

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790333

研究課題名（和文）四肢異常を伴う眼球低形成の責任遺伝子 *MLA1* 同定と機能解析

研究課題名（英文）Isolation of a causative gene for microphthalmia with limb anomaly

研究代表者

増子 精視（西山 精視）（MASUKO KIYOMI）

横浜市立大学・医学研究科・技術吏員

研究者番号：00535817

研究成果の概要（和文）：稀なヒト劣性遺伝性疾患である Microphthalmia with limb anomalies (MLA) は、眼球低形成と四肢の形成異常を主徴とする常染色体劣性遺伝性疾患である。沖縄、レバノン、トルコから貴重な MLA の家系 4 家系を解析する機会を得て、高密度 SNP アレーを用いた連鎖解析を行い、候補遺伝子領域の特定から 3 家系に於いて責任遺伝子 *SMOC1* のホモ接合性変異を特定した。*Smoc1* トラップマウスモデルの解析において同マウスで MLA 患者で特徴的な視神経の形成不全と小眼球症、および合指症や腓骨の低形成などの四肢形成異常が高頻度に認められた。本研究でこれまで機能の詳細が不明であった *SMOC1* が、ヒト及びマウスの正常な眼・手足の形成に必須であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Microphthalmia with limb anomalies (MLA) is a rare autosomal recessive disorder, presenting with anophthalmia/microphthalmia and hand/foot malformation. We mapped the MLA locus to 14q24 and successfully identified three homozygous (a nonsense and two splice site) mutations in the SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) related modular calcium binding 1 (*SMOC1*) gene in three families. *Smoc1* is expressed in the developing optic stalk, ventral optic cup and limbs of mouse embryos. *Smoc1* null mice recapitulated MLA phenotypes, including aplasia/hypoplasia of optic nerves, hypoplastic fibula/bowed tibia and syndactyly in limbs. A thinned and irregular ganglion cell layer and atrophy of the anteroventral part of the retina were also observed. Soft tissue syndactyly, resulting from inhibited apoptosis, was related to disturbed expression of genes involved in BMP signaling in the interdigital mesenchyme. Our findings indicate that *SMOC1/Smoc1* protein is essential for ocular and limb development in both humans and mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：分子遺伝学

### 1. 研究開始当初の背景

MLA は眼球の無(低)形成と四肢末端の異常を主徴とする稀な常染色体劣性遺伝性疾患である。1935年に Waardenburg が初めて紹介し Waardenburg 劣性型無眼球症候群とも言われる。これまでに、21家系 35症例の報告がある。MLA家系の多く(90%)は血族婚家系である。疾患に特徴的な無・小眼球は、両側性であることが多くその重症度は様々である。四肢異常についても両側性が多く典型的は乏趾症等を呈す。責任遺伝子は不明であった。我々は、沖縄在住で MLA を2例に発症した日本人1家系、トルコ人1家系、レバノン人2家系を解析する機会を得た。高密度 SNP アレーを用いた全ゲノムスキニングと追加多型マーカー解析を用いて候補領域を絞り込み、4家系中の3家系に共通する 10p11.23 の 400 Kb の領域が候補領域であることを報告した (Am J Med Genet, 2009)。この領域に存在する唯一の遺伝子 *MPP7* は、マウス胎仔の眼球と四肢において十分な発現を認めるため、有力な候補遺伝子としてシーケンス解析を行ったがいずれの家系にも変異を見いだせず責任遺伝子であるとの結論に至らなかった。集積した家系における遺伝的な異質性を考慮し、改めて4家系中の3家系に共通する候補領域の割り出しを行った。4家系のうちの3家系が遺伝的に同一であると仮定し、3家系のあらゆる組み合わせで解析した共通の責任領域を計4領域を抽出した。このうち前述の *MPP7* 領域を除いた3領域を真の責任遺伝子の局在領域の可能性が高いと考え、順次領域内の候補遺伝子の変異解析を行い、遂に常染色体領域 A 内の責任遺伝子 *SMO1* において3家系で変異を同定した。本研究は、*SMO1* 遺伝子の機能を解き明かすことと変異未同定家系の原因を明らかにすることと

を目的として計画された。

### 2. 研究の目的

(1) *SMO1* の機能的解析：ヒト発生における *SMO1* の発現および機能解析は、材料調達に於いて非常に困難なため、マウスを用いた whole mount *in situ* hybridization を行い、眼組織と四肢の発生における発現時期と発現パターンの詳細を明らかにする。さらに *SMO1* のジーントラップマウスが既に作成され入手可能であるため入手後、*SMO1* が homozygous にトラップされた機能的に null なマウスを作成し当該組織の発生パターンを詳細に解析し *SMO1* 異常の影響を検討する。

(2) 変異未同定の1家系における候補遺伝子の網羅的な検討：変異の同定できていない1家系の発端者において候補領域を網羅的・詳細に解析するため次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析し遺伝子変異を同定する。

