

## 論文の内容の要旨

論文題目 A recurrent *de novo* *FAM111A* mutation causes Kenny-Caffey syndrome type 2 (Kenny-Caffey 症候群 2 型の原因遺伝子の同定)

氏名 磯島 豪

### 【序文】

Kenny-Caffey 症候群(KCS)は、均整のとれた著明な低身長、副甲状腺機能低下症による低カルシウム血症、長管骨の骨膜肥厚と髄質の狭小化、大泉門の開大と閉鎖遅延、眼の異常を伴う非常に稀な症候群である。

KCS は、1966 年に初めて報告された時には常染色体優性遺伝形式をとると考えられていたが、その後、常染色体劣性形式を示す KCS が存在することが報告された。現在では、KCS は、遺伝形式と臨床症状により 2 つの型に分類されている。KCS1 型は、常染色体劣性遺伝形式を示し、精神運動発達遅滞を伴うが、KCS2 型は、常染色体優性遺伝形式または散発的な発症を呈し、精神運動発達遅滞を伴わない。

KCS1 型は、1998 年にクウェートの近親婚の 8 家系の連鎖解析から原因遺伝子が、染色体 1q42-43 にあることが報告され、2002 年に *TBCE* (tubulin-folding cofactor E) 遺伝子が原因であることが明らかにされた。*TBCE* 遺伝子異常は、中東地域を中心に報告されていた副甲状腺機能低下症、精神発達遅滞、骨格異常を伴う Sanjad-Sakati 症候群 (SSS) の原因であることも報告された。一方で、常染色体優性遺伝形式または散発的な発症をする KCS2 型の原因は不明であった。原因の 1 つは、KCS2 型が非常に稀なためこれまでの原因遺伝子の探索方法に限界があったことが挙げられた。

近年のゲノム解析技術の進歩により、ゲノムワイドに網羅的かつ高精度にゲノム異常を検出することが可能となった。特に、全ヒトゲノムの 2%にも満たない蛋白質コード領域のみをターゲットとしたエクソームシーケンスは、希少疾患の原因遺伝子同定の研究には有望な方法と考えられた。その理由は、メンデル遺伝形式を示す疾患の原因は、蛋白をコードする遺伝子の異常によることが多いためである。実際に、数例の症例のエクソームシーケンスにより、これまで原因不明であった希少疾患の原因遺伝子が次々に判明した。さらに、散発性の希少疾患においても、両親と患児のトリオ検体を用いることで、少ない症例数でも原因遺伝子の解明が出来る時代になった。

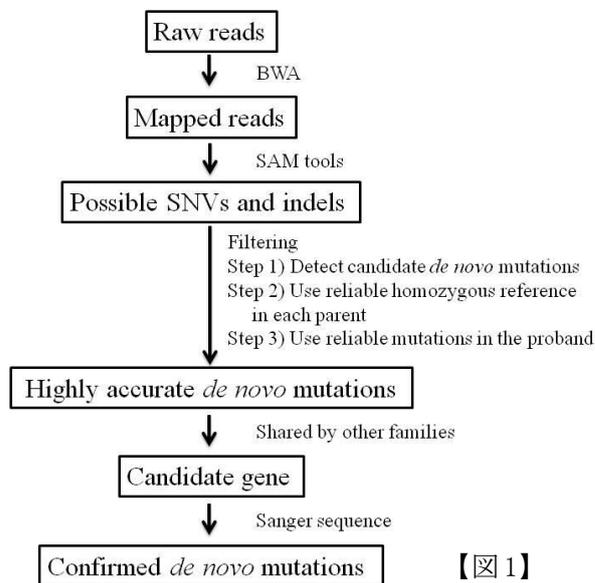
KCS2 型は、日本でこれまで散発性の 5 人しか報告されていない非常に稀な疾患であるが、筆者らは両親と患児のトリオ検体のエクソームシーケンスにより原因遺伝子を特定できるのではないかと考え、KCS2 型の原因遺伝子の同定を目的として本研究を行った。

【方法】

東京大学医学部倫理委員会（承認番号 2010-G3060）の承認を得た後に、日本で報告のあ

った臨床的に診断された散発性 KCS2 型の 4 症例とその家族 9 例から同意を得て末梢血を採取し、DNA を抽出した。最初に、サンガー法を用いて、4 症例に KCS1 型の原因遺伝子である *TBCE* 遺伝子のコード領域に変異が無いことを確認した。

