



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1603号
学位記番号	第1138号
氏名	堀 いくみ
授与年月日	平成30年3月26日
学位論文の題名	CTCF deletion syndrome: clinical features and epigenetic delineation (CTCF 遺伝子欠失を認めた2女児の臨床的および遺伝学的検討) Journal of Medical Genetics. 2017;54: 836-842
論文審査担当者	主査: 杉浦 真弓 副査: 岡本 尚, 齋藤 伸治

論文内容の要旨

【背景】 *CTCF* (CCCTC-binding factor; MIM 604167) 遺伝子は 16q22.1 に位置し、11 個の zinc finger ドメインをもつ転写因子をコードしている。*CTCF* はゲノムワイドに存在するメチル化感受性結合部位に結合し、転写活性/抑制、インスレーション、インプリンティング、X 染色体不活性化 (XCI) などの様々な制御を行う。これまでに、様々な程度の知的障害、小頭症、成長障害を呈する児の原因として *CTCF* 変異が 4 例報告されている (mental retardation, autosomal dominant 21; MRD21; MIM 615502)。4 例の変異の内訳はフレームシフト変異 2 例、ミスセンス変異 1 例、*CTCF* 遺伝子を含む微細欠失 1 例である。*CTCF* 遺伝子のハプロ不全が知的障害を引き起こすと考えられているが、不明な点が多い。本研究では *CTCF* 遺伝子欠失の病態を明らかにするために *CTCF* 遺伝子を含む欠失を同定した女兒 2 例を臨床的および遺伝学的に検討した。

【方法】 研究対象はマイクロアレイ染色体検査、FISH にて *CTCF* 遺伝子を含む欠失を同定した女兒 2 例である。XCI の状態を確認するために、3 色 (*XIST*, *ATRX*, *UTX*) RNA-FISH 及びアンドロゲン受容体遺伝子解析を行った。3 色 RNA-FISH は EB ウイルスで樹立したリンパ芽球様細胞を用いて解析した。29 か所のインプリンティング領域のメチル化状態をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) 法及びパイロシーケンス法で解析した。ゲノムワイドのエピジェネティクス異常を検討するために HumanMethylation450 BeadChip (illumina) を用いて DNA メチル化アレイ解析を行った。48 万以上の CpG サイトを解析し、*CTCF* 結合部位からの距離に基づき 3 群に分けて検討した。

【結果】 2 症例とも仮死なく出生。出生時身長、体重、頭囲は正常範囲内であった。2 症例とも顔貌異常を認め、乳幼児期より精神運動発達遅滞、成長障害を認めた。染色体核型は 46,XX であった。マイクロアレイ染色体検査にて 16q22.1 領域に *CTCF* 遺伝子を含む 1.1Mb (症例 1) 及び 1.6Mb (症例 2) の欠失を認めた。XCI 比率は 55:45 (症例 1)、51:49 (症例 2) であった。3 色 RNA-FISH を用いた XCI パターン解析では、*XIST* の両アレル発現は認めず、明らかな異常パターンは認めなかった。インプリンティング領域のメチル化解析では MALDI-TOF MS 法にて症例 1 の *MEST*, *GNASXL*、症例 2 の *IGF2-DMR2* に高メチル化が認められたが、パイロシーケンス法ではメチル化の異常は認めなかった。ゲノムワイド DNA メチル化アレイ解析にて *CTCF* 結合部位内 CpG サイトで患児に高メチル化傾向を認めた。*CTCF* 結合部位内に位置し、2 症例とも高メチル化を示した CpG サイトは 299 か所だった。遺伝子オンロジー解析では、特徴的な用語は検出されなかった。299 か所の CpG サイトのうち、*PRKCZ* と *FGFR2* が脳神経関連遺伝子であった。

【考察】 今回検討を行った 2 症例は過去の報告と類似した特徴を認めた。*CTCF* のハプロ不全は知的障害を主体とする独立した症候群を示すと考えられた。欠失サイズが異なっても似た表現型を示すことから *CTCF* が主要な表現型決定因子であることが示唆された。本症例は *CTCF* ハプロ不全の貴重なモデルになると考えられる。*CTCF* 遺伝子欠失例で XCI は正常であった。*CTCF* の単一对立遺伝子の欠失は、*Xist* の転写を変化させる閾値に達しない可能性がある。*CTCF* 遺伝子欠失例ではインプリンティング遺伝子の病態への関与は否定的であったが、*CTCF* 結合部位にゲノムワイドに高メチル化傾向を認めた。同様の結果がマウスの肺組織を用いた研究で示されて

