

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870255

研究課題名(和文) 裂手裂足症およびその類縁疾患を招く遺伝学的機序の解明

研究課題名(英文) Genetic mechanism of split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency

研究代表者

永田 絵子(Nagata, Eiko)

浜松医科大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：90535569

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)：本研究では、裂手裂足症およびその類縁疾患における疾患成立機序の解明、遺伝カウンセリングの向上に貢献することを目的とした。成果として、BHLHA9遺伝子を含むduplication/triplicationは、四肢・指趾形成不全を招く量効果を有する強い感受性因子であることが解明された。日本人創始者 duplications が FoSTeS/MMBIR で生じ、染色体間/姉妹染色分体間の組換えによりtriplicationや重複領域内のゲノム構造の多様性を獲得していると考えられた。表現度の多様性、浸透率の不完全性には複数の因子が関与することが判明した。

研究成果の概要(英文)：BHLHA9 copy-number gain constitutes a strong susceptibility factor with a dosage effect for limb malformations. Japanese founder duplication was generated through a replication-based mechanism and underwent subsequent triplication and haplotype modification through recombination-based mechanisms. Clinical variability appears to be due to multiple factors.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：先天異常 遺伝子解析 臨床遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

裂手裂足症は、出生 2 万人当たり 1 人程度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。現在までに、少数の患者において TP63 および WNT10B 遺伝子変異や染色体コピー数異常が同定されているが、多くの患者において発症原因は不明である。これに関し、われわれは、現在までに集積した 52 家系中 25 家系の裂手裂足症およびその関連疾患を有する患者・家族の解析を終了し、12 家系において染色体 17p13 領域における約 200 kb の同一の重複を見出し、さらに、この重複上の BHLHA9 が責任遺伝子であるというデータを得ていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、この先行研究を推進し、裂手裂足症およびその類縁疾患における疾患成立機序の解明、新規治療法の開発、遺伝カウンセリングの向上に貢献すると共に、日本人創始者効果として形成されたと推測される 17p13 重複の形成機序や伝搬様式の解明を目指す。

具体的には以下と通りである。

裂手裂足症およびその関連疾患を有する患者・家系の集積：われわれは、現在までに、52 家系の裂手裂足症およびその類縁疾患 (裂手裂足症+脛骨欠損、裂手裂足症+大腿骨形成不全) を有する患者・家族の臨床情報ならびに検体を集積している。これらの患者において、既知責任遺伝子である TP63 および WNT10B の変異は認められていない。

多数例における同一の染色体 17p13 重複の同定：われわれは、現在までにゲノムワイドアレイ CGH 解析を 25 家系で終了し、12 家系において 17 番染色体短腕の 2 コピーと 3 コピーの約 200 kb のタンデム重複を見出した。そして、その重複融合点のシーケンス決定と融合点配列の Real-time PCR 解析により、重複融合点が、2 コピーの重複と 3 コピーの

重複を有する全ての症例において同一であることが判明した。さらに、この重複は裂手裂足症のみならず、裂手裂足症+脛骨欠損や裂手裂足症+大腿骨形成不全を有する患者においても認められた。ここで、17p13 領域の重複は、欧米において複数の裂手裂足症症例で報告されているが (Klopocki et al. J Med Genet 2012;49:119-125)、その重複範囲は症例ごとに異なり、今回、すべての患者で同じ重複であったことは、日本人創始者効果の存在を示唆される。

正常表現型を呈する重複保因者の同定：この 12 家系の解析から、一見孤発例とされる患者においても両親のいずれかが表現型正常の重複保因者であることが判明した (図 2)。さらに、この重複は、一般集団 1000 人中 2 例においても認められた。

17p13 領域重複と裂手裂足症発症の関連性と modifier 仮説：以上の成績から、17 番染色体短腕重複は、裂手裂足症および類縁疾患と密接に関連することが判明した (患者集団と一般集団の頻度比較：フィッシャーの正確確率検定 P 値 =  $1.75 \times 10^{-19}$ )。さらに、この重複だけでは必ずしも裂手裂足症およびその関連疾患が発症することはなく、何らかの modifier の存在が示唆される。

候補遺伝子 BHLHA9 の同定：この重複領域には 2 個の遺伝子が存在し、そのうち、Mouse Genome Informatics から、BHLHA9 が胎生 10.5 日齢の四肢遠位部の軸決定領域で発現していることが判明した。したがって、この遺伝子が裂手裂足症の発症に関連すると推測される。

【研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか】

集積された全家系の解析：既集積された家系、ならびに今後集積される家系の全てにおいて、上記の分子遺伝学的解析を終了する。BHLHA9 の指趾形成における役割の検討：このためにメダカを用いたモルフォリーノッ

クダウン解析を行い、ヒトの指趾の相当するヒレの形態変化を観察する。

Modifier の同定：先行研究より 17p13 領域の重複が疾患発症に決定的な役割を果たしていると同時に、疾患発症には modifier が関与することが示唆される。本研究では、罹患重複保因者、非罹患重複保因者、健常者の比較から、この modifier の同定に挑む。

日本人創始者重複の伝搬様式の解明：in silico 解析により、重複融合点周辺のゲノム構造が FoStES/MMBIR に合致する replication error を生じやすいものであるか否かを検討すると共に、重複内のマイクロサテライトパターンを解析し、どのように aberrant inter- / intra-chromatid recombination が生じたかを検討する。

