

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20862

研究課題名（和文）先天性四肢形成不全症を招く新規疾患成立機序の解明

研究課題名（英文）Clarification of molecular basis of congenital limb anomalies

研究代表者

矢本 香織（YAMOTO, Kaori）

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：00906919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：先天性四肢形成不全症は、出生時より四肢の形態異常を示す疾患の総称であり、臨床的・遺伝学的に多様な疾患である。われわれは、全エクソーム解析の再解析により、本邦初のX染色体劣性PORCN non-Goltz spectrumの原因となるPORCN遺伝子変異、および、Goltz症候群の家族例におけるPORCN遺伝子のintron変異を同定した。さらに、集積した120家系のうち、これまでの解析で発症機序が解明されていない123家系28名の全ゲノム解析を施行し、裂手裂足症の原因遺伝子であるTP63遺伝子のdeep intron変異を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患原因が未解明であった症例に対して、全エクソーム解析の再解析および全ゲノム解析を施行し、新たに3家系で疾患原因となる遺伝子変異を同定できた。本研究の成果として、X染色体劣性PORCN non-Goltz spectrumという新たな疾患概念を支持する研究結果は、臨床的意義の高いものである。また、スプライス異常予測ツールを用いることで、これまで病的意義が不明であったintron変異の中から効率的に候補バリエーションを絞り込むことが可能であり、今後、遺伝子診断率向上につながる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Congenital limb anomalies are clinically and genetically heterogeneous. We reported two patients with PORCN variants identified by re-analyses of whole exome sequencing; 1) a maternally inherited PORCN variant in a Japanese boy with ocular and limb manifestations, and developmental delay and 2) a novel PORCN intronic variant in a mother and her daughter with focal dermal hypoplasia. In addition, we carried out whole genome sequencing in 23 patients from 28 families with congenital limb anomalies in which underlying genetic causes including pathogenic copy-number variants remained undetected in our previous studies. We identified a deep intronic variant in TP63 which is known as a causative gene for split hand and foot malformation.

研究分野：遺伝学

キーワード：先天性四肢形成不全症 全ゲノム解析 TP63 PORCN

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

先天性指趾/四肢形成不全症は、出生時より指趾/四肢の形態異常を示す疾患の総称であり、臨床的・遺伝学的に多様な疾患である。代表的な疾患として、指趾に限局する裂手裂足症、短指症、合指症、さらに、長管骨の形成不全を伴う橈骨・尺骨欠損症、大腿骨形成不全症、中間肢異形成症などが挙げられる。近年、次世代シーケンサーをはじめとした遺伝学的解析手法の発展により、いくつかの原因となる遺伝子変異やゲノムコピー数異常が同定されている。

われわれは、現在までに先天性四肢形成不全症 120 家系を集積し、そのうち 80 家系において、*FGFR1*、*WNT10B*、*TP63*などの遺伝子変異、2q31領域のヘテロ欠失、10q24領域のヘテロ重複、*BHLHA9*遺伝子を含む17p13.3領域のヘテロ重複などのゲノムコピー数異常を同定するとともに、特筆すべき成果として、裂手裂足症の新規原因遺伝子 *UBA2*・*LRP6*の発見、世界で2家系目となる *IGF2* 遺伝子変異の検出、中間肢異形成症の新規原因遺伝子 *AFF3* の同定などを報告した。しかし、残る40家系において、その発症原因は明らかでない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、これら発症機序不明の先天性四肢形成不全症家系の検体を用いて、全ゲノム解析を含めた網羅的遺伝子解析を行い、先天性四肢形成不全症の新規疾患成立機序の解明、四肢および指趾の発生過程の解明、遺伝カウンセリングの向上に貢献することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 全エクソーム解析の再解析：

これまで全エクソーム解析を施行した症例に対し、最新の解析プログラムおよびデータを用いた再解析を行った。

#### (2) 全ゲノム解析：

上記の再解析でも発症機序不明であった23家系28名に対して、全ゲノム解析を施行した。下記の解析プログラムを用いて効率的に候補バリエーションの絞り込みを行った。

##### ① 深部イントロンや転写調整領域の候補バリエーションの抽出

非コード領域のゲノム解析の問題点として、膨大な量のバリエーションが検出されることが挙げられる。疾患原因となる可能性のある候補バリエーションを絞り込むために、抽出したバリエーションの中から、公共のデータベースに登録のある頻度1%以上のバリエーションで頻度の高いバリエーションを除外し、稀なバリエーションのみを抽出した。さらに、転写調節に関するアノテーションや、スプライス異常を引き起こす可能性をディープラーニングを用いて予測するAIプログラムである *SpliceAI* (Jaganathan K, et al. *Cell*. 2019.)などの情報をもとに、候補バリエーションを検出した。

