

A novel autosomal recessive syndrome with cutis
verticis gyrata, high bone mass, and prognathism:
identification of causal variants in *HIVEP3* gene
and bone phenotypic analysis of knock-in mice

(脳回転状皮膚・高骨塩量・顎突出症を呈する常染色体劣性遺伝性の新規症候群の発見：原因遺伝子 *HIVEP3* の特定とノックインマウスを用いた骨表現型解析)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：三川信之教授)

新井 美波

【目的】

脳回転状皮膚と顎突出症はそれぞれ独立した疾患と考えられているが、そのメカニズムや原因遺伝子の詳細は不明である。今回我々は、高骨密度と顎突出症を有する脳回転状皮膚の成人男性患者において *HIVEP3*(Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer-Binding Protein 3)変異を同定した。症例を報告すると共に、遺伝子改変マウスを用いて疾患メカニズムを解析することを目的とした。

【方法】

原因遺伝子解析目的に患者と両親に対してエクソーム解析を行った。発見された変異を再現したノックインマウスを CRISPER-Cas9 法を用いて作成、C57BL/6 マウスと 6 世代戻し交配し、同胞の野生型マウスと変異マウスで表現型解析を行った。8、16 週齢の変異マウスと野生型マウスから大腿骨を採取し、 μ CT で皮質骨・海綿骨の定量的に評価した。また、カルセイン二重染色を用いた骨形態解析により骨形成速度を解析した。*In vitro* 解析では、8 週齢マウスの大腿骨から単離した Bone marrow stromal cells (BMSCs)を骨分化培養し、アリザリンレッド染色で骨分化能を評価した。更に培養細胞より RNA を抽出し、定量 PCR で Runx2 など骨分化に関わるマーカーの発現を解析、RNA-seq で網羅的な遺伝子発現を解析した。また、不死化した BMSCs に *Hivep3*(野生型、各変異型)を過剰発現させ、TOPFLASH ルシフェラーゼアッセイにより *Hivep3* と WNT- β カテニンシグナル活性の関連

を評価した。

【結果・考察】

エクソーム解析による遺伝子診断の結果、転写因子 HIVEP3 (c.599 C>T and c.4651 G>A) の複合ヘテロ接合型変異を認め、うち c.599 C>T は新規変異であった。

16 週齢の変異マウスの大腿骨 μ CT で、骨量と骨梁増加、骨形成の増加を認め、変異マウスは *in vivo* 解析において患者と同様の骨量増加を示すことが明らかになった。BMSCs を用いた *in vitro* 解析では、変異マウスの BMSCs は骨分化培養でアリザリンレッドの沈着が多く、骨分化能が高いことが明らかになった。骨分化誘導前後で施行した BMSCs の定量 PCR では、骨分化前後ともに *Alp*, *Osx*, *Runx2* などの骨形成マーカーの発現が変異マウスで亢進しており、これらも患者表現型と矛盾のない所見だった。RNA-seq 解析により、変異群における骨形成の亢進が明らかとなり、WNT アンタゴニスト *sFRP1* の発現低下が背景にあることが示唆された。

不死化 BMSCs に対する TOPFLASH ルシフェラーゼ解析では、野生型 HIVEP3 が WNT/ β カテニンシグナルを阻害するのに対し、変異群ではその転写活性が上昇することを見出した。野生型 HIVEP3 の過剰発現により、WNT アンタゴニスト *sFRP1* の発現が増加し、WNT/ β カテニンシグナルが抑制、 β カテニン活性が低下する。一方で、変異型 HIVEP3 を過剰発現させると、*sFRP1* の発現増加が野生型に比べて抑

制され、WNT/ β カテニンシグナルの抑制も軽度に留まり、結果的にWTより変異群は β カテニン活性が高い結果であった。以上からHIVEP3はsFRP1の発現を促進する可能性が示唆された。

【結論】

HIVEP3が皮膚肥厚と頭蓋顔面骨の過成長を特徴とする新規症候群を引き起こすことを初めて発見した。変異マウスは*in vivo*解析で変異マウスは骨形成が亢進し、海綿骨量が増加し、*in vitro*解析では変異マウスBMSCは骨芽細胞分化能が亢進したことから、両親由来のHIVEP3変異は共に機能低下型変異であることが示された。また、HIVEP3のヒト骨代謝への関与が明らかになった。転写因子HIVEP3はWNTアンタゴニストsFRP1の発現調節を介してWNT/ β カテニンシグナルを調整し、ヒトの骨と皮膚に表現型をもたらす可能性が示唆された。