

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390408

研究課題名(和文) 骨系統疾患の原因遺伝子の同定と分子病態の解明

研究課題名(英文) Identification of the causative genes and investigation of the molecular pathogenesis for skeletal dysplasias

研究代表者

古市 達哉 (FURUICHI TATSUYA)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30392103

研究成果の概要(和文)：新規の骨系統疾患の原因遺伝子として、*SLC39A13*/*ZIP13*、*TRIP11*、*CHST14*、*SMOC1*を同定した。*SLC35D1*、*CANT1*、*TRPV4* 遺伝子変異による疾患スペクトルの定義をおこなった。*Zip13*、*Trip11*、*Smoc1* 遺伝子変異マウスを解析し、これらの遺伝子の機能異常による病態発症機序について検討した。これらの結果から得られる知見は、骨系統疾患の新たな診断・治療方法を確立するために有用な情報である。

研究成果の概要(英文)：We identified *SLC39A13*/*ZIP13*, *TRIP11*, *CHST14*, and *SMOC1* as novel causative genes for skeletal dysplasias. We defined the spectrum of the diseases caused by *SLC35D1*, *CANT1*, and *TRPV4* mutations. By using *Zip13*, *Trip11*, and *Smoc1* mutant mice, we examined the disease-causing mechanisms by respective gene mutations. These findings should be useful to establish novel strategies for diagnosis and therapy of skeletal dysplasias.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨系統疾患、遺伝子診断、小児運動器学

1. 研究開始当初の背景

骨系統疾患とは骨・軟骨の発生・成長の異常により骨格の形態や構造に系統的な異常をきたす疾患の総称であり、ほとんどがメンデル式遺伝をする単一遺伝子病である。2006年に改訂された国際分類では、372の疾患が記載されたが、このうちの157疾患の責任遺伝子は同定されていなかった。大部分の骨系統疾患は、有効な診断・治療法のない難病である。

2. 研究の目的

新規原因遺伝子の同定、遺伝子変異による疾患スペクトルの解析および遺伝子改変マウスの解析を通して、分子レベルで骨系統疾患の病態を明らかにする。骨系統疾患の新たな診断・治療方法の確立を目指す。

3. 研究の方法

ポジショナルクローニング、候補遺伝子ア

ブローチ等のゲノム解析により、新規の原因遺伝子の同定を行った。既に報告されている原因遺伝子については、更に多くの症例で変異を同定し、遺伝子変異の位置・種類と臨床像との関連を検討した。遺伝子改変マウスの解析等を通じて、骨系統疾患の病態発症機序を調べた。

4. 研究成果

(1) *SLC35D1* 遺伝子変異による疾患スペクトル

蝸牛様骨盤異形成症 (SBD) は重症脊椎異形成症 (SSDD) グループに分類される骨系統疾患である。SSDD グループは SBD、軟骨無発生症 1A 型、脊椎骨幹端異形成症 Sedaghatian 型、繊維性軟骨発生症および成熟遅延骨異形成症の 5 疾患で構成される。これら SSDD グループ疾患の原因遺伝子は長い間、不明であったが、我々は SBD の原因遺伝子 *SLC35D1* を 2007 年に同定した (Nat Med. Hiraoka et al)。本研究では新たな SBD 5 症例および SBD 以外の SSDD グループに属する 15 症例について、*SLC35D1* 遺伝子変異を調べた。その結果、SBD 3 症例の両アレルに機能消失型変異を同定した。しかし、他の SSDD グループ疾患症例に変異は同定されなかった。従って、*SLC35D1* 遺伝子変異は SBD に特異的であることが強く示唆された。

(2) *CANT1* 遺伝子変異と Desbuquois 骨異形成症

Desbuquois 骨異形成症 (DBQD) は高度の低身長、多発性関節脱臼、特徴的な顔貌異常、手指の変形等を特徴とする骨系統疾患であり、DBQD type I, type II および Kim variant の 3 つの臨床的サブタイプが報告されている。DBQD type I の原因遺伝子として *CANT1* が報告されていたが、我々は type II および Kim variant の症例にも *CANT1* 遺伝子変異を同定し、*CANT1* は DBQD 3 タイプすべての原因遺伝子であることを明らかにした。更に *CANT1* 酵素活性の簡便なスクリーニング系を構築し、DBQD 症例に同定された *CANT1* ミスセンス変異はすべて機能消失あるいは低下を引き起こすことを証明した。

(3) *TRPV4* 遺伝子変異による疾患スペクトル

TRPV4 は Kozlowski 型脊椎骨幹端異形成症、変容性骨異形成症の原因遺伝子である。両疾患症例のゲノム DNA を用い、大規模な *TRPV4* 遺伝子変異のスクリーニングを実施した。その結果、42 症例中 41 症例に変異を同定し、両疾患の原因となる *TRPV4* 遺伝子変異のホットスポットを同定した。更に我々は、*TRPV4* は Meroteaux 型脊椎骨幹端異形成症、parastremmatic dysplasia の原因遺伝子でも

