

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09585

研究課題名(和文) 家族性膝蓋骨無形成症の新規原因遺伝子の同定と疾患発症機序の解析

研究課題名(英文) Identification of novel causative gene for familial patellar aplasia and analysis of pathogenesis

研究代表者

高木 潤子 (TAKAGI, JUNKO)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：00319336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膝蓋骨形成異常を認める患者さんに遭遇したことから、その原因遺伝子を検出し、その機能を明らかにすることを目的として研究を実施した。患者さんの家族の中で、有症状者と無症状者のゲノム遺伝子を比較解析し、有症状者にのみ共通して認められる、骨形成に関わると推定される遺伝子の変異を検出する事ができた。

この遺伝子の変異の有無の検査により、疾患を予測でき、また、膝蓋骨形成異常を予防する治療法の開発に役立つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私達は、この疾患の原因を調べることは、診断治療法の開発に寄与するであろうと考えて研究に着手した。膝蓋骨形成異常を生じる他の疾患を含め、膝関節の形成には多様性があり、その原因の一部は先天性の形成異常による。これら疾患における患者のQOLにおいて共通する点は、加齢による変化が徐々に加わることにより、歩行の観点から著しく自立運動能力が阻害される事である。本研究は、膝関節の形成における学術的進歩、また再生医療領域における膝関節組織形成の発展においても、貢献できるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Having encountered patients with patellar dysplasia, we conducted a study to detect the causative genes and to elucidate their functions.

Through comparative analysis of genomic genes between symptomatic and asymptomatic patients in the patient's family, we were able to detect a mutation in a gene presumed to be involved in bone formation that is commonly found only in symptomatic patients. Testing for the presence or absence of mutations in this gene could predict the disease, and furthermore, could be useful in the development of treatments to prevent dysplasia.

研究分野：臨床遺伝学

キーワード：膝蓋骨 歩行障害 常染色体顕性遺伝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2018年に歩行障害を有する患者を診療する機会を得た。患者への家族歴聴取により、4世代にわたる歩行障害を有することが判明した。罹患者における歩行障害の原因は、全て膝蓋骨形成異常であり、その発症形式から常染色体顕性遺伝による遺伝子疾患が想定された。患者の症候から、当初は本邦の指定難病であるネイルパテラ症候群を疑ったが、報告されている合併症の所見を欠いた異なる表現型を認めた。以上の経緯から、膝蓋骨形成異常を呈する新しい常染色体顕性遺伝疾患の研究の着想に至った。

本研究では、この家系の疾患発症者において共通に見出される変異遺伝子について検索し、その遺伝子の産生する分子の機能解析を計画した。この研究の遂行により、対象とする疾患を確定し、その診断治療法開発に寄与することができると考えられた。

### 2. 研究の目的

- (1) 本家系の膝蓋骨無形成症の原因遺伝子を検出し、既報告の類似疾患の原因遺伝子との関連について明らかにする。
- (2) 検出した疾患原因候補遺伝子がコードする分子を明らかにし、さらに、遺伝子変異による分子の変化についても明らかにする。
- (3) 膝蓋骨形成の過程における、本遺伝子産物の機能を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 患者及び家族に対し、詳細な問診、臨床所見、及び検査による評価を行い、表現型を確認した。その後、遺伝子検査対象となる患者、家族構成員を選択した。
- (2) 倫理委員会の審査を経て、本家系三世代の罹患者および非罹患者各三人から血液を採取し、抽出したDNAを用い全ゲノムシーケンスによる網羅的解析を行った。この結果から、罹患者は、既報告の疾患における原因遺伝子にその原因となる変異を有さないことを確認した。その上で、罹患者のみが共有し、非罹患者が有さない変異を伴う疾患関連候補遺伝子を特定した。
- (3) 罹患者のみが持つ変異を有する遺伝子と、変異のない野生型遺伝子発現系細胞をそれぞれ作成し、変異を有する遺伝子と、野生型遺伝子によりそれぞれ産生された分子の機能における違いを検討した。
- (4) ゲノム編集システムを用いて、罹患者のみが有する遺伝子変異導入マウスを作成し、骨形成に対する影響を検討した。検討は、変異を有さない野生型マウスと比較して、経時的な肉眼的観察および動物用CTによる骨格系観察により行った。また、それぞれのマウスにおける骨形成に関し、病理学的差異について検討した。

