

令和元年5月28日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16710

研究課題名(和文) 早期発症の骨系統疾患の原因遺伝子の系統的シーケンス解析

研究課題名(英文) Systematic sequence analysis for early onset skeletal dysplasia

研究代表者

王 铮 (Wang, Zheng)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：90794313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨系統疾患とは、骨・軟骨など骨格を形成する組織の成長・発達・分化の系統的な障害により、骨・関節の形成・維持に異常をきたす疾患の総称である。骨系統疾患のかなりの部分が、胎児期から周産期にかけて発症する。本研究の目的は、これら早期発症骨系統疾患の原因遺伝子の同定である。国内外の臨床の専門家と連携し、全エクソーム解析など次世代シーケンサーを駆使した大規模シーケンス解析により、異骨性骨硬化症の原因遺伝子TNFRSF11Aなど5遺伝子を世界で初めて発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早期発症の骨系統疾患の診断は、1) 十分な臨床症状を得るのが難しい、2) X線などの画像情報を得るのが難しい、3) 骨格の成長・発達の個体差、年齢差が極めて大きい、ことなどから非常に困難である。多くの症例が、的確な診断が付かず、十分な治療が受けられない。一方で、早期発症骨系統疾患は、日常臨床の現場で、妊娠継続、延命処置の適否など重大な医学的決断を限られた時間内に下さないといけない状況におかれる場合が多い。迅速・簡便でかつ再現性のある診断方法の開発が喫緊の課題となっている。

早期発症の骨系統疾患の包括的遺伝子診断法の開発はこの課題を克服出来る。それには、原因遺伝子の同定が出发点となる。

研究成果の概要(英文)： Skeletal dysplasia refers to a group of diseases that affect the skeletal system including bone and joint. More than 400 diseases are included in this disease category and most of them are rare, monogenic diseases. A large part of skeletal dysplasia develops early in life. Those early-onset skeletal dysplasias are difficult to diagnose and treat. The purpose of the present study is to identify the disease genes for the early-onset skeletal dysplasia. By a large-scale sequence analyses in collaboration of experts all over the world, including whole-exome sequencing, we have succeeded in identification of the disease genes for the first in the world, including TNFRSF11A (RANK) and CSF1R for dysosteosclerosis, TONSL for SPONASTRIME dysplasia, EXTL3 for spondylo-epi-metaphyseal dysplasia with immune deficiency, and KIAA0753 for a novel type of skeletal ciliopathy.

研究分野：疾患遺伝学、医科遺伝学、ゲノム医科学

キーワード：骨系統疾患 単一遺伝子病 遺伝子変異 ゲノム解析 エキソーム解析 分子病態 遺伝子診断

1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患とは、骨・軟骨など骨格を形成する組織の成長・発達・分化の系統的な障害により、骨・関節の形成・維持に異常をきたす疾患の総称である。ほとんどが遺伝性の疾患で、2015年に発表された目下の国際分類では436の疾患が記載されている。しかし、その大部分が有効な診断・治療法がない難病である。

骨系統疾患のかなりの部分が、胎児期から周産期にかけて発症する。タナトフォリック骨異形成症、骨形成不全症などが代表的な疾患である。これら早期発症の骨系統疾患の診断は、1) 十分な臨床症状を得るのが難しいこと、2) X線やCTなどの画像情報を得るのが難しく、また、得られたとしてもその情報量が解像度の問題等で低いこと、3) この時期の骨格の成長・発達の個体差、年齢差が極めて大きいこと、などから、診断が難しいとされる骨系統疾患の中でもとりわけ困難である。このため、多くの症例が、的確な診断が付かず、十分な治療が受けられないままである。一方で、これらの早期発症の骨系統疾患は、日常臨床の現場で、妊娠継続の可否、延命処置の適否、致命的合併症の予防など、他の時期に比べて、重大な医学的決断を非常に限られた時間内に下さないといけない状況におかれる場合が多い。迅速・簡便でかつ再現性のある診断方法の開発が、喫緊の課題となっている。

