

博士(医学) 佐藤大介

学位論文題名

遺伝性疾患における分子遺伝学研究

学位論文内容の要旨

先天性奇形症候群の発症機構は多岐にわたり、発症の成因によって解析方法も多岐にわたる。本研究では、複数の先天異常症候群において、その発症機構を考慮しながら、複数のアプローチ法でその原因・成因を明らかにすべく解析を行った。本研究で対象とした疾患は、先天性無鼻症、先天性合指症IV型、ダウン症候群である。尚、本研究に用いた患者試料はすべてインフォームドコンセント取得後、収集・使用した。先天性無鼻症は出生時より外鼻欠損・外鼻孔の閉鎖を主徴とする極めて稀な先天異常である。原因は不明であるが家族発症例の存在と染色体異常例が報告されており遺伝的要因が発症に関与することが推測されている。いくつかの候補遺伝子が考えられているが、これまで遺伝解析は行われていない。合指症は先天性四肢奇形の中で最も高頻度に見られる奇形の一つであり、単独症状あるいは奇形症候群の部分症状として見られる。癒合している手指・足趾により5型(I~V型)に分類される。合指症I、II、III、V型はそれぞれ染色体領域2q34-q36、2q31-q32、6q21-q23.2、2q31-q32に遺伝子座がマッピングされている。一方、合指症IV型は、骨癒合を伴わない完全合指症で、いわゆるコップ手を呈し、Haas型とも呼ばれ極めて稀な疾患で遺伝子座の局在は不明である。ダウン症候群は精神発達遅滞を伴う最も多い先天異常である。殆どのダウン症候群患者は21番染色体完全トリソミーを有するが、稀に21番染色体部分トリソミーを有する患者が存在し、彼らのゲノム解析からダウン症候群の本質的な特徴に寄与する遺伝子(群)を含むと考えられている特定領域、Down syndrome critical region(DSCR)の存在が示唆されている。DSCRは21q22の長さ約5.4 Mbの特定の範囲に存在すると推測されている。本研究では、先天性無鼻症、先天性合指症IV型、ダウン症候群について、それぞれの解析法により疾患発症機構を解明することを目的とした。

対象と方法

(1) 先天性無鼻症5症例の分子遺伝学解析

先天性無鼻症を伴う新生均衡型転座t(3;12)(q13.2;p11.22)を有する台湾人症例の染色体転座切断点解析を行った。また、核型正常の無鼻症患者4症例のDNAサンプルを用いて解像度約1.5Mbの全ゲノムアレイCGH解析および候補遺伝子変異解析を行った。

(2) 先天性合指症IV型の連鎖解析および変異解析

中国で発見された非症候性先天性合指症IV型を伴う5世代8名(男性4名、女性4名)の罹患者を有し、常染色体優性遺伝性の1家系で全ゲノム連鎖解析および候補遺伝子変異解析を行った。

(3) 珍しい核型を呈するダウン症候群患者の解析

DSCRを狭める可能性のある21番染色体部分トリソミーのダウン症候群患者の分子遺伝学解析を行った。550バンドGバンド解析、染色体SKY(Spectral karyotyping)法、2色カラーフィッシュ、解像度約1.5Mbの全ゲノムアレイCGH解析を行った。染色体切断点を同定すべく通常のFISH解析も行った。

## 結果

(1) ゲノムデータベース上から 3q 切断点付近に局在する BAC クローンを選択し、次いで各クローンを用いた FISH 解析を患者染色体上で行ったところ 3q13.2 転座切断点領域に約 19 Mb の欠失を確認した。もう一方の切断点の 12p11.22 では、転座点を含む BAC クローンが同定できたが、ゲノムデータベース上で転座によって破壊されている既知遺伝子は存在せず、また欠失も無いと考えられた。全ゲノムアレイ CGH 解析では、ゲノムコピー数の異常は認めなかった。FISH 解析で明らかになった 19 Mb の 3q 欠失領域内に顔面発生に関わる遺伝子 *COL8A1* と *CPOX* が存在し、それらを候補遺伝子と考え正常核型 4 症例の無鼻症の DNA を用いてエクソン及びエクソン近傍イントロンの変異解析を行ったが病的変異は見つからなかった。

