

令和元年6月25日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10852

研究課題名(和文)先天性橈尺骨癒合症の原因遺伝子同定とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and Molecular Analysis of a Potential Disease-causing Mutation in gene A in Congenital Radioulnar Synostosis

研究代表者

加藤 博之 (Kato, Hiroyuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：40204490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本事業の目的は先天性橈尺骨癒合症孤発例に対して全エクソン解析を行い原因遺伝子を同定すること、そこで見つかった遺伝子変異をゼブラフィッシュを用いて機能解析することである。4家系の血液を用いて全エクソン解析を行い、候補遺伝子Aのゼブラフィッシュにおける発現部位、組織について、脳、眼、胸鰭の一部に同遺伝子の強い発現をみとめた。またゼブラフィッシュモデルにおいて遺伝子Aの過剰発現に伴いBMPシグナルを制御する点を見出した。さらにCrispr/Cas9システムを用いて遺伝子Aノックアウトゼブラフィッシュを作製、解析を行い、ヒト橈尺骨癒合症に相当する器官であるゼブラフィッシュの胸鰭の成長障害を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本事業により、先天性橈尺骨癒合症の原因遺伝子同定とその遺伝子の機能が明らかになる。また遺伝子を標的とした発症抑制のオーダーメイド治療法の開発の糸口となる。手術を行う整形外科医が臨床の視点に立って遺伝子解析を行う事は、基礎医学から臨床応用の発展に繋がる。さらに本研究は、関節の発生、分化における遺伝子発現の知見が得られ、骨関節の再生医療に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Congenital radioulnar synostosis is a skeletal disorder resulting in fusion of the radius and ulna. Since the etiology is largely unknown, elucidation of pathophysiology of RUS is needed for development of better treatment.

We collected DNA samples of 10 trios (an affected patient and his or her biological parents) and performed whole exome-sequencing (WES). We identified mutations in several candidate genes including the gene A. The WES identified the following potential disease-causing de novo heterozygous missense mutation in a patient. We performed whole-mount in situ hybridization (ISH) in zebrafish. ISH showed specific expression of gene A in pectoral fins, which correspond to human upper limbs, and in craniofacial regions. Gene A knockdown in zebrafish caused defects in pectoral fins and dorso-ventral patterning, which are likely caused by inhibitory effects of bone morphogenetic protein (BMP) action. These abnormalities were partially rescued by bmp2b RNA overexpression.

研究分野：手外科

キーワード：遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの基礎研究では妊娠ラットの特定時期に薬剤を投与して胎仔に生じた先天異常を分析した。これら古典的な方法から先天異常の生じる臨界期、投与薬剤と遺伝的感受性と先天異常の関係、肢芽・手板における細胞異常と形態形成遺伝子の発現などを明らかにしてきた(Ogino T, Kato H. Congenital Anomalies.1993, Kato H., J Hand Surg Euro.1990, Wang L, Kato H., J Jpn Soc Surg Hand.1988, Ogino T, Kato H. The Hand, ed by Paoul Tubinana, 1998)。しかし、橈尺骨癒合症の発症機序については手がかりはつかめなかった。

近年、上肢先天異常の発症に関する分子生物学・遺伝学アプローチが進歩し、胎生期に形態形成遺伝子群 (*Shh*, *Bmp4*, *Fgf8*, *Hox*, *p63*) が関節・骨の形成分化に重要な働きをしていることが明らかになった。頻度の高い母指多指症、多合指症、短指症では疾患関連遺伝子の異常が報告され注目を集めた (Daluisi A. J Hand Surg Am. 2001)。しかしこれらの先天異常に次いで頻度の高い先天性橈尺骨癒合症に対して全ゲノム網羅的アプローチ(全エクソン解析)を用いた報告はなく、その原因遺伝子は不明であった。

