

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16236

研究課題名(和文) ターゲットシーケンス法による全前脳胞症の遺伝学的診断基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of basic approach for genetic diagnosis of holoprosencephaly by targeted sequence method

研究代表者

阿部 裕 (Abe, Yu)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00789787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：令和元年度末までに、典型的なHPE症例2例、Binderoid complete cleft lip/plateとその疑い例 17 例を同定した。その中のHPE症例2例 (ALOBAR型1例、SEMILOBAR型1例)、Binderoid complete cleft lip/plate症例1例において、患者本人および両親から採血を実施した。G分染法ではいずれも正常核型であることを確認した。HPEの発症に関わる主要なpathwayに含まれる遺伝子の変異を同定するため、Targeted NGS panelを実施し、HPE症例1例においてSIX3遺伝子にフレームシフト変異が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在日本国内において全前脳胞症 (HPE)、Binder 症候群、および Binderoid complete cleft lip/plate について遺伝子解析を実施する体制は整っていない。本研究では典型的なHPE症例において既知の原因遺伝子であるSIX3が同定され、本研究での解析方法により速やかにHPEの遺伝学的診断が可能であることが示された。現在、さらに残りの17症例の解析を継続中である。本研究の結果は、これらの疾患における遺伝子型と表現型、環境要因の関連、およびHPE スペクトラムの広がりを分子遺伝学的に明らかにする足がかりとなるものである。

研究成果の概要(英文)：By the end of the fiscal year of 2019, we identified 2 typical cases of HPE, 17 cases of Binderoid complete cleft lip / plate and suspected cases. Among them, We collected blood samples from the patients and their parents in 2 cases of HPE (1 case of ALOBAR, 1 case of SEMILOBAR) and 1 case of Binderoid complete cleft lip / plate among them. We confirmed that their karyotypes were normal by the G-staining method. Targeted NGS panel was performed to identify mutations in genes included in the major pathways involved in the development of HPE, and a frameshift mutation was identified in the SIX3 gene in 1 case of HPE.

研究分野：胎児期早期の脳の分化・発生、およびその異常に起因する発生異常のメカニズムの解明

キーワード：全前脳胞症 holoprosencephaly Binder症候群

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

全前脳胞症 (Holoprosencephaly:HPE) はヒトの脳や顔面に奇形を呈する疾患の中で最も発生頻度の高い疾患の一つである (10,000 出生に 1 例、250 胎児に 1 例) (Shiota and Yamada.Amer J Med Genet. 2010;154C:22-28)。胎児期早期の神経管の腹側化障害により左右の大脳半球 (前脳) が分離不全を生じ、正中中部で大脳皮質・基底核・視床の癒合を認め、顔面正中中部の異常を呈する。臨床的にその表現型は極めて多様性に富んでおり、最重症例では単眼症や前脳の未分割を呈するが、軽症例では単一中切歯等の微細な小奇形を呈するのみである (図 1)。

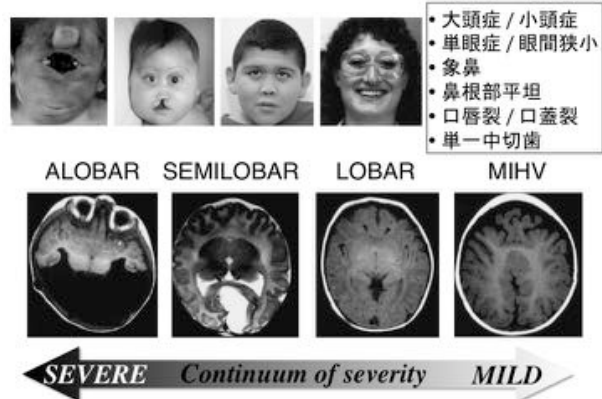


図1, 全前脳胞症 (Holoprosencephaly: HPE)

HPE の原因は多岐にわたる (図 2)。13 トリソミーや 3 倍体 (トリプロロイディー) などの染色体異常に併発する例が 25%-50%と最も多く、18%-25%は Pallister-Hall 症候群 (GLI3 変異による多発奇形症候群) や Smith-Lemli-Opitz 症候群 (コレステロール代謝異常) など他の先天奇形症候群に併発する。また、18-25%は染色体の微細な欠失によるものであり CGH アレイにより診断される。さらに、様々な環境要因が関与することが明らかにされており、妊娠中の母体糖尿病、母体のアルコール摂取、スタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害薬) の摂取などが知られている。

