

主論文の要旨

**Gain-of-function *MYCN* causes  
a megalencephaly-polydactyly syndrome  
manifesting mirror phenotypes of  
Feingold syndrome**

*MYCN*遺伝子の機能獲得型バリエーションは  
Feingold症候群と対照的表現型を呈する  
巨脳-多指症候群の原因である

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発育・加齢医学講座 小児科学分野

(指導：高橋 義行 教授)

西尾 洋介

## 【緒言】

*MYCN*は、*MYC*、*MYCL*と共に*MYC proto-oncogene*ファミリーに属する転写因子で細胞増殖、分化、アポトーシスに関わる遺伝子の転写調節を行っている。*MYCN*遺伝子の増幅は神経芽腫の予後不良因子で、生殖細胞系列における機能喪失型バリエントはFeingold症候群の原因であり、腫瘍および臓器発生において重要な役割を果たしている。小頭症を特徴とするFeingold症候群とは対照的に、巨脳症を呈し*MYCN*の機能獲得型バリエント [NM\_005378.6:c.173C>T;p.Thr58Met (T58M)]を有する患者が1例報告されているが、疾患概念確立のため新規患者の集積と病態解析が必要である。今回我々は、*MYCN*の機能獲得型バリエントを有する巨脳症患者のリクルートおよび臨床情報の詳細な検討に加え、モデルマウスを用いた病態解析を行うことで、*MYCN*の機能獲得型バリエントによる巨脳-多指症候群を新規疾患概念として確立すること目的とした。

## 【方法】

国内のゲノム解析拠点および国際的な遺伝性疾患の共有プラットフォームであるGeneMatcherを通じて*MYCN*バリエントを有する巨脳症患者をリクルートし臨床情報を収集した。リクルートした患者の有する*MYCN*バリエントの機能解析のため、*MYCN*-WT (pcDNA3-hemagglutinin-tagged human *MYCN*, addgene #71463)を鋳型としてインバースPCR法により各変異体の発現ベクターを作製した。HEK293T細胞にリポソームトランスフェクション法により遺伝子導入し、*MYCN*のリン酸化状態や、*MYCN*を標的とするユビキチンリガーゼのF-box and WD repeat domain-containing 7 (Fbw7)を共トランスフェクションした際の*MYCN*発現量をウェスタンブロット法で評価した。さらに、細胞から抽出したRNAを用いた定量的逆転写PCR法により、*MYCN*の既知の転写ターゲットの定量を行った。*In vivo*の解析では、CRISPR/Cas9システムを用いて巨脳症患者で同定した*Mycn*-T58M変異を導入した*Mycn*機能獲得型マウス、および機能喪失型マウスモデルとして2塩基欠失によりフレームシフト (frameshift, FS)をきたす*Mycn*ハプロ不全マウスを作成した。生後の各発生段階の体重、脳重量、四肢形態などの基本的な表現型解析に加え、脳、腎臓、女性生殖器などを採取および固定、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびニッスル染色、各種抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。統計学的解析は2群間の平均値の差の比較には Two-sided Student's t-testを、3群間以上の平均値の差の比較にはone way ANOVAを用い、 $P<0.05$ の場合に統計学的有意とした。

## 【結果】

*MYCN*遺伝子に*de novo*のミスセンスバリエント [患者1: NM\_005378.6:c.179C>T;p.Pro60Leu (P60L); 患者2: NM\_005378.6:c.173C>T;p.Thr58Met (T58M)] を有する2名の新規患者をリクルートした。患者1は妊娠31週で人工妊娠中絶された胎児、患者2は8か月の男児で、いずれも既報患者と同様に巨脳症、脳室拡大、軸後性多指、眼間乖