先天性橈尺骨癒合症は、橈骨と尺骨が近位橈尺関節で癒合し、前腕の回旋が不能となる。回内強直が最も多く、手掌が上を向かないため“ちょうだい”の動作が出来ない。本疾患の外科的解離術は困難とされてきたが、本邦より癒合部解離術(Kanaya F, J Bone Joint Surg Am. 1998 Funakoshi T, Kato H, J Shoulder Elbow Surg. 2004)が開発され、手術治療が広く行われるようになった。さらに研究代表者は、低侵襲な橈骨良肢位回旋骨切り術 (Fujimoto M, Kato H, J Pediatr Orthop Am. 2005)を開発し、骨切り術も多く行われている。このように、本症の外科的治療は進歩したにも拘わらず、術後機能回復には限界があり、QOL および ADL には障害が残存する (Masuko T, Kato H. J Bone Joint Surg Am. 2004)。

研究代表者は 2005 年以降、骨系統疾患の一つであるエーラスダンロス症候群の発症遺伝子探求の共同研究に参画し、同症候群の新型とその原因遺伝子を明らかにした (Kosho T, Kato H. Am J Med Genet A. 2005, Am J Med Genet A. 2007, Human Mutat. 2010, Am J Med Genet A. 2010)。さらに教室内研究分担者である中村は、偽性リウマチ様異形成の原因遺伝子 WISP3 の同定に関与し詳細な機能解析を行った (Nakamura Y, J Clin Invest. 2007)。また先天性上肢、脊椎障害に内臓異常を示す VACTERL 連合における疾患関連遺伝子 PCSK5 変異も同定し (Nakamura Y, Kato H. BMC Res Notes. 2015) 先天性側弯症 5 家系の全エクソン解析から 4 つの *de novo* 変異を同定した (未公表データ)。

従って現在の当教室の研究体制から、これまで上肢先天異常の中で全く手がかりのなかった先天性橈尺骨癒合症の遺伝子同定、発症機序の解明に対する研究に着手する準備は万全と判断し、本研究を申請するに至った。

既に本疾患の 9 家系より臨床情報の収集、血液採取、ゲノム DNA 抽出済である。そのうち 2 家系 (兄弟発症例、両親健常) (妹発症、姉健常、両親健常) のゲノム DNA を用いて、EPPK1 遺伝子 (機能は不明) 上に両親からヘテロ遺伝子変異を有し、罹患児は両方の遺伝子変異を持つ“複合ヘテロ変異”を新たに同定した。遺伝形式として常染色体劣性遺伝と考えられる (未公表データ)。一方、橈尺骨癒合症は橈骨の短縮と彎曲がみられ、ファーター連合における橈側列形成障害とも類似しており、両先天異常に何らかの関連があると推測される。一方、AFF1 遺伝子は本疾患を有する患者のみに変異をみとめた *de novo* 変異である。AFF1 遺伝子は AFF ファミリーに属し、同ファミリー-AFF4 遺伝子に変異 (ALF 相同ドメイン内) があるとユビキチン・プロテアソーム系による AFF4 の分解が妨げられ、特徴的な顔つき、発達の遅れ、肥満と低身長を主な特徴とする CHOPS 症候群を発症する (Izumi K, Nat Genet. 2015)。AFF1 遺伝子変異は全 20 エクソンの中で第 15 エクソン上 (ALF 近傍 CHD ドメイン内) に存在するため、疾患関連変異である可能性が高い。

当教室内の実験室に、独自のゼブラフィッシュ飼育システムを有している。本システムでは、30 個の水槽と各水槽に 7 尾のゼブラフィッシュを飼育している。ゼブラフィッシュは骨軟骨を有する脊椎動物であり、遺伝子機能研究に欠かせない遺伝子導入、特異的遺伝子ノックダウン、あるいは過剰発現を容易に効率よく行うことができる。

研究分担者の中村はゼブラフィッシュを用いて、これまでに 20 以上の新規同定遺伝子の機能解析を行ってきたので、ゼブラフィッシュを用いて遺伝子の機能解析をする体制は万全である (J Cell Sci. 2009; Hum Mol Genet. 2010; Mol Cell Biol. 2011; Nature Communications. 2011; BMC Dev Biol. 2012)。

