

| | |
|------------|---|
| 氏 名 ・ (本籍) | 近藤 大喜 (秋田県) |
| 専攻分野の名称 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 医博甲第980号 |
| 学位授与の日付 | 平成30年9月28日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科・専攻 | 医学系研究科医学専攻 |
| 学位論文題名 | A novel ZC4H2 gene mutation, K209N, in Japanese siblings with arthrogryposis multiplex congenita and intellectual disability : characterization of the K209N mutation and clinical findings (先天性多関節拘縮症および精神発達遅滞を呈した日本人兄弟において発見された、ZC4H2 遺伝子における新規突然変異 K209N、その特徴と臨床所見について) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 寺田 幸弘 (副査) 教授 島田 洋一 教授 清水 宏明 |

学位論文内容要旨

A novel ZC4H2 gene mutation, K209N, in Japanese siblings with arthrogyriposis multiplex congenita and intellectual disability: characterization of the K209N mutation and clinical findings

(先天性多関節拘縮症および精神発達遅滞を呈した日本人兄弟において発見された、ZC4H2 遺伝子における新規突然変異 K209N、その特徴と臨床所見について)

申請者氏名 近藤 大喜

研究目的

先天性多関節拘縮症とは2つ以上の関節における先天的な拘縮を呈する疾患であり、胎生期における四肢の運動低下や無動症に関連し発症する。中枢および末梢神経の障害や筋肉の障害などに由来する場合もあり、多種の疾患を含む疾患概念でもある。近年、X染色体連鎖性遺伝を示す先天性多関節拘縮症である、Wieacker-Wolff 症候群や Miles-Carpenter 症候群の原因として、ZC4H2 遺伝子変異が報告された。ZC4H2 遺伝子は人体において様々な臓器に発現するが、特に胎児期の脳で強く発現し、胎児期の神経発達に密接に関与する可能性がある。ゼブラフィッシュにおける ZC4H2 遺伝子のノックアウトでは、 α 運動ニューロンの発達の障害や GABA 作動性ニューロンの著しい減少が報告され、ZC4H2 遺伝子が神経系の発達において重要であることが示唆されている。ZC4H2 遺伝変異を示す患者における遺伝子型と表現型、すなわち臨床症状の検討は、遺伝子の機能を解析し、疾患を理解する上で非常に有益足りうる。

今回、先天性多関節拘縮症および精神発達遅滞を呈した日本人兄弟において発見した、ZC4H2 遺伝子における新規突然変異である K209N について、ZC4H2 蛋白における変異の影響と臨床所見における特徴について検討を行った。

研究方法

対象患者は11歳の男児と8歳の男児の兄弟、およびその母であった。兄弟はいずれも正期産で出生し、新生児期から多関節の拘縮、顔貌異常などの症状を認め、成長後には精神運動発達遅滞を認めた。兄は幼児期より難治性の低血糖症を繰り返し、糖負荷試験からは負荷後120分以後のインスリンの過分泌および低血糖を認めた。また、右脚ブロックおよび高血圧症を認めた。弟は臨床症状として重度の低血糖は認めなかったが、糖負荷試験では潜在性の低血糖症が示唆され、さらに気管切開前には難治性の徐脈や洞停止を繰り返した。兄弟の母は左足趾の軽微な拘縮、および2型糖尿病と30代で脳梗塞を発症した。

兄弟および母を含む協力が得られた家系内の6名を対象にサンガー法によるダイレクトシーケンスによって ZC4H2 遺伝子解析を行った。同定した変異については、Mutation Taster, Polyphen-2, SIFT/Provean, PANTHER-PSE, cNLS mapper, NLStradamus, LocTree3 を用いた *in silico* 解析により蛋白の機能に与える影響を推測した。さらに、正常 ZC4H2 遺伝子および同定した変異を含む ZC4H2 遺伝子両者において、pEGFP-N1, pAcGFP-C1 ベクターを使用し ZC4H2-GFP 融合蛋白を発現するベクターを作成した。作成した各種ベクターを COS-7 細胞にトランスフェクションし、遺伝子変異による細胞内局在の変化を観察した。

本研究は秋田大学医学部付属病院倫理委員会の承認を受け施行した。

研究成果

サンガー法によるダイレクトシーケンスにより、患者兄弟およびその母から ZC4H2 遺伝子において c.627G>C, p.K209N 変異を同定した。母方祖父母の解析結果からは母における *de novo* 変異であると推測された。同変異は ExAC, 1000 genome browser, HGVD などのエクソーム解析データベースにおいて報告がなかった。Mutation Taster, Polyphen-2, SIFT/Provean, PANTHER-PSEP を用いた *in silico* 解析による機能予測においては、全ての解析において蛋白機能に重大な影響を与える可能性が高いとの結果であった。さらに、cNLS mapper, NLStradamus, LocTree3 を用いた ZC4H2 蛋白における核移行シグナル予測においても、p.K209N 変異は高確率で核移行シグナルに位置すると推測された。pEGFP-N1, pAcGFP-C1 ベクターを用いた COS-7 細胞における ZC4H2-GFP 融合蛋白の細胞内局在の観察では、いずれのベクターを用いた場合においても、K209N 変異を有する融合蛋白において、核内移行の障害が観察された。

