

アラジール症候群の家系のjagged1遺伝子異常の同定と臨床病型の検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4551

アラジール症候群の家系の *jagged1* 遺伝子異常の同定と 臨床病型の検討

金沢大学大学院医学系研究科循環医学専攻血管分子遺伝学

(旧講座名：内科学第二)

(主任：馬淵 宏教授)

佐 藤 広 隆

アラジール症候群 (Alagille syndrome, AGS) は常染色体優性遺伝形式をとる疾患で、肝、心臓、眼球、骨格、顔貌における異常を5主徴とする。臨床的には組織学的に証明された肝内胆管の減少に、少なくとも他の3主徴を伴うものがAGSと診断される。近年、AGSの責任遺伝子がNotch受容体のリガンドをコードするヒト *jagged1* 遺伝子であることが明らかにされた。この研究の目的はAGSの家系において *jagged1* 遺伝子異常を同定し、その臨床病型を検討することである。発端者は29才の女性で、AGSによる胆汁性肝硬変による肝不全で死亡した。この発端者の末梢血から高分子DNAを抽出し、*jagged1* 遺伝子のすべてのエクソンをPCR法で増幅し、SSCP法で配列異常をスクリーニングした。SSCPで検出された異常バンドを直接塩基配列決定法で解析し、これまでに報告のない変異である2556insGTGCを同定した。この変異により早期終始コドンが生じ、産物は途中までしか翻訳されない。家系解析の結果、発端者の母親と兄が同様の変異を有した。発端者は肝内胆汁鬱滞と、末梢型肺動脈狭窄症、蝶型椎骨、特徴的顔貌、慢性腎不全を有し、臨床的にAGSと診断可能であった。母親は腎不全と特徴的顔貌、兄は心房中隔欠損症、蛋白尿および特徴的顔貌を認めるものの、遺伝子変異を有するにもかかわらず肝病変を欠くため、臨床的にはAGSとは診断されなかった。この家系では比較的頻度が低いと考えられている腎機能異常が顕著であった。

Key words Alagille syndrome, *jagged1*, Notch1, JAG1

アラジール症候群 (Alagille syndrome, AGS) は、70,000-100,000 出生あたり1の頻度で発生する比較的小な疾患で、肝内胆汁鬱滞に加え、肺動脈の低形成または狭窄、骨格の異常、特徴的な顔貌を伴う症候群として、Alagilleら¹⁾によって1969年に初めて記載された。その後、Watsonら²⁾、Rielyら³⁾による詳細な観察と検討が加えられ、1987年に、AGSは胆汁鬱滞および心血管系異常、骨格異常、眼科的異常、特徴的顔貌を5主徴とする疾患とされた⁴⁾。臨床的に5徴すべてを伴うものを完全型、3徴あるいは4徴にとどまるものを不全型と診断する。

AGSによる胆汁鬱滞は新生児黄疸の遷延や、小児期の黄疸を契機として明らかになることが多い。その程度は皮膚掻痒感にとどまるものから、胆汁性肝硬変により肝不全に至るものまでさまざまである。心血管系の異常は、AGSの90%に合併する^{4)~6)}。肺動脈弁や肺動脈およびその分枝の狭窄が最も多く、他にファロー四徴症、心室中隔欠損症、心房中隔欠損症、大動脈弁狭窄症、大動脈縮窄症などが認められる。骨格系の異常は、蝶型椎骨が最も多く、AGSの70%に見られる⁵⁾⁶⁾。まれながら、二分脊椎や椎骨の癒合も認められることがある。眼科的異常として、角膜周辺の胎生環遺残は頻度が高く、AGSの89%に認められるとの報告もあり^{5)~8)}、診断上極めて意義が大きいとさ

れる。また、AGSの患者は、前額の突出、眼球の陥没、両眼解離、尖状の顎部を示し、全体として三角形の印象を与える顔貌を呈する^{4)~7)}。腎機能あるいは腎形態の異常の合併頻度は20-70%と報告により一定していないが³⁾⁴⁾⁹⁾¹⁰⁾、頻度は高くはないとするものが一般的で、その内容についての多数例での検討はない。その他、AGSに合併する異常として、精神遅滞、身体発育の遅延などの報告がある⁴⁾⁵⁾。AGSの生命予後は、症例によって極めて異なり、肝疾患および心疾患の重症度により規定される。近年では、重症肝不全に至った後、生体部分肝移植により救命される例の報告も増加している¹¹⁾。

この疾患は孤発例も存在するが、家族例が多く、多くは常染色体優性遺伝形式をとることは早くから観察されていた⁷⁾¹²⁾。1986年に、初めて染色体20p12の欠損症例が報告され¹³⁾、1995年の3世代にわたる連鎖分析の結果、20p11.2-p12がAGSの責任領域と考えられた¹⁴⁾。しかし、症例の精力的な集積にもかかわらず^{15)~17)}、同領域に顕微鏡的な欠損を伴う症例は頻度が低く(7%)¹⁵⁾、その後、この領域に存在する遺伝子の検索が始められた1997年にOdaら¹⁸⁾、Liら¹⁹⁾2つのグループによって、独立にこの領域に存在する遺伝子 *jagged1* がAGSの責任遺伝子であることが明らかにされた。

平成13年11月26日受付、平成14年1月21日受理

Abbreviations : AGS, Alagille syndrome; DSL, Delta/Serrate/Lag-2; EGF, epidermal growth factor; SSCP, single strand conformational polymorphism; RFLP, restriction fragment length polymorphism; TBE, Tris-boric-acid EDTA; CR, cystein rich

今回の研究ではAGSの家系において*jagged1*遺伝子異常の同定と、その臨床病型の検討を行った。尚、本研究は金沢大学大学院医学研究科ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて審査中である。

