博士（医　学）　藤　岡　浩　賢

学　位　論　文　題　名

*GLI3*morphopathyの再評価；合指症1型を合併した軸前性多趾症4型1例および軸前性多指症1型3例における*GLI3*遺伝子解析

学位論文内容の要旨

【緒言】　手指・足趾の先天異常の一部は7p13に存在する*GLI3*遺伝子の変異に起因し、常染色体優性遺伝型式をとる。*GLI3*遺伝子の変異による多指症の表現型は多岐にわたることから、*GLI3* morphopathyという概念が提唱されている。その中には異常が指・趾に限られた軸前性多指症4型、軸後性多指症と顔面や頭蓋など指・趾以外の異常を合併するGreig cephalopolysyndactyly症候群、Pallister-Hall症候群などが挙げられる。また、一つの手に多指症と合指症を合併する異常が*HOXD 13*遺伝子の変異でおこることが見出され、その後*GLI3*遺伝子の変異でも同様の異常が生じることが報告された。しかし、多指症全てで*GLI3*遺伝子との関連が明らかになっているわけではない。軸前性多指症1～3型についてはこれまで*GLI3*遺伝子を解析した報告はなく、原因遺伝子は不明である。合指症単独の原因遺伝子も同定されていず、足に多趾症、手に合指症が生じるような組み合わせの場合でも*GLI3*遺伝子変異との関連は解明されていない。

今回、中指と環指間の合指症である合指症1型を合併した軸前性多趾症4型1例と軸前性多指症1型3例を解析する機会を得た。合指症1型は合指症で最も多いタイプであり、中指と環指に全体もしくは部分的に癒合を認める。軸前性多趾症4型は軸前性の多合趾症である。軸前性多指症1型は第1指の多指症（3指節型を除く）で、多指症の中で多いタイプである。

これまで国内外において手の合指症と足の軸前性多趾症4型を合併する症例や軸前性多指症1型症例で、*GLI3*遺伝子の解析は報告されていない。そこで、本研究ではこれら2つの先天指・趾異常と*GLI3*遺伝子変異の関連を明らかにし、*GLI3* morphopathyの表現型の境界をより明瞭にすることを目的とした。

【対象と方法】

対象；症例1．生後6ヶ月、男性。右足に軸前性多趾症4型（第1趾と第2趾間の合趾症を合併した軸前性多趾症）と左足に軸前性多趾症4型（第2趾と第3趾間の合趾症を合併した軸前性多趾症）を認め、父親も両足軸前性多趾症4型（第1趾と第2趾間の合趾症を合併した軸前性多趾症）であった。父親と発端者の重要な表現型の違いは、発端者には、左手の中指と環指の間に合指症があり、父親にはなかった点である。

症例2．生後11ヶ月、男性。右手に軸前性多指症1型を認めた。

症例3．生後1才、男性。左手に軸前性多指症（軸前性多指症1型）を認めた。

症例4．生後1才、男性。両手に軸前性多指症（軸前性多指症1型）を認めた。気管食道瘻を伴う

食道閉鎖症と停留精巣を合併していた。母親が妊娠初期に抗ヒスタミン剤を内服していた。
方法；*GLI3*遺伝子のコーディング領域のエクソン及びスプライス部位の解析を目的として独自に設計したプライマーを設計した。採取した血液から抽出したゲノムDNAを鋳型としたPCRを行った。PCR後、ゲル抽出キットを使って精製した。その後、精製したPCR産物を使ってシークエンス反応後、シークエンス解析を行った。*HOXD13*遺伝子について*GLI3*遺伝子と同様にシークエンス解析を行った。症例1と4で検出されたC868TとT825C（*GLI3*遺伝子）について健常者群でのスクリーニングした。C868Tについては塩基置換によって制限酵素AluⅠ認識部位が新たに生じる事を利用して判別した。T825Cについては蛍光5'ヌクレアーゼ（TaqMan）・アッセイにてスクリーニングした。

【結果】症例1に868番目の塩基がシトシンからチミンに変わるヘテロの一塩基置換を認めた。これは、290番目のアミノ酸がアルギニンから終止コドンにかわるナンセンス変異である。軸前性多趾症４型を認めた父親でも同じ変異を認めたが、母親と90人の健常者には認められなかった。症例2と症例３では既知の多型をヘテロで認めた。