離、耳介低位などの特徴的顔貌を示した。既報患者は乳児期(生後7か月)に神経芽腫を発症しているが、患者2も乳児期(生後3か月)に神経芽腫を発症していた。新規バリエーションであるp.P60Lが機能獲得型バリエーションであることを確認するため、MYCN-WTおよびMYCN-T58M、-P60LをHEK293T細胞にトランスフェクションし、ウェスタンブロット法で評価したところ、MYCN-T58Mと-P60LはThr58におけるリン酸化の低下を認めた(Fig.1A,B)。また、MYCNとFbw7を共発現させたところ、共発現によりMYCNの発現量が減少するMYCN-WTとは対照的にMYCN-T58Mおよび-P60LにおいてはMYCNの発現量は減少しなかった(Fig.1C,D)。さらに、定量的逆転写PCR法によりMYCN-T58Mおよび-P60LにおいてもWTと同様に既知の転写ターゲットであるCyclin Dの転写促進機能が維持されていることを確認した(Fig.1E)。in vivoの解析においては、p.T58Mバリエーションを有するMycn機能獲得型マウス(T58M/WTマウス)およびハプロ不全マウス(FS/WTマウス)の胎生14.5日の皮質から抽出した蛋白を用いてウェスタンブロット法でMycn蛋白の発現量を確認したところ、野生型マウスと比較してT58M/WTマウスでは有意に発現量が増加し、FS/WTマウスでは低下を認めた(Fig.2A-D)。生後56日における体重はFS/WTマウスにおいて有意に軽かったが、T58M/WTマウスにおいては有意差を認めなかった(Fig.2E-G)。また、T58M/WTマウスにおいては患者でみられた軸後性多指および巨脳症が再現された(Fig.2H-J)。ニッスル染色による形態学的評価では、T58M/WTマウスにおいて大脳皮質厚は有意に厚く、FS/WTマウスにおいて有意に薄かった(Fig.3A-D)。また大脳皮質のみでなく小脳虫部の形成に関しても、T58M/WTマウスでは有意に大きく、FS/WTマウスでは有意に小さかった(Fig.3E,F)。T58M/WTマウスにおいて、生直後および生後7日には巨脳症を呈していることから(Fig.4A-G)、胎生期に巨脳症を決定付ける病態があると考え、胎生14.5日の大脳皮質における神経新生を評価したところ、神経細胞の遊走遅延および中間神経前駆細胞の有意な増加を認めた(Fig.4H-K)。中枢神経以外の臓器においては、腎臓の嚢胞性変化および膈閉鎖に伴う子宮水腫を認めた。

## 【考察】

MYCNの機能獲得型バリエーションによる巨脳-多指症候群を新規疾患概念として確立した。既報患者を含めた3患者は、機能喪失型バリエーションによるFeingold症候群とは対照的に巨脳症を呈し、多指症、特徴的顔貌、神経芽腫など共通する臨床像から認識可能な疾患であることが示された。既報患者および患者2で同定されたバリエーションの置換部位であるThr58は、MYCNの安定性に重要なリン酸化部位であり、リン酸化に次ぐFbw7によるユビキチン化によりMYCNの分解が誘導される。患者1で新たに同定されたp.Pro60Leuは、p.Thr58Metと同様にThr58のリン酸化が低下し、ユビキチン化が誘導されないために、MYCNが分解されずに蓄積することを示した。結果として、細胞増殖に関連するCyclin Dなどの転写が亢進することが巨脳症などの細胞増殖の結果として生じる表現型の原因の一であると考えた。さらに、我々が世界で初めて樹立したMycn機能獲得型マウスを用いた解析では、神経新生期である胎生14.5日における遊走

遅延および中間神経前駆細胞の増加を認めた。神経新生においては、放射状グリアなどが対称性分裂を終えた後に大脳皮質各層への遊走を始めることから、MYCNの過剰発現により対称性分裂が遷延し、遊走遅延および中間神経前駆細胞の増加をきたしていると考えた。また、中枢神経外の表現型解析から、腎臓の嚢胞性変化や腔における上皮性組織の肥厚に伴う子宮水腫を認め、いずれも各臓器における過剰な細胞増殖に起因することが示唆された。MYCNの転写ターゲットは多彩であり、機能獲得型バリエーションにより過剰発現したMYCNが、各臓器のいずれの発生段階において、いずれのターゲットの転写に影響を与え、発生異常に寄与しているかなどの網羅的な分子メカニズムの理解には更なる検討が必要である。

### 【結語】

今回我々は、MYCNの機能獲得型バリエーションによる巨脳-多指症候群を新規疾患概念として確立し、小頭症を伴うFeingold症候群と対照的な表現型を示す臨床的に認識可能な症候群として報告した。MYCNは腫瘍発生のみならず臓器発生においても重要な役割を果たしていることが示された。機能獲得型マウスを用いた発生異常の分子生物学的な理解は、発生期のみならず腫瘍発生や進展におけるMYCNの役割の詳細な理解にも貢献する可能性がある。