対象および方法

I. 対象

対象は発端者29才女性。正常満期産3250gで出生。新生児期に遷延性黄疸を認め、その後の知能および身体の発育・発達に問題はなかった。12才時に学校検診で心雑音を指摘された。精査目的で近医を受診し、胸部X線撮影にて第8胸椎の蝶型変形を指摘された。引き続き行われた心臓カテーテル検査にて末梢型肺動脈狭窄症と診断された。同時に肝生検が施行され、肝内胆管の低形成が認められた。これらの所見に加え、広い前額、突き出した下顎、両眼解離などからなる特徴的顔貌を認め、AGSと診断された。18才時に特に誘因なく鮮紅色の吐血を来した近医に入院。この時点で肝硬変と食道静脈瘤を指摘された。以後、食道静脈瘤破裂や肝性脳症にて入退院を繰り返した。経過中、徐々に腎機能が悪化したため27才時に腎生検が行われたが、既に終末期腎であった。その後、肝不全が進行し生体肝移植の適応と考えられたが、ドナーが得られず断念した。肝不全に対する内科的治療を継続し、腎不全に対しては血液透析を

導入したが、29才時に肝不全で死亡した。

II. 方法

1. 高分子DNAの抽出

対象の末梢血をEDTA-2Naを抗凝固剤として採取し、これよりTriton X-100融解変法²⁰⁾にて高分子DNAを抽出した。すなわち融解液(320mM ショ糖液, 1% Triton X-100, 5mM MgCl₂, 10mM Tris-HCl, pH 7.6)にて赤血球を溶血させ、遠心分離により白血球を含む沈殿を得た。この沈殿物をプロテアーゼK (Sigma, St.Louis, USA)にて消化後、フェノール-クロロホルム(1:1)で1回、続いてクロロホルム-イソアミルアルコール(24:1)にて2回抽出し、最後にエタノール沈殿によりDNAを分離した。このようにして得られたDNAをTris-EDTA緩衝液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA-2Na, pH 8.0)に溶解し、260nmにおける吸光度測定で収量を求めた。

2. PCR

各々のエクソンの増幅には、Odaら¹⁹⁾が報告した31対のプライマーセットを用いた(表1)。プライマーはDNA合成機モデルABI381A (Applied Biosystems, Inc. Foster City, USA)を用いてベータシアノエチルホスホアミダイト法²¹⁾にて合成した。アンモニア水に溶解して55℃で一晩静置した上で-20℃に冷却、減圧下で遠心して乾燥、再滅菌蒸留水1mlに溶解しカラムNAP-5 (Pharmacia-LKB, Uppsala, Sweden)に通して精製した。

Table 1. Oligonucleotide primers flanking the exons of the human *jagged1* gene for PCR amplification

Exon	Sense primer (5'→3')	Antisense primer (5'→3')
1	TCCAATCGGCGGAGTATATTAGAGC	AGAGGACGGCTGGGAGGGA
2-1	GCGTGACCTACCTACCTTCAACCTCA	CACGATGCGGTTGCGGTC
2-2	GGGGCAACACCTTCAACCTCA	CCAGGCGCGGTTGTGAG
3	AAGGAAGGGGAGTTGGTTTG	GAGAAAAGTCCACAGAAGCGATAC
4-1	GGGAAGAAGGCTGCAATGTGAATA	CTGGGGCGGCACAACCTTATTG
4-2	CCTGTGATGACTACTACTGGCTTTGG	GACACTAAAAGCAACAGGCACACG
5	GCAGTGTGCTGACACGCCCT	AAGAGGCATAGTCACAATAAAGTCAGTTCC
6	AAGGCTAACCTGGAGGTGTGCTG	TCCCACCCTGGGTCTCATCC
7	TGGGTTCCGCATCTTCCACAGG	TCAGCATCACCCAAAAAAGCTTTAGAGA
8	CATCCCTCTCTGACTGCCATCC	ACCTCTCCCCAACGTGGTATCTT
9	TGAATTAATAATTGTCAACCCCTCCTT	TTGGTATAAAAAATTACAGTCACAGGGATG
10	CTCATGCTCATCCCCATCTCCTT	CAGCAAGTCGGCTACCCAAGTTT
11	CACTGTAAATTACCTCTTTAAATGATGAC	GAGCTCTCCTAGTGTGCGACAAAATCT
12	TGAAGCCCTGTGTTTGTCCAATAC	GAAAAGTAAAGGGAAGCGCGGAGGAG
13	CCCTCCCCCTTTTCGCTGTT	AAGTGGGGACAAAAGGAGCAAGT
14	GAATGCCGCATCTGTGGGTG	AGGCTGGGGAGCTCTGGTC
15	AGGAGGGAGCCATGAAAACCTGC	CAACATGACCCATACATCCCAGAG
16	GTGAATGGTCTGGATCTCGTCTT	GCCCCCTCCCACAGAAGACAG
17	GGGGCCACTGGGACTCACAC	CCAGGGGCCAACAGCAGA
18	GATATTTCTCTGGGCTGTTCTTG	CCGACAGCCCTGGGACAGTT
19	GGCTAAGACCGCTTTCCCTGTT	ACGATAGTGGATGAGTGCTGGCTT
20	AGAGTAATGGACTGGGAGGTTGGTAA	AGGCATGGAATGAAGCGGTAAAG
21	CATCAGTCCCTAAACTTGAACCTCATT	CGCYCACCCAGAAAGACCCAY
22	GGCACAGGCATAACCATTTTCATAA	GAAGTGGGCGAGCCATCAT
23-1	TGGCTGCCGCAGTTCACCT	TCTCCTTGTTAAAGGTTAAATGTGATGTTT
23-2	AGTGTGCGGTCTTCCAGTCTCCAG	CAAGCAGACATGGACCACCATTTCAAAA
24	TCTCAATCTTACAGTGTGTGGGTTT	ATCGAATAATGAGGTGTGAATGGGTC
25	AATTTTGAAGAAAGGCTGCTTTGAGTAT	CCTCGACCTGATGGCTTTATTGAA
26-1	TCTTGGAGAGTTAATTGGTTTTGTGC	CCTTGATGGGGACCGTGTG
26-2	GCTGAACCAGATCAAAAACCCCA	TTGTCCAGTTTGGGTGTTTTGTCCG
26-3	GCGTATACGCTGGTAGACAGAGAAGA	GACAGTTTAAAGAACTACAAGCCCTCAGA