## 2. 研究の目的

本研究では、1) サンプル数を増やし 2 つの新規遺伝子変異の再現性を確認し、2) 最新の解析ツールにより疾患原因遺伝子を同定し、3) 遺伝子改変動物を作成し遺伝子群の機能を解明すること、を目的とした。

### 3. 研究の方法

1)未解析の 7 家系サンプルを用いた全エクソン解析による新規原因遺伝子の絞り込みと  
同定を行う

- ・次世代シーケンサーと未解析7トリオ全サンプルを用いて、全エクソン解析を行う
- ・試薬キットはアジレント社の Sure Select Human All Exon 50mb kit を用いる
- ・獲得した遺伝子変異から疾患関連変異遺伝子を絞り込む
- ・エクソーム解析で得た変異遺伝子に関して、遺伝子変異ごとに特異的 PCR プライマ  
ーの作成、PCR 法、従来型 DNA シーケンサーを用いたサンガーシーケンス(3回以上)  
による変異の確認、を行う

2)EPPK1 遺伝子および AFF1 遺伝子変異の再現性確認

未解析7トリオゲノム DNA サンプルを用いて、サンガーシーケンス(3回以上)による  
変異の確認、を行う。EPPK1 遺伝子上の同一変異、および過去に見出した AFF1 遺伝子  
上の de novo 変異と同一部位における変異のみならず、他の遺伝子部位(ALF 相同ドメ  
イン内など)に変異を確認する(複合ヘテロ変異)。

- ・当教室には、ゼブラフィッシュ飼育システムが完備されている。
- ・各遺伝子特異的配列を有するプローブを作成し、whole-mount *in situ* hybridization 施  
行、ヒトの四肢に相当する器官である胸ヒレとその近傍組織に発現する遺伝子に着目する。
- ・アンチセンスオリゴであるモルフォリノを用いて、各遺伝子のノックダウンを行い、アル  
シンプルーおよびアリザリンレッド染色(骨軟骨染色)を用いて表現型を検証する。
- ・各遺伝子の全長をクローニングし、pCS2+の専用ベクターに組み込む。その後、1 あるいは2細胞期のゼブラフィッシュ卵に DNA を注射し、遺伝子特異的な過剰発現を行う。
- ・既知の遺伝子機能、遺伝子ノックダウン、遺伝子過剰発現の結果から得られた情報により、  
遺伝子のシグナル伝達系を理解し、分子メカニズムを解明する。

### 4. 研究成果

遺伝子 A のゼブラフィッシュにおける発現部位、組織について、*in situ* hybridization を  
用いて脳、眼、胸鱗の一部に同遺伝子の強い発現をみとめた。またゼブラフィッシュモデルに  
おいて遺伝子 A の過剰発現に伴い BMP シグナルを制御する点を見出した。さらに Crispr/Cas9  
システムを用いて遺伝子 A ノックアウトゼブラフィッシュを作製、解析を行い、ヒト橈尺骨癒  
合症に相当する器官であるゼブラフィッシュの胸鱗の成長障害を見出した。

### 5. 主な発表論文等

該当なし

### 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中村 幸男

ローマ字氏名：Nakamura Yukio

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系（医学部附属病院）

職名：講師

研究者番号（8桁）：00549488

研究分担者氏名：林 正徳

ローマ字氏名：Hayashi Masanori

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：20624703

研究分担者氏名：岩崎 倫政

ローマ字氏名：Iwasaki Norimasa

所属研究機関名：北海道大学

部局名：医学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：30322803

研究分担者氏名：小松 雅俊

ローマ字氏名：Komatsu Masatoshi

所属研究機関名：信州大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任研究員

研究者番号（8桁）：60723070

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 孝子

ローマ字氏名：Suzuki Takako