

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21681

研究課題名(和文) 異所性骨化とGNAS遺伝子領域インプリンティング異常に関する研究

研究課題名(英文) The relationship between heterotopic ossification and GNAS imprinting

研究代表者

宮井 健太郎 (MIYAI, Kentaro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00749004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：進行性骨異形成症(POH)に偽性副甲状腺機能低下症 a(PHP a)または偽性偽性副甲状腺機能低下症(PPHP)のオーバーラップを認める症例から、異所性骨化を生じる遺伝学的背景について検討した。POH/PHP a 2例、POH/PPHP 1例の全3例でGNAS遺伝子異常を認めた。全例de novo変異で、RT-PCRおよびSNP解析によりPOH/PHP a 1例は母由来アレル変異、残り2例は父由来アレル変異であった。またDNAメチル化異常は認めなかった。GNAS遺伝子の母由来アレル変異でもPOHを引き起こしうることが確認された。局所病変におけるエピゲノム異常については更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the genetic backgrounds of heterotopic ossification in patients with POH overlapped with PHP a (two patients) or PPHP (one patient). The de novo mutations in GNAS gene were detected in all three patients. RT-PCR method and SNP analyses showed that one mutation(POH/PHP a) was on the maternal allele and the other two mutations were on the paternal allele. DNA methylation abnormalities were not detected. These data suggested that GNAS mutation on the maternal allele could cause heterotopic ossification.

研究分野：小児科学 内分泌学

キーワード：GNAS POH DNAメチル化異常

1. 研究開始当初の背景

異所性骨化は頭部外傷や人工股関節置換術後などの後天的要素に加え、先天的な骨異形成症など様々な原因で発症することが知られている。いずれの病態においても関節拘縮や疼痛を招き患者 QOL を大きく損なうため病態解明、治療法の確立が望まれるが、その発生メカニズムの多くは不明である。

本研究では、遺伝性疾患である進行性骨異形成症 (Progressive Osseous Heteroplasia; 以下 POH) に着目した。POH は真皮、筋層、腱などの深部組織に異所性骨化をきたす非常に稀な疾患であるが、その異所性骨化には左右差を認める特徴がある。POH は GNAS 遺伝子機能喪失変異の父性遺伝が原因であるが、同遺伝子機能喪失変異の父性遺伝は偽性偽性副甲状腺機能低下症 (Pseudopseudohypoparathyroidism; 以下 PPHP) の原因でもある。遺伝学的に同一とされる POH と PPHP の表現型の差異がなぜ生じるかは現在のところ解明されていない。一方、偽性副甲状腺機能低下症 a 型 (Pseudohypoparathyroidism a; 以下 PHP a) は GNAS 遺伝子機能喪失変異の母性遺伝であるが、近年、臨床的に PPHP および PHP a それぞれに POH のオーバーラップした症例報告が散見されるようになってきている。これまでの知見では、このようなオーバーラップ症例の遺伝学的な説明が困難である。

2. 研究の目的

PPHP もしくは PHP a に、POH のオーバーラップを認める患者群 (以下それぞれ POH/PPHP、POH/PHP a) から得られた試料をもとに、異所性骨化に関与するゲノム DNA 異常、エピゲノム異常など遺伝学的背景を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

臨床診断 POH/PPHP; 1 例、POH/PHP a; 2 例を集積し以下の解析を行った。(1)リンパ球由来 DNA を用いた PCR ダイレクトシーケンシング法による GNAS 遺伝子解析。(2)GNAS 遺伝子変異については両親解析を行った。また変異の由来同定のため RT-PCR ならびに SNP 解析を行い同定を試みた。(3)リンパ球由来 DNA および一部症例では爪検体を用いたメチル化特異的 MLPA (MS-MLPA) を行い、DNA メチル化異常の関与について検討した。

4. 研究成果

(1)PCR ダイレクトシーケンシング

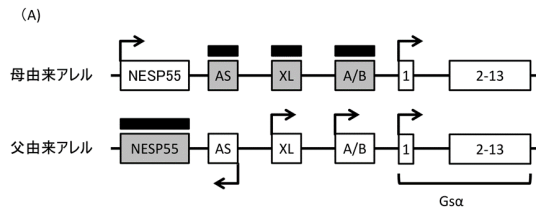
GNAS 遺伝子変異を 3 例全例でヘテロ接合性に同定した (c.432+1G>A, c.565-8delGACT, もう一つは新規変異)。