さらに200倍に希釈して260nmにおける吸光度測定で濃度を調整し、10pMとした。

DNA断片の増幅にはSaikiら²⁰⁾によるPCR法を用いた。高分子DNA 1 μ gを鋳型DNAとして終濃度40pMのプライマーと終濃度200 μ Mの各デオキシヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) と2.5単位のTaqポリメラーゼ (東洋紡, 東京) を、0.01%ゼラチンを含む緩衝液 (終濃度10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂) に加え再滅菌蒸留水を計50 μ lとなるように加え攪拌した。ミネラルオイル (Sigma) を適量滴下して蒸発を防ぎ、サーマルサイクラーを用いて以下の反応を行った。すなわち、94℃3分の初期変性の後、94℃30秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を30サイクル行い、最後に72℃3分の伸長反応を行った。

増幅したDNA断片は、終濃度0.1%となるようにエチジウムブロマイドを加えた1%アガロースゲルを用いて泳動し、紫外線透過装置上で断片長を確認した。鎖長マーカーとしてスーパーラダー・ロー・dsDNA マーカー・キット (Gen Sura Laboratories, San Diego, USA) を用いた。

3. PCR一本鎖構成体多型 (PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 法

0.5mM EDTA 2 μ l, 滅菌再蒸留水88 μ lを混合し5N NaOH 10 μ lを加えアルカリ溶液を作り、PCR産物8 μ lにアルカリ溶液2 μ lを加え42℃3分、95℃2分加熱後、0℃に急冷し、一本鎖DNAに変性させた。これを20%ポリアクリルアミドゲル (アトー, 東京) を用いて、対照とともに泳動緩衝液中で4℃、60Vで18時間泳動した。泳動用緩衝液はTris-HCl 54g, ホウ酸27.5g, 0.5M EDTA 20mlに蒸留水を加え3lにしたものを保存用の5 \times Tris-ホウ酸-EDTA (Tris-boric acid-EDTA, TBE) 泳動用緩衝液とし、泳動直前に1 \times の濃度に希釈したものをを用いた。

染色にはBio-Rad 銀染色キット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) を用い、プロトコールに従って銀染色を行った。すなわち10%エタノール、5%酢酸混合液200mlにてゲルの固定を行った後、酸化剤100mlにて5分間酸化させた。蒸留水で洗浄の後、銀染色溶液を加え20分間振とうし、さらに蒸留水で洗浄の後、現像液を加え、バンドを出現させた。その後5%酢酸100mlを加え反応を停止させた。

バンドが対照と異なる泳動度を示したものを変異DNAとして検出した。

4. 直接塩基配列決定 (direct sequencing) 法

PCRで増幅したDNA断片を1%アガロースゲルに鎖長マーカーと共に泳動し、断片長を確認した上で目的とするDNA断片のバンドを含む部分を切り出した。ウルトラフリー (Amicon, Denver, USA) とマイクロコン-30 (Amicon) を用いて精製および濃縮を行い、再滅菌蒸留水5 μ lにて抽出したものを、直接塩基配列決定法の鋳型DNAとした。

直接塩基配列決定法はシークエンシング・ハイ・プラス・キット (東洋紡) を用い、ピオチン-アピジン系によるサイクルシーケンシングを行った。反応はサーマルサイクラーを用い、95℃30秒、60℃255秒を30サイクル行った。6%ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド: ビス, 19: 1) を用い、室温のもと1500Vで1-2時間泳動を行った。泳動終了後、ゲルを専用メンブレン (ハイ・ボンド, アマシャムジャパン, 東京) に6-8時間圧着した。その後メンブレンをイメージング・ハイ・キット (東洋紡, 東京) を用いて化学発光させ、レントゲンフィルムに

感光させて現像した。

5. PCR制限酵素切断多型 (PCR-restriction fragment length polymorphisms, PCR-RFLP) 法

変異配列が決定された後、変異の確認の目的で、変異の存在下のみで切断部位が生じる制限酵素を用いて、PCR制限酵素切断多型法を行った。ピペットにてミネラルオイル下層より取り出したPCR産物に特定の制限酵素とその反作用緩衝液を加え、至適条件下で8時間反応させた。その後、終濃度0.1%となるようにエチジウムブロマイドを加えた3%アガロースゲルに鎖長マーカーと共に泳動し、切断の有無で変異の存在を確認した。

6. 家系内調査

発端者の家系図を作成し、家族歴の聴取をおこなった。可能な場合は理学所見、検尿、一般生化学検査、胸部レントゲン写真、心臓超音波検査、腹部超音波検査を行った。

成 績

I. *Jagged1* 遺伝子解析

1. PCR-SSCP法の結果

発端者のPCR-SSCP法にてエクソン17に異常バンドが検出された (図1)。

2. エクソン17の塩基配列の決定

発端者のエクソン17の塩基配列解析の結果、2556insGTGCの変異が見出された (図2)。4塩基挿入によるフレームシフトにより715番目のアミノ酸から変異がおこり、723番目が終始コドンとなる。なお、変化したバンドは正常のバンドと併存しており、発端者は本変異のヘテロ接合体であった。

II. 家系遺伝子解析

1. 家系調査

図3に発端者の家系図を示す。発端者の母親は慢性腎不全透析療法を受けている。母方祖父および母方祖父の弟は50才代で詳細不明の腎疾患で死亡している。母親の異母姉妹に高血圧