(2) 全ゲノムに均一に分布する計 406 個のマイクロサテライトマーカーを用いたアレルタイピングでは 7 人(II-2, III-2, 5, 6, 7, IV-2, 3)の DNA サンプルのみが解析できた。その結果ロッドスコアが 1 以上の候補領域が 5 箇所 (それぞれ 2 番、7 番、12 番、16 番、17 番染色体上の D2S2152, D7S559, D12S1052, D16S3039, D17S182) 見つかった。これらの 5 候補領域の内、ハプロタイプ解析により 4 候補領域が除外され、7q36.3 の D7S559 のみが合指症 IV 型の候補領域となった。7q36.3 周囲のマーカーを追加し、後に得られた 4 人 (IV-1, 4, V-1, 2) の DNA サンプルを加え更なる解析を行った。候補領域内の 2 点解析で最大ロッドスコアは組換え率 0.00、浸透率 1.00 で 1.613 を算出した。ハプロタイプ解析により 5 マーカー、D7S1815, D7S798, D7S637, D7S2447, D7S559 で罹患者のみ同一ハプロタイプ 3-1-1-3-4 を共有していた。これらの所見より本家系の合指症 IV 型の遺伝子座は算出ロッドスコアが完全な連鎖を認めるには十分な値ではないが 7q36 の 17.39-cM に存在すると考えられた。その領域内で *LMBR1*, *SHH*, *ZRS* を候補遺伝子と考えエクソン及びエクソン近傍イントロンの変異解析を行ったが病的変異は見つからなかった。

(3) 患者の核型は最終的に 46,XX,psu idic(21)(q22.13)ins(13;21)(q12.1;q22.13q22.3)dn と考えられた。アレイ CGH は同一の 21 番染色体部分トリソミー領域を検出したが他のゲノムコピー数の異常は認めなかった。ゲノムデータベース上で切断点に既知遺伝子が存在しないことも確認した。

## 考察

(1) 転座例の先天性無鼻症の切断点に既知遺伝子は存在しなかったが、その切断点に未知の RNA 転写物が存在する可能性と、切断が長距離位置効果を及ぼしている可能性が考えられた。また、3q11.2-3q13.31 欠失領域と一部分でも重複する欠失を有する症例の欠失領域と臨床所見との比較により、3q12-3q13.31 欠失領域は先天性無鼻症発症に関係ないと考えられ、無鼻症遺伝子局在が 3 番染色体長腕にあるならば、3q11.2-3q12 間に限局できると考えられた。

(2) 全ゲノム連鎖解析により合指症 IV 型の遺伝子座を 7q36 にマッピングした。また合指症 IV 型は合指症 I, II, III, V 型とは non-allelic な疾患であると考えられた。合指症 IV 型の遺伝子座のマッピングは初めての報告であり、今後原因遺伝子同定の有力な第一歩となると思われる。

(3) 正確な切断点が同定されている 21 番染色体部分トリソミー症例群と本患者のトリソミー領域を比較することにより、DSCR の範囲を従来の約 5.4 Mb から約 2.3 Mb までに絞り込むことが可能であると考えられた。我々の患者はダウン症候群の殆どの主要症状を呈していたので、今回新たに限局された DSCR は人間のダウン症候群発症の主要な役割を担うと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主査教授 笠原正典  
副査教授 清水宏  
副査教授 秋田弘俊  
副査教授 小野江和則  
副査教授 有賀正

## 学位論文題名

### 遺伝性疾患における分子遺伝学研究

先天性奇形症候群の発症機構は多岐にわたり、発症の成因によって解析方法も多岐にわたる。本研究では、複数の先天異常症候群において、その原因・成因を明らかにすべく分子遺伝学解析を行った。本研究で対象とした疾患は、先天性無鼻症、先天性合指症IV型、ダウントン症候群である。先天性無鼻症は出生時より外鼻欠損・外鼻孔の閉鎖を主徴とする先天異常である。合指症IV型は、骨癒合を伴わない完全合指症で遺伝子座は不明である。ダウントン症候群は精神発達遅滞を伴う最も多い先天異常でダウントン症候群の本質的な特徴に寄与する遺伝子（群）を含むと考えられている特定領域、Down syndrome critical region (DSCR) が21q22の約5.4 Mbに存在すると推測されている。本研究では、先天性無鼻症、先天性合指症IV型、ダウントン症候群について、分子遺伝学解析法により疾患発症機構を解明することを目的とした。

