



FGFR1 analyses in four patients with hypogonadotropic hypogonadism with split-hand/foot malformation: Implications for the promoter region

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-05-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大高, 幸之助 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3353

博士(医学) 大高 幸之助

論文題目

FGFR1 analyses in four patients with hypogonadotropic hypogonadism with split-hand/foot malformation: Implications for the promoter region

(裂手裂足症を伴う低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 4 症例における *FGFR1* 遺伝子解析:プロモーター領域に関する知見)

論文の内容の要旨

[はじめに]

FGFR1 遺伝子ヘテロ接合性機能低下型変異は、単独の低ゴナドトロピン性性腺機能低下症(HH)、無嗅症/嗅覚低下症を伴う HH (Kallmann 症候群)、裂手裂足症(SHFM) を伴う HH を含む様々な常染色体優性遺伝性疾患の原因として知られている。そして、単独の HH と Kallmann 症候群が、高度な遺伝的異質性に富む疾患であるのに対し、SHFM を伴う HH は、そのほとんど(90%以上)が *FGFR1* 遺伝子変異に起因する。したがって、*FGFR1* 遺伝子は、SHFM を伴う HH を呈する患者において、まず初めに解析されるべき遺伝子である。

われわれは、今回、SHFM を伴う HH 症例において *FGFR1* 遺伝子解析を行い、*FGFR1* プロモーターに関する有用な知見を得た。

[対象ならびに方法]

対象:SHFM を伴う HH の 4 症例(症例 1-4)と症例 4 の母である。症例 4 の母は、単独型 HH のために生殖補助医療を受け、症例 4 を出産した。

方法:まず全症例に白血球ゲノム DNA を用いた *FGFR1* 遺伝子の直接塩基配列決定を行った。続いてミスセンス変異体の機能解析を、オステオカルシンプロモーターおよび FGF8 を用いたルシフェラーゼ法で行った。スプライスサイト変異の影響は reverse-transcription PCR (RT-PCR)、直接塩基配列決定、*in silico* 解析で検討した。欠失の有無は、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)、アレイ CGH、直接塩基配列決定で確認し、その影響を種々の遺伝子断片を用いたルシフェラーゼ解析と、定量 real-time PCR (qPCR)で検討した。また欠失周囲の塩基配列をデータベースで解析した。本研究は、浜松医科大学臨床研究倫理委員会にて、「16-075 先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索」として承認の下に行われた。

[結果]

症例 1 では(c.289G>A, p.G97S)が、症例 2 では(c.2231G>C, p.R744T)が同定され、それぞれ優性阻害効果を持たない機能低下型変異であることが判明した。

症例 3 では(c.1663+1G>T)が同定された。RT-PCR で 2 つのバンドが得られ、これらは、野生型アレル由来バンド(463 bp)と、エクソン 12(111 bp)の in-frame deletion を伴う変異アレル由来バンド (352 bp)であると判明した。RT-PCR 25 サイクル後における変異アレル由来バンドと野生型アレル由来バンドの濃度比は、0.65: 1.00 であった。*in*

silico 解析により、エクソン 11-12 の間で正常スプライスが生じた後、(1) 変異部位に新しいスプライスドナーサイトが形成され、エクソン 13 にスプライスした後、フレームシフトのためにエクソン 14 で終止コドンが出現する可能性、(2) エクソン 12-13 のスプライスが起きずに、下流のイントロン配列内で終止コドンが出現する可能性が予測された。その結果として産生される mRNA は、nonsense-mediated mRNA decay (NMD) を受ける条件を満足した。

症例 4 とその母には、塩基配列異常は認められなかったが、非コードエクソン 1 (E1U) を含むヘテロ接合性微小欠失が同定された。この欠失は 8,312 bp であった。融合点の DNA 配列は、*Alu repeats* を介した non-allelic homologous recombination が生じたことに一致した。またデータベース上 E1U の transcription start site (TSS) 周辺には、転写に関連するヒストン修飾や種々の transcription factor binding site が存在した。この領域の転写活性化能は、TSS を含み、E1U の 5' 領域から上流域を包含する 414 bp の断片で明らかに上昇していた。これに一致して白血球 mRNA を用いた qPCR で、*FGFR1* の発現量は、症例 4 で対照者の約半分であった。

[考察]

症例 1-3 では、塩基置換が同定された。症例 1 と 2 の塩基置換は、ルシフェラーゼ解析により優性阻害効果を持たない機能低下変異であることが証明された。症例 3 のスプライスサイト置換は、エクソン 12 をスキップする異常 mRNA が検出されたことから、病的変異と考えられる。ここで、RT-PCR における変異アレル由来バンドの濃度が野生型と比較し相対的に薄い理由は、変異アレルからはエクソン 12 が in-frame deletion した NMD を受けない mRNA と、NMD を受ける mRNA の両方が産生されるため、検出される mRNA 量が減少するためと考えられる。

症例 4 では、母由来の E1U を含む 8,312 bp の欠失が同定された。そして、*FGFR1* の発現量が半減していること、ならびに TSS を含む 414 bp 領域が明らかな転写活性化能を有することが示された。この結果は、コアプロモーターが通常 TSS に近接していること、プロキシマルプロモーターが TSS 上流 200 bp 以内に存在することに一致し、E1U 周辺の 414 bp 領域に *FGFR1* のいくつかの重要なプロモーター構成要素が存在することを示すものである。さらにこの結果は、非コード領域解析の重要性を示唆するものである。

[結論]

われわれは、*FGFR1* 遺伝子ヘテロ接合性機能低下型変異が SHFM を伴う HH を招くことを再確認した。特に、症例 4 およびその母において、TSS を含み、E1U の 5' 領域から上流域を包含する 414 bp にプロモーター構成要素が存在することを明確とし、その欠失が *FGFR1* 変異関連疾患を招くことを明らかにしたことが特筆される。