(2)-1 両親解析

3 例とも de novo 変異であった。

(2)-2- 由来同定 RT-PCR

次に RT-PCR 法を用いて変異アレルの由来同定を試みた。図(A)に示すように、GNAS 遺伝子はクラスターを形成している。インプリンティングを受けているため各クラスター遺伝子は発現由来が異なることが知られている。すなわち NESP55 は母性発現を AS、XL、A/B は父性発現を、GNAS は両性発現をする。末梢血リンパ球より mRNA を抽出し RT-PCR を行って解析したところ、POH/PPHP と臨床診断された 1 例で判明した GNAS 遺伝子 c.565-8delGACT 変異は NESP55 に認められず、A/B で認められた。このことより、上記変異は父由来アレル変異と考えられた。



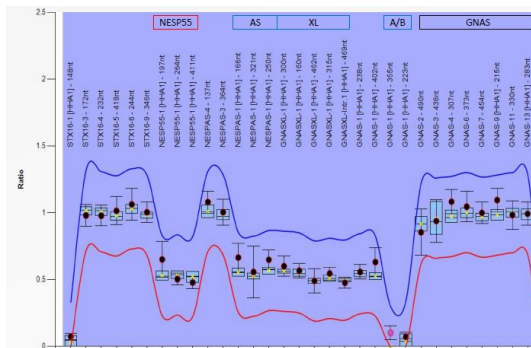
図(A) GNAS 遺伝子クラスター (灰は DNA メチル化されているため発現しない)

(2)-2- 由来同定 SNP 解析

臨床病型 POH/PHP a に認められた GNAS 遺伝子変異の前後 5kb 内には T 塩基連続 (20-30 塩基程度) 以外に解析に適した SNP を認めなかった。この T 塩基連続は PCR の過程で slipping を高率に起こしてしまうため Sanger 法の応用では解析困難であった。そこで、ロングリードが可能な 1 分子リアルタイム DNA シークエンサーである PacBio[®] RS を用いて解析を行った。その結果、POH/PHP a と臨床診断された 2 例は 1 例が母由来アレル変異、1 例が父由来アレル変異であることが判明した。

(3) MS-MLPA

リンパ球由来 DNA を用いた解析では 3 例ともに GNAS クラスターに DNA メチル化異常を認めなかった (図 B)。また四肢に分けて行った爪検体の解析において (POH/PHP 1 例および POH/PHP a 1 例) も DNA メチル化異常は認めなかった。



図(B) MS-MLPA
GNAS はメチル化されていないためメチル化

特異的制限酵素の影響を受けない。一方 NESP55、AS、XL、A/B (1A) は通常片アレルがメチル化されているため、メチル化特異的制限酵素により DNA が半量となる。本検体では過剰メチル化あるいは脱メチル化は認めない。

以上の結果から、GNAS 遺伝子異常は父アレル変異および母アレル変異両者とも異所性骨化に関与し、表現型として POH のオーバーラップを起こしうることが明らかになった。また、由来の同定において、1 分子リアルタイム DNA シークエンサーの有用性を見出した。一方で、GNAS 遺伝子機能喪失変異を有する症例において、POH を合併することは非常に稀であるため、GNAS 遺伝子異常以外の要素が関与していると考えられた。次に、今回施行した MS-MLPA 解析の結果からは特段の DNA メチル化異常は見出せなかった。本結果は表現型のオーバーラップや左右差を説明しうるものではないと考えられた。しかしながら、検査施行可能な臓器が限定的であったため、異所性骨化病変部位局所的に DNA メチル化異常の関与がないとは断定できない。異所性骨化の病態解明のためには、DNA メチル化異常に限らず、ヒストンアセチル化やヒストンメチル化といった他のエピゲノム修飾も含めてモデルマウスや罹患臓器由来の細胞を用いた解析が必要であり、今後の課題と考えられた。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Miyai K, Nishina N, Takagi M, Goto M, Hasegawa Y.

Variable Degree of Hormonal Resistance in Patients with Progressive Osseous Heteroplasia.

54th Annual Meeting of European Society of Paediatric Endocrinology (2015, Oct. Barcelona, Spain)

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮井 健太郎 (MIYAI, Kentaro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：00749004

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

鹿島田 健一 (KASHIMADA, Kenichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80451938