

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K21079

研究課題名(和文) 裂手裂足症を招く新規疾患成立機序の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms that causes SHFM

研究代表者

永田 絵子(NAGATA, EIKO)

浜松医科大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90535569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：裂手裂足症は、単独で発症するタイプと、裂手裂足症+脛骨形成不全や裂手裂足症+大腿骨形成不全などの関連疾患の一部の表現型として発症するタイプに大別される。我々は現在までに140家系以上のSHFM、SHFLD、GWCの患者を集積した。ほぼ当初計画通りに進め、時に分子遺伝学的解析手法の変更などを含めて、連携協力者と協力して研究を遂行した。次世代シーケンサーの遺伝子解析において、複数の患者に塩基置換が同定された遺伝子を候補遺伝子としていくつかの遺伝子を同定し、マウスにて発現部位の解析を行った。最終年度の成果では、新規のSHFMの候補遺伝子として、LRP6およびUBA2が可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

裂手裂足症は、単独で発症するタイプと、裂手裂足症+脛骨形成不全や裂手裂足症+大腿骨形成不全などの関連疾患の一部の表現型として発症するタイプに大別される。我々は現在までに140家系以上のSHFM、SHFLD、GWCの患者を集積した。計画通りに進め、時に分子遺伝学的解析手法に関して、連携協力者と協力して研究を遂行した。次世代シーケンサーの遺伝子解析、マウス等の解析において、いくつかの遺伝子を同定し、最終年度の成果では、新規のSHFMの候補遺伝子として、LRP6およびUBA2が可能性があることを見出した。今後これらの候補遺伝子を研究することによって四肢および指趾の再生医療等に貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Split-hand/foot malformation (SHFM) is a clinically and genetically heterogeneous condition. We sequentially performed screening of the previously identified gene mutation, array comparative genomic hybridization, and whole exome sequencing (WES) in recruited 140 Japanese families with nonsyndromic and syndromic SHFM. Consequently, we identified not only known pathogenic CNVs and rare variants in known causative genes, but also a de novo 19q13.11 deletion disrupting UBA2 and variants that probably affect function in LRP6 and UBA2. Furthermore, the results together with previous data such as the development of SHFM in Lrp6 knockout mice, the presence of SHFM in two subjects with 19q13 deletions involving UBA2, and strong mouse Uba2 expression in the developing limb buds, imply that LRP6 and UBA2 represent plausible candidate genes for SHFM.

研究分野：希少疾患

キーワード：臨床遺伝学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

裂手裂足症 (Split-hand/foot malformation, SHFM) は、約出生 2 万人当たり 1 人の発症率で認められる先天性四肢末端形成異常であり、中央列 (第 2-4 指・趾) 欠損による V 字形の裂隙形成を特徴とする。その原因は多様であり、現在までに TP63、WNT10B、DLX5、FGFR1 遺伝子の変異や、7q21.2-21.3 領域のヘテロ欠失・転座、10q24 領域のヘテロ重複、BHLHA9 を含む 17p13 領域のヘテロ重複などのゲノムコピー数異常が見出されている。しかし、約半数以上の患者において発症原因は未解明にとどまっている。

## 2. 研究の目的

研究では、われわれが現在までに集積した 91 家系における裂手裂足症およびその関連疾患の患者のうち原因不明の約 60 家系の患者・家系、ならびに研究期間中に集積される原因不明の裂手裂足症家系の患者・家系の検体を用いて、アレイ CGH 解析や次世代シーケンサーなどを駆使した分子遺伝学的解析を行う。これにより、裂手裂足症およびその関連疾患における新規疾患成立機序を解明し、遺伝カウンセリングや医学・医療に貢献することを目指すことであった。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の解析を行い、裂手裂足症およびその関連疾患の発症機序解明を進めた。原因が同定されずアレイ CGH 解析を施行していない家系において、アレイ CGH を用いたゲノムワイドコピー数解析、さらに、原因不明の家系において、より微小なコピー数異常を検出するカスタムコピー数解析を行った。続いて、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行い、既知・新規候補原因遺伝子変異の同定を行った。新しく見いだされた候補遺伝子の解析: 新規候補原因遺伝子が同定されたときには、原因不明の患者における変異解析、マウス whole mount in situ hybridization による発現部位の解析、モルフォリーノノックダウンなどを行い、SHFM の責任遺伝子であるか否かを明確とした。

