

学位論文題名

# Genetic factors that determine Prader-Willi syndrome phenotype

(プラダー・ウィリー症候群の表現型を規定する遺伝要因に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

### 【背景と目的】

Prader-Willi 症候群 (PWS) は新生児期の筋緊張低下、乳児期以降の食欲亢進と肥満、精神遅滞などを特徴とする、比較的頻度の高い疾患である。発生頻度は 15,000 人に 1 人とされ、遺伝性肥満では最も一般的である。責任領域は 15 番染色体長腕 q11-q13 (15q11-q13) に位置し、この領域はゲノム刷り込み現象の対象領域で親由来により特異的な遺伝子発現が行われている。15q11-q13 に位置する父性発現遺伝子の機能障害により PWS が発症する事が古くから知られているが、PWS の原因遺伝子は特定されておらず、この領域に含まれる全ての父性発現遺伝子が候補遺伝子となっている。また本研究室では PWS 様表現型を呈する症例中に、特に乳児期の表現型が類似する 14 番染色体母性片親性ダイソミー (upd(14)mat) の存在を同定し報告している。さらに近年 PWS 様表現型を呈する他の染色体異常の報告もあり、PWS 様表現型を呈する他の遺伝要因が示唆されている。本研究では全ゲノムを対象に網羅的コピー数解析を行い、同定された微細染色体異常の遺伝型表現型解析を検討する事とした。これにより PWS の表現型を規定する遺伝要因に関して検討し、さらに PWS 病因解明への情報発信を行う事を目的とした。

### 【対象と方法】

1996 年から 2010 年までの期間に臨床症状より PWS が疑われた症例 175 例中、PWS および upd(14)mat が遺伝学的に否定された 78 例を対象とした。表現型をもつ患児の末梢血白血球由来ゲノム DNA を用いて Genome-Wide Human SNP Array 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) によるマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイデータの数値化およびコピー数算出から染色体コピー数異常を検討し、同定された染色体コピー数異常は確認のため FISH 法または MLPA 法を行った。また表現型解析ではアンケート調査による現在の臨床情報を収集し、遺伝型解析と併せて詳細検討を行った。さらに同定された微細染色体異常の中に、新奇性に富むものが含まれているか様々なデータベースを用いて新奇性検討を行った。なお本研究は北海道大学大学院医学研究科・医学部医学科の倫理委員会の承認を得て実施している。

### 【結果】

1Mb 以上のコピー数異常を 21 例同定した。内訳は PWS 様表現型を呈すると報告のあるコピー数異常が 3 例 (1p36 欠失 2 例、Xq28 重複)、精神遅滞などの原因であることが既に報告されているコピー数異常 12 例 (1q44 欠失、2p14 欠失、2q24 欠失、3q13 欠失、4q21 欠失、5q31 欠失 2 例、6q24 欠失、7p15 欠失、15q13 重複、22q11.2 欠失、Xp22 欠失)、

精神遅滞や自閉症などの疾患感受性が報告されているコピー数異常が3例(1q21.1欠失、1q21.1重複、16q13.11重複)であった。残り3例(1q22欠失、1q42重複、Xq22重複)はこれまでに報告のないコピー数異常であり、CNVの報告と一致しない位置であった。また報告のないコピー数異常3例のうち遺伝性検討が可能であった2例は全て *de novo* の異常であった。表現型に関しては、染色体コピー数を同定した群での比較より、乳幼児期の表現型である筋緊張低下、精神発達遅滞はほぼ全例に認め、男児例では停留睾丸も併せて呈していた。さらに3歳以降では乳児期症状と併せ肥満症状を呈する例が増えていた。また新奇性検討から、7p15欠失症候群はこれまで着目されていなかった共通した表現型を呈する症候群である事と、2例の5q31.3欠失症候群は新奇の症候群が予想される事から、詳細解析の必要性が示された。

#### 【考察】

過去の様々な体系的な先天性疾患のゲノム網羅的解析の結果と比較すると、本研究で同定された微細染色体異常の割合は多いと考えられる。本研究において微細な染色体コピー数異常が比較的多く同定された事は、アレイ解析が効果的である疾患の1つと予想された。詳細な表現型解析から乳児期の発育不良、筋緊張低下はほとんど全ての症例で呈する表現型であり、これらは微細染色体異常を疑う要因である事が示唆された。また乳児期には疾患特有の表現型が十分に確立されていないので、乳児期の発育不良、筋緊張低下を主訴とする症例に対するアレイ解析などによる網羅的解析は意義が高いと考えられる。

本研究では7p15欠失症候群および5q31.3欠失症候群の新奇性を報告した。7p15欠失症候群は欠失領域内に含まれるHand-Foot-Genital症候群の責任遺伝子 *HOXA13* を含むため、この疾患の特徴も示すもののPWSと一部共通した表現型を呈する事が示唆された。5q31.3欠失症候群の検討では、同様の欠失例集積から表現型の特徴を捉える事ができた。さらに全例で共通した表現型を呈する事から新奇微細染色体欠失症候群である事が示唆された。

#### 【結論】

臨床症状よりPWSが疑われ遺伝学的にPWSが否定された症例中に、複数の微細染色体異常を同定した。同定された微細染色体異常を有する症例はPWSとよく似た表現型を呈しており、これらの領域に含まれる遺伝子はPWSの発症に関連する可能性がある。よって本研究で実施した遺伝型表現型解析は、PWSの発症機序を理解する上で重要な情報となる事が期待される。さらに本研究で同定された微細染色体異常は他の体系的な研究に比べ検出率が高く、PWSで高頻度に認められる乳児期の筋緊張低下および発育不良などの症状を呈する症例はアレイ解析が有用である事が示された。