早期発症の骨系統疾患の包括的遺伝子診断法の開発はこの課題を克服出来る。それには、原因遺伝子の同定が出発点となる。しかし、骨系統疾患を始めとする遺伝性疾患の原因遺伝子の効率的な同定の為には、1) 効率的な遺伝子シーケンス解析の基盤と、2) 広汎な臨床サンプルの収集体制の二つのインフラが必要不可欠である。

申請者らのグループは、臨床、基礎の両面から長らく骨系統疾患の研究に取り組んできた。臨床面では、骨系統疾患コンソーシウムを組織し、1990年代から日本国内での骨系統疾患の診断、研究のサポートを行なっている。また、全世界の骨系統疾患研究者のネットワークである ISDS (International Skeletal Dysplasia Society)の一員として、骨系統疾患の国際分類の作成を始め、全世界レベルで骨系統疾患の臨床に貢献して来た。基礎面では、計20疾患の骨系統疾患の原因遺伝子の同定に成功してきた。

幸いなことにわが国においては、上記の早期発症骨系統疾患の原因遺伝子の同定の為の二つのインフラの整備が完成しようとしている。シーケンス解析の基盤としては、遺伝病の Exome シーケンス解析研究の拠点が形成され、数多くの成果を生み出している。サンプルの収集体制としては、骨系統疾患コンソーシウムと胎児骨系統疾患フォーラムが互いに連携しながら、all Japan 体制で、数多くの臨床情報、DNA の収集に取り組み、数々の実績を挙げている。大規模な遺伝子シーケンス解析により、効率的に早期発症骨系統疾患の原因遺伝子を同定することが、可能な時代になってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、早期発症の従来の方法では診断の困難な骨系統疾患の原因遺伝子を同定することである。系統的なシーケンス解析により原因遺伝子を同定し、同定した遺伝子について、多くの患者で変異を解析し、遺伝子変異、疾患表現型のスペクトラムを明らかにし、遺伝子レベルでの迅速・簡便な診断法を確立する。臨床像・X線像との関連の検討、遺伝子変異の *in vitro*、*in vivo* の解析を通じて、当該疾患の分子レベルで病像、病態を明らかにし、治療への基盤を形成する。

3. 研究の方法

以下の3段階からなる系統的シーケンス解析を行う。

- a) 既知疾患遺伝子のシーケンス解析
- b) 新規候補遺伝子のシーケンス解析
- c) 未知疾患遺伝子の網羅的解析

研究の効率化のために、骨系統疾患の臨床の専門家集団とともに各症例を臨床データ、遺伝子情報をもとに評価し、それに応じて段階的にシーケンス解析を適用する。すなわち、疾患遺伝子が既知の疾患と判定された検体に対しては、まず既知遺伝子の変異をスクリーニングする。ここで、変異のなかったもの、及び疾患遺伝子が未知の疾患について、big data を用いた情報解析によって候補遺伝子を検索する。ここでも、変異のなかったもの、及び有力な候補遺伝子が無い検体に対して、Exome シーケンス解析を行う。

各段階の方法の内容は以下のとおり。

- 1) サンガー法によるシーケンス解析
- 2) Exome解析
- 3) 次世代シーケンスデータ解析
- 4) 次世代シーケンスデータの検証

5) 遺伝子変異と臨床病型の検討

4. 研究成果

国内外の臨床の専門家と連携し、全エキソーム解析など次世代シーケンサーを駆使した系統的な大規模シーケンス解析により、以下の遺伝子を世界で初めて発見した。

(1) 骨格シリア病の原因遺伝子、KIAA0753

Hammarsjo *et al.* Novel KIAA0753 mutations extend the phenotype of skeletal ciliopathies. *Sci Rep* 2017.