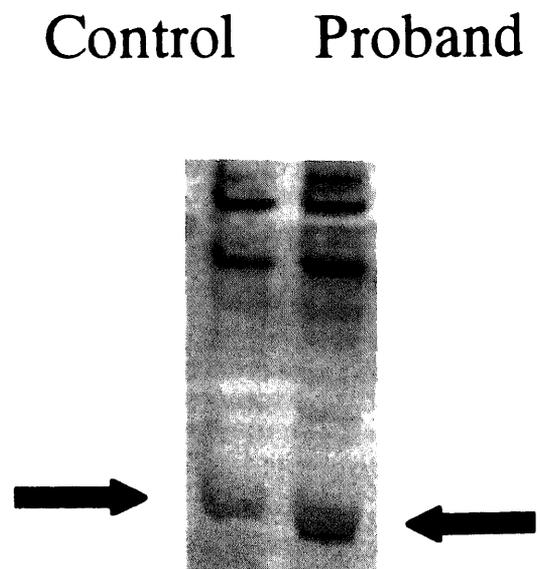


Fig.1. PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) analysis in the exon 17 of *jagged1* gene. The proband shows the abnormal band shift with variant conformer.

症を認めた。発端者の兄は心房中隔欠損症で手術歴があり、蛋白尿を指摘されている。

2. 家族の *jagged1* 遺伝子エクソン17の塩基配列決定

同意の得られた発端者の母親、父親、兄について発端者と同様の方法を用いて末梢血より高分子DNAを抽出し、*jagged1* 遺伝子エクソン17について直接塩基配列決定法を行った。母親、兄に発端者と同様の変異2556insGTGCが見出された。母親、兄ともに本変異のヘテロ接合体であった(図4)。

3. PCR-RFLP法による変異の確認

エクソン17のPCR産物の全長は109塩基対であるが、2556insGTGCがある場合のみ制限酵素 BsiWIにより93塩基対と16塩基対に切断される。図5に発端者と母親、父親、兄、対照のPCR-RFLP法による変異の確認結果を示した。発端者

を含めて、母親、兄において正常のバンドと切断されたバンドの両方が認められ、本変異のヘテロ接合体であることが確認された。

Ⅲ. 臨床像の検討

遺伝子検索をし得た発端者・母親・父親・兄についてその臨床像を検討した(表2, 図6)。

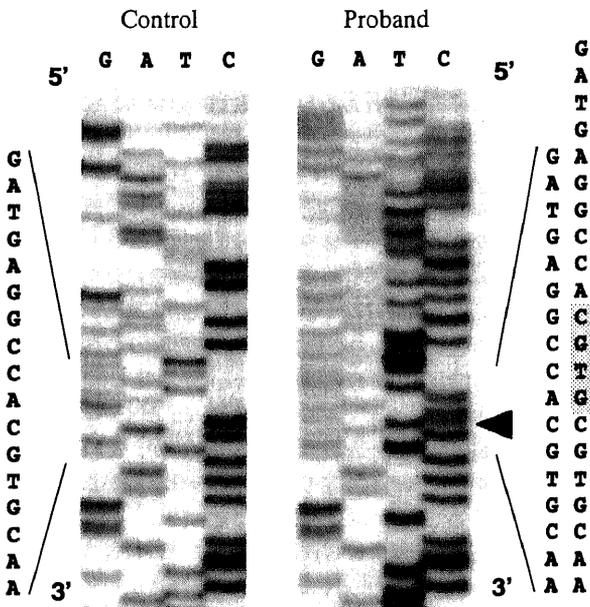


Fig. 2. Direct sequencing of the exon 17 of *jagged1* gene. The proband shows 2556insGTGC.

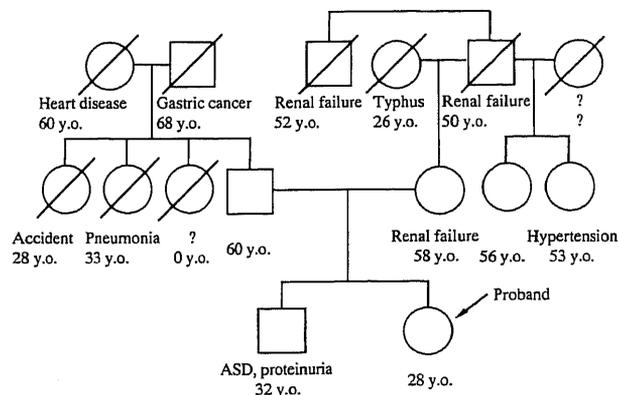


Fig. 3. The pedigree of the family. The arrow in the pedigree indicates the proband. The square and the circle in the pedigree indicate male and female, respectively. Diagonal line indicates the deceased. ASD; atrial septal defect

C P F M B

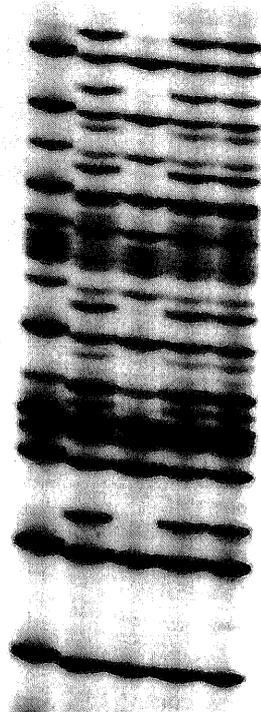


Fig. 4. Direct sequencing of the exon 17 of *jagged1* gene in the family members. Only guanine bands are shown. C, P, F, M and B indicate control, proband, father, mother and her brother, respectively. The proband, her mother and brother show the same ladder pattern.