1996 年に Roessler らが HPE の原因遺伝子として SHH を報告して以降、神経管の腹側化誘導因子 (SHH, SIX3, TGIF, PTCH, など) もしくは背側化因子 (ZIC2) の遺伝子変異によって HPE が発症することが明らかになってきた (Roessler et al. Nat genet. 1996; 14: 357-360)。今日までに HPE では 4 つの主要遺伝子 (SHH, ZIC2, SIX3, TGIF) を含む 15 遺伝子のヘテロ接合性変異が同定されている。これらの遺伝子にコードされるタンパク質の多くは Hedgehog signaling pathway に属し、胎児期早期の前脳の発生・発達において主要な役割を果たしていると考えられている (Roessler and Muenke.Am J Med Genet.2010; 154C(1):52-61)。現在米国では臨床的に HPE が疑われた患者に対し、一般的に 4 つの主要遺伝子の変異の同定、あるいは既知の HPE 遺伝子を含む領域、またはその染色体全体の欠失の同定により遺伝学的な診断がなされる。常染色体優性遺伝形式家族性発症では遺伝子変異同定率は 40% 前後であるが、孤発例における変異同定率はもっとも頻度が高い SHH でも 5%未満である。

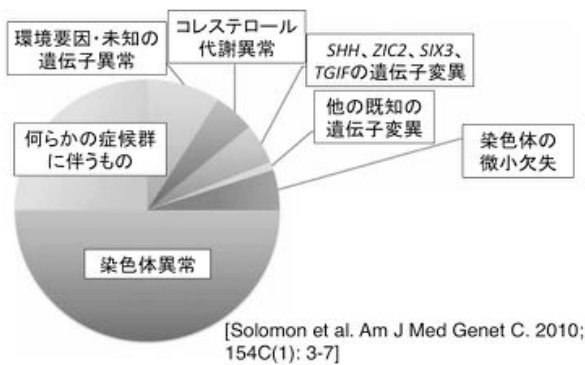


図2, 全前脳胞症 (出生児) の原因の内訳

申請者はこれまでに京都大学先天異常標本解析センターが所蔵する「京都コレクション」から HPE 標本 143 例を抽出し、臨床的解析を行った (Abe et al. Anat Rec. 2016; in press) (図 3)。京都コレクションは器官形成期ヒト胚子・胎児標本とその臨床データから成り、1961 年以来収集された標本数は 40,000 例以上に及ぶ。京都コレクションに含まれる胎児の多くは、当時の法律に則って社会的・経済的理由により、妊娠第 1 三半期までに妊娠中絶されたものである。その中には、切迫流産・自然流産により中絶に到った症例や母体の出血など母体適応により中絶に到った症例も含まれる。このように収集された京都コレクションは日本における子宮内胚子・胎児の動態を表すバイアスの少ない縮図として非常に貴重なコホートである。解析の中で申請者は母体のアルコール摂取、母体の流産・死産歴、妊娠中の性器出血が HPE の発症と関連することを明らかにした。さらに申請者は抽出した HPE 標本 143 例の遺伝学的な背景の解析のため標本からの DNA 抽出を試みた。標本の多くは娩出直後からブアン液 (ピクリン酸、ホルマリン、酢酸の混合固定液) 中で 30~40 年保存されており、抽出された DNA は 170 ± 50 塩基長に断片化されていた。申請者は SNP chip による染色体の数の異常・染色体微小欠失の同定、及び全エクソームシーケンスによる遺伝子変異の同定を試みたが、DNA の損傷が激しいために、現時点までに京都コレクションの胚子・胎児における遺伝学的背景に関しては明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

日本国内では臨床的に特発性 HPE が疑われる症例に対する遺伝学的解析はほとんど行われていない。その理由として、HPE は非常に高い genetic heterogeneity を呈し、これまでに報告されている原因遺伝子についての包括的な解析が日本国内では困難な状況であることが挙げられる。HPE において遺伝学的解析を行うためには、G-Banding や CGH アレイなどの細胞遺伝学的な解析も含めて、包括的な解析が可能な診断基盤の確立が必要である。

本研究では Targeted next-generation sequencing (NGS) assay による HPE の分子遺伝学的な診断基盤を確立することにより、日本人における HPE の遺伝学的背景を明らかにすることを目的とする。また、臨床症状を集積し遺伝子型と表現型、及び環境要因の関連を解析することにより、表現型を修飾する因子を明らかにする。