あることも明らかにした。最近、*TRPV4* は先天性遠位脊髄性筋萎縮症等の神経筋疾患の原因遺伝子であることが報告され、*TRPV4* 変異による疾患スペクトルは、非常に広範囲に渡ることが明らかになってきた。

(4) 新型 Ehlers-Danlos 症候群の原因遺伝子 *ZIPI3* の同定

Ehlers-Danlos 症候群 (EDS) は皮膚、関節症状を特徴とする先天性のコラーゲン代謝異常に起因した結合組織異常疾患である。我々は EDS 血管型の特徴と椎体変形、骨量減少、歯牙形成不全といった骨形成不全症の特徴の一部を合わせ持ち、劣性遺伝形式をとるユニークな EDS 症例を見出した。この症例の家族の DNA を用いたホモ接合体マッピングを行い、責任領域を 11 番染色体上の 10 Mb に特定した。

一方で我々はゴルジ体膜上に発現する亜鉛トランスポーター *Slc39a13/Zip13* を欠損するマウスが上記の EDS 症例と相同性の高い表現系を示すことを見出した。実際に *SLC39A13* は同定した EDS の責任領域内に存在しており、上記の症例にホモ接合の *SLC39A13* ミスセンス変異 (c.221G>A, p. G74D) を同定した。*SLC39A13* は BMP/TGF- β のシグナル伝達に関わっており、p. G74D は機能消失型変異であった。以上の結果から、*SLC39A13* は新規の EDS 原因遺伝子であることが示された。

(5) 軟骨無発生症 1A 型の原因遺伝子 *TRIP11* の同定

軟骨無発生症 1A 型 (ACG1A) は周産期致死性の骨系統疾患であり、重症脊椎異形成症グループに分類される。我々は Golgi microtubule-associated protein 210 (GMAP-210) をコードする遺伝子 *Trip11* を欠損するマウスが、ACG1A の病態と高い相同性を示すことを見出した。そこで ACG1A 症例 DNA を用い、*TRIP11* 変異のスクリーニングを実施した。その結果、10 症例の両アレルに機能消失をもたらすことが予測される変異を同定し、ACG1A の原因遺伝子が *TRIP11* であることが明らかとなった。ACG1A 症例、*Trip11* 変異マウスの軟骨細胞では共にゴルジ体の形態異常が観察され、*Trip11* 欠損マウス細胞では、ゴルジ体におけるタンパク質の分泌が阻害されていた。従って *TRIP11* がコードする GMAP-210 は軟骨細胞におけるゴルジ体の機能に必須であり、同分子の機能欠損は致死的な骨格形成異常をもたらすことが示された。

(6) その他の新規原因遺伝子の同定
新型 Ehlers-Danlos 症候群の原因遺伝子として *CHST14* を、四肢異常を伴う小眼球症候群 (Microphthalmia with limb anomalies) の原因遺伝子として *SMOC1* を同定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Furuichi T (以下 15 名). *CANT1* mutation is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant. *J Med Genet.* 48:32-37, 2011 (査読有)
- ② Okada I, Furuichi T (以下 26 名、13 番目). *SMOC1* is essential for ocular and limb development in humans and mice. *Am J Hum Genet.* 88:30-41, 2011(査読有)
- ③ Watanabe Y, Furuichi T (以下 16 名、9 番目). Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyl transferase-1 is required for normal cartilage development. *Biochem J.* 432:47-55, 2010(査読有)
- ④ Dai J, Furuichi T (以下 33 名、29 番目). Novel and recurrent *TRPV4* mutations and their association with distinct phenotypes within the *TRPV4* dysplasia family. *J Med Genet.* 47:704-709, 2010 (査読有)
- ⑤ Miyake N, Furuichi T (以下 23 名、4 番目). Loss-of-function mutations of *CHST14* in a new type of Ehlers-Danlos syndrome. *Hum Mutat.* 31:966-974, 2010(査読有)
- ⑥ Dai J, Ikegawa S (以下 6 名、8 番目). *TRPV4*-pathy, a novel channelopathy affecting diverse systems. *J Hum Genet.* 55:400-402, 2010(査読有)
- ⑦ Nishimura G, Ikegawa S (以下 15 名、16 番目). Spondylo-epiphyseal dysplasia, Maroteaux type (pseudo-Morquio syndrome type 2), and parastremmatic dysplasia are caused by *TRPV4* mutations. *Am J Med Genet.* 152A:1443-1449, 2010 (査読有)
- ⑧ Kim OH, Ikegawa S ((以下 12 名、12 番目). A variant of Desbuquois dysplasia characterized by advanced carpal bone age, short metacarpals, and elongated phalanges: report of seven cases. *Am J Med Genet.* 152A:875-885, 2010 (査読有)
- ⑨ Murakami T, Furuichi T(以下 18 名、15 番目). Signaling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASISS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol.* 11:1205-1211, 2009(査読有)
- ⑩ Saito A, Furuichi T (以下 11 名、9 番目). Regulation of endoplasmic reticulum

stress response by a BFB2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis. *Nat Cell Biol.* 11:1197-1204, 2009(査読有)