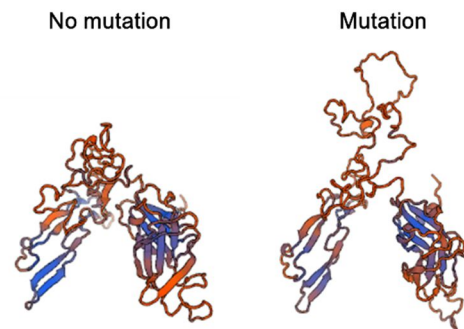
### 4. 研究成果

- (1) 愛知医科大学倫理審査委員会の承認を得た後、患者と血縁者に十分な説明を行った。患者から、研究に対する理解と同意を得た後、臨床及び検査所見から表現型について検討した。罹患者の全てにおいて、両側膝蓋骨の完全な無形成を認めた。また、年齢とともに悪化する歩行障害を認め、この原因が膝蓋骨無形成であると診断した。罹患者には、程度の異なる肘関節屈曲障害が認められた。膝蓋骨形成異常を示す既報告の疾患である、ネイルパテラ症候群で認められる様な爪形成異常および腎機能障害などの表現型は認められなかった。

この事から、本家系に認められる疾患は、これまで報告されていない表現型を有する膝蓋骨無形成症であると判明した。

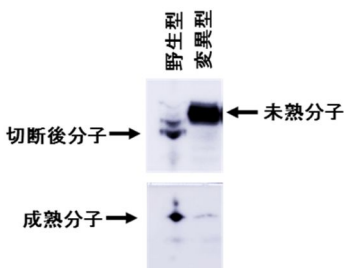
- (2) 疾患遺伝子の同定を行う事を目的として、3世代の各世代で、罹病者と非罹病者各2人、計6人について全ゲノムシーケンス法による解析を実施した。その結果、既報のネイルパテラ症候群の責任遺伝子 *LMX-1b* に変異は認められなかった。罹病者に共通して有し、かつ非罹病者が有さない遺伝子で、新規な変異として認められた遺伝子を絞り込んだところ、22の遺伝子において、これまで疾患との関連が報告されていない新しい遺伝子に、罹病者のみが共有する点変異を確認した。また、最終的に、その中で、骨形成と関わると考えられる遺伝子が一つ見出された。検出した変異について、改めて罹患者の遺伝子のダイレクトシーケンスを行い、網羅的解析で検出されたものと同じ変異が存在することを確認した。

- (3) 本疾患原因候補遺伝子がコードする蛋白は、細胞内で分子内切断され、切断により得られた成熟型小分子が細胞外に分泌されて機能すると想定されている。今回検出した遺伝子変異によりコードするアミノ酸に変異が生じ、これにより明らかな蛋白構造変化を生じることが想像された。また、この構造変異により、変異型



遺伝子を持つ分子では細胞内切断に障害を生じると予想された。この検討のために、変異

型及び野生型遺伝子の動物細胞発現用ベクターを構築した。その後、それぞれの遺伝子を導入した細胞株を樹立し、産生される蛋白の成熟化のための切断の有無について検討した。その結果、野生型遺伝子発現系細胞では、成熟小分子が認められるが、変異遺伝子発現系では成熟小分子は極めてわずかしか見出す事ができない事が明らかとなった。