## 4. 研究成果

結果は、図 1 および 2 に示した。

それぞれ、日本人創設者効果である 17p13.3 重複の BHLHA9 を含んでいる duplications/triplications については、グループ 1 の家系#1-19 と家系#20-21 の発端者で同定された。臨床的には異常が認められていない両親においても、常にいずれかがキャリアであることを同定した。また aCGH 検査を実行し、4 つの家系から 5 つの家系で既知の病原性 CNVs

を明らかにした。2q31 欠失 (SHFM5) に、HOXD 遺伝子が関連して、成長障害、発達上の遅れ、四肢異常を認めた。10q24 複製 (SHFM3) は、共通して LBX1、BTRC、POLL と DPCD を含んでいることが同定された。データベースには無い 19q13.11 の新規の 1.35Mb の欠失が認められた被験者が 1 名同定された。WES では、2 つのフレームシフト変形を候補遺伝子で明らかにした。第 1 に、LRP6 (低密度リポタンパク質レセプター関連のタンパク質の変異で、この LRP6 は、ホモ接合の Lrp6 ノックアウトマウスの SHFM 表現型のため、候補遺伝子と考えられた。第 2 に、UBA2 (ユビキチンのような条件剤活性化酵素 2) の変異で、发育過程のマウス肢芽に強い Uba2 発現が同定された。

以上のことから、新規の SHFM の候補遺伝子として、ノックアウトマウスおよび SHFM の被験者の遺伝子解析結果から、LRP6 および UBA2 遺伝子が原因遺伝子である可能性を見出した。

