燥。高調な声。腱反射正常。両足底に鶏眼あり。下腿潰瘍は認めない、厚生省の班会議作

成の WRN の診断基準⁷⁾のうち、3主徴候、5副徴候を示した。

遺伝子解析

4種のマイクロサテライト多型、D8S360⁸⁾、D8S1055⁹⁾、D8S339¹⁰⁾、ANK1¹¹⁾を用いて、家系構成員の遺伝子型を決定した。表1に、各マイクロサテライト多型の対立遺伝子の長さや遺伝子頻度を示す。各遺伝子の遺伝子地図での順序は、第8染色体短腕末端から動原体へ順に、D8S360-D8S1055-D8S339-ANK1となる。各マイクロサテライト多型のプライマーの塩基配列、アニーリングの温度、PCR産物の長さは既に報告されている^{8)~11)}。以下に例としてD8S360の場合を示す。フォワードプライマーの塩基配列は5'-CTAGCTCCTGTGTTTCCATCA-3'、リバースプライマーの塩基配列は5'-TCTCACAGGTGCC-TGTGCAG-3'で、それぞれのプライマーを合成した。フォワードのプライマーをRI標識し、96°C45秒のdenature反応、60°C30秒のannealing反応、72°C30秒のextension反応を1サイクルとし、35サイクルのPCRを行った。日本人健常者50名を解析すると101bpから2bp間隔で115bpまで8個の対立遺伝子が8種存在し、観察されたヘテロ接合性は78%であった⁸⁾。

結 果

図1に解析した結果を示す。父 (I-1) は A/G のへ

表1 各マイクロサテライト多型の対立遺伝子の長さや遺伝子頻度

対立 遺伝子	D8S360		D8S1055		D8S339		ANK1	
	長さ	頻度	長さ	頻度	長さ	頻度	長さ	頻度
A	101	0.15	95	0.01	163	0.32	107	0.44
B	103	0.01	97	0.02	165	0.05	109	0.00
C	105	0.23	99	0.22	167	0.00	111	0.04
D	107	0.34	101	0.04	169	0.00	113	0.5
E	109	0.12	103	0.00	171	0.00	115	0.02
F	111	0.05	105	0.02	173	0.37		
G	113	0.09	107	0.01	175	0.13		
H	115	0.01	109	0.36	177	0.09		
I			111	0.07	179	0.01		
J			113	0.01	181	0.03		
K			115	0.06				
L			117	0.07				
M			119	0.02				
N			121	0.03				
O			123	0.04				
P			125	0.02

図2 4種のマイクロサテライト多型を利用して作製したハプロタイプを示す。網目模様部分は WRN 変異遺伝子をもつハプロタイプ、矢印は染色体上で遺伝子の組換えが発生したと考えられる位置を示す。

テロ接合体, 母 (I-2) は F/G のヘテロ接合体で, WRN 患者である三女 (II-3) と四女 (II-4) は, G/G のホモ接合体であった。長女 (II-1) は A/F, 次女 (II-2) は A/G のヘテロ接合体であった。他の3種のマイクロサテライト多型の解析結果をまとめてハプロタイプを作成した結果を図2に示す。図の網目模様部分は WRN 変異遺伝子をもつハプロタイプを示す。矢印は染色体上で遺伝子の組換えが発生したと考えられる位置を示す。父 (I-1) が D-H-G-D の変異 WRN 遺伝子を含む染色体を受け継ぎ, 母 (I-2) は G-H-G-D の変異染色体を受け継いでいた。長女 (II-1) は, D8S360 と D8S1055 との間で遺伝子組換えを発生したと考えられる。I-1 と I-2 も, 以前に同じマーカー間で組換えの起こったと思われる異なる変異染色体が受け継がれており, 両マーカー間の遺伝子距離は近くないことが分かる。次女 (II-2) は, G-H-G-D のハプロタイプを母より受け継いでいるため, WRN 変異遺伝子を1個もつ保因者であることが判明した。三女 (II-3) と四女 (II-4) は, 両親より変異 WRN 遺伝子をもつ染色体 D-H-G-D/G-H-G-D を受け継いだため, WRN が疾患として発症したと考えられる。II-1 と II-2 は, WRN 変異遺伝子を全くもたない姉と, 変異遺伝子をヘテロ接合体で持つ妹であるが, 臨床的には両者に異常はなく健常者であった。この結果は, WRN は劣性遺伝であることを裏付けた。

考 察

WRN は, 悪性黒色腫, 髄膜腫など, 間葉系の特殊な悪性腫瘍を高頻度に合併することが知られている。今回, 甲状腺乳頭状腺癌と骨髄異形成症候群を合併した WRN の患者を経験したが, WRN における多重癌の合併の報告は稀ではない¹²⁾。本患者においても, 骨髄異形成症候群発症後, 約半年で急性骨髄性白血病への移