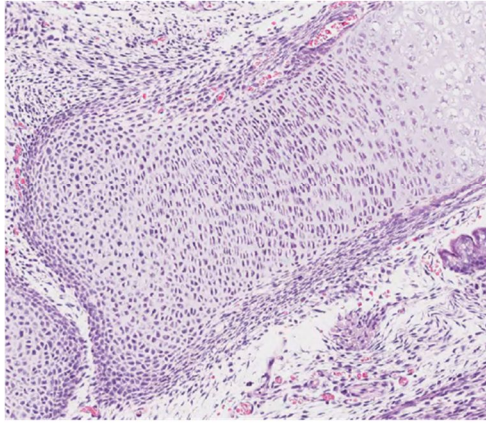


- (4) ゲノム編集システムを用いて、疾患関連候補遺伝子のバリエーション導入マウスを、委託によって作成した。作成した変異型遺伝子導入マウスは、採血により得たDNAを用いてダイレクトシーケンスを行い、遺伝型を確認した。確認されたホモ、ヘテロ及び野生型マウスを繁殖し、骨格形成における経時的变化について検討を行った。

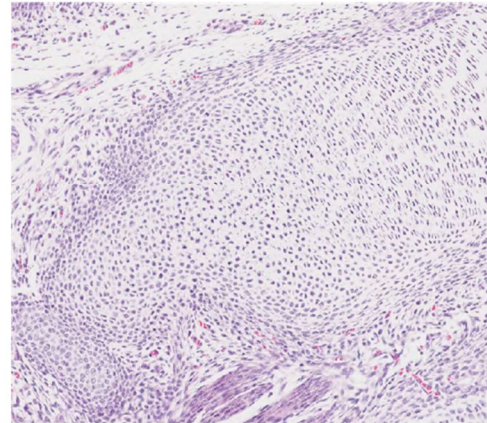
小動物用CTを用いた出生後の幼若マウスの検討では、日齢0、30および60日のマウスの骨格において、膝蓋骨も含め、CT画像上で確認できる明らかな解剖学的差異は認められなかった。膝蓋骨が形成過程にある胎生期マウスにおいては、石灰化が未熟なことにより、CTによる検討は困難であった。

このため、ホモ、ヘテロ、野生型の膝関節部を含むパラフィン切片を新たに作成し、病理学的手法による比較検討を行った。病理組織検体は、膝蓋骨形成が開始される胎生14日、及び形成がほぼ完了する胎生16日のマウスから作成した。その結果、ホモ接合型マウスの

野生型



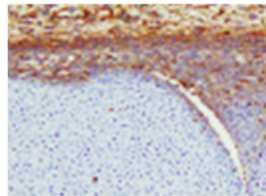
変異型



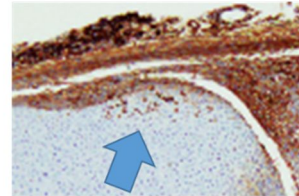
大腿骨組織における先端部では、通常では増殖細胞から骨細胞へ分化していく細胞が存在する領域において、野生型マウスと比較すると、骨形成のための比較的大きな分裂細胞の領域が拡大しており、細胞密度の違いが観察された。ホモ接合型マウスの骨組織では、増殖期にある細胞が多く認められると考えられた。細胞増殖期にある細胞かどうかを判断するため、ホモ接合型及び野生型マウスの組織標本を対象として、ki-67 陽性細胞を比較し

た。その結果、ホモ接合型の骨組織では明らかに ki-67 陽性細胞が多く認められ、細胞増殖は進んでいるが、骨への成熟分化が進んでいないと考えられた。この結果から、今回見出した疾患関連遺伝子候補は、骨形成

野生型



変異型



に関わる細胞の分裂増殖から分化に関わる機能を有すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	出家 正隆  (DEIE MASATAKA)  (30363063)	愛知医科大学・医学部・教授    (33920)	
研究分担者	吉川 和宏  (YOSHIKAWA KAZUHIRO)  (60109759)	愛知医科大学・公私立大学の部局等・特務教授    (33920)	
研究分担者	高見 昭良  (TAKAMI AKIYOSHI)  (80324078)	愛知医科大学・医学部・教授    (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関