3 家系においては、両親と患児のトリオ検体を得ることが出来たため、3 家系のトリオ検体のエクソームシーケンスを行った。KCS2 型は、*de novo* 変異が原因の疾患と仮説を立て、*de novo* 変異による原因疾患を同定するパイプラインを新たに構築した (図 1)。エクソ



【図 1】

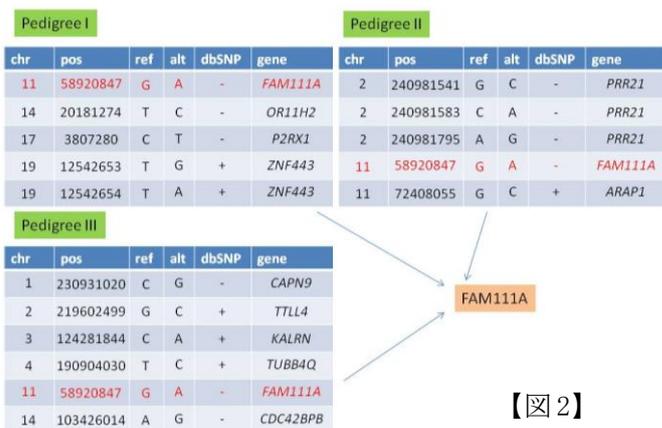
ムシーケンスで得られたデータを、Burrows-Wheeler Aligner (BWA) と SAM tools を用いて病因として可能性のある非同義性変異を同定した後に、①候補となる *de novo* 変異の抽出、②両親には変異のない *de novo* 変異の抽出、③患児に確実に変異のある *de novo* 変異の抽出の 3 つのフィルタリングを行うことで、*de novo* 変異として確かな原因候補遺伝子の抽出を行った。得られた候補遺伝子の変異について、患児に確かに変異があるかどうか、家族には変異がないかどうかについてはサンガー法を用いて確認を行うこととした。

さらに、患児および健常家族の末梢血から得られた RNA を用いて cDNA を合成して、リアルタイム法を用いて候補遺伝子の白血球における発現についての検討も行った。

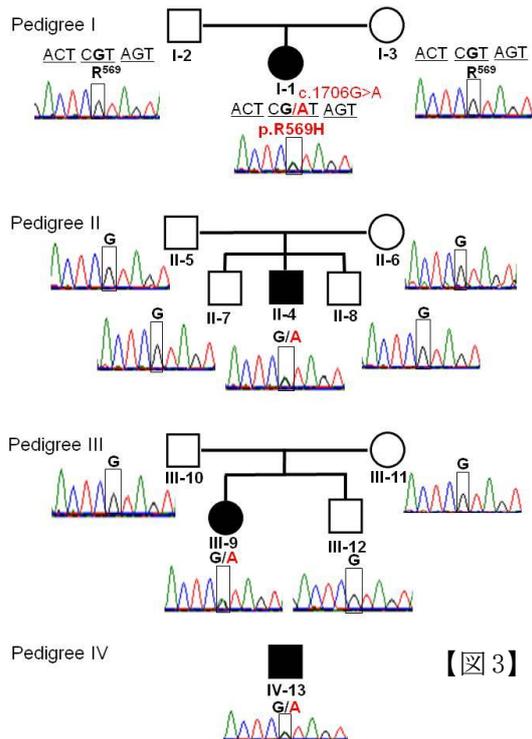
【結果】

3 家系のトリオ検体を用いたエクソームシーケンスにより、原因の可能性のある非同義

性の変異を、それぞれの家系に 11,024 個、10,828 個、11,020 個が同定した。さらに、方法に記載したフィルタリングを行い、それぞれの家系に 5 個、5 個、6 個の候補遺伝子を抽出した。抽出された候補遺伝子の中で、3 つの家系に共通していたのは *FAM111A* (family with sequence similarity 111, member A) 遺伝子のみであり、*FAM111A* 遺



【図 2】



【図 3】

行ったが、R569H は同定出来なかった。このことから R569H は多型ではなく変異であると考えられた。さらに、SIFT と PolyPhen2 を用いて *in silico* 解析を行ったところ、R569H は、FAM111A の機能を障害する可能性の低い変異と推定された。また、リアルタイム法を用いた白血球における FAM111A 遺伝子 mRNA の発現解析では、健常コントロール、患児、家族に発現の差は認めなかった。

