

Title	アミロイドーシスの一病因遺伝子の同定 : トランスサイレチン (Ser50→Arg)
Author(s)	高橋, 信行
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37778">https://hdl.handle.net/11094/37778</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	たか 高	はし 橋	のぶ 信	ゆき 行
博士の専攻分野 の名称	博 士 (医 学)			
学位記番号	第 9 8 7 9 号			
学位授与年月日	平成 3 年 8 月 8 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
学位論文名	アミロイドーシスの一病因遺伝子の同定 —トランスサイレチン (Ser <sup>50</sup> →Arg) —			
論文審査委員	(主査) 大手前病院顧問 垂井清一郎			
	(副査) 教授 西村 健 教授 高井新一郎			

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

アミロイドーシスは、先行疾患、遺伝性の有無、障害臓器、アミロイドの蓄積分布、および前駆体蛋白の種類からきわめて多様性に富む疾患の集まりであると考えられる。

本研究においては、末梢神経が系統的に障害され、心不全にて死亡した全身性アミロイドーシス症例の沈着アミロイドが、トランスサイレチン (TTR) に由来することを同定したのち、TTR 遺伝子を解析し、本邦はもとより世界的にも報告のない一塩基置換を同定した。本例の家系調査、血縁者の遺伝子解析および臨床像の詳細な分析を加えて報告する。

### 〔方法ならびに成績〕

#### (1) 症 例

男性：41歳から起立性低血圧、無力性膀胱、陰萎等の自律神経症状、表在覚の低下が出現した。知覚障害は対称性に上肢遠位部に始まり、つづいて下肢遠位部に出現した。心室壁肥厚、房室ブロックをきたし、心機能不全にて46歳で死亡した。全身臓器、特に末梢神経、心に高度のアミロイド沈着を認めた。

#### (2) 剖検組織の免疫組織学的検討

抗ヒトTTR, AL, AA抗体を第一抗体として、avidin biotin peroxidase complex 法により剖検組織パラフィン切片を免疫染色した。アミロイド物質はTTR抗体と反応した。

#### (3) アミロイド前駆体蛋白の同定

免疫組織学的解析の結果から、アミロイド物質は抗TTR抗体と反応することが示された。そこで、患者心筋を生理食塩水中でホモジナイズ後遠心する操作を頻回に行って可溶性蛋白を除いた。次に沈渣蛋白を塩酸グアニジンで可溶化したのち分子ふるいにかけて、抗TTR抗体反応画分を得た。この抽出蛋白は免疫電気泳動法、免疫ブロッティング法では正常の血清TTRと同一の移動度、分子サイズであり、本例のアミロイド物質はTTR関連蛋白であることが判明した。

#### (4) TTR遺伝子の解析

肝組織から抽出したゲノムDNAを鋳型としたpolymerase chain reaction (PCR)法によりTTR遺伝子の全エクソン（隣接領域を含む）を増幅、M13ベクターに組み込みクローン化し、ジデオキシヌクレオチド酵素法にて塩基配列を決定した。エクソン3領域にTからGへの一塩基置換があり、TTRサブユニット蛋白の50番目のセリンのコードン（AGT）がアルギニンのコードン（AGG）へ変わっていた。なおこのアミノ酸置換は本例の血清TTRのアミノ酸配列の分析によっても確認された。正常塩基配列の遺伝子も存在しており、本例はTTR遺伝子についてヘテロ接合体である。

この一塩基置換によって増幅断片365 base pairs (bp)の5'端から216 bpの部位に制限酵素MvaIの新たな切断部位が生ずる。事実、増幅断片をMvaIで消化後、ゲル電気泳動を行うと正常バンド（365 bp）に加え、予想される二本の異常消化断片（216 bp, 149 bp）が検出された。

次に増幅したエクソン3をナイロン膜へdot blotし、正常遺伝子のT、変異遺伝子のG、それぞれ一方をもつ2種の〔 $\gamma$ - $^{32}$ P〕dATP標識オリゴヌクレオチドをプローブとして、allele specific oligonucleotide (ASO)解析を行った。患者DNAは正常、変異プローブ双方にハイブリダイズした。このように制限酵素消化断片多型性 (RFLP)解析とASO解析からも一塩基置換が確認された。ASO解析で検索した正常対象者20名には変異TTR遺伝子は存在せず、本症と変異TTR遺伝子とは連鎖していると考えられた。

#### (5) 家族の遺伝子解析

母、姉、3人の子供のTTR遺伝子についてMvaIを用いてRFLP解析を行った。子供1人に本例で見られた2本の異常消化断片が検出された。そこでTTR遺伝子全エクソンの塩基配列を決定した結果、エクソン3に本例と同一の塩基置換を確認した。

#### 〔総括〕

1. 本例の沈着アミロイドの前駆蛋白はトランスサイレチンである。
2. 本例はトランスサイレチン変異遺伝子 (Ser<sup>50</sup>→Arg)を病因遺伝子とする家族性アミロイドポリニューロパチーの新しい一型である。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は末梢神経障害および心筋障害を主徴とする全身性アミロイドーシス症例において、その病

因を解明する目的で沈着アミロイド蛋白の免疫生化学的解析および遺伝子解析を行ったものである。

その結果、アミロイド前駆蛋白はトランスサイレチン (TTR) 蛋白であることを同定し、TTR 遺伝子の塩基配列解析からアミノ酸変異 (Ser<sup>50</sup>→Arg) をきたす一塩基置換が本症に特異的に存在することを見いだした。この遺伝子変異は本研究により世界で初めて見いだされたものである。さらにこの置換が次世代に受け継がれていること、および変異遺伝子産物 (TTR-Arg<sup>50</sup>) が血中に存在することを確認した。

本研究は家族性アミロイドポリニューロパチーにおける新しい病因遺伝子を同定し、アミロイドーシスの発症機構の解明に貢献するものであり学位に値する。