骨格シリア病は、ciliaの機能不全により、骨格の異常をきたす一群の疾患の総称である。脊椎と骨幹端の異形成を主な特徴とする著明な低身長をきたす。そのうちのひとつが、KIAA0753遺伝子の両アレルの機能喪失変異により起こることを発見した。ゼブラフィッシュモデルを用いて、骨格シリア病の病態を *in vivo* で検討し、内軟骨骨化の異常を明らかにした。

(2) 脊椎骨端骨幹端異形成症 (Spondylo-epi-metaphyseal dysplasia)の原因遺伝子、EXTL3

Guo *et al.* Identification of biallelic EXTL3 mutations in a novel type of spondylo-epi-metaphyseal dysplasia. *J Hum Genet* 2017.

脊椎骨端骨幹端異形成症は、扁平椎と長・短管骨の骨端、骨幹端異形成を主な特徴とする稀な骨系統疾患である。著明な低身長をきたし、免疫系の異常を合併することがある。常染色体劣性遺伝病である。全エキソーム解析により、その原因遺伝子EXTL3 (exostosin-like 3)を発見した。EXTL3の両アレルの機能喪失変異が、免疫不全を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症を起こすことを発見した。EXTL3は、機能未知の糖転移酵素である。患者の変異EXTL3は、その酵素活性が低下していることを、*in vitro*の機能解析で証明した。

(3) 異骨性骨硬化症(Dysosteosclerossi)の第二の原因遺伝子、TNFRSF11A (RANK)

Guo *et al.* Dysosteosclerosis is also caused by TNFRSF11A mutation. *J Hum Genet* 2018.

異骨性骨硬化症は、全身の骨濃度の増加、脊椎椎体の形成不全(扁平椎)、管状骨(長・短管骨)の骨幹端の透遠像を伴う拡大を主な特徴とする稀な骨系統疾患である。常染色体劣性遺伝病で、遺伝的異質性があることが知られている。全エキソーム解析により、その原因遺伝子TNFRSF11Aを発見した。TNFRSF11A 遺伝子の両アレルの機能の喪失を起こす変異により破骨細胞の機能が低下し、異骨性骨硬化症を生じることがわかった。TNFRSF11A の mRNA には多数の isoform が存在し、isoform に対する変異の影響の違いで、表現型が非常に異なることがわかった。異骨性骨硬化症では変異により、異常なタンパクを産生する isoform ができることがわかった。

(4) 異骨性骨硬化症の第三の原因遺伝子、CSF1R

Guo *et al.* Bi-allelic CSF1R mutations cause skeletal dysplasia of dysosteosclerosis-pyle disease spectrum and degenerative encephalopathy with brain malformation. *Am J Hum Genet* 2019

異骨性骨硬化症は、遺伝的に異質な疾患の集合で、既に疾患遺伝子として、*SLC39A3*, TNFRSF11A が知られていた。また、*CSF1R* 遺伝子の片方のアレルの変異は、神経軸索スフェロイド形成を伴う遺伝性びまん性白質脳症 (HDLS) という遅発性の神経変性疾患を引き起こすが、*CSF1R* がヒトの骨格に与える異常については分かっていなかった。全エキソーム解析により、*CSF1R* 遺伝子の両方のアレルの機能喪失変異が、広範かつ多様な骨格、脳神経系の異常を持つ、新たなタイプの難病の原因となることが明らかになった。骨格の異常は、異骨性骨硬化症、もしくは Pyle 病 (骨幹端異形成症) に類似していた。脳の異常は HDLS と同様だが、より早期に発症し、重篤で、かつ HDLS では見られない、先天的な奇形を伴っていた。*CSF1R* は骨では保骨細胞に、中枢神経ではミクログリアに強く発現していることから、これらの細胞の機能不全が、この新しい症候群の多彩な表現型を作り出していると考えられた。

(5) SPONASTRIME Dysplasia の原因遺伝子、TONSL

Chang *et al.* Hypomorphic mutations in TONSL cause SPONASTRIME dysplasia. *Am J Hum Genet* 2019.

