

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

題目(中):結節性硬化症:TSC2 基因變異與相關表現型研究

題目(英):Tuberous sclerosis: TSC2 changes and genotype-phenotype correlation

計畫編號: NSC 88-2314-B-002-170

執行期限: 87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

主持人: 侯家瑋 執行機構及單位名稱: 台大醫學院小兒科

## 一、中文摘要

結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex, TSC) 是一種可影響多數身體器官的顯性遺傳疾病, 包括腦、皮膚、腎臟、心臟及其它內臟器官或組織均可能發生症狀(缺陷瘤為主), 常表現出皮膚病變、抽搐及智障。第二型結節硬化症基因(TSC2)是一個較大的基因, 包含了 41 個 exons, 約有 43kb 的 DNA。本研究的目的乃在評估病人臨床症狀的差異與所帶基因變異的關聯性。利用 Southern blotting, SSCP 及 DNA 定序等方法去篩檢較大基因片段異常, 較小的突變並與臨床表現做比較分析。本研究在大規模 TSC2 之 exons 篩檢後結果顯示基因變異有: nonsense (C1531T:1; C2269T:1; C4393T:3), missense (G1850A:1; C4947G:1; C5042T:1), in-frame deletion (5266 del 18bp:4), 以及多基因缺損 (TSC2-RTS:1)。最後一種情況並由螢光性原位雜交法(FISH)證實為大片段的基因缺損。經由基因型及臨床表現型的比較分析, 發現 nonsense 者之臨床預後較差即有較厲害的智障及癲癇症發生, 推定乃基因提早停止功能, 使其最終蛋白質產物 tuberin 嚴重不足所致。另外在 18 名 TSC 病人當中(包括父或母親 3 名), 有 15 名呈現 TSC2 基因反應, 顯示第二型 TSC 較第一型發生率為高, 可能與第一型症狀較緩和(因此不易早期診斷)有關。另外 TSC2 基因有較多的大片段基因缺損 TSC 病人也會有腎囊腫或罕見的 Rubinstein-Taybi 二氏症, 亦顯示在染色體區域 16p13.3 處的確存在一個相鄰基因症候群(contiguous gene syndrome)。

**關鍵詞:** 結節性硬化症, TSC2 基因, 常染色體顯性多囊腎, 染色體 16, Rubinstein-Taybi 二氏症。

## Abstract

Tuberous sclerosis complex (TSC) is an inherited tumor suppressor syndrome, characterized by a broad phenotypic spectrum that can include seizures, mental retardation, renal dysfunction, and dermatological abnormalities. It is an autosomal dominant neurocutaneous disorder associated with the growth of hamartomas (tumor-like malformations) in many tissues and organs, including brain, skin, heart, and kidney. The TSC2 gene consists of 41 exons, spanning 43kb of genomic DNA. To evaluate the differences in the clinical phenotype of the patients and the underlying mutations, we performed Southern blotting analysis, SSCP analysis and DNA sequencing to screen for large abnormalities, smaller mutations in the TSC2 gene, along with the clinical manifestations. After intensive screening of the exons of TSC2 gene, the results revealed several different mutations: nonsense (C1531T:1; C2269T:1; C4393T:3), missense (G1850A:1; C4947G:1; C5042T:1), in-frame deletion (5266 del 18bp:4), and multigene deletion (TSC2/RTS:1) which is proved by fluorescence in situ hybridization using the probe RT203 and E4F1. The comparison of clinical manifestation and mutational changes showed the patients harboring the nonsense mutation have poor prognosis, when they are more prone to the occurrence of epilepsy or mental retardation. The result also

showed TSC2 (15/18) has higher prevalence than TSC1, possibly due to the milder phenotype in TSC1 patients. Besides, a contiguous gene syndrome does exist in the chromosomal region 16p13.3, because of the more frequent larger abnormalities associated with complicated phenotype (eg, RTS-TSC2-PKD).

**Keywords:** tuberous sclerosis, TSC2 gene, autosomal dominant polycystic kidney disease, chromosome 16, Rubinstein-Taybi syndrome

