

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17320

研究課題名(和文)全前脳胞症スペクトラムに表現型の多様性をもたらす分子遺伝学的背景の解明

研究課題名(英文)The study to elucidate the background of molecular genetics that cause holoprosencephaly spectrum disorders the diversity of phenotype

研究代表者

阿部 裕 (ABE, Yu)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：00789787

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HPE 症例5例、Binderoid complete cleft lip /plate および疑い症例3例において Targeted NGS panel を実施した。そのうち1例のHPE 症例で既知の原因遺伝子SIX3 にde novo のフレームシフトを同定した。2例のHPE では病的意義が明確ではないバリエーションを認めたと候補バリエーションの絞り込みは困難であった。残り2例のHPE は解析を継続中である。Binderoid complete cleft plate 疑いの1例でKAT6A のミスセンス変異を同定しArboleda-Tham syndrome と診断した。

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)：A Targeted NGS panel was performed in 5 HPE cases and 3 Binderoid complete cleft lip / plate cases. Among them, a de novo reported frameshift variant was identified on the causative gene SIX3 in a HPE case. In 2 cases of HPE, the variants with unclear pathological significance were found, but it was difficult to narrow down the candidate variants. The remaining two HPEs are still being analyzed. A missense mutation in KAT6A was identified in a Binderoid complete cleft lip / plate suspected case and diagnosed as Arboleda-Tham syndrome.

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、研究者個人に帰属します。

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、正中部で大脳皮質・基底核・視床の癒合を認め、顔面正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)。

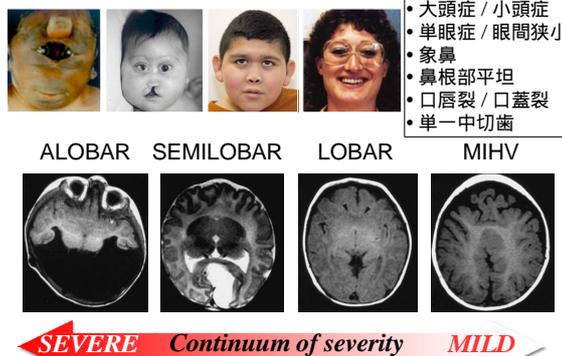


図1, 全前脳胞症 (Holoprosencephaly: HPE)

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13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。

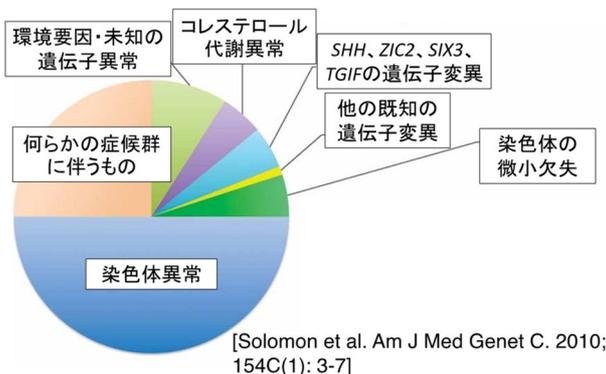


図2, 全前脳胞症(出生児)の原因の内訳

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3)。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。

図3, Binderoid complete cleft lip/plate



Roessler らは Trio (HPE 発端者+母+父)136 家系を含む 333 例を対象に神経発生に關与する主要なシグナル伝達経路上に存在する 153 遺伝子を、targeted capture sequence によって解析した(Roessler et al. Hum Mutat. 2018; 39(10): 1416-1427.)。解析の中で彼らは、非翻訳領域中の種を超えて保存されている領域(evolutionary conserved region)に存在する common variant が、SHH などの主要遺伝子に存在する driver mutation の modifier として機能している可能性を示唆している。HPE においては、autosomal driver としての主要遺伝子の変異と、common modifier としての種を超えて保存された非翻訳領域に存在する common variant が同時に存在することにより、表現型が修飾される遺伝形式(digenic inheritance)が最も common なメカニズムとして存在している可能性を示している。

HPE の多様性に關与する common modifier の存在は、HPE スペクトラムの広がりをも分子遺伝学的に説明しうる可能性がある。申請者は、HPE と Binder 症候群、Binderoid complete cleft lip /plate について、その臨床的類似性に着目し、HPE、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、HPE スペクトラムとして共通の分子遺伝学的病態が存在する可能性について思い至った。

2. 研究の目的

本研究では 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 による解析を行い、遺伝子型と表現型の關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し、表現型に多様性をもたらす修飾因子や胎児期早期の前脳の発生・発達に關与する因子を明らかにすることを目的とする。

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、顔面正中領域の低形成による顔貌異常を伴う症例とする。脳画像検査で大脳皮質・基底核・視床の正中領域での癒合を認める症例、あるいは大脳鎌の欠損、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關する申請を行い、許可を得る。次に東北大学医学系研究科の遺伝子検査に關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 10 ml 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 の発症に關わる主要な 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、シグナル伝達に關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・発達への關連が報告されているその他の signaling pathway (fgf, bmp, wnt, notch, nodal, tfp)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關わる遺伝子