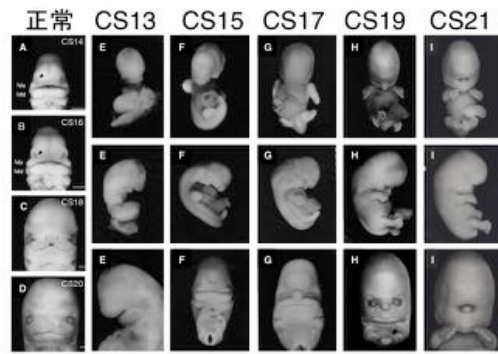


図3, 全前脳胞症(京都コレクションより)

本研究では Targeted next-generation sequencing (NGS) assay による HPE の分子遺伝学的な診断基盤を確立することにより、日本人における HPE の遺伝学的背景を明らかにすることを目的とする。また、臨床症状を集積し遺伝子型と表現型、及び環境要因の関連を解析することにより、表現型を修飾する因子を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### 1. 対象

対象は年齢・性別を問わず、臨床症状として口唇顎口蓋裂・眼窩間距離の狭小化など、顔面正中部の低形成による顔貌異常を伴う症例とする。脳画像検査で大腦皮質・基底核・視床の正中部での癒合を認める症例、あるいは大腦鎌の欠損、透明中隔の欠損、背側嚢胞など脳奇形を認める症例も含める。他の先天奇形症候群が臨床所見、検査所見などで否定され、基礎疾患が明らかでないものとする。

### 2. 症例の収集

該当症例があった協力病院の倫理委員会において本研究に関する申請を行い許可を得る。次に東北大学医学系研究科の遺伝子検査に関する指針などに従って作成した同意書を用いて、主治医が患者もしくは家族よりインフォームドコンセントを得る。その後、末梢血約 10ml を EDTA2Na の試験管に採取してもらう。当院当科で末梢血より DNA を抽出して保存し、以後の検査にあてる。同時に環境要因の解析のため、調査票を用いて両親の年齢、職業、既往歴、生活歴、内服薬の有無などについて情報を収集する。

### 3. 解析方法 (図 4)

以下の順序で解析を進める。

A, G-banding : 13 トリソミー・18 トリソミー・三倍体など染色体の数の異常の検索。

B, CGH アレイ、MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

: 染色体の微小な欠失・重複、及び Copy Number Variant の検索。

C, Targeted NGS assay

: 既知の遺伝子変異の同定、及び HPE の発症に関わる主要な pathway に含まれる遺伝子の変異を同定する。Targeted NGS panel に含める候補遺伝子は以下 a、b、c に含まれる 153 遺伝子である。

a, Hedgehog signaling pathway において、シグナル伝達に関わるリガンドや受容体などの主要な分子をコードする遺伝子

b, 脊椎動物の前脳の発生・発達への関連が報告されているその他の signaling pathway (fgf, bmp, wnt, notch, nodal,  $tgf\beta$ ) 上の主要なリガンド、受容体をコードする遺伝子

c, コレステロール代謝に関わる遺伝子

上記の 148 遺伝子のエクソン領域 (コーディング領域、UTR) に加えて、ECRbrowser (<http://ecrbrowser.dcode.org>) を用いて同定した非コーディング領域の evolutionarily conserved region (ECR: 脊椎動物において種を超えて保存されている領域) を解析領域に含める。

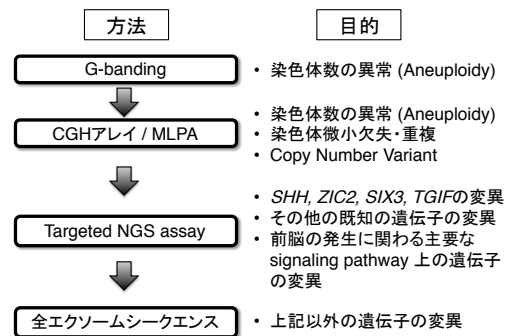


図4, 遺伝学的解析のストラテジー



#### 4. 研究成果

今回の研究で我々は、HPE に加えて、Binder 症候群（上顎鼻異形成）、および Binderoid complete cleft lip/plate を研究対象に加えた

Binder 症候群(上顎鼻異形成)は、前方上顎と鼻を主に障害する 発生異常である (Head Neck Surg. 1980;3(2):105-22.)。従来このような症例は、DeMyer による HPE の分類の中でも予後良好なまれな例として分類されてきた。

