

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591411

研究課題名(和文) 先天性中枢性低換気症候群の病態について：  
PHOX2B変異とハプロタイプ研究課題名(英文) Molecular basis of congenital central hypoventilation syndrome：  
PHOX2B mutation and its haplotypes

研究代表者

佐々木 綾子(SASAKI AYAKO)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：60333960

研究成果の概要(和文)：

先天性中枢性低換気症候群の約90%の症例では、PHOX2B遺伝子の5-13個のアラニン鎖の伸長変異を有しており、残りの10%はその他の変異である。私達は、伸長変異は父由来であり、精子形成時における姉妹染色分体交換によることを報告した。今回の研究では、これらの更なる確認と、7アラニン伸長変異とrs17884724:A>C多型との関係を明らかにし、主な伸長機構は精子形成時における姉妹染色分体交換であることを確認した。また、アラニン伸長変異の約90%はde novoの変異であると考えられてきたが、最近、親からの遺伝が25%を占めるとの報告があり、今回の研究で同様な結果を確認した。遺伝子診断は確定診断、合併症の管理および遺伝カウンセリングに非常に有用であることを報告した。

研究成果の概要(英文)：

With congenital central hypoventilation syndrome (CCHS), most patients carry *de novo* polyalanine expansion mutation in *PHOX2B*. We reported previously that *de novo* polyalanine expansion mutations were of paternal origin and derived from unequal sister chromatid exchange during spermatogenesis. In the present study, we analyzed the relation between the haplotypes and *de novo* polyalanine expansion in *PHOX2B* and confirmed the origin and expanded mechanism of *de novo* polyalanine expansion mutation. We also found that haplotypes carrying rs17884724:A>C were detected frequently in seven-alanine expanded (27 alanine) mutant alleles, most prevalent mutations in CCHS. The allele with rs17884724:A>C would make fewer nucleotide mismatches in the misalignment at crossing over than the allele without rs17884724:A>C. High frequency of rs17884724:A>C in seven-alanine expansion mutations would also support the unequal crossover mechanism for polyalanine expansion.

More than 90% of the alanine expansion mutations had been considered to be *de novo* mutation, however, a recent report stated that 25% of patients inherited the alanine-expanded allele from their parents with somatic mosaicism or constitutive mutation. We studied inheritance in 45 unrelated families, and found that 10 patients (22%) inherited alanine expansion mutation from a parent with late-onset central hypoventilation syndrome or asymptomatic parents with somatic mosaicism. Genetic analysis is needed for definite diagnosis and effective genetic counseling.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：

先天性中枢性低換気症候群、*PHOX2B*、アラニン伸長変異、不等姉妹染色分体交換

1. 研究開始当初の背景

先天性中枢性低換気症候群は肺病変や心臓疾患、神経筋疾患及び明らかな脳幹の異常は認めず、呼吸中枢の先天的な異常により睡眠中に低換気を来し著明な低酸素血症、高炭酸ガス血症をもたらす疾患である。本症はヒルシュスプルング病や神経芽細胞腫と合併することがあり、neurocristopathy (神経堤細胞の分化や移動の異常により生ずる疾患)のひとつと考えられており、また多くの症例を集約した疫学的研究から遺伝性疾患であることが示されてきた。

神経堤細胞の分化・誘導に関わる RET, GDNF および EDN3 などの遺伝子異常が、私たちを含め報告されてきた。2003年、フランスの Amiel ら、日本の私達、米国の Weese-Mayer らにより、呼吸中枢の形成および RET の発現に関与する *PHOX2B* の遺伝子異常が確認された。大部分の症例では、ポリアラニンの異常伸長を、一部の症例では、点変異が確認されている。

*PHOX2B* のポリアラニンの異常伸長の殆どは *de novo* の変異である。ポリアラニンの伸長機構としては、減数分裂時における相同染色体間の不等交差によると推定されていたが、2007年、私達は informative な6家系を解析し、全て父親由来の *PHOX2B* が伸長していることを確認した。更に、4家系では、精子形成時の不等姉妹染色分体交換により、伸長していることを明らかにした (J Hum Genet. 52:921-925, 2007)。