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。

4. 研究成果

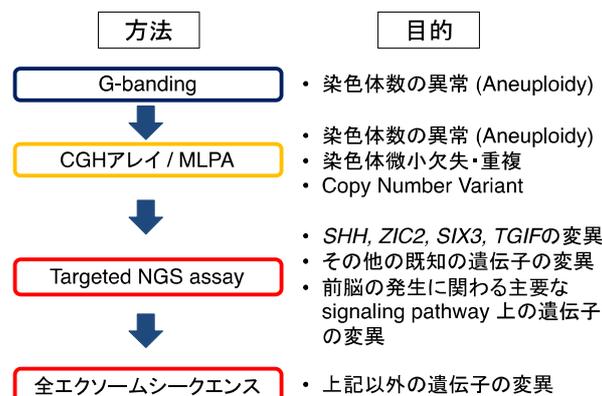


図4, 遺伝学的解析のストラテジー

対象症例は年齢・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した。本研究開始時点で東北大学病院から Binder 症候群 3 例、 Binderoid cleft lip /plate 8 例を含む、15 例の HPE スペクトラム症例を集積していた。新たに宮城県立こども病院・八戸市民病院でそれぞれ HPE 症例 1 例、鶴岡市立荘内病院で典型的な HPE 症例(LOBAR 型)1 例と 4 例の Binderoid complete cleft lip /plate 疑い例を同定した。対象症例は令和 4 年度末までに、東北大学病院・宮城県立こども病院・八戸市立市民病院・鶴岡市立荘内病院から典型的な HPE 症例 8 例、東北大学病院・鶴岡市立荘内病院から Binder 症候群・Binderoid complete cleft lip /plate とその疑い例 15 例となった。

番号	施設	生年月日	性別	全前脳胞症	結果
1	東北大学病院	2000/09/07	女	全前脳胞症	未
2	東北大学病院	2001/12/18	女	全前脳胞症	未
3	東北大学病院	2008/09/19	女	全前脳胞症	未
4	東北大学病院	2011/06/01	女	全前脳胞症	n.p.
5	東北大学病院	1990/09/25	女	Binderoid Cleft	未
6	東北大学病院	1996/10/18	女	Binderoid Cleft	未
7	東北大学病院	1998/01/24	女	Binderoid Cleft	未
8	東北大学病院	2001/11/19	女	Binderoid Cleft	未
9	東北大学病院	2007/11/13	女	Binderoid Cleft	未
10	東北大学病院	1998/06/16	男	Binderoid Cleft	未
11	東北大学病院	2009/12/25	女	Binderoid Cleft	未
12	東北大学病院	2011/08/31	男	Binderoid Cleft	未
13	東北大学病院	1998/09/03	女	Binder症候群	未
14	東北大学病院	2005/07/14	女	Binder症候群	未
15	東北大学病院	1998/12/05	女	Binder症候群	未
16	八戸市立市民病院		女	全前脳胞症	SIX3, de novo
17	宮城県立こども病院	2016/4/17	女	全前脳胞症	n.p.
18	東北大学病院	2021/6/9	男	全前脳胞症	解析中
19	鶴岡市立荘内病院	2013/12/9	女	全前脳胞症	解析中
20	鶴岡市立荘内病院	2020/1/17	女	特徴的顔貌、小頭症、三角頭蓋	n.p.
21	鶴岡市立荘内病院	2020/7/8	女	特徴的顔貌、斜頭+斜頭蓋	KAT6A, de novo
22	鶴岡市立荘内病院	2016/9/21	男	特徴的顔貌、頭囲拡大、過成長	n.p.
23	鶴岡市立荘内病院	2020/12/14	男	特徴的顔貌、知的障害	未

図5, 症例の集積状況

その中の HPE 症例 5 例 (ALOBAR 型 1 例、SEMILOBAR 型 1 例、LOBAR 型 3 例)、Binderoid complete cleft lip /plate およびその疑い症例 3 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。全ての症例に対して 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 975,605 bp 対象領域とし、Hiseq 2000 を用いてシーケンスを実施した。

そのうち八戸市立市民病院で同定された ALOBAR 型の HPE 症例で既知の原因遺伝子 SIX3 に de novo のフレームシフトを同定した。2 例の HPE では病的意義が明確ではないバリエーションを認めしたが、候補バリエーションの絞り込みは困難であった。残りの 2 例の HPE は解析を継続中である。Binderoid complete cleft plate 疑いの 1 例で KAT6A のミスセンス変異を同定し Arboleda-Tham syndrome と診断した。残りの Binderoid complete cleft plate 疑い 2 例では解析を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------