行を認めており, 基礎疾患としての WRN の存在が注目される¹³⁾。本症候群の発症機序は, 未だ不明であるが, 老化の機序を探る手立てとして有力視されており, 原因遺伝子の単離同定後の研究を待つことになる。本症例においても, 染色体の欠失などの異常を認めており, 遺伝子修復過程や複製過程に異常がある可能性が示唆される。

多型性遺伝子マーカーとしての DNA マーカーは, RFLP や VNTR から, (CA) 反復配列などからなるマイクロサテライト多型を利用する時代になり, WRN 遺伝子のマッピングもこれらを利用して行われた^{14)~17)}。マイクロサテライト多型は全染色体にほぼ均等に分布し, ヘテロ接合体となる頻度が高いため連鎖分析に役立ち, 少量の高分子量 DNA で解析が可能であるため非常に有用な遺伝子マーカーである。既に, 全染色体上で3,000個以上単離され, 米国の私企業より市販もされており, 全世界の研究室で, 遺伝子地図作成や遺伝子診断に利用されている¹⁸⁾。今回, WRN 家系の遺伝子型を決めることにより, WRN の正確な遺伝子座位の決定と保因者診断が可能であることを示した。将来単離同定される WRN 遺伝子を利用すれば, さらに正確な遺伝子診断が可能となるであろう。

今回のハプロタイプの解析によって, 長女 (I-2) は, WRN 原因遺伝子を受け継いでいないが, 次女 (II-2) は, WRN 原因遺伝子をヘテロ接合体でもつことが判明した。ハプロタイプの解析は, 遺伝子診断の精度を向上させる。一般に, 原因遺伝子領域 (D8S1055-D8S339) を挟んだ二つの遺伝子マーカー (染色体末端側の D8S360 と動源体側の ANK1) を利用した遺伝子診断は精度が高い事が知られている。今回の場合を例にとると, 次女の G-H-G-D ハプロタイプが正常の WRN 遺伝子を含んでいるためには, D8S360 と D8S1055-D8S339 領域の間と, D8S1055-D8S339 領域と ANK1 の間で二度遺伝子組み換えの発生する必要があるが, この頻度は極めて低い ($p < 0.001$)。このように, 4つの遺伝子マーカーを用いた遺伝子診断の精度は高いと考えられる。

ホモ接合型マッピングは, 発生頻度が稀な常染色体性劣性遺伝病で, 近親婚患者が多い他の疾患に応用できる。例えば, 最近日本人によって発見された福山型先天性筋ジストロフィー症座位がホモ接合型マッピングにより決定されている¹⁹⁾。WRN のように日本人に関連のある疾患の解析は, 積極的に研究を推進させる必要があると考える。

最後に、これまでの、分子遺伝学的解析から、日本人の WRN の遺伝子は、8p11.2付近の一カ所に存在し、遺伝子座位の遺伝的多型性はないと考えられる。WRN 遺伝子近傍のハプロタイプの解析から、少なくとも 5 つの独立した遺伝子変異が日本人集団に存在することが判明している²⁰⁾²¹⁾。数年以内に単離同定される WRN 遺伝子の機能は、老化機構を考える大きな手がかりとなるであろう。