図 1

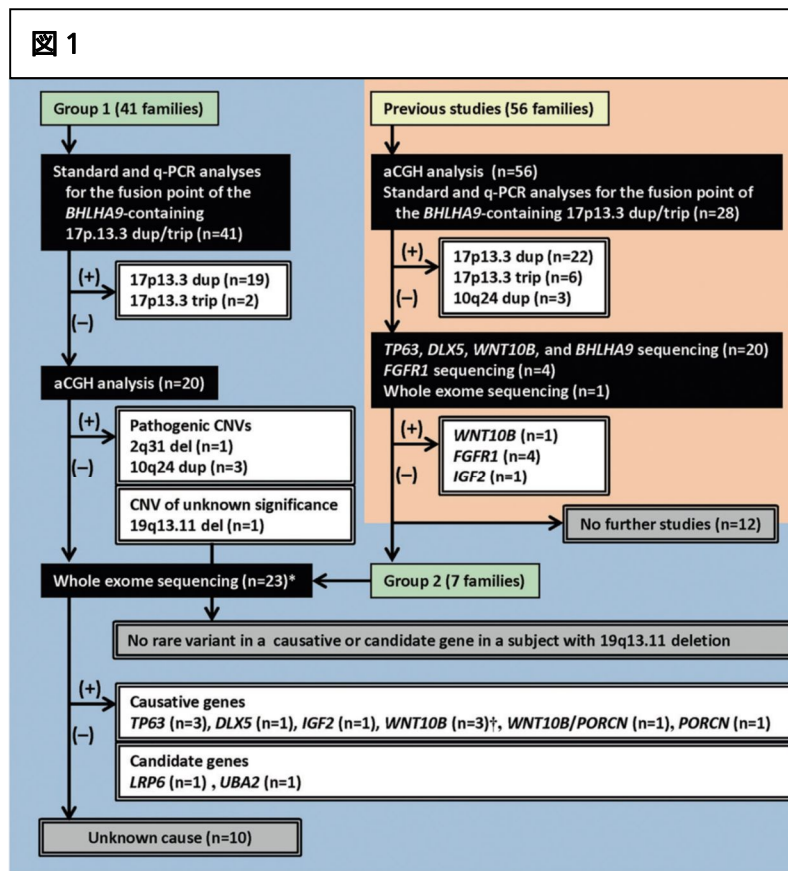
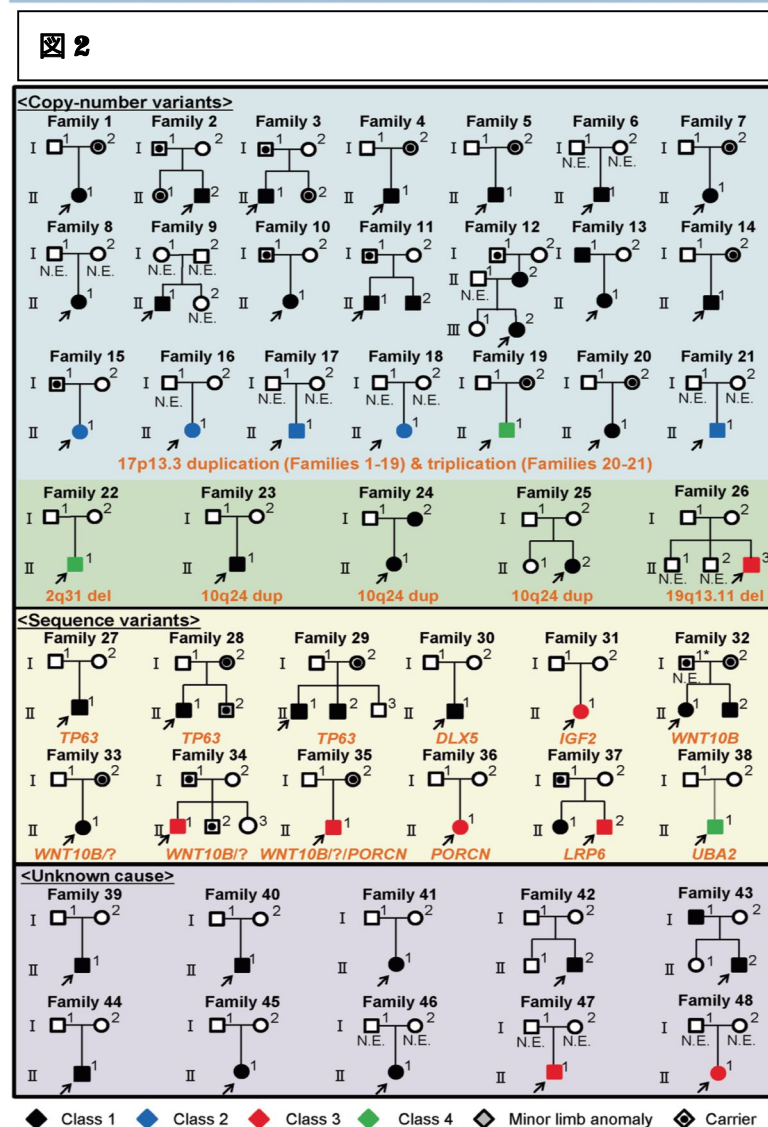


図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamato Kaori, Saito Hiroto, Nishimura Gen, Kosaki Rika, Takayama Shinichiro, Haga Nobuhiko, Tonoki Hidefumi, Okumura Akihisa, Horii Emiko, Okamoto Nobuhiko, Suzumura Hiroshi, Ikegawa Shiro, Kato Fumiko, Fujisawa Yasuko, Nagata Eiko, Takada Shuji, Fukami Maki, Ogata Tsutomu	4. 巻 27
2. 論文標題 Comprehensive clinical and molecular studies in split-hand/foot malformation: identification of two plausible candidate genes (LRP6 and UBA2)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1845 ~ 1857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41431-019-0473-7">https://doi.org/10.1038/s41431-019-0473-7</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田 絵子
2. 発表標題 若手シンポジウム
3. 学会等名 日本小児遺伝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 矢本香織, 小崎里華, 永田絵子, 鹿野博亀, 池川志郎, 加藤英弥子, 高田修治, 深見真紀, 才津浩智, 緒方勤.
2. 発表標題 先天性四肢形成不全症92家系における分子遺伝学的解析
3. 学会等名 日本小児遺伝学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----