##### ② 非コード領域のゲノムコピー数異常およびゲノム構造異常の同定

全ゲノム解析データに対して、*Manta* (Chen X, et al. *Bioinformatics*. 2016.)および *Canvas* (Roller E, et al. *Bioinformatics*. 2016.)の解析プログラムを用いて、非コード領域のゲノムコピー数異常およびゲノム構造異常を抽出した。抽出されたこれらのゲノム構造異常に対しては、*AnnotSV* プログラムを用いて、調節因子・影響を受ける遺伝子・一般集団での頻度などのアノテーションを付与してスコアリングし、評価した。また、*TEMP2* (Yu T, et al. *Nucleic Acid Research*. 2021.)の解析プログラムを用いて、レトロトランスポゾンなどの転移因子を検出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 全エクソーム解析の再解析：

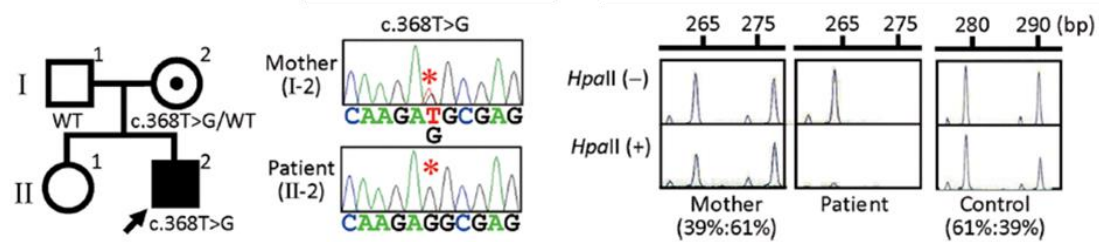
##### ① *PORCN* 遺伝子のミスセンス変異が同定された *PORCN* non-Goltz spectrum の46,XY男児 (Fukahori K, et al. *Am J Med Genet A*. 2023)

これまで、*PORCN* 遺伝子変異は、X染色体優性遺伝で主に女兒に発症する Goltz 症候群の原因として知られており、男児では、モザイク例を除くと胎生致死になると考えられていた。近年、無症状の母親に由来する非モザイクのヘミ接合性 *PORCN* 変異を有する3家系6名の男児が報告され、Goltz 症候群とは異なる臨床像を呈することから、X染色体劣性 *PORCN* non-Goltz spectrum が提案された (Happle R. *Am J Med Genet A*. 2021)。

今回、全エクソーム解析の再解析を行った結果、両側小眼球、右手合指・多指症、両側裂足症、両側移動精巣、体重増加不良、筋緊張低下、運動発達の遅れが認められる10歳男児に、*PORCN* 遺伝子のヘミ接合性ミスセンス変異 (NM\_203475.3:c.386T>G;p.(Met123Arg))を同定した (図1)。無症状の母にも同一の変異が認められ、また、X染色体の不活化の偏りは認めなかった。過去に報告された3家系でも小眼球症や四肢の奇形(橈骨欠損、裂手裂足症)が認められており、本症例の解析結果は、X染色体劣性 *PORCN* バリエーションが男児における皮