症例4の発端者に825番目の塩基がチミンからシトシンに変わるヘテロの一塩基置換（C825T）が検出された。そこで健常な父母や、50人の健常者群に対してT825Cの有無について解析したところ、父親と健常者群2人にT825Cが検出された。

【考察】症例1と父親に認められたC868Tによるナンセンス変異（Arg290Stop）は、今まで国内外での報告例がない新奇の変異である。また、軸前性多趾症では、1999年にインドの家系で検出された*GLI3*変異についで国内外において2例目になる。*GLI3*遺伝子の判明している機能的ドメインは、zinc finger domain（ZFD）、 cAMP response element binding protein binding domain（CBPD）、transactivation domain 2（TA2）と TA1である。ZFDやそれよりC末端側の変異は軸後性多指（趾）症、Pallister-Hall症候群、Greig cephalopolysyndactyly症候群（GCPS）、世界で最初の軸前性多趾症4型の報告例など様々な病型が報告されている。

一方、症例1で290番目のアミノ酸の位置にナンセンス変異を認めたが、これはZFDよりN末端側に位置する。ZFDよりN末端側にナンセンス変異が生じると、たとえ変異タンパク質が産生されたとしても*GLI3*特有の機能的ドメインはすべて失われる事が予想される。これまでの報告ではZFDよりN末端側にある変異はすべてGCPSの症例であった。GCPSは大頭、突出した前額、広い鼻根部、軸前性および軸後性多指（趾）症、合指（趾）症などの複雑な表現型を呈する。このことから、ZFDよりN末端側では重症型を示すという表現型—遺伝子型の関連性が考えられていた。しかし、症例1はこの関連性があてはまらない初めての例である。

症例１に合指症１型があり、父にはない。合指症1型単独の原因遺伝子はわかっていないが*HOXD13*遺伝子の変異により手の合指症1型を含む多指症および足の軸前性多趾症と軸後性多指症を合併した報告例がある。そこで、*HOXD13*遺伝子の変異の有無を検索したが変異を認めなかった。同じ*GLI3*遺伝子変異をもつ家系でも、個々人で様々な表現型をしめすこともあるため、症例1の合指症1型は*GLI3*遺伝子の変異が原因であり、父との病型の差は他の遺伝子変異が加担したのではないと判断した。

軸前性多指症1型3例では*GLI3*遺伝子の変異はなかった。症例4で検出されたT825Cは、一塩基多型（SNPs）データーベースには登録されていなかったが父親や健常者にも認められた。したがって、T825Cは新奇のSNPで、父から由来したものと判断した。軸前性多指症1型が*GLI3*遺伝子変異と関連しないことを示唆する。本研究結果は以下の事実からも支持される。第一に、*GLI3*遺伝子の変異による手の多指症はほとんど軸後性であること。第二に、軸前性多指症1型3例は

GCPSで認める軸前性多指症と型が異なり、GCPSではWassel 1型や2型（末節骨が、二分あるいは重複）で、幅広い爪や重複爪を呈するのに対して、症例2と4はWassel 3や4型（末節骨と基節骨が、二分あるいは重複）であること。これらは表現型がこれまで報告されているGLI3 morphopathyとは異なり、発生機序が異なる事を示唆する。最後に、軸前性多趾症4型の大部分が家系例であるのに対して、軸前性多指症1型は弧発例が多いことである。この事は遺伝子異常以外の要因を示唆している。

本研究では*GLI3*遺伝子に関連する2つの表現型に関して評価を行った。その結果、合指症1型を合併した軸前性多趾症4型は*GLI3* morphopathyに含まれ、軸前性多指症1型は含まれないと判断した。*GLI3* morphopathyの表現型をより明確にするために、さらに指・趾の先天異常の分子遺伝子学的研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主　査　教　授　杉　原　平　樹
副　査　教　授　小　林　邦　彦
副　査　教　授　三　浪　明　男