### 3. 研究の方法

(1) 正常発生マウスにおける whole mount *in situ* hybridization

眼球および肢芽発生時期として重要な E10-E14 を中心に *SMO1* 遺伝子プローブを用いた whole mount *in situ* hybridization を行う。既にパイロットスタディーを施行し眼組織と肢芽で非常に特徴的な強い発現を認めている。

(2) *SMO1* を homozygous にトラップしたモデルマウスの作成

データベース検索の結果、幸運にも *SMO1* トラップマウスが既に作成されていることを確認し、既に *SMO1* トラップマウスの受精卵を入手している。この受精卵を偽妊娠

マウスに戻しヘテロのトラップマウスを得る。*SMOC1* のみで確実にトラップされていることを、PCR およびサザンブロット法で検証した後、ヘテロの雄とヘテロの雌を交配させホモトラップマウスを得る。

#### (3) マウスモデルの解析

ホモトラップマウス胎仔を含めてまず表現型を詳細に解析し MLA を呈するかを検討する。さらに(1)と同様の時期での whole in situ hybridization および形態の観察を行う。*SMOC1* と関連する分子の発現等も詳細に検討する。

#### (4) 変異未同定の1家系における候補遺伝子の網羅的な検討

エクソンキャプチャーを用いて全遺伝子を網羅的に集積し保有する次世代シーケンサー・イルミナゲノムアナライザーIIxにて大量並列シーケンスを行い塩基置換およびIns/De1 リストを作成し、データベーススクリーニングによって SNP を除外し、病的な変化の候補をリストアップする。さらに通常のキャピラリーシーケンサーを用いて塩基変化部位が同様に検出できるかを検証する。

#### 4. 研究成果

Sleeping beauty system により作成されたトラップマウスで *Smoc1* 異常が報告されているマウスを入手し、遺伝子トラッピングを詳細に観察した。この結果入手したマウスは *Smoc1* 部位以外にさらに異なる3箇所の異常を認めため交配により *Smoc1* 異常のみを有するマウスを単離した。この *Smoc1* トラップマウスモデルの解析において同マウスで MLA 患者で特徴的な視神経の形成不全と小眼球症、および合指症や腓骨の低形成などの四肢形成異常が高頻度に認められた。またモデルマウスの四肢発生に於いて BMP シグナルの減少(異常)が、趾間部での細胞死の減少をもたらし、これが合指症の原因となっている可能性が強く示唆された。本研究でこれまで機能の詳細が不明であった SMOC1 が、ヒト及びマウスの正常な眼・手足の形成に必須であることが判明

した。残りの未解明の1家系では次世代シーケンサーによる全エクソーム解析を施行した。現在候補遺伝子の探索が進行している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

①Okada I, Hamanoue H, Terada K, Tohma T, Megarbane A, Chouery E, Abou-Ghoch J, Jalkh N, Cogulu O, Ozkinay F, Horie K, Takeda J, Furuichi T, Ikegawa S, Nishiyama K, Miyatake S, Nishimura A, Mizuguchi T, Niikawa N, Hirahara F, Kaname T, Yoshiura K-i, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Furukawa T, Matsumoto N, Saito H. *SMOC1* is essential for ocular and limb development in humans and mice. *Am J Hum Genet* 88(1): 30-41, 2011

②Saito H, Hoshino H, Kato M, Nishiyama K, Okada I, Yoneda Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kubota M, Hayasaka K, Matsumoto N. Paternal mosaicism of a *STXBPI* mutation in Ohtahara syndrome. *Clin Genet* 80 (5):484-488, 2011.

③Saito H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama K, Nishimura A, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N. Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (*SRGAP2*). *Am J Med Genet Part A* 158 (1):199-205, 2011

④Saito H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, Shiina M, Kondo Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Doi H, Ogata K, Inoue K, Matsumoto N. Mutations in *POLR3A* and *POLR3B* encoding RNA polymerase III subunits cause an autosomal recessive

hypomyelinating leukoencephalopathy. Am J Hum Genet 90 (1):86-90, 2011.

⑤Saitsu H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Furukawa T, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Hachiya Y, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai S, Ogata K, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. Dominant negative mutations in  $\alpha$ -II spectrin cause early onset West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. Am J Hum Genet 86(6):881-889, 2010.

⑥Saitsu H, Kato M, Okada I, Orii KE, Kondo N, Wada T, Hoshino H, Kubota M, Arai H, Tagawa T, Kimura S, Sudo A, Miyama S, Takami Y, Watanabe T, Nishimura A, Nishiyama K, Miyake N, Osaka H, Hayasaka K, Matsumoto N. *STXBPI* mutations in severe infantile epilepsies with suppression-burst pattern. Epilepsia 51(12): 2397-2405, 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増子 精視 (西山 精視) (MASUKO KIYOMI)  
横浜市立大学・医学研究科・技術吏員  
研究者番号：00535817

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

松本直通 (MATSUMOTO NAOMICHI)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：80325638

才津浩智 (SAITSU HIROTOMO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40402838