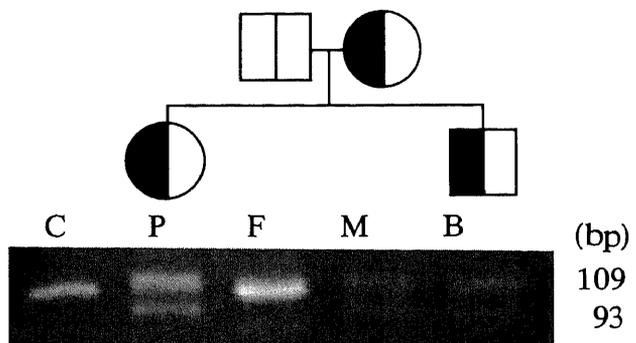


Fig. 5. PCR-RFLP of the exon 17 of *jagged1* gene in the family members digested by BsiWI. C, P, F, M and B indicate control, proband, father, mother and brother, respectively. The proband, mother and brother show the same band pattern.

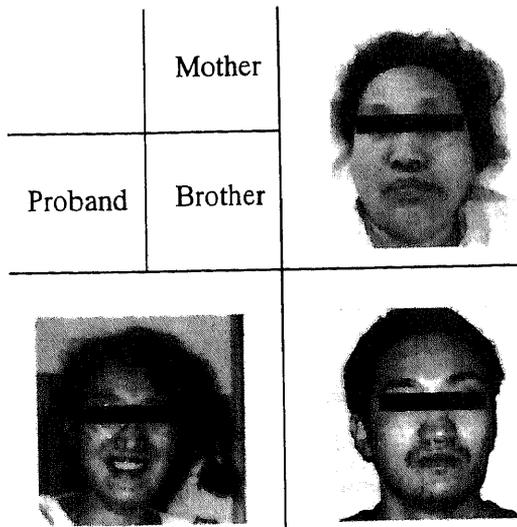


Fig. 6. Characteristic facial features of the affected members.

Table 2. Clinical manifestations of affected members

Subject	Liver	Heart	Eye	Skelton	Face	Kidney
Proband	LC	PPS	-	Butterfly	+	CRF
Mother	-	-	-	-	+	CRF
Brother	-	ASD	-	-	+	Proteinuria

LC; liver cirrhosis, PPS; peripheral pulmonary stenosis, ASD; atrial septal defect Butterfly; butterfly vertebrae, CRF; chronic renal failure.

1. 発端者

腹部超音波検査, 肝機能検査により, 肝硬変を示した。また, 12才時に心臓カテーテル検査にて末梢性肺動脈狭窄症と診断されていた。胸部レントゲン写真にて胸椎の蝶型変形を認めた。両眼解離など, 特徴的な顔貌を示した。腎不全を認めた。眼病変はなし。

2. 母親

慢性腎不全にて血液透析療法を施行されている。原因腎疾患は特定されていない。AGSに特徴的な顔貌を認めた。肝機能障害, 心疾患, 骨格の奇形, 眼病変は認めなかった。

3. 父親

肝疾患, 心疾患, 眼病変, 骨格の異常, 特徴的顔貌, 腎疾患いずれも認めなかった。

4. 兄

幼少時に心房中隔欠損症にて手術を受けた。健康診断で蛋白尿を指摘されているが精査はされていない。特徴的な顔貌を認めた。肝疾患, 骨格の異常, 眼疾患は認めなかった。

考 察

AGSの責任遺伝子 *jagged1* 遺伝子は36kbの鎖長をもち, 26エクソンから構成されている。*Jagged1* 遺伝子の mRNA 相補性 DNA は5942bp で1219アミノ酸からなる JAG1 蛋白に翻訳される。JAG1 蛋白は, Notch 受容体と共に Notch 信号伝達系を構成する Notch 受容体のリガンドである²²⁾²³⁾。

JAG1 蛋白は大きな細胞外領域と, 比較的小さな細胞内領域

および膜貫通領域 (transmembrane) からなる。細胞外領域には種をこえて良く保存された4つの構造が存在する。すなわち, 21アミノ酸からなるシグナルペプチド (signal peptide) ドメイン, 40アミノ酸の Delta/Serrate/Lag-2 (DSL) ドメイン, 16の表皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) 様繰り返し配列, そしてシステインに富む (cystein rich, CR) 領域である。EGF 様繰り返し配列は多くの細胞膜受容体に共通の配列で, システインを多く含みジスルフィド結合によって分子の立体構造を形成すると考えられる。DSL ドメイン, EGF 繰り返し配列, CR 領域がリガンドと受容体の相互作用に重要と考えられている^{23)~25)}。

JAG1 蛋白は, ヒト成人の胃, 甲状腺, 脊髄, リンパ節, 気管, 副腎, 骨髄, 心臓, 肺, 骨格筋, 腎臓, 脾臓などあらゆる組織に発現している¹⁹⁾。ヒト胚および胎児組織における生体内局所ハイブリダイゼーションによる検討では, 心臓, 大動脈などすべての分化途上の血管, 眼球, 腎尿管, 肺, 胃, 十二指腸, 内耳, 四肢での発現が認められる²⁶⁾²⁷⁾。また, 新生児の肝組織では, 胆管上皮と zone 3 の肝細胞に発現していることが明らかになっている²⁸⁾。これらの JAG1 蛋白発現部位は AGS の症状発現部位に合致する。

Notch 信号伝達系は, 種間で極めて良く保存されており, *Drosophila melanogaster* や *Caenorhabditis elegans* で詳細に検討された。この系は, 隣接する細胞に信号を伝達することによって, 多能性幹細胞がある特定の機能を有する細胞に分化する過程を制御し, 分化のある段階で停止させる役割を果たす。異常な Notch 遺伝子を1つ持つ *Drosophila melanogaster* のヘテロ接合体は羽根に特徴的な切れ込み (notch) が出現し, これが Notch 遺伝子の名称の由来である。異常 Notch 遺伝子のホモ接合体の *Drosophila melanogaster* は生存し得ないが, その個体は中枢神経系の異常な過形成を示し, 細胞の分化誘導が正しく行われず, ある段階で停止してしまうことを示唆している²²⁾²⁹⁾。