### 3. 研究の方法

#### 【平成 26 年度】

集積された全家系の解析：集積された全家系のアレイ CGH 解析、重複融合点のシーケンズ解析および Real-time PCR 解析等を終了する。これについては、先行研究の項目に記載したように、われわれは十分な経験と実績を有する。これは平成 26 年度内で終了させる。

BHLHA9 の指趾形成における役割の検討：メダカを用いたモルフォリーノノックダウン解析を行い、ヒトの指趾に該当するヒレの形態変化を観察する。ここで、今回、BHLHA9 を含む重複が裂手裂足症および関連疾患の発症因子であるが、ノックダウン実験により、何らかのヒレの形態変化が生じたときには、BHLHA9 が指趾の形成に関与することを支持する所見になると期待される。

Modifier の同定：この modifier は、17p13 重複が非罹患保因者や一般集団においても認められることから想定される。すなわち、裂手裂足症は、基本的に 17p13 重複あるいは modifier のみでは発症しないが、この 2 つが共存するときに発症すると推測される。事実、この仮説のもとでは、観察されている常

染色体劣性形式の発症も常染色体優性形式の発症も説明される。

ここで 2 つの解析を行う。第 1 に、重複していない 17p13 上の BHLHA9 機能亢進の有無を検討する。これは、BHLHA9 の 1 つの染色体におけるコピー数増加ともう一つの染色体における機能亢進の組み合わせが疾患発症を招くという可能性に立脚する。このような実例として、thrombocytopenia with absent radii において、同じ遺伝子の欠失と機能低下変異の組み合わせが報告されている。具体的には、罹患重複保因者、非罹患重複保因者、健常者のセルラインを用いた発現量比較、次世代シーケンサーを用いたプロモーター領域のゲノム構造比較、tag-SNP を用いた関連解析を行う。第 2 に、BHLHA9 以外の因子が modifier である可能性を検討する。このために、主に比較的大きな家系を対象とするエクソーム解析ならびにゲノムワイド関連解析を行い、非罹患重複保因者には存在せず、罹患重複保因者ならびに非罹患重複保因者の配偶者に存在する因子を探索する。これは modifier がごく少数のときに奏功する可能性があるかと期待される。

#### 【平成 27 年度】

BHLHA9 の指趾形成における役割の検討：平成 26 年度の遺伝子変異解析を継続する。

Modifier の同定：平成 26 年度の遺伝子変異解析を継続する。なお、modifier が同定された場合、その遺伝子の発現解析やルシフェラーゼアッセイ等の機能解析を行う。さらに、一般集団における modifier の頻度を検討する。

日本人創始者重複の伝搬：平成 26 年度の解析を継続する。さらに、上記の BHLHA9 の tag-SNP を用いた関連解析で得られたデータとマイクロサテライトデータを組み合わせることで、より正確な重複の形成および伝搬機序を検討する。

#### 4. 研究成果

BHLHA9 遺伝子を含む duplication/triplication は、四肢・指趾形成不全を招く量効果を有する強い感受性因子であることが判明した。

特に Gollop-Wolfgang complex 発症機序の解明は、世界で唯一の成果である。

日本人創始者 duplications が FoStES/MMBIR で生じ、染色体間/姉妹染色分体間の組換えにより triplication や重複領域内のゲノム構造の多様性を獲得している表現度の多様性、浸透率の不完全性には複数の因子が関与すると推測される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

・ Nagata E, Haga N, Fujisawa Y, Fukami M, Nishimura G, Ogata T. Femoral-tibial-digital malformations in a boy with the Japanese founder triplication of BHLHA9. *Am J Med Genet A*. doi: 10.1002/ajmg.a.37290. 2015 (IF=2.08)

・ Nagata E, Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura K, Kosho T, Hasegawa T, Kimizuka M, Suzuki A, Shimizu K, Ohashi H, Haga N, Numabe H, Horii E, Nagai T, Yoshihashi H, Nishimura G, Toda T, Takada S, Yokoyama S, Asahara H, Sano S, Fukami M, Ikegawa S, Ogata T\*. Japanese founder duplications/triplications involving BHLHA9 are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gollop-Wolfgang complex. *Orphanet J Rare Dis* 9(1):125, 2014. (IF=3.96)

〔学会発表〕(計3件)

・ Eiko Nagata: Japanese founder duplications/triplications involving

BHLHA9 are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gollop-Wolfgang complex: Pediatric Academic Societies (PAS) Annual Meeting 2015: 2015年4月25日-28日

・ 永田絵子 「BHLHA9 遺伝子を含む日本人創始者コピー数増加は裂手裂足症および関連疾患の発症の感受性因子である」第118回日本小児科学会学術集会高得点演題口演 2015年4月17日-19日

・ 永田絵子 「指趾奇形責任遺伝子候補 CEBPA および CEBPG の同定」第58回日本人類遺伝学会学術集会 2013年11月20日-23日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

永田絵子 (NAGATA, Eiko)

浜松医科大学医学部附属病院

臨床研究管理センター 特任助教

研究者番号: 90535569

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

深見真紀 (Fukami, Maki)

国立成育医療研究センター

分子内分泌研究部 部長

研究者番号: 40265872

緒方 勤 (Ogata, Tsutomu)

浜松医科大学小児科 教授

研究者番号: 40169173

##### (4) 研究協力者

なし