本研究において同定された微細染色体異常の詳細な遺伝型表現型解析から、新奇性の富む7p15欠失症候群および5q31.3欠失症候群を同定し報告した。7p15欠失型Hand-Foot-Genital症候群の同定から、PWSとの一部共通する表現型を有するなど疾患の特徴を捉える事が出来た。また5q31.3欠失症候群は遺伝型表現型解析より新奇の微細染色体欠失症候群である事を同定し、欠失幅検討から2つの候補遺伝子同定へ繋がった。

本研究では遺伝型解析と併せて表現型解析も詳細に検討していることより、これらの情報発信は臨床遺伝学のみならず臨床診療への貢献に繋がるものと考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	田中伸哉
副査	准教授	矢部一郎
副査	准教授	折館伸彦
副査	教授	有賀正

学位論文題名

## Genetic factors that determine Prader-Willi syndrome phenotype

(プラダー・ウィリー症候群の表現型を規定する遺伝要因に関する研究)

Prader-Willi 症候群 (PWS) は新生児期の筋緊張低下、乳児期以降の食欲亢進と肥満、精神遅滞などを呈する疾患である。PWS はゲノム刷り込み現象の対象である 15q11-q13 を責任領域とし、この領域の父性発現遺伝子の機能喪失により発症する。本研究室では PWS 様表現型を呈する症例中に、特に乳児期の表現型が類似する 14 番染色体母性片親性ダイソミー (upd (14) mat) の存在を同定し報告している。さらに近年 PWS 様表現型を呈する他の染色体異常の報告もあり、PWS 様表現型を呈する他の遺伝要因が示唆されている。本研究では全ゲノムを対象に網羅的コピー数解析を行い、同定された微細染色体異常の遺伝型表現型解析を検討する事とした。対象は、臨床症状より PWS が疑われたが PWS および upd (14) mat が遺伝学的に否定された 78 例とした。方法は、北海道大学大学院医の倫理委員会の承認のもと、Genome-Wide Human SNP Array 5.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて染色体微細コピー数異常の有無を検討し、併せて表現型解析を行い遺伝型表現型連関に関して検討した。1Mb 以上のコピー数異常を 21 例同定した。内訳は PWS 様表現型を呈すると報告のあるコピー数異常 3 例 (1p36 欠失 2 例、Xq28 重複)、精神遅滞などとの関連が既に報告されるコピー数異常 12 例 (1q44 欠失、2p14 欠失、2q24 欠失、3q13 欠失、4q21 欠失、5q31 欠失 2 例、6q24 欠失、7p15 欠失、15q13 重複、22q11.2 欠失、Xp22 欠失)、精神遅滞や自閉症などの疾患感受性が報告されるコピー数異常 3 例 (1q21.1 欠失、1q21.1 重複、16q13.11 重複) であった。残り 3 例 (1q22 欠失、1q42 重複、Xq22 重複) はこれまでに報告のないコピー数異常で CNV の報告と一致せず、遺伝性検討が可能であった 2 例は全て *de novo* の異常であった。表現型に関しては、染色体コピー数を同定した群での比較より、乳幼児期の表現型である筋緊張低下、精神発達遅滞はほぼ全例に認め、男児例では停留睾丸も併せて呈

していた。さらに 3 歳以降では乳児期症状と併せ肥満症状を呈する例が増えていた。また詳細な遺伝型解析より、7p15 欠失症候群、5q31.3 欠失症候群は新奇性に富む事が予想され、詳細解析を行った。本研究では約 27% (21/78) の症例に微細染色体異常が同定され、比較的検出率が高い事からアレイ解析が効果的である疾患の 1 つと予想された。詳細な表現型解析から乳児期の発育不良、筋緊張低下はほぼ全例で呈する表現型であり、これらは微細染色体異常を疑う要因であると考えられた。また乳児期には疾患特有の表現型が十分に確立されていないので、乳児期の発育不良、筋緊張低下を主訴とする症例に対するアレイ解析などによる網羅的解析は意義が高いと示唆される。さらに、7p15 欠失症候群は Hand-Foot-Genital 症候群の特徴を示しかつ PWS と一部共通した表現型である事、また 5q31.3 欠失症候群は同様の欠失例集積より表現型の特徴を捉え新奇微細染色体欠失症候群である事が示唆された。

学位論文審査では、はじめに副査の矢部准教授より、PWS の責任領域 15q11-q13 における遺伝学的解析の詳細、PWS が疑われる臨床症状、および 5q31.3 欠失症候群の責任候補遺伝子に関する質問を受けた。次いで副査の折館准教授より、臨床症状での PWS 診断基準、および現在 PWS 候補遺伝子として最有力視される HBII-85 に関する質問を受けた。次いで主査の田中教授より、臨床遺伝学的な先天性奇形症候群の DNA アレイ研究の進め方、候補遺伝子の選定方法、および今後 5q31.3 欠失症候群の責任遺伝子の同定へ発展させるための方法論に関する質問を受けた。最後に副査の有賀教授より、近年報告された 15q11.2 微細欠失による PWS 症例の詳細、snRNA および HBII-85 の今後の解析アプローチ方法、および 7p15 欠失症候群の表現型に関する質問を受けた。申請者は全ての質問に対し、自身の実験結果や過去の文献引用などから、概ね適切に回答した。

この論文は、PWS で高頻度に認められる乳児期の筋緊張低下および発育不良などの症状を呈する症例においてアレイ解析が有用であると報告した点、新奇性の富む 7p15 欠失症候群および 5q31.3 欠失症候群を同定し報告した点で高く評価され、今後の PWS の発症機序を理解する上で重要な情報となる事が期待される。

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合わせて申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有すると評価した。