

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：29-17

課題名：クロマチン制御因子と希少疾患-新規原因遺伝子の探索と病的意義の解明-

福井 由宇子 (国立研究開発法人・国立成育医療研究センター)  
(研究所・分子内分泌研究部・特任研究員)

(研究成果の要約) 本研究課題では頭部顔面に多様な小奇形を伴う希少疾患原因遺伝子解析を行った。成育医療研究センター病院における検体収集は分担研究者・遺伝診療科・小崎医長、また国内他機関との連携による検体の収集には分担研究者・成育医療研究センター研究所・分子内分泌研究部・深見部長が小崎医長とともに遂行した。平成30年度は、*CHD7*翻訳領域変異陰性と診断された5名のCHARGE症候群患者を対象にエクソーム解析をおこなった。新規原因候補遺伝子変異を検討した。1名に *WDR11* 遺伝子に新規ヘテロ接合性ミスセンス変異 R703Q を認め主治医と共同で報告をした。一方において、ゲノム編集による変異マウス作成技術改変を分担研究者高田部長が行い、新たな変異候補の病原性を検証する技術基盤を整備した。

### 1. 研究目的

クロマチン構造変換・制御因子群遺伝子は、近年頭部顔面小奇形を伴う症候性希少疾患の原因遺伝子として、相次いで報告されている。しかし、これらの疾患の表現型は多様であり、各々の疾患の境界は明確ではない。クロマチン構造変換・制御因子群は共通の遺伝子を制御すると想定されるため、これはいわば必然の結果であり、複数の遺伝子変異が同一疾患の原因、あるいは一つの遺伝子の変異が複数の疾患の原因になる可能性を示唆される。主任研究者が行ってきたモデル動物マウスにおけるクロマチン制御因子の機能解析では、複数のクロマチン制御因子が頭部顔面形成を制御することを見いだしてきた。これらの独自の研究成果に基づき、病原変異未同定の頭部顔面小奇形を伴う希少疾患において、クロマチン構造変換・制御因子群の遺伝子変異による疾患のダイバーシティを検証する。

### 2. 研究組織

・研究者:福井 由宇子

所属施設:国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・分子内分泌研究部

・研究者:小崎 里華

所属施設:国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・器官病態系内科部・遺伝診療科

・研究者:高田 修治

所属施設:国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・システム発生・再生医学研究部

・深見 真紀

国立研究開発法人・国立成育医療研究センター・研究所・分子内分泌研究部

### 3. 研究成果

頭部顔面に多様な小奇形を伴う希少疾患原因遺伝子解析を対象とした。成育医療研究センター病院における検体収集は分担研究者・遺伝診療科・小崎医長、また国内他機関との連携による検体の収集は小崎医長ならびに分担研究者・成育医療研究センター研究所・分

子内分秘研究部・深見部長が遂行した。多くの国内施設(北海道大学、東北大学、東京医科歯科大学、浜松医科大学、久留米大学、聖マリアンナ医科大学、大津市民病院、岐阜総合医療センターなど)より協力を得た。

*CHD7* 遺伝子翻訳領域変異陰性とされた、CHARGE 症候群 5 名を対象に、エクソーム変異解析を行った。解析は分担研究者・成育医療研究センター研究所・分子内分秘研究部・深見部長とともに主任研究者が行った。この内 1 名には *WDR11* 遺伝子に新規ヘテロ接合性ミスセンス変異 R703Q を認め、主治医と共同で報告をした。*WDR11* は嗅覚異常を伴う低ゴナドトロピン性性線機能低下症原因遺伝子の一つである。2010 年に R395W, A435T, R448Q, H690Q, F1150L ヘテロ接合性ミスセンス変異がゴナドトロピン性性線機能低下症原因遺伝子として報告されて以来、XY 性分化疾患、統合失調症患者にも相次いで変異が報告されている。また、*Wdr11* ノックアウトマウスは性線機能低下以外に、成長障害、眼球低形成、心室中核異常など CHARGE 症候群患者が示す症状に類似した表現型が認められているが、これまでに CHARGE 症候群患者での報告はない。そのため、主治医とともに症例報告を行った(業績参照)。他の 4 名の解析では、患者が持ち、in house 8 名の正常コントロールは持たない全変異 1630 から、1000G、HGVD、ToMMo などによる一般集団中の頻度解析、CADD, PP2 による変異の有害性予測、クロマチン構造変換・制御機能、転写調節機能への関与の予想を推定し、18 遺伝子 19 変異を新規原因候補遺伝子変異として抽出した [表 1]。