#### 【考察】

本研究は、患児と両親のトリオ検体のエクソームシーケンスと、新たに作成した *de novo* 変異による原因疾患を同定するパイプラインにより、FAM111A 遺伝子が KCS2 型の原因候補遺伝子であることを明らかにした。本研究の報告の準備中に、スイスの別の独立したグループから、KCS2 型患児のエクソームシーケンスを用いた研究により同様の報告があった。その報告によると、5 人の KCS2 型患児の 4 人に、本研究で同定されたのと全く同じ R569H が同定されていた。FAM111A の機能はほとんどわかっていないが、本研究とスイスからの報告により、KCS2 型の原因遺伝子は FAM111A であることが確定した。さらに、2 つのグループにより解析された 9 症例のうち 8 症例に R569H 変異が同定されたことから、R569H は KCS2 型のホットスポットであることが判明した。

*In silico* 解析では、R569H は FAM111A の機能に影響を与えないこと、白血球における FAM111AmRNA 発現解析で患児と健常コントロールの発現の差を認めないことから、R569H 変異は FAM111A の機能には影響しないことが予測された。FAM111A の機能は不明であるが、R569H により KCS2 型が発症する理由として、次の 2 つの仮説が考えられた。1 つは、FAM111A 遺伝子の C 末端には、ペプチダーゼとの相同領域があることから、変異

伝子が KCS2 型の原因候補遺伝子と考えられた(図 2)。また、患児 3 人に認められた *de novo* 変異は、全く同じ R569H であった。サンガー法により、患児 3 人の FAM111A 遺伝子に同一の変異 R569H があることと、患児の家族には FAM111A 遺伝子のコーディング領域には変異が無いことを確認した。残りの 1 症例についてもサンガー法にて FAM111A 遺伝子解析を行ったところ、同一の変異 R569H を同定した。これらの結果から、KCS2 型の原因遺伝子は FAM111A であると考えられた(図 3)。

R569H は、東京大学ゲノム医学センターの 373 人の健常日本人のデータベースには存在しなかった。また、別の健常日本人 50 人をサンガー法で FAM111A 遺伝子解析を

体により何らかの標的となるペプチドに対するペプチターゼ活性を変化させることにより病気が発症するというものである。もう1つは、*FAM111A* は生理的に何らかの蛋白と共同して働き、変異体はその共同して働く蛋白との相互作用が機能しなくなることで病気が発症するというものである。相互作用する蛋白の候補としては *TBCE* が挙げられる。さらに、*R569C* という SNP が報告されていることや *R569* が種族であまり保存されていないことを考えると、ヒスチジンに変化する *R569H* 変異特異的に *FAM111A* の何らかの機能を変化させることで、*KCS2* 型を発症させたと考えられた。

*FAM111A* の機能は不明である。本研究により *FAM111A* が *KCS2* 型の原因遺伝子と判明したことから、今後は、成長障害、低身長、副甲状腺機能低下症という *KCS* に特徴的な症状や、子宮内発育遅延や精神発達遅滞といった *KCS1* 型と *2* 型に異なる症状に注目した研究が進んでいくと考えられる。例えば、*KCS* は均整のとれた低身長であり、低身長症の極型と考えることができる。これまで成長促進治療薬開発の研究においては、薬剤の効果を確かめる有用な疾患モデルが存在しなかった。最近、軟骨無形成症の患者の検体を用いて作成された *iPS* 細胞を用いて、軟骨無形成症の成長促進治療にスタチンが有効である可能性が報告された。この研究で用いられた患者の検体から *iPS* 細胞を作成するという疾患モデルは、*KCS2* 型でも応用できると考えられる。*KCS2* 型の原因遺伝子が *FAM111A* と判明したことは、長期的に低身長治療の薬剤の開発に貢献すると考えている。

#### 【結論】

*KCS2* 型の原因遺伝子が *FAM111A* であり、そのホットスポット変異が *R569H* であることが判明した。*FAM111A* の機能についてはほとんど分かっていないが、*KCS* の臨床症状から、*FAM111A* がヒトの骨成長、副甲状腺の発生や制御に重要な因子であることが示された。今回の発見により、ヒトの成長やミネラル代謝の新しい研究分野が開拓されたと言える。