伸長機構の解明と、臨床型と遺伝子型との

関係を明らかにするために、多数の症例の遺伝子および haplotype 解析を行う必要があった。

2. 研究の目的

先天性中枢性低換気症候群の約90%の症例では、*PHOX2B* 遺伝子の5-13個のアラニン鎖の伸長変異を有しており、残りの10%はその他の変異である。私達は、伸長変異は父由来であり、精子形成時における姉妹染色分体交換によることを報告した。

今回は、haplotype 解析を行い伸長機構の更なる確認と、7アラニン伸長変異と rs17884724:A>C 多型との関係を明らかにし、主な伸長機構を明らかにする事である。更に、アラニン伸長変異の約90%は *de novo* の変異であると考えられてきたが、本研究開始後、親からの遺伝が25%を占めるとの報告があり、報告は少数例であったために、これらを確認することも目的とした。

3. 研究の方法

国内の医療機関より遺伝子診断を依頼される症例および家族について、文書による承諾書を得たものを対象とした。*PHOX2B* について、翻訳領域を PCR にて増幅し、直接塩基配列を決定した。また、伸長変異に関しては、一部 PCR 産物をプラスミドにサブクローンし塩基配列を決めた。haplotype 解析では、long PCR を施行し、プラスミドにサブクローンし塩基配列を決めた。伸長変異を有する症例の家族解析では、Fragment analysis を行った。な

お、定量に際しては、伸長変異を有するゲノムと対照ゲノムを混合し標準試料を作成し、同様に測定し、回帰直線を求め、定量した。

#### 4. 研究成果

de novo の伸長変異に関し、2007年、私達は informative な6家系を解析し、全て父親由来の *PHOX2B* が伸長していることを確認した。更に、4家系では、精子形成時の不等姉妹染色体分体交換により、伸長していることを明らかにした。今回、更にこれらの事実を3家系で確認した。7アラニン伸長変異では、rs17884724:A>C 多型頻度が有意に高く、この多型を有すると不等姉妹染色体分体交換モデル作成時にミスマッチが少なくなることから、推定する伸長機構の裏付けになるものと考えた。

また、アラニン伸長変異の約90%は de novo の変異であると考えられてきたが、最近、親からの遺伝が25%を占めるとの報告があり、今回45家系を解析し、1例は late-onset CCHS の親から、また9例は無症状の変異のモザイクの親からの遺伝であることを明らかにし、約25%は親からの遺伝であることを確認した。遺伝子診断は確定診断。合併症の管理および遺伝カウンセリングに非常に有用であることを報告した。

#### 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4件)

- ① Fujiwaki T, Hasegawa H, Arai H, Hayasaka K, Ohta S. Slowly progressive sleep apnea in late-onset central hypoventilation syndrome. *Pediatr Int*, 254: 290-292, 2012. 査読有  
Doi:10.1111/j.1442-200X.2011.03431.X
- ② Meguro T, Yoshida Y, Hayashi M, Toyota K, Otagiri T, Mochizuki N, Kishikawa Y, Sasaki A, Hayasaka K. Inheritance of polyalanine expansion mutation of *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome. *J Hum Genet*, 22, in press, 2012, 査読有

Doi:10.1038/jhg.2012.27

- ③ 早坂 清、荒井博子、吉田悠紀、小田切徹州、佐々木綾子、先天性中枢性低換気症候群における *PHOX2B* 遺伝子異常について、日本小児科学会雑誌、115、769-776、2011、査読有
- ④ Arai H, Otagiri T, Sasaki A, Umetsu K, Hayasaka K. Polyalanine expansion of *PHOX2B* in congenital central hypoventilation syndrome: rs17884724:A>C is associated with seven-alanine expansion. *J. Hum. Genet.* 55, 4-7, 2010, 査読有

[学会発表] (計1件)

- ① 早坂清. 先天性中枢性低換気症候群における *PHOX2B* 遺伝子異常について. 第114回日本小児科学会総会. 平成23年4月15-17日. 東京都港区 グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐々木 綾子 (SASAKI AYAKO)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号：60333960

##### (2) 研究分担者

早坂 清 (HAYASAKA KIYOSHI)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号：20142961