## 二、緣由與目的

結節性硬化症(Tuberous sclerosis, TSC)是一種常見引起抽搐及智障的顯性遺傳疾病，它可造成許多器官之缺陷瘤(hamartomatous growths)。在最近十年有關TSC的研究是一個熱門的話題，然而因為它臨床表現的多樣性常造成TSC診斷的不易，其盛行率亦仍未有定論。實際上的發生率應較臨床上觀察到的典型病例為高(新生兒約1/6000)。有些極輕微的病例或較大年齡才出現部分症狀的病例常被忽略。TSC的三大表徵包括抽搐(如嬰兒性痙攣，複雜性部分發作或肌陣攣)，皮膚病變及程度不一的智障[1]，另外TSC亦常合併心臟橫紋肌瘤，多囊性腎疾病(與家族性顯性遺傳多囊腎-ADPK臨床上無法區分，常需組織病理學或遺傳學上進一步鑑別)，此合併症常造成致死的病例。結節性硬化症雖然已被公認為常染色體顯性遺傳，但仍有不少病例是由新突變產生。由於TSC常見的遺傳歧異性，高自然突變率，及極度變化或與年齡依存性的臨床表現症，使它的基因診斷實為不易。目前已知有兩種致病的基因TSC1及TSC2，前者定位於9q34，後者則是16p13.3[2]。TSC基因變化相當多種，可能對造成TSC臨床表徵不同的嚴重程度。由於腎臟囊腫(renal cyst)是此病常見的合併症之一，又常染色體顯性多囊腎疾病基因(PKD1)亦位於16p13.3，顯示PKD1與TSC2基因除了位置相近外，在結節性硬化症病人合併多囊

腎可能是PKD1受到波及導致去活化(位置的關係)或一併缺失產生的結果。吾等研究TSC病人，及其家族成員，經由詳細的理學檢查(尤其是皮膚、牙齒及眼底的變化)及影像分析(如內臟超音波、核磁共振檢查)找出結節性硬化症是否合併腎囊腫(尤其早期無症狀者)，以研究是否於16p13.3區域有一種所謂“相鄰基因症候群”的存在。由於腎疾是結節性硬化症病人第二大死因(第一為腦內腫瘤)，早期偵測腎病變，並評估腎功能具有早期防治的意義。另外由TSC2與PKD1基因及周圍16p13.3相關基因的研究，除了可提供國內對此遺傳疾病診斷的服務外，並可由基因型-表現型的分析了解病情的預後及探討致病的機轉。

本研究將以遺傳學方法先區分TSC1及TSC2(先行篩檢)，並比較其表現型的不同，之後重點放於TSC2與腎囊腫病變的病例，期望發現不同的突變型態(點突變，16p13.3小微細缺失及較大微細缺失)與TSC2臟器合併症(缺陷瘤或其他腫瘤生長)的關係。

## 三、結果

共有15名臨床上呈現典型TSC症狀的病人及3名父母接受抽血檢查，並經由PCR-SSCP, DNA定序及FISH等研究，結果如表一及表二。

表一 TSC2 基因之致病突變

突變	exon	突變型態	人數
C1531T	14	Nonsense	1
C2269T	20	Nonsense	1
C4393T	33	Nonsense	3
G1850A	16	Missense	1
C4947G	37	Missense	1
C5042T	38	Missense	1
5266 del 18bp	40	In-frame deletion	4
del TSC2-RTS		Multigene deletion	1

表二 TSC2 表現型與基因型比較

	Nonsense (n=5)	Missense/ in-frame deletion (n=7)	multigene deletion (n=1)
臉部血管纖維瘤	4	4	0
低色素斑	5	6	1
腦部結節硬化	5	5	1
抽搐	5	4	1
智障	5	4	1
腎囊腫	1	0	1
RTS	0	0	1

#### 四、討論

早期在國內 TSC 只有少數病例報告，直到 1994 年，Hou 等有系統地整理 TSC 病人(1 至 18 歲)之症狀型態及其病程[1]，發現只有三分之一有家族史，其他均屬新突變散發性病例。由於症狀較不明顯的病例常造成診斷上的困難，DNA 技術的發展乃日趨重要。稍早以 gene linkage study 標定 TSC 的基因位於 9q 位置，之後更多的家族分析發現了 TSC 的遺傳多變性(genetic heterogeneity)，位於染色體 9q 上的 TSC 基座(9q34)稱為 TSC1，另一個基座 TSC2 則由 TSC 合併 ADPK(第一型基座 PKD1 在 16p13.3)的家族研究確定。臨床上 TSC1 及 TSC2 異常造成的 TSC 表現型(phenotype)雖無明顯差別，但包括本研究顯示由於 TSC2 的基因變化較大，也較易有大片段的缺損，與 TSC1 多見的點突變有些差異，故症狀也較明顯，也可解釋為何 TSC2 的發生率較 TSC1 較高(許多因症狀不特異而未被診斷出)。TSC2 基因的變化包括 1-5kb 的缺失，甚至更小的突變均可形成 TSC 的臨床表徵[2,3]。TSC2 基因(41 exons)可轉錄 5.5kb 的 transcript (mRNA)，並在體內廣泛表現蛋白質產物 tuberin(此與 GTPase-activating protein GAP3 有相似的區域)，與細胞增生及分化的調控有關，類似 tumor suppressor gene 的角色，本研究結果顯示 TSC2 基因有各式的突變，包括 nonsense, missense, in-frame deletion 及更大的 multigene deletion(如表一)。其結果將造成品質不良的或無蛋白質產物。Nonsense 病例由於 tuberin 產物少，