TONSL 遺伝子の両アレルの機能の喪失変異により、SPONASTRIME Dysplasia が起きることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5件)

Guo L, Bertola DR, Takanohashi A, Saito A, Segawa Y, Yokota T, Ishibashi S, Nishida Y, Yamamoto GL, Franco JFDS, Honjo RS, Kim CA, Musso CM, Timmons M, Pizzino A, Taft RJ, Lajoie B, Knight MA, Fischbeck KH, Singleton AB, Ferreira CR, Wang Z, Yan L, Garbern JY, Simsek-Kiper PO, Ohashi H, Robey PG, Boyde A, Matsumoto N, Miyake N, Spranger J, Schiffmann R, Vanderver A, Nishimura G, Passos-Bueno MRDS, Simons C, Ishikawa K, Ikegawa

S、Bi-allelic CSF1R mutations cause skeletal dysplasia of dysosteosclerosis-pyle disease spectrum and degenerative encephalopathy with brain malformation、Am J Hum Genet、
査読有、104(5):925-935、2019、doi: 10.1016/j.ajhg.2019.03.004

Chang HR, Cho SY, Lee JH, Lee E, Seo J, Lee HR, Cavalcanti DP, Mäkitie O, Valta H, Girisha KM, Lee C, Neethukrishna K, Bhavani GS, Shukla A, Nampoothiri S, Phadke SR, Park MJ, Ikegawa S, Wang Z, Higgs MR, Stewart GS, Jung E, Lee MS, Park JH, Lee EA, Kim H, Myung K, Jeon W, Lee K, Kim D, Kim OH, Choi M, Lee HW, Kim Y, Cho TJ、Hypomorphic Mutations in TONSL Cause SPONASTRIME Dysplasia、Am J Hum Genet、査読有、104(3):439-453、2019、doi: 10.1016/j.ajhg.2019.01.009

Ürel-Demir G, Simsek-Kiper PO, Akgün-Doğan Ö, Göçmen R, Wang Z, Matsumoto N, Miyake N, Utine GE, Nishimura G, Ikegawa S, Boduroglu K、Further expansion of the mutational spectrum of spondylo-meta-epiphyseal dysplasia with abnormal calcification、J Hum Genet、
査読有、63(9):1003-1007、2018、doi: 10.1038/s10038-018-0473-4

Guo L, Elcioglu NH, Karalar OK, Topkar MO, Wang Z, Sakamoto Y, Matsumoto N, Miyake N, Nishimura G, Ikegawa S、Dysosteosclerosis is also caused by TNFRSF11A mutation、J Hum Genet、
査読有、63(6):769-774、2018、doi: 10.1038/s10038-018-0447-6

Hammarsjö A, Wang Z, Vaz R, Taylan F, Sedghi M, Girisha KM, Chitayat D, Neethukrishna K, Shannon P, Godoy R, Gowrishankar K, Lindstrand A, Nasiri J, Baktashian M, Newton PT, Guo L, Hofmeister W, Pettersson M, Chagin AS, Nishimura G, Yan L, Matsumoto N, Nordgren A, Miyake N, Grigelioniene G, Ikegawa S、Novel KIAA0753 mutations extend the phenotype of skeletal ciliopathies、Sci Rep、査読有、7(1):15585、2017、doi: 10.1038/s41598-017-14778-y

〔学会発表〕(計 3件)

WANG Z、IKEGAWA S、New Discovery on the Basic Research of Camurati-Engelmann Disease、
第9回 Orthopedic Research Club、2019年

WANG Z、GUO L、IKEGAWA S、Identification of Disease Genes of Skeletal Dysplasia – Lessons
from Skeletal Ciliopathy、第8回 Orthopedic Research Club、2017年

WANG Z、IKEGAWA S、Identification of disease genes of skeletal dysplasia、The 3rd
Tsinghua-RIKEN Joint Symposium on Immunology and Immunotherapy、2017年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.riken.jp/lab-www/OA-team/research.html>

<http://www2.riken.jp/lab-www/OA-team/JSDC/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：郭 龍

ローマ字氏名：(GUO, long)

研究協力者氏名：池川 志郎

ローマ字氏名：(IKEGAWA, shiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。