今回見出した変異 2556ins GTGC はこれまでに報告のない新しい変異であった。AGS 患者における *jagged1* 遺伝子異常は今回のものを含めこれまでに234種の報告がある^{18)19)30)~37)}。これらの変異はすべて JAG1 蛋白の細胞外領域と膜貫通領域に分布しており細胞内領域での変異の報告はない。高頻度で見出される特定の变異はないものの, 各エクソンにおいて見られる変異の数にはある程度の偏りが見られる。すなわち, 全コード記述領域の28%を占めるエクソン2, 4, 9, 17, 23に既報の変異の40% (90例/233例中) が存在する。さらに25%の変異がエクソン1, 5, 6, 12, 20上にあり, 結果的にすべての変異のうち68%が全26エクソンのうちの11個のエクソンに存在することになる。今回見出した変異も報告の多いエクソン17上に存在した。

また報告されている変異の大半 (168/233) は早期に終始コドン形成してしまうナンセンス変異またはフレームシフト変異につながる数塩基の欠失または挿入変異である。今回の変異も早期終始コドンを723番目のアミノ酸に生じるフレームシフト変異であった。他にミスセンス変異が233例中31例, mRNA の異常なスプライシングにつながると思われるスプライス部位の変異が233例中34例報告されている³⁸⁾。

今回見出した変異も含め, ナンセンス変異または早期終始コドンを生じるフレームシフト変異によって, 生成される JAG1 蛋白は膜貫通部位を欠くため, 細胞膜に発現しない。よってこ

のようなヘテロ接合体においてはNotch受容体に対するリガンド刺激は野生型の約半量となり、これがいわゆるハプロ不全(haploinsufficiency)としてAGSの表現型をとると考えられる(27)37)。AGSの約7%は肉眼的に確認できる染色体20p12領域の欠損によることは既に述べたが、このような例では*jagged1*の対立遺伝子の1つは完全に欠損しており、これはAGSがJAG-1蛋白のハプロ不全で発症することを強く裏付ける。さらに、*Drosophila melanogaster*においては、膜貫通部位を欠くJAG1蛋白が分泌型として存在し、低い生理活性で量依存効果を示したり、優性陰性効果(dominant negative effect)により疾患起因性となる可能性も検討されている³⁰⁾。優性陰性効果とは、変異蛋白が野生型蛋白の生理活性を阻害することで、具体的には、分泌型JAG1蛋白がNotch受容体への野生型JAG1蛋白の結合を競合的に阻害する機構や、分泌型JAG1蛋白が野生型JAG1蛋白とヘテロ重合体を形成し、Notch受容体との結合能を喪失させてしまう機構が考えられている。ミスセンス変異では、ジスルフィド結合や糖鎖の得失によって蛋白の3次構造を変化させ、生理活性が変化することにより疾患起因性となると考えられている³⁰⁾。しかしこれらの機構はヒトでは明らかにされていない。AGSでは遺伝子型と表現型の連関が明らかでないとしてきた。同一の*jagged1*の変異を持つAGSの表現型が一致しないばかりか、染色体20p12の欠損が明らかな群、*jagged1*の単一遺伝子異常の証明された群、どちらも見出されないが臨床的にAGSと診断されている群の群間でも、その表現型に明らかな差異は認められていない。また、同一家系内における検討でも表現型は個体によってかなり異なるとされている^{30)~35)}。今回の研究では発端者およびその母親、発端者の兄が*jagged1*遺伝子の2556insGTGCを有していた。しかし、その表現型は著しく異なり、母親と兄は、古典的な診断基準では肝病変を欠くため、AGSの不全型の診断にも至らなかった。

Yuanら³⁵⁾はAGSの18例における検討で、肝障害の重症度と*jagged1*の変異部位に関係があることを見出した。すなわち、肝不全に至った重症例5例中4例でDSLドメインの欠失変異を認めたが、非重症例13例においてはDSLドメインの異常を認めた例は皆無であった。同一家系の他の変異保持者の臨床像には言及されておらず不明である。今回の対象の発端者は肝不全で死亡しているがその*jagged1*変異はEGF様繰り返し配列に存在していた。

今回の対象の家系では、*jagged1*変異を有した発端者、母親、兄はいずれも腎機能異常を有していた。発端者と母親は終末期腎不全であり、兄は顕性蛋白尿を認める。また、遺伝子検索はされていないが、母方の家系に詳細不明の腎疾患を認め、AGSの症候である可能性がある。本家系においてはAGSでは比較的低頻度とされる腎病変が顕著であるといえる。Krantzら⁶⁾³¹⁾の報告を検討すると腎機能異常を呈す変異は同じくEGF様繰り返し配列上に多い傾向があるが、多数例の検討はなく相関関係は不明である。

これまでの報告によると、古典的な臨床的診断基準で診断されたAGS患者のうち、*jagged1*遺伝子に異常を認めるものは、染色体の部分欠損例も含めて70%内外とされている³⁶⁾。先に述べたように*jagged1*遺伝子異常の有無によってAGSの臨床症状に特徴はないとされている。いずれの報告もSSCP法を用いて遺伝子異常を検出しているため、偽陰性の可能性も否定はできないが、一方でNotch信号伝達系上の他の部位やNotch信号

伝達系以外の系に存在する遺伝子異常のAGSへの関与を示唆している可能性もあり、今後の検討が待たれる。また、*jagged1*遺伝子の変異が同一でも表現型が全く異なる事実は、*jagged1*遺伝子異常を有するAGSも、同様に他の要素の介在を示すものかもしれない。