- ⑪ Furuichi T (以下 12 名). Identification of loss-of-function mutations of *SLC35D1* in patients with Schneckbecken dysplasia, but not with other severe spondylodysplastic dysplasias group diseases. *J Med Genet.* 46:562-568, 2009(査読有)
- ⑫ Smits P, Ikegawa S (以下 18 名、15 番目). Lethal skeletal dysplasia in mice and humans lacking the golgin GMAP-210. *New Engl J Med.* 362:206-216, 2010(査読有)
- ⑬ Fukada T*, Civic N*, Furuichi T* (以下 23 名). The Zinc transporter *SLC39A13/ZIP13* is required for connective tissue development; Its involvement in BMP/TGF- β signaling pathways. *PLoS One.* 3:e3642, 2008 (査読有) * equal contribution
- ⑭ Miyake A, Furuichi T (以下 6 名、7 番目). A compound heterozygote of novel and recurrent *DTDST* mutations results in a novel intermediate phenotype of Desbuquois dysplasia, diastrophic dysplasia and recessive form of multiple epiphyseal dysplasia. *J Hum Genet.* 53:764-768, 2008(査読有)
- ⑮ Furuichi T (以下 13 名). Association of the *MSX2* gene polymorphisms with ankylosing spondylitis in Japanese. *J Hum Genet.* 53:419-424, 2008(査読有)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 古市達哉. 遺伝子改変マウスから見いだされた骨格異常を伴う新規トランスポーター病とその分子病態解析. 第 38 回北陸実験動物研究会. 2010 年 10 月 2 日. 富山
- ② 古市達哉 (以下 7 名). ENUミュータジェネシスによる新規 II 型コラーゲン遺伝子 (*Col2a1*) 変異マウスの同定. 第 150 回日本獣医学会. 2010 年 9 月 16-18 日. 帯広
- ③ Ikegawa S. From genome to skeletal diseases - recent advances in the association study of osteoarthritis and lumbar disc herniation and its association with ECM biology. Gordon Conference (Proteoglycan). July 14, 2010, NH USA
- ④ 古市達哉 (以下 4 名). 亜鉛トランスポーター遺伝子 *ZIP13/SLC39A13* の機能消失型変異は Ehlers-Danlos 症候群を引き起こす. 第 54 回日本人類遺伝学会. 2009 年 9 月 23-26 日. 東京
- ⑤ Dai J, 古市達哉 (以下 5 名、2 番目). Novel

and recurrent mutations in *TRPV4* cause SMD, Kozłowski type and Metaropic dysplasia in Asians. 第54回日本人類遺伝学会. 2009年9月23-26日. 東京

- ⑥ 古市達哉、池川志郎. 糖ヌクレオチド輸送体SLC35D1は軟骨組織におけるコンドロイチン硫酸合成に必須であり、その機能欠損は重度な骨格形成不全を引き起こす. 第1回新潟プロテオグリカン研究会. 2009年3月6日. 新潟
- ⑦ 古市達哉、池川志郎. 大規模関連解析による変形性関節症感受性遺伝子の同定. 第82回日本生化学会シンポジウム:「運動器」形成・再生のための分子基盤. 2009年10月21-24日. 神戸
- ⑧ 池川志郎、古市達哉. マウスとヒトの融合遺伝アプローチによる新規のトランスポーター病の同定とその分子病態の解明. 日本薬学会129年会シンポジウム:遺伝子改変マウスから見いだされたトランスポーター・チャンネルの新規機能. 2009年3月26-28日. 京都
- ⑨ Furuichi T (以下4名). Nucleotide-Sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human. The 26th Naito Conference: OSTEIO BIOLOGY. Nov. 4 - 7, 2009. Awaji-shima, Japan
- ⑩ 古市達哉(以下4名). 蝸牛様骨盤異形成症の責任遺伝子*SLC35D1*の同定. 第53回日本人類遺伝学会. 2008年9月27-30日. 東京
- ⑪ 古市達哉(以下4名). 蝸牛様骨盤異形成症の責任遺伝子*SLC35D1*の同定. 第20回日本整形外科学会骨系統疾患研究会. 2008年12月12日. 東京

[図書] (計4件)

- ① 池川志郎. 後縦靭帯骨化症のモデルマウス - *ttw*(tiptoe walking) -. CLINICAL CALCIUM 21:142-148, 2011
- ② 古市達哉、池川志郎. 蝸牛様骨盤異形成症の責任遺伝子 *SLC35D1* の同定. 第20回日本整形外科学会 骨系統疾患研究会記録集:31-34. 2009
- ③ 池川志郎、古市達哉 (以下2名). 糖ヌクレオチド輸送体SLC35D1は骨格形成に必須である. 実験医学 26:913-916, 2008
- ④ 池川志郎、古市達哉、西村玄. 骨系統疾患と遺伝子異常-蝸牛様骨盤異形成症の原因遺伝子*SLC35D1*の発見-. 最新医学 63:2211-2217, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.go.jp/lab-www/OA-team/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古市 達哉 (FURUICHI TATSUYA)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号: 30392103

(2) 研究分担者

池川 志郎 (IKEGAWA SHIRO)

独立行政法人理化学研究所・骨間接疾患研究

チーム・チームリーダー

研究者番号: 30272496