將更容易有癲癇症產生，亦即智障的可能性就變大[1]，預後也較差。TSC2 基因已被證實恰在 PKD1 基因旁(染色體 16p13.3 區域)，而且相當數目的相鄰基因缺失亦在 TSC 及多囊性腎疾病病例出現。Rubinstein-Taybi 二氏症(RTS)是一種罕見的畸形症候群，發生率為十二萬五千分之一，主要表現寬大的拇指及大腳趾、特殊臉型、肌肉低張力症及發育遲緩。在本研究中有一名六歲男童出現抽搐，皮膚白斑及典型的 RTS 症候，經由螢光原位雜交法(以 16p13.3 位置 cosmid 為探針)及上述分子遺傳方法證實這裡有多基因的缺損，證實了於 16p13.3 存在一種相鄰基因症候群。由於三分之二的 TSC 病例為新突變，遺傳諮詢的工作是非常困難的，此病再發危險率由不到 1%到 50%。正確的遺傳諮詢除了完整的臨床檢查(雙親及其他家族成員)，包括皮膚檢查(如低色素斑以 Woods 光檢測)，眼底甚至 CT，超音波常是必要的。產前診斷目前仍有許多困難需突破，利用 Southern blot analysis 可偵檢出部分帶有較大 TSC2 缺失的病例。由於 TSC2 基因約有 45kb，含高達 41 個 exons，每個 exon 由 70 至 213bp 甚至最大 488bp 組成，因此欲直接測出 TSC2 突變是相當困難的。基因缺失仍不易直接檢測，由分子遺傳學研究應可應用於診斷仍需更多的努力。由於 TSC2 基因突變的偵測仍是 TSC2 遺傳診斷的重要步驟之一，因此若欲推展 TSC 的遺傳診斷，除了已知家族內突變方式外，應可利用 tuberin 蛋白質截斷試驗(protein truncation test)直接偵測 TSC2 基因之 mRNA 產物是進一步欲建立的目標。

#### 五、計畫成果自評

##### 一、預期完成之工作項目：

1. 確定 TSC 之分子遺傳學層次的診斷，可應用於早日偵測次臨床(subclinical)腦波異常與治療抽搐(減少智障機會或其嚴重程度)，矯正學

習障礙及行為問題(TSC 常見的  
唯一症狀), 並偵檢出 TSC 之合  
併症, 以提供遺傳諮詢之正確訊  
息。

2. 經由基因型 – 表現型關聯分析  
給予 TSC 病人預後評估(研究報  
告中正常 IQ 病人與無抽搐發作  
有關, 此原因及與遺傳變異型式  
有關)。
3. 由 TSC, TSC + infantile  
polycystic kidney 或 + RTS 病  
人之基因分析, 得知的確存在  
16p13.3 區域微細缺失之一種相  
鄰基因症候群(contiguous gene  
syndrome)。

## 二、對於學術研究、國家發展及其他應用 方面之貢獻:

1. 對 TSC, ADPKD 及 RTS 病人及家  
族提供優生保健服務。
2. 對 16p13 上面之其他重要基因功  
能如 RTS 有更進一步的了解。
3. 建立本土 TSC2, RTS 及 ADPKDI  
的基本資料, 提供 TSC 進一步研  
究的基礎。

## 三、對於參與研究者獲得之訓練:

1. 結合臨床與分子遺傳學之研究  
方法。
2. 對國人常見遺傳疾病之可能致  
病基因探索, 並建立於產前診  
斷與家族分析之流程。

## 六、參考文獻

- [1] Hou JW, Wang PJ, Wang TR (1994): Tuberous  
sclerosis in children. *Acta Paediatr Sin* 35:102-  
107.
- [2] Jones AC, Daniells CE, Snell RG, et al (1997):  
Molecular genetic and phenotypic analysis  
reveals differences between TSC1 and TSC2

- associated familial and sporadic tuberous  
sclerosis. *Hum Mol Genet* 6:2155-2161.
- [3] Au KS, Rodriguez JA, Finch JL, et al (1998):  
Germ-line mutational analysis of the TSC2 gene  
in 90 tuberous-sclerosis patients. *Am J Hum  
Genet* 62:286-294.