対象は先天性無鼻症では新生均衡型転座t(3;12)(q13.2;p11.22)を有する1症例と核型正常の4症例で、転座切断点解析および全ゲノムアレイCGH解析と候補遺伝子変異解析を行った。先天性合指症IV型では中国の5世代8名の罹患者を有し、常染色体優性遺伝性の1家系で全ゲノム連鎖解析および候補遺伝子変異解析を行った。ダウントン症候群ではDSCRを狭める可能性のある21番染色体部分トリソミーのダウントン症候群患者の分子細胞遺伝学解析を行った。

結果として転座例の先天性無鼻症でFISH解析を行ったところ3q13.2転座切断点領域に約19Mbの欠失を確認した。もう一方の切断点12p11.22では、転座点を含むBACクローンが同定できたが、転座によって破壊されている既知遺伝子は存在しなかった。全5症例の全ゲノムアレイCGH解析では、3qの欠失以外にはゲノムコピー数異常は認めなかった。2つの候補遺伝子を同定し正常核型4症例の無鼻症で変異解析を行ったが病的変異は見つからなかった。先天性合指症では全ゲノム連鎖解析で合指症IV型の遺伝子座を7q36の

17.39-cM にマッピングした。3つの候補遺伝子を変異解析したが病的変異は見つからなかつた。ダウン症候群患者の核型は 46,XX,psuidic(21)(q22.13)ins(13;21)(q12.1;q22.13q22.3)dn と考えられた。

以上の結果より転座例の先天性無鼻症の切断点に既知遺伝子は存在しなかつたが、その切断点に未知の RNA 転写物が存在する可能性と、切断が長距離位置効果を及ぼしている可能性が考えられた。また、他の 3q 欠失症例との比較により、無鼻症遺伝子局在が 3q11.2-3q12 間に限局できる可能性が考えられた。先天性合指症 IV 型では全ゲノム連鎖解析により遺伝子座を 7q36 にマッピングした。ダウント症候群では 21 番染色体部分トリソミー症例群と本患者のトリソミー領域を比較することにより、DSCR の範囲を従来の約 5.4 Mb から約 2.3 Mb までに絞り込むことが可能であると考えられた。

非公開発表に際し、主査の笠原正典教授から、先天性無鼻症の候補領域、候補遺伝子、他の候補遺伝子の可能性、合指症の候補領域、候補遺伝子、候補領域内の他の遺伝子、本研究において申請者が実験を行った範囲、今後の本研究の発展性について、副査の清水宏教授から、先天性無鼻症 5 症例の表現型、同病は単一遺伝子病かどうか、合指症の候補領域の確実性、更なる候補領域限局の必要性、新たな DSCR 内にダウント症候群関連遺伝子の有無について、また副査の秋田弘俊教授から先天性無鼻症候補領域内の遺伝子の発現部位、同病発症原因の考察、ダウント症候群と癌の関連性、遺伝子の 3 倍量発現で正常と異なる表現型を生じる機序について、また副査の小野江和則教授から先天性無鼻症の報告数、候補遺伝子変異解析部位と候補遺伝子を完全に否定できるかどうか、原因遺伝子の破壊という用語使用法、合指症発生機序および治療、ダウント症候群の寿命について、また副査の有賀正教授から先天性無鼻症の発生機序における家族発症報告例の遺伝的解釈、合指症 IV 型の表現型についての質問があつたが、いずれの質問に対しても申請者は妥当な回答をした。

本研究は、先天性無鼻症の初の分子遺伝学解析、合指症 IV 型の遺伝子座の初のマッピング、DSCR 狹小化の可能性という多くの新しい知見を示した点で高く評価され、今後、これらの結果をふまえてこれらの疾患の原因遺伝子を同定し発症機構を解明する有力な手がかりとなることが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。