主論文の要旨

MYCN de novo gain-of-function mutation in a patient with a novel megalencephaly syndrome

（*MYCN*遺伝子の新生突然機能獲得型変異は
新規の巨脳症症候群を呈する）

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：髙橋 義行　教授）
加藤 耕治

【緒言】

次世代シークエンサーによる網羅的な遺伝子解析が可能となったのに伴い、先天異常症候群の責任遺伝子が次々に明らかとなっている。また、責任遺伝子が同定されることによって、様々な疾患において発症に関与する分子学的メカニズムの解明が進み、従来は困難であった治療法の開発も試みられている。しかしながら、現在でも臨床現場では未診断の症例が多く存在する。今回我々は、巨脳症、脳室拡大、脳梁低形成、多趾症、心室中隔欠損症、神経芽細胞腫を合併した重度知的障害の症例を対象とし、責任遺伝子の同定とその病態解明を目的とした。

【方法】

父、母、患者の末梢血から抽出した DNA を用いてトリオのエクソーム解析を行った。検出された variant のうち、アレル頻度 0.5%以上、または synonymous 変異などのタンパク機能に影響を及ぼさないと考えられる variant は除外した。常染色体優性、常染色体劣性、X 連鎖劣性遺伝形式を満たす候補遺伝子をそれぞれ抽出し、アレル頻度や遺伝子機能、発現プロファイルなどをもとに候補遺伝子を絞り込んだ。

絞り込んだ variant の機能解析のため、wild-type（WT）と変異体の発現 vector を作成した。これを HEK293T や Neurosphere などの細胞にトランスフェクションし、タンパクのリン酸化状態やターゲット遺伝子のタンパク発現量をウェスタンブロット法で確認した。

In vivo の解析では、子宮内胎児エレクトロポレーション法を用いて、Empty（コントロール）もしくは Mycn の発現 vector をレポータータンパクである GFP 発現 vector と Embryonic day 14,5 （E14.5）の胎児マウス脳に導入した。細胞周期からの離脱に関する検討では、E15.5 に経静脈的に EdU を投与し、E16.5 に脳組織を固定、抗 GFP 抗体、抗 EdU 抗体、抗 Ki67 抗体を用いて免疫染色を行った。また neuronal cell migration に関する解析では、Postnatal day 0 に脳切片を採取し、GFP で染色して Mycn の過剰発現と migration に対する影響を検討した。

統計学的検討は 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 を用いた。$P < 0.05$ の場合に統計学的有意とした。

【結果】

トリオのエクソーム解析の結果、*MYCN* 遺伝子に *de novo* のミスセンス変異（NM_005378.5; c.173C>T; p.Thr58Met）を同定し、サンガー法でも確認した。この変異は ExAC などのデータベースに登録がなく、種を超えた保存性の高いアミノ酸に生じており、病的意義が疑われた。

MYCN 遺伝子に検出された p.Thr58Met がタンパク機能に及ぼす影響を検討するため、MYCN-WT もしくは MYCN-T58M を HEK293T 細胞に強制発現したところ、MYCN-WT では Thr58 のリン酸化を認めたが、MYCN-T58M では認めなかった

（Fig.1A）。また、 Neurosphere cells に Empty、Mycn-WT もしくは Mycn-T58M を Mycn の ubiquitin ligase である Fbw7 と共発現させたところ、Mycn-WT に比較して Mycn-T58M で Mycn タンパクの発現が増強していた。また、Mycn-WT の強制発現は Empty に比較して Ccnd1、Ccnd2 の発現を亢進させ、Mycn-T58M は Ccnd1、Ccnd2 の発現を Mycn-WT より更に有意に増加させた（Fig.1B、C：one-way ANOVA with post hoc Tukey's Honestly Significant Difference Calculator test; DF = 2、F= 19.5、P< 0.01 for Ccnd1; DF=2、F= 43.9、P< 0.01 for Ccnd2）。

次に *in vivo* で Mycn の過剰発現が細胞周期に及ぼす影響を観察したところ、Mycn の過剰発現は神経前駆細胞の細胞周期からの離脱を有意に遅延させた（Fig.2A、B：Two-sided Student's *t*-test; P< 0.01; Empty; n=5; WT; n=4）。また、Mycn の過剰発現と神経細胞の遊走障害との関連を検討したところ、Mycn の過剰発現により有意な遊走障害が観察された（Fig.2C、D：Two-sided Student's t-test; P< 0.05 for layers Ⅱ-Ⅳ and layers Ⅴ-Ⅵ; Empty; n=3; WT; n=3）。

【考察】

今回我々は、*MYCN* 遺伝子の *de novo* の機能獲得型変異が巨脳症症候群を引き起こすことを世界で初めて報告した。今回変異が同定された Thr58 のリン酸化は MYCN の分解を誘導する重要なアミノ酸である。MYCN-T58M は Thr58 のリン酸化能が欠落しているため、タンパクが分解されずに安定となり蓄積し、結果として CCND1、CCND2 の発現増加を引き起こすことが示された。更に、*in vivo* の検討では MYCN の過剰発現が神経前駆細胞の細胞周期からの離脱を遅延させることが示され、これが巨脳症と関連していると考えられた。

従来 *MYCN* 遺伝子は神経芽細胞腫との関連がよく知られているが、本症例でも乳児期に神経芽細胞腫を発症しているのは、MYCN-T58M が機能獲得型変異であることに由来する可能性が考えられる。また、生殖細胞系列の *MYCN* 遺伝子変異に関しては、機能喪失型変異で小頭症を伴う Feingold 症候群の原因になることが知られていた。一方で、今回 MYCN-T58M により発現増加を認めた *CCND2* の機能獲得型変異は巨脳症、脳室拡大、多小脳回、脳梁肥大、多指症を伴う症候群の原因として知られている。本症例でも巨脳症や脳室拡大、多趾症など類似した表現型を呈している一方、脳梁の形態や多小脳回の有無など一部表現型が異なっており、新規の症候群と捉えるべきと考えられるが、それらの相違を引き起こす分子学的なメカニズムに関しては更なる検討が必要である。

【結語】

今回我々は、*MYCN* 遺伝子の機能獲得型変異が新規の巨脳症症候群の原因となることを報告した。小頭症を伴う Feingod 症候群との対比や我々の分子生物学的検討は、*MYCN* 遺伝子の発生における重要な役割に新たな知見を与えるものである。