膚症状のない小眼球症や四肢の奇形をきたすという、X 染色体劣性 *PORCN* non-Goltz spectrum を支持するものである。

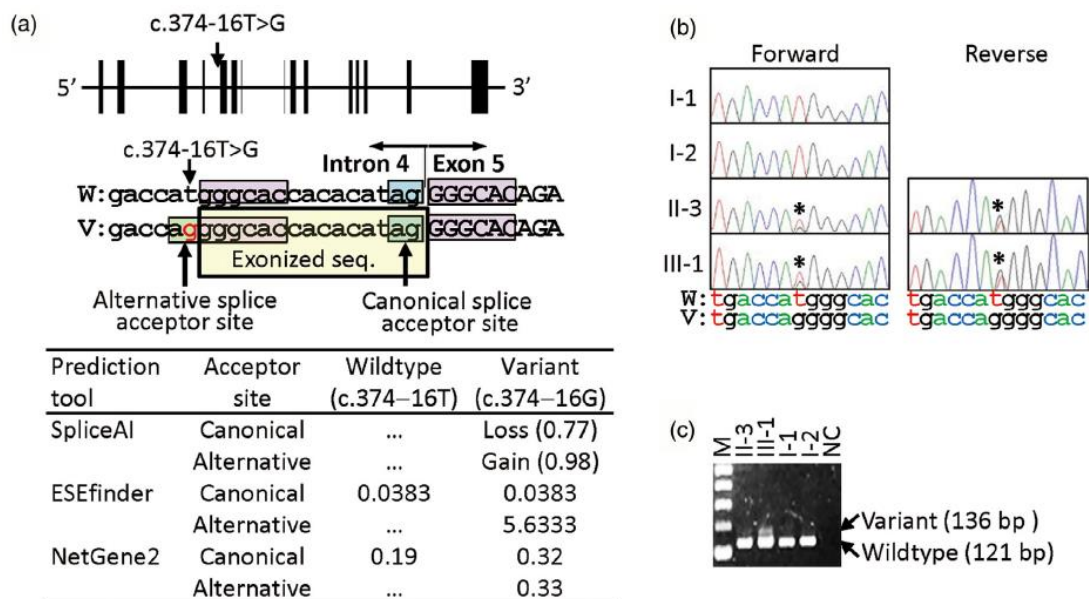
図 1. *PORCN* 遺伝子のミスセンス変異および X 染色体不活性化解析結果



② *PORCN* 遺伝子のスプライス異常が同定された Goltz 症候群の家族例 (Yamoto K, et al. *Am J Med Genet A*. 2022)

これまで、全エクソーム解析においてエクソンから±10 塩基のイントロン領域を対象としていたが、±50 塩基を対象として再解析を行ったところ、Goltz 症候群の母子例において、*PORCN* のイントロン変異 (NM\_203475.3:c.374-16T>G) を同定した (図 2)。本変異は、SpliceAI などのスプライシング予測ツールによって、新たなスプライスアクセプター部位を形成し、スプライス異常を引き起こすことが予測され、実際に、リンパ芽球セルラインを使用した RT-PCR において、15 塩基挿入された産物を同定し、スプライス異常が生じることを確認した (図 2)。本症例の解析結果は、全エクソームおよび全ゲノム解析において、スプライシング予測ツールがイントロン変異の病原性評価およびバリエーションの絞り込みに非常に有用であることを示す。

図 2. *PORCN* 遺伝子のイントロン変異および RT-PCR 結果



(2) 全ゲノム解析 :

両側裂手裂足症を有する男児において、裂手裂足症の原因遺伝子である *TP63* 遺伝子の deep intron 変異を同定した。本変異は、公共のデータベースの登録のない変異で、SpliceAI などのスプライシング予測ツールによって、pseudo exon が形成されることが予測された。現在、minigene を用いた minigene splicing assay を施行し、実際にどのようなスプライス異常が生じるのか、解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamato Kaori, Okada Satoshi, Kato Fumiko, Fujisawa Yasuko, Fukami Maki, Saitsu Hiroto, Ogata Tsutomu	4. 巻 188
2. 論文標題 A novel intronic PORCN variant creating an alternative splice acceptor site in a mother and her daughter with focal dermal hypoplasia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 1612 ~ 1617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.62649	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 -

1. 著者名 Fukahori Kyoko, Yamato Kaori, Saitsu Hiroto, Ogata Tsutomu, Nagasaki Keisuke	4. 巻 191
2. 論文標題 PORCN related microphthalmia with limb anomalies: Case report and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 636 ~ 639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ajmg.a.63048	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 -

1. 著者名 矢本香織、永田絵子、緒方勤	4. 巻 84
2. 論文標題 BHLHA9 (関連疾患: 裂手裂足症)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 1689-1692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 矢本 香織、岡田 賢、加藤 芙弥子、藤澤 泰子、深見 真紀、才津 浩智、緒方 勤
2. 発表標題 スプライス異常が同定されたfocal dermal hypoplasiaの家族例
3. 学会等名 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長崎 啓祐、深堀 響子、矢本 香織、才津 浩智、緒方 勤
2. 発表標題 母由来のPORCNミスセンス変異を同定した46, XY男児のPORCN non-Goltz spectrumの1例
3. 学会等名 日本人類遺伝学会
4. 発表年 2022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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関