*Jagged1*遺伝子異常がAGSの主たる原因であることが判明してから、AGSの古典的な診断基準を満たさないAGSの症例が明らかになってきたのに加え、逆にこれまでAGSとは無関係であったと考えられてきた疾患に*jagged1*遺伝子異常が見出され、AGSの部分症として捉え直される可能性も生じてきた。Eldadahら⁴⁰⁾は家族性にファロー四徴を示す1家系で*jagged1*のミスセンス変異(G821A)を同定した。この家系内にはAGSの他臓器病変は見出されなかった。Krantzら⁴¹⁾も*jagged1*ナンセンス変異で孤発性の心疾患例2例を報告している。今後原因不明でAGSとは全く無関係と思われていた肝疾患や腎疾患でも同様に*jagged1*の異常が同定され、AGSの疾患概念がさらに拡大する可能性は高いと考える。

結 論

AGS家系において*jagged1*遺伝子の解析と臨床病型の検討を行い以下の結論を得た。

1. AGS家系の発端者にこれまでに報告のない変異2556insGTGCを見出した。
2. 同変異により早期終始コドンが生成され、疾患起因性と考えられた。
3. 同一の変異が発端者の母親および兄にも認められた。
4. 同一の変異を有するにもかかわらず、発端者、母親、兄の臨床病型は著しく異なった。また本家系においては腎病変が顕著であった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御検閲を賜りました恩師金沢大学大学院血管分子遺伝学講座馬淵宏教授ならびに直接御指導頂きました岡田俊英講師に深甚なる謝意を申し上げます。また、終始御助言および御協力を頂きました塩野雄太氏、金田恭子氏、血管分子遺伝学講座第5研究室各位に厚く御礼申し上げます。また多大なる御協力を賜りました福井県立病院内科木藤知佳志先生、辰巳靖先生、伊部直之先生に感謝申し上げます。

本研究の一部は第35回肝臓学会総会(1999年、東京)、第96回内科学会総会(1999年、東京)において発表した。

文 献

- 1) Alagille D, Habib EC, Thomassin N. L'atresie des voies biliaires intrahepatiques avec voies biliaires extrahepatiques permeables chez l'enfant. A propos de 25 observation. Paris: Editions Medicales Flammarion, 1969: 301-318
- 2) Watson GH, Miller V. Arteriohepatic dysplasia, familial pulmonary arterial stenosis with neonatal liver disease. Arch Dis Child 48: 459-466, 1973
- 3) Riely CA, Cotlier E, Jensen PS, Klatskin G. Arteriohepatic dysplasia: a benign syndrome of intrahepatic cholestasis with multiple organ involvement. Ann Intern Med 91: 520-527, 1979
- 4) Alagille D, Estrada A, Hadchouel M. Syndromic paucity of intralobular bile duct. J Pediatr 110: 195-200, 1987
- 5) Alagille D. Alagille syndrome today. Clin Invest Med 19: 325-30, 1996