いる。78684か所のCTCF結合部位 CpG サイトのうち 299か所のみを高メチル化を認めた。CTCF結合部位のほんの一部のみである。CTCF ハプロ不全はCTCF結合部位にメチル化異常をきたし、遺伝子発現を変化させ、これが病態に関与している可能性が示唆された。CTCF ハプロ不全に起因する高メチル化領域候補を検討したところ、*PRKCZ*と*FGFR2*遺伝子が該当した。*FGFR2* 遺伝子で高メチル化が認められた領域は、CTCF の ChIP-seq ピークが検出された細胞数が少なかった。*FGFR2*がCTCF 遺伝子欠失の病態に関与している可能性は少ないと考えられた。*PRKCZ*は神経細胞の極性形成に関与しており、これがCTCF 遺伝子欠失の病態に関与している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

【背景】CTCF はゲノムワイドに存在するメチル化感受性結合部位に結合し、転写活性/抑制、インスレーション、インプリンティング、X 染色体不活性化 (XCI) などの様々な制御を行う。これまでに、知的障害、小頭症、成長障害を呈する児の原因として CTCF 変異の報告がある。CTCF 遺伝子のハプロ不全が病因であると考えられているが、不明な点が多い。本研究では CTCF 遺伝子欠失の病態を明らかにするために CTCF 遺伝子を含む欠失を同定した女児 2 例を検討した。【方法】研究対象はマイクロアレイ染色体検査、FISH にて CTCF 遺伝子を含む欠失を同定した女児 2 例である。3 色 (XIST, ATRX, UTX) RNA-FISH 及びアンドロゲン受容体遺伝子解析を行い、XCI の状態を確認した。29 か所のインプリンティング領域のメチル化状態をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計法及びパイロシーケンス法で解析した。DNA メチル化アレイ解析を行い、ゲノムワイドなエピジェネティクス異常を検討した。【結果】2 症例とも顔貌異常、精神運動発達遅滞、成長障害を認めた。染色体核型は 46, XX であった。マイクロアレイ染色体検査にて CTCF 遺伝子を含む 1.1Mb (症例 1) 及び 1.6Mb (症例 2) の欠失を認めた。XCI 比率は 55:45 (症例 1)、51:49 (症例 2) であった。3 色 RNA-FISH を用いた XCI 解析では、明らかな異常パターンは認めなかった。インプリンティング領域のメチル化解析でも異常は認めなかった。ゲノムワイド DNA メチル化アレイ解析にて CTCF 結合部位内 CpG サイトで患児に高メチル化傾向を認めた。78684 か所の CTCF 結合部位 CpG サイトのうち 2 症例とも高メチル化を示した CpG サイトは 299 か所だった。

【考察】今回検討を行った 2 症例は過去の報告と類似した特徴を認めた。CTCF のハプロ不全は知的障害を主体とする独立した症候群を示すと考えられた。異なる欠失幅でも似た表現型を示すことから CTCF が主要な表現型決定因子であると示唆された。本症例は CTCF ハプロ不全の貴重なモデルになると考えられる。CTCF ハプロ不全は CTCF 結合部位にメチル化異常をきたし、遺伝子発現を変化させ、これが病態に関与している可能性が示唆された。CTCF ハプロ不全に起因する高メチル化領域候補を検討したところ、PRKCZ と FGFR2 遺伝子が該当した。FGFR2 遺伝子で高メチル化が認められた領域は、CTCF の ChIP-seq ピークが検出された細胞数が少なかったため、CTCF 遺伝子欠失の病態に関与している可能性は少ないと考えられた。PRKCZ は神経細胞の極性形成に関与しており、これが病態に関与している可能性がある。

【審査の内容】約 20 分間のプレゼンテーションの後に、主査の杉浦からは X 染色体不活化の評価方法、マイクロアレイ染色体検査の原理について、CTCF 欠失症例の表現型について、個人情報取り扱いの難しさについて等、研究の方法論、結果の解釈、研究者としての心構えについての 10 項目の質問がなされた。また第一副査の岡本教授からは、CTCF のゲノムオーガナイザーとしての機能、動物実験で明らかにされていること、CTCF 欠失以外の要因に対する解釈、EB ウイルスを用いた解析での限界、今後の解析の進め方について等、12 項目の質問がなされた。第二副査の齋藤教授からは専門領域に関連して、知的障害の現在の知見、知的障害の遺伝学的解析の位置づけ、今後の治療への展開など、3 項目の質問がなされた。いずれに対しても大変満足のいく回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると共に専門領域の知識も十分であると判断した。本研究は、CTCF ハプロ不全症例を臨床的・遺伝学的に詳細に検討した初めての論文であり、意義がある。以上をもって本論文の著者には、博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 杉浦 真弓

副査 副査 岡本 尚 齋藤 伸治