2003年に Mulliken らは、すべての症例において画像診断上脳に奇形を認めず、知能発達面に異常がないこと、患者母にワーファリン内服の既往やアルコール摂取などの妊娠歴の異常がなかったことなどから、HPE の normal end にも属さない全く独立した疾患として、Binderoid complete cleft lip/plate という概念を提唱した(Plast Reconstr Surg. 2003;111(3):1000-10.) (図5)。Binderoid complete cleft lip/plate は完全口唇顎口蓋裂と顔面正中領域の低形成、および眼窩間距離の狭小化など Binder 症候群様の顔貌を特徴とし、知能面や身体面での発達には異常は認められない。そのため、従来の分類とは全く異なった独立した疾患として詳細な検討を加えたいと報告された。

本研究では、遺伝子型と表現型の関連を解析することにより、HPE スペクトラムの広がりをも分子遺伝学的に明らかにすることを目的として Binder 症候群、Binderoid complete cleft lip/plate を含む顔面正中領域の低形成を示す症例について、Targeted next-generation sequencing (NGS) assay による解析を行った。

令和元年度末までに、宮城県立こども病院・八戸市立市民病院から 2 例の典型的な HPE 症例、東北大学病院から Binderoid complete cleft lip/plate とその疑い例 17 例を同定した。その中の HPE 症例 2 例 (ALOBAR 型 1 例、SEMILOBAR 型 1 例)、Binderoid complete cleft lip/plate 症例 1 例において、患者もしくは家族よりインフォームドコンセントを取得し、患者本人、および両親から採血を実施した。3 症例に対して G-banding を行い、いずれも正常核型であることを確認した。続いて、既知の遺伝子変異の同定、及び HPE の発症に関わる主要な pathway に含まれる遺伝子の変異を同定するため、Targeted NGS panel を実施した。148 の候補遺伝子のエクソン領域、および ECR browser を用いて同定した非コーディング領域の evolutionarily conserved region (脊椎動物において種を超えて保存されている領域)を解析領域とした。以上を含めた全 975,605bp 対象領域とし、Hiseq2000 を用いてシーケンスした。現在までに HPE 症例 1 例において SIX3 遺伝子にフレームシフト変異が同定された。

現在、残りの 2 症例について得られたデータの解析中であり、reference sequence (hg19)にマッピングし genotyping を行っている。同定された Binder 症候群、Binderoid complete cleft lip/plate の残りの 14 症例について、インフォームドコンセントを取得中である。

図5, Binderoid complete cleft lip/plate

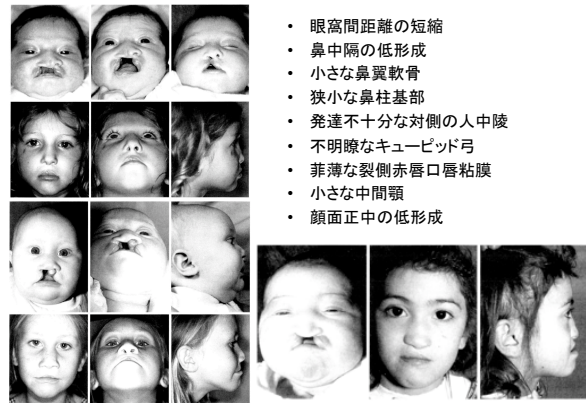


図6, 症例の集積状況

	性別	生年月日	疾患名
1	女	2000/9/7	正中唇裂・正中顔面裂・全前脳胞症
2	女	2001/12/18	唇顎口蓋裂・全前脳胞症
3	女	2008/9/19	唇顎口蓋裂・全前脳胞症
4	女	2011/6/1	唇裂・歯槽裂・顎裂(口蓋裂なし)・全前脳胞症
5	女	1990/9/25	唇顎口蓋裂・Binderoid Cleft
6	女	1996/10/18	唇裂・歯槽裂・顎裂(口蓋裂なし)・Binderoid Cleft
7	女	1998/1/24	唇顎口蓋裂・Binderoid Cleft
8	女	2001/11/19	唇顎口蓋裂・Binderoid Cleft
9	女	2007/11/13	唇顎口蓋裂・Binderoid Cleft
10	男	1998/6/16	唇顎口蓋裂・Binderoid Cleft
11	女	2009/12/25	唇顎口蓋裂・Binderoid Cleft
12	男	2011/8/31	唇顎口蓋裂・Binderoid Cleft
13	女	1998/9/3	Binder症候群
14	女	2005/7/14	Binder症候群
15	女	1998/12/5	Binder症候群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yu Abe, Paul Kruszka, Ariel F. Martinez, Erich Roessler, Kohei Shiota, Shigehito Yamada, Maximilian Muenke
2. 発表標題 Clinical evaluation of a Holoprosencephaly cohort from Kyoto Collection of human embryos
3. 学会等名 第59回日本小児神経学会総会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----