[表 1]

1) CADD\_phred は

<https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D88>

6/5146191 による。我々は、>20 を有害と判定する。

2) ヘテロ接合性機能欠失変異(LoF)変異の有害性を判定する pLI 値は ExAC Exome Aggregation Consortium web site <http://exac.broadinstitute.org>より得た。

患者番号	遺伝子名	変異(全てヘテロ接合性変異)	CA DD 1)	ヘテロ病原性予測 2)
1	PTPN11	Chr.12:p.E139D	27.4	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有) Noono 症候群)
	SNRPB	Chr.20:p.A123P	23.2	pLI=0.69 (ヘテロ病原性無) Cerebrocostomandibular syndrome
	CAMTA 2	Chr.17:p.R1066W	23.7	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
2	ZNF609	Chr.15:p.N271K	23.2	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
	NEDD4 L	Chr.18:p.E655Q	23.4	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
	HYAL2	Chr.3:p.R234C	26.1	pLI=0.02 (hetero 病原性無)
	HYAL2	Chr.3:p.F60S	28.3	pLI=0.02 (hetero 病原性無)

3	INTS10	Chr.8: p.E79X	41	pLI=0.98 (ヘテロ病原性有)
	KMT2C	Chr.7: p.P1530 L	27.7	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
	TAOK1	Chr.17: 2785763 8 +2G>A, splicing 変異	27	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
	TLE4	Chr.9: G376E	33	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
	FRYL	Chr.4: 4853035 4 +2C>G, splicing 変異	25.8	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有) Cerebrocostomandibular syndrome
4	HIRA	Chr.22: p.K329R	22.8	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
	AGAP2	Chr.12: p.R65W	27.3	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
	ARHGE F1	Chr.19: p.V569I	31	pLI=0.91 (ヘテロ病原性有)
	BCL9L	Chr.11: p.E536K	28.6	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
	DOCK4	Chr.7: p.S456C	28.7	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)

KIF11	Chr.10: p.I333V	25.2	pLI=1.00 (ヘテロ病原性有)
VPS18	Chr.15: p.R608C	25.1	pLI=0.94 (ヘテロ病原性有)

また、本研究課題では、エクソーム解析を行うため、多くの候補遺伝子変異を解析対象にせざるをえない。より効率的で、かつオフターゲットでの組換えの少ない改変が必要である。分担研究者・成育医療研究センター研究所システム発生・再生医学研究部・高田部長は、CAS9 タンパクを用いて高効率ゲノム編集が可能であることを確認した。さらに、tracrRNA (trans-activating crisper RNA) と fCas9(FokI-dCas9)を用いた効率的かつエラーの少ない正確な変異導入基盤を整備した。またマウス表現型解析に必要な *CHD7* 変異マウスを Knockout Mouse Project (KOMP) Repository より導入した。一方クロマチン構成タンパク Cbx2 null マウスでは、成長障害、耳介形態異常、左右非対称の顔面、嚥下困難などの表現型を観察し、本年度報告した(業績参照)。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

遺伝子解析はヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守して下記承認課題にて行った。

組換え DNA 実験はカルタヘナ法を厳守し申請により下記承認を受けている。

[国立成育医療センター遺伝子組換え実験安全委員会・実験計画番号(06-7, 07-7)]

[承認番号 2013-001, 2016-001]

動物実験は 3R (refinement, replacement, reduction) の原則を遵守して当センター研究所の規定に準じて下記承認課題にておこなった。

[先天奇形症候群における遺伝的要因の探索  
(課題番号 518; 代表 深見真紀)]

本研究課題では、研究への参加および撤回が自由意思で決定されること、検体が匿名化された後に解析されることが定められている。同意は書面で行われ、同意書、患者-匿名化番号の対応表は個人情報管理者居室の鍵付きキャビネットで保管される。検体試料の採取を行う各施設においても本課題が承認されている。