文 献

- 1) Bauer EA, Silverman N, Busiek DF, Kronberger A, Deuel TF: Diminished response of Werner's syndrome fibroblasts to growth factors PDGF and FGF. *Science* 1986; 234: 1240—1243.
- 2) Salk D, Bryant E, Au K, Hoehn H, Martin GM: Systematic growth studies, cocultivation, and cell hybridization studies of Werner syndrome cultured skin fibroblasts. *Hum Genet* 1981; 58: 310—316.
- 3) Fukuchi K, Martin GM, Monnat RJ Jr: Mutator phenotype of Werner syndrome is characterized by extensive deletions. *Proc Nat Acad Sci* 1989; 86: 5893—5897.
- 4) Epstein C, Martin G, Schultz AL, Motulsky AG: Werner's syndrome: A review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural aging process. *Medicine* 1986; 45: 177—211.
- 5) 三木哲郎, 名倉 潤, 紙野晃人, 荻原俊男: 早老症—ウェルナー症候群と Hutchinson-Gilford プロジェリア症候群—, *Molecular Medicine「老化と神経性疾患」*, 1993; 30: 1166—1173.
- 6) 名倉 潤, 三木哲郎, 荻原俊男: 遺伝性早老症とウェルナー症候群. *Biomedica* 1993; 8: 1154—1158.
- 7) 尾形悦郎: 総括研究報告. 厚生省特定疾患ホルモン受容体機構異常調査研究班, 昭和59年度総括研究事業報告書, p13—27, 1984.
- 8) Kamino K, Nakura J, Kihara K, Ye L, Nagano K, Ohta T, Jinno Y, Niikawa N, Miki T, Ogihara T: Population variation in the dinucleotide repeat polymorphism at the D8S360 locus. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1751.
- 9) Ye L, Kihara K, Nakura J, Kamino K, Mitsuda N, Takahashi-Fujii A, et al: Dinucleotide repeat polymorphism at the D8S1055. *Jpn J Hum Genet* 1994; 39: 441—443.
- 10) Thomas W, Drayna D: A polymorphic dinucleotide repeat at the D8S339 locus. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 828.
- 11) Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, et al: Dinucleotide repeat polymorphism at the human ankyrin gene (ANK1). *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 969.
- 12) 大野賢朗, 富田勝朗郎, 土屋弘行, 松原藤継, 稲沖真, 川島篤弘. 悪性腫瘍を合併した Werner 症候群の 3 例. *整形・災害外科* 1990; 33: 1293—1298.
- 13) Takemoto Y, Hata T, Kamino K, Mitsuda N, Miki T, Kawagoe H, et al: Leukemia Developing after ¹³¹I Treatment for Thyroid Cancer in a Patient with Werner's syndrome: Molecular and Cytogenic Studies. *Internal Med* 1995; 34: 863—867.
- 14) Goto M, Rubenstein M, Weber J, Woods K, Drayna D: Genetic linkage of Werner's syndrome to five markers on chromosome 8. *Nature* 1992; 355: 735—737.
- 15) Schellenberg GD, Martin GM, Wijsman EM, Nakura J, Miki T, Ogihara: Homozygosity mapping and Werner's syndrome. *Lancet* 1992; 339: 1002.
- 16) Nakura J, Miki T, Nagano K, Kihara K, Ye L, Kamino K, et al: Close linkage of the gene for Werner's syndrome to ANK1 and D8S87 on the short arm of chromosome 8. *Gerontol* 1993; 39: 11—15.
- 17) Nagano K, Nakura J, Kihara K, Ye L, Kamino K, Mitsuda N, et al: Isolation and mapping of microsatellites from a library microdissected from the Werner's syndrome region, 8p11.2-p22. *Jpn J Hum Genet* 1993; 38: 393—399.
- 18) Gyapay G, Morissette J, Vignal A, Dib C, Fizames C, Millasseau P, Marc S, et al: The 1993—94 Genethon human genetic linkage map. *Nature Genet* 1994; 7: 246—339.
- 19) Toda T, Segawa M, Nomura Y, Nonaka I, Masuda K, Ishihara T, et al: Localization of a gene for Fukuyama type congenital muscular dystrophy to chromosome 9q31-33. *Nature Genet* 1993; 5: 283—286.
- 20) Ye L, Nakura J, Mitsuda N, Fujioka Y, Kamino K, Ohta T, et al: Genetic association between

chromosome 8 microsatellite (MS8-134) and Werner syndrome (WRN): Chromosome microdissection and homozygosity mapping. Genomics 1995 ; 28 : 566—569.

21) Yu C-E, Oshima J, Goddard KAB, Miki T,

Nakura J, Ogihara T, et al : Linkage disequilibrium and haplotype studies of chromosome 8p 11.1-21.1 markers and Werner's syndrome. Am J Hum Genet 1994 ; 55 : 356—364.

Abstract

Genetic Analysis of Werner Syndrome in a Family

Atsuyuki Morishima, Noriaki Mitsuda, Jun Nakura, Kouzin Kamino,
Naoyuki Sato, Tetsuro Miki and Toshio Ogihara

Werner syndrome (WRN) is a rare autosomal recessive disorder, one of the progeroid syndromes, and is characterized by features of premature aging. The incidence of WRN in the Japanese population, 1 in 200,000, is higher than that in the Caucasian population. The genetic defect of WRN is unknown. But genetic linkage to several markers on the short arm of chromosome 8 has been reported recently. Here, we studied one family with WRN in which an affected individual had a papillary thyroid carcinoma and myelodysplastic syndrome. Using 4 microsatellites closely located to the WRN locus:

D8S360, D8S1055, D8S339 and ANK1, we analyzed the genotypes of this patient, her three siblings and her parents, who were first cousins. The mutative haplotype, identified through the generations in pedigree, helps detect a carrier or a presymptomatic patient. The eldest sister inherited two normal haplotypes, but the second sister inherited one mutative haplotype. There was no difference in clinical signs and symptoms between these sisters. when the WRN gene is isolated, it will help us understand the mechanism of aging.

Key words: *Werner syndrome, Polymorphic microsatellite, Genetic analysis, Homozygosity mapping* (Jpn J Geriat 1995; 32: 817—821.)

Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School