過去の ZC4H2 遺伝子変異を有する先天性多関節拘縮症の文献的考察からは、低血糖症の報告は男児21例中3例と報告されているが、いずれもその詳細な検討はさなれていなかった。本研究は ZC4H2 遺伝子変異を認めた患者において、低血糖症の背景に耐糖能異常が存在する可能性を示唆するものである。

結論

ZC4H2 遺伝子の K209N 変異は、ZC4H2 蛋白の核内移行を阻害し、機能を障害する。さらに、本兄弟例の臨床所見からは、多関節拘縮および精神発達遅滞のみならず、耐糖能異常にも関与する可能性が示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査： 寺田 幸弘

申請者： 近藤 大喜

A novel ZC4H2 gene mutation, K209N, in Japanese siblings with arthrogryposis multiplex congenita and intellectual disability: characterization of the K209N mutation and clinical findings

（先天性多関節拘縮症および精神発達遅滞を呈した日本人兄弟において発見された、ZC4H2 遺伝子における新規突然変異 K209N、その特徴と臨床所見について）

要旨

著者らの研究は、論文内容要旨に示すように、先天性多関節拘縮症および精神発達遅滞を呈した日本人兄弟例において発見された、ZC4H2 遺伝子における新規突然変異 K209N について、ジンクフィンガーの一種である ZC4H2 タンパク質に対する影響、細胞内局在すなわち核への移行の変化を、各種シミュレーターによる *in silico* 解析と、GFP-ZC4H2 融合蛋白を発現するベクターを COS-7 細胞に導入し、観察することにより検討したものである。また、患者における症状を詳細に検討することで、ZC4H2 遺伝子変異患者において耐糖能異常など内分泌学的異常を生じる可能性についても提示している。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下のとおりである。

1) 斬新さ

ZC4H2 蛋白は亜鉛イオンに対する配位子として、4 つのシステインと 2 つのヒスチジンが存在するジンクフィンガー蛋白である。2013 年に X 染色体連鎖性遺伝を示す先天性多関節拘縮症の原因遺伝子として同定されたが、その機能や細胞内局在はいまだ不明な点が多く認められる。本研究の斬新性は、COS-7 細胞において、GFP-ZC4H2 融合蛋白を一過性発現させ、その変異による細胞内局在の変化を観察することで、新規変異 K209N における ZC4H2 蛋白の機能喪失の原因と、蛋白における核移行シグナル部位の同定を行ったことにある。さらに、2018 年現在、ZC4H2 遺伝子変異患者家系は全世界で 9 家系のみである。本邦において家系として初の報告であり、希少性の高い研究である。

2) 重要性

ジンクフィンガー蛋白の多くは DNA と結合し、転写因子としての活性を示す。ZC4H2 蛋白も同様に転写因子としての機能を持つ可能性が高く、最近の報告では BMP-SMAD シグナルに密接に関与しているとも推測されている。多くの転写因子において、核移行の過程は制御段階の一つとして重要であり、すなわち、ZC4H2 蛋白における核移行シグナル部位の同定は、その制御機構を検討する上で極めて重要な事項である。また、希少疾患であり、個々の症例における臨床症状に対する検討は、今後の蛋白機能の解析と新規患者における診療において重要な情報となりうる。

3) 研究方法の正確性

原因遺伝子の同定の際には、他の先天性多関節拘縮症をきたす原因遺伝子を考慮しつつ、症状の特徴と遺伝性素因から鑑別を行い、さらに複数のアルゴリズムを用いた *in silico* 解析を併用することでより精度を高めている。さらに、ZC4H2-GFP 融合蛋白発現ベクターを使用する際には、pEGFP-N1 ベクター、pAC-GFP-C1 ベクターという、それぞれ対象蛋白との融合部位の異なる 2 種類のベクターでそれぞれ検討することで、GFP による細胞内局在への影響を極力除外している。いずれも、客観的な評価において、十分な正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

これまでの問題点の解決、すなわち、先天性多関節拘縮症の原因である ZC4H2 遺伝子変異と、臨床症状にかかわる分子的な機序を明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を明瞭に記載していると考ええる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。