学 位 論 文 題 名

*GLI3*morphopathy の再評価；合指症1型を合併した軸前性多趾症4型1例および軸前性多指症1型3例における *GLI3* 遺伝子解析

手指・足趾の先天異常の一部は 7p13 に存在する GLI3 遺伝子の変異に起因し、その表現型は多岐にわたることから、GLI3 morphopathy という概念が提唱されている。本研究の目的は、合指症 1 型を合併した軸前性多趾症 4 型 1 例と軸前性多指症 1 型 3 例を解析することで、GLI3 morphopathy の表現型の境界をより明瞭にすることである。症例 1 は両側の軸前性多趾症 4 型を認め、父親も両側軸前性多趾症 4 型を認めた。父親と発端者の重要な表現型の違いは、発端者には、左手に合指症 1 型があり、父親にはなかった点である。症例 2 は右手に軸前性多指症 1 型、症例 3 は左手に軸前性多指症 1 型、症例 4 は両手に軸前性多指症 1 型を認めた。症例 4 は、気管食道瘻を伴う食道閉鎖症と停留精巣を合併していた。採取した血液有核細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型として、GLI3 遺伝子のコーディング領域を PCR 後、シークエンス解析を行った。その結果、症例 1 に 868 番目の塩基がシトシンからチミンに変わるヘテロの一塩基置換を認めた。これは、290 番目のアミノ酸がアルギニンから終止コドンにかわるナンセンス変異であった。父親でも同じ変異が検出された。症例 2 と症例 3 ではヘテロの、既知の SNP を認めた。症例 4 で検出された T825C は新奇の SNP であった。症例 1 の変異は、新奇の変異であり、軸前性多趾症 4 型では国内外において 2 例目、本邦初である。GLI3 タンパク質は zinc finger domain (ZFD) を有し転写調節因子である。ZFD やそれより C 末端側では、Pallister-Hall 症候群、Greig cephalopolysyndactyly 症候群 (GCPS)、軸後性多指症、軸前性多趾症 4 型など様々な病型が報告されている。一方、症例 1 の変異は ZFD より N 末端側に位置する。これまでの報告では ZFD より N 末端側にある変異はすべて GCPS の症例であった。GCPS は大頭、突出した前額、広い鼻根部、軸前性および軸後性多指（趾）症、合指（趾）症などの複雑な表現型を呈する。このことから、ZFD より N 末端側では重症型を示すという表現型ー遺伝子型の関連性が考えられていた。しかし、症例 1 はこの関連性があてはまらない初めての例である。軸前性多指症 1 型 3 例では GLI3 遺伝子の変異はなかった。軸前性多指症 1 型が GLI3 遺伝子の変異と関連しないことを示唆するこの結果は以下の事実からも支持さ

れる。第一に、GLI3 遺伝子の変異による手の多指症はほとんど軸後性であること。第二に、軸前性多指症 1 型 3 例は GCPS で認める軸前性多指症と型が異なり、GCPS では Wassel 1 型や 2 型（末節骨が、二分あるいは重複）で、幅広い爪や重複爪を呈するのに対して、症例 2～4 は Wassel 2 や 4 型（末節骨と基節骨が重複）であること。最後に、軸前性多指症 1 型は、軸前性多趾症 4 型に較べて弧発例が多いことである。この事は遺伝子異常以外の要因を示唆している。本研究では GLI3 に関連する 2 つの表現型に関して評価をおこなった。その結果、合指症 1 型を合併した軸前性多趾症 4 型も GLI3 morphopathy に含まれ、軸前性多指症 1 型は含まれないと判断した。GLI3 morphopathy の表現型をより明確にするために、さらに指・趾の先天異常の分子遺伝子学的研究が必要である。

公開発表にあたり副査三浪明男教授から 1）ダウン症候群の多指症と GLI 3 遺伝子との関連性、2）腓骨側の多趾症での遺伝子解析、3）患者の家族への説明についての質問があった。また軸性の多指症や合指症の発生と臨界期の差の関連性についてコメントがあった。次いで副査小林邦彦教授から 1）7 番染色体が欠損している症例報告はあるか、2）ハプロ不全と表現型ー遺伝子型の関係、3）父と患者で症状が異なる点、4）GLI3 は癌遺伝子か、5）ホモの変異では致死なのかについて質問があった。主査杉原平樹教授から、食道閉鎖症の合併例と GLI3 遺伝子変異との関連について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究内容と文献を引用し、妥当な回答をした。最後に遺伝子治療講座の有賀正助教授より表現型のバリエーションについて GLI3 遺伝子は転写調節因子であるが、他の転写調節因子の影響や個々人で転写量に差があるために生じているのではないかとコメントがあった。

この論文は、国内外で 2 例目、本邦初となる軸前性多趾症 4 型の変異を検出した点で高く評価され、今後、軸前性多指症の発症原因や *GLI3* 遺伝子機能の解明などにつながることが期待される。

審査員一同、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。