- 6) Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB. Alagille syndrome. *J Med Genet* 34: 152-157, 1997
- 7) Henriksen NT, Langmark F, Sorland SJ. Hereditary cholestasis combined with peripheral pulmonary stenosis and other anomalies. *Acta Paediatr Scand* 66: 7-15, 1977
- 8) Deprettere A, Portman B, Mowart A. Syndromic paucity of the intrahepatic bile ducts: diagnostic difficulty; severe morbidity throughout early childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 6: 865-871, 1987
- 9) Mueller RF, Pagon RA, Pepin MG. Arteriohepatic dysplasia: phenotypic features and family studies. *Clin Genet* 25: 323-331, 1984
- 10) Berman MD, Ishak KG, Schaefer EJ. Syndromic hepatic ductular hypoplasia (arteriohepatic dysplasia): a clinical and hepatic histologic study of three patients. *Dig Dis Sci* 26: 485-497, 1981
- 11) Tzakis AG, Reyes J, Tepetes K. Liver transplantation for Alagille's syndrome. *Liver Transpl* 128: 337-339, 1993
- 12) LaBrecque DR, Mitros FA, Romanchuk KG, Judisch GF, El-Khoury GH. Four generations of arteriohepatic dysplasia. *Hepatology* 2:467-474, 1982
- 13) Byrne JLB, Harrod MJ, Friedman JM, Howard-Peebles PN. Del (20p) with manifestations of arteriohepatic dysplasia. *Am J Med Genet* 24: 673-678, 1986
- 14) Hol FA, Hamel BC, Geurds MP, Hansmann I, Nabben FA, Daniels O, Mariman ECM. Localization of Alagille syndrome to 20p11.2-p12 by linkage analysis of a three-generation family. *Hum Genet* 95: 687-690, 1995
- 15) Krantz ID, Rand EB, Genin A, Hunt P, Jones M, Louis AA. Deletions of 20p12 in Alagille syndrome: frequency and molecular characterization. *Am J Med Genet* 70: 80-86, 1997
- 16) Spinner NB, Rand EB, Fortina P, Genin A, Taub R, Semeraro A, Piccoli DA. Cytologically balanced t (2; 20) in a two-generation family with Alagille syndrome: cytogenetic and molecular studies. *Am J Hum Genet* 55: 238-243, 1994
- 17) Anad F, Burn J, Matthews D, Cross I, Davison BCC, Mueller R. Alagille syndrome and deletion of 20p. *J Med Genet* 27: 729-737, 1990
- 18) Oda T, Elkhoun AG, Pike BL, Okajima K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC. Mutations in the human *jagged1* gene are responsible for Alagille syndrome. *Nat Genet* 16:235-242, 1997
- 19) Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont MEM, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB. Alagille syndrome is caused by mutations in human *jagged1*, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 16: 243-251, 1997
- 20) Vandenplas S, Wild I, Rabie AG, Brebner K, Ricketts M, Wallis G, Bester A, Boyd C, Mathew C. Blot hybridization analysis of genomic DNA. *J Med Genet* 21:164-172, 1984
- 21) Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166, 1986
- 22) Artvanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. Notch signaling. *Science* 268: 225-233, 1995
- 23) Lindsell CE, Shawber DJ, Boulter J, Weinmaster G. Jagged: a mammalian ligand that activates Notch 1. *Cell* 80: 909-917, 1995
- 24) Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artvanis-Tsakonas S. Specific EGF repeats of Notch mediates interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *67: 687-699*, 1991
- 25) Artvanis-Tsakonas S. Alagille syndrome-a notch up for the Notch receptor. *Nat Genet* 16:212-215, 1997
- 26) Crosnier C, Attie-Bitac T, Audollent S. Expression of JAGGED1 gene in human embryos. *Am J Hum Genet* 65: A174, 1999
- 27) Loomes KM, Underkoffler LA, Morabito J. The expression of Jagged1 in the developing mammalian heart correlate with cardiovascular disease in Alagille syndrome. *Hum Mol Genet* 8: 2443-2449, 1999
- 28) Louis AA, Van EP, Haber BA. Hepatic *Jagged1* expression studies. *Hepatology* 30: 1269-1275, 1999
- 29) Artvanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776, 1999
- 30) Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J, Kobayashi N, Yamada M. Mutational analysis for the *jagged1* gene in Alagille syndrome families. *Hum Mol Genet* 7: 1363-1369, 1998
- 31) Krantz ID, Colliton RP, Genin A, Rand EB, Li L, Piccoli DA, Spinner NB. Spectrum and frequency of *Jagged1* (*JAG1*) mutations in Alagille syndrome patients and their families. *Am J Hum Genet* 62:1361-1369,1998
- 32) Onouchi Y, Kurahashi H, Tajiri H, Ida S, Okada S, Nakamura Y. Genetic alterations in the *JAG1* gene in Japanese patients with Alagille syndrome. *J Hum Genet* 44: 235-239, 1999
- 33) Crosnier C, Draincourt C, Raynaud N, Dhorne-Pollet S, Pollet N, Bernard O, Hadchouel M, Meunier-Rotival M. Mutations in *JAGGED1* gene are predominately sporadic in Alagille syndrome. *Gastroentology*116:1141-1148, 1999
- 34) Heritage ML, MacMillan JC, Colliton RP, Genin A, Spinner NB, Anderson GJ. *Jagged1* (*JAG1*) mutation detection in an Australian Alagille syndrome population. *Hum Mutat* 16:408-416, 2000
- 35) Yuan ZR, Okaniwa M, Nagata I, Tazawa Y, Ito M, Kawarazaki H, Inomata Y, Okano S, Yoshida T, Kobayashi N, Kohsaka T. The DSL domain in mutant JAG1 ligand is essential for the severity of the liver defect in Alagille syndrome. *Clin Genet* 59: 330-337, 2001
- 36) Spinner NB, Colliton RP, Krantz ID, Hadchouel M, Meunier-Rotival M. Jagged1 mutations in Alagille syndrome. *Hum Mutat* 17: 18-33, 2001
- 37) Wilkie AOM. Molecular basis of genetic dominance. *J Med Genet* 31: 89-98, 1994
- 38) Sun X, Artvanis-Tsakonas S. The intracellular deletions of

Delta and Serrate define dominant negative forms of the Drosophila Notch ligands. *Development* 122: 2465-2474, 1996

39) Morrissette JJD, Colliton RP, Spinner NB. Defective intracellular transport and processing of *JAG1* missense mutations in Alagille syndrome. *Hum Mol Genet* 10: 405-413, 2001

40) Eldadah ZA, Hamosh A, Biery NJ, Montgomery RA, Duke

M, Elkins R, Dietz HC. Familial tetralogy of Fallot caused by mutation in the *jagged1* gene. *Hum Mol Genet* 10: 163-169, 2001

41) Krantz ID, Smith R, Colliton RP, Tinkel H, Zackai EH, Piccoli DA, Goldmuntz E, Spinner NB. *Jagged1* mutations in patients with isolated congenital heart defects. *Am J Med Genet* 84: 56-60, 1999

Mutational analysis of the *jagged1* gene and clinical examination of a family with Alagille syndrome Hiro Satoh, Department of Molecular Genetics of Cardiovascular Disorders, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 – *J. Juzen Med Soc.*, **111**, 66 – 73 (2002)

Key words Alagille syndrome, *jagged1*, Notch1, JAG1

Abstract

Alagille syndrome (AGS) is an autosomal dominant inherited disorder characterized by five major abnormalities in the liver, heart, eye, vertebrae, and face. This syndrome is clinically diagnosed by the presence of intrahepatic bile duct paucity proved by histology and at least three of other abnormalities. The responsible gene has been recently identified as the human *jagged1* gene, which encodes a ligand for Notch-1 receptor. The aim of this study is to identify the *jagged1* mutations in an AGS family and to examine their clinical manifestations. The proband was a 28 years old female who died of hepatic failure due to biliary cirrhosis. A DNA sample was extracted from the peripheral whole blood. All *jagged1* exons were amplified by PCR and screened by SSCP. Subsequently the DNA fragments with abnormal SSCP bands were analyzed by the direct sequencing method. A novel *jagged1* mutation, 2556insGTGC, was identified in the proband. This mutation makes a premature stop codon, which leads to a truncated protein. Analysis of other family members revealed her mother and brother had the same mutation. The proband could be diagnosed clinically as AGS because she had typical AGS manifestations such as cholestatic liver disease, peripheral pulmonary artery stenosis, butterfly vertebrae, peculiar face, and choric renal failure. Her mother had chronic renal failure and peculiar face, and her brother had atrial septal defect, renal dysfunction and peculiar face. However they could not be diagnosed as AGS, in spite of the presence of *jagged1* mutation, because of the lack of hepatic manifestation. This AGS family was characterized by prominent renal manifestations, even though renal involvement is relatively rare in AGS.