

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591309

研究課題名（和文）骨形成不全症の遺伝学的背景の解明：遺伝子型によるオーダーメイド治療への展開

研究課題名（英文）The elucidation of the genetic background of osteogenesis imperfecta: Deployment to the custom-made medical treatment by a genotype.

研究代表者

菅野 潤子 (KANNO JUNKO)

東北大学・病院・医員

研究者番号：30509386

研究成果の概要(和文):骨形成不全症(Osteogenesis imperfecta:OI)の患者22名のCOL1A1、COL1A2変異解析を行い、14種の遺伝子変異を同定した。全ての変異は、一家系のみで検出され、COL1A1、COL1A2変異の異質性が認められた。グリシンがセリンに置換する変異がより重度の表現型を呈した。殆どの患者が青色強膜と歯牙形成不全を有していた。ビスフォスホネート治療で全ての患者の骨密度の上昇を認めた。遺伝子型による治療効果への影響は認めなかった。

研究成果の概要(英文): Sequencing analysis of COL1A1 and COL1A2 in 22 OI patients revealed 14 mutations. Each of the 14 mutations was found only in a single family. COL1A1 and COL1A2 mutant alleles are heterogeneous. Glycine to serine substitutions tend to lead to a more severe phenotype. Most of the patients had blue sclerae and dentinogenesis imperfecta. Bisphosphonate significantly increased BMD in all the patients, though no correlation was found between the mutated gene or mutation type and increment in BMD.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：骨形成不全症、ビスフォスフォネート、COL1A1、COL1A2、LEPRE1、CRTAP

## 1. 研究開始当初の背景

(1)骨形成不全症(Osteogenesis imperfecta:OI)は、骨の脆弱性による易骨折性とそれ

に伴う骨変形を特徴とする遺伝性の骨粗鬆症で、全身の結合組織の異常であるため、青色強膜、歯牙形成不全、関節と皮膚の過進展

や難聴など骨外症状も伴う (Rauch: *Lancet*. 2004)。重症度は、周産期致死性の重症型から殆ど骨折を認めない軽症型まで様々で、現在、7つの病型が提唱されている。OIの患者においては、全身の結合組織におけるI型コラーゲンに異常が認められる (Marlowe: *J Med Genet*. 2002)。I型コラーゲン分子は2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖の3本のポリペプチド鎖から構成されるトリプルヘリックス構造をとり、 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖は各々、*COL1A1*、*COL1A2*によりコードされている。OIの臨床的診断は、家族歴を有する場合や幾つかの典型的な症状を有する場合は容易であるが、孤発例や骨外症状のない症例では困難である。臨床的診断が難しい場合、I型コラーゲンの分子学的解析は診断に有用である。欧米の報告では、*COL1A1*と*COL1A2*の変異解析により、OIのI~IV型の患者の約90%において、I型コラーゲンの異常が原因と報告されている (Marlowe: *J Med Genet*. 2002)。遺伝子検査が陰性の患者は、I型コラーゲンの異常をもっていながら検出されない、またはI型コラーゲンの以外の病因によると考えられる。

(2)OIのVII型は常染色体劣性遺伝性で責任遺伝子は3p22-24.1にマッピングされていたが (Labuda: *Bone*. 2002)、この部位に局在する*CRTAP* (cartilage-associated protein) が、責任遺伝子として同定された (Morello *Cell*. 2006)。一方、致死性II型の常染色体劣性遺伝の患者においても、*CRTAP*の変異が、報告された (Baldrige *Human Mutation*. 2008)。また、同じように細胞内のcollagen-modification complexである、prolyl 3-hydroxylase (P3H1) をコードする、*LEPRE1*の機能喪失型変異も、明らかになった (Cabral *Nat Genet*. 2007, Baldrige *Human Mutation*. 2008)。

(3)日本人のOIの患者の系統だった解析はこれまで報告がなかったが、最近、DHPLC法を用いた、OIのI型~IV型の患者の*COL1A1*、*COL1A2*の変異解析が報告された (Kataoka: *Pediatr Int*. 2007)。この報告において変異検出率は41%と高くなく、重症のII型では75%であった。このことから、日本

人の患者では欧米の報告と異なり、DHPLC法で検出されない変異の存在や、*COL1A1*、*COL1A2*以外の責任遺伝子の存在が示唆される。

(4)ビスフォスフォネートは、強力な骨吸収抑制作用により、本症患者の半数以上で有用であることが報告されており (Glorieux: *N Engl J Med*. 1998)、応募者らも本症患者に4週毎1回の同剤投与を行い、効果を得ている (Fujiwara *Eur J Pediatr*. 1998)。しかし、これまで遺伝子型とビスフォスフォネートの治療効果との関連について検討された研究はなく、また、本症患者におけるビスフォスフォネート治療の適応についての明確な指針はない。

(5) 応募者らは、常染色体劣性遺伝性の先天性代謝性疾患である非ケトーシス型高グリシン血症においてmultiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法を用いた遺伝子診断法を確立し、患者の20%で、責任遺伝子である*GLDC*の大きな欠失を検出した (Kanno *J Med Genet*. 2007)。MLPA法は1組の隣接する1本鎖DNAプローブの結合反応を利用して相対的な遺伝子コピー数を推定する欠失、重複検出法で、様々な大きさの欠失や重複を、部位特異的、定量的に多重解析が可能である (Shoutenl: *Nucleic Acids Res*. 2002)。この方法で検出された患者の欠失の断端は、ヒトゲノムに最も多く存在する繰り返し配列である*Alu*配列内にあることも解明し、*Alu*配列による相同組み換えの促進が欠失の原因のひとつであることが示唆された。また応募者らは、ピリドキシン依存性けいれんの患者の*ALDH7A1*変異解析においても、大きな欠失が原因の患者を検出し、欠失の断端が*Alu*配列内にあることを見出した (Kanno *J Mol Genet Metab*. 2007)。*Alu*配列による欠失や重複は、様々な遺伝性疾患において、病因であることが報告されている。*COL1A1*、*COL1A2*における病因変異の報告は殆どが点変異であるが、欠失の報告もある。

(6)欧米の報告と異なり、*COL1A1*、*COL1A2*のDHPLC法での変異検出率の低い日本人の

OI患者においてCOL1A1、COL1A2、CRTAP、LEPRE1のMLPA法と直接シーケンス法による包括的な変異解析を行い遺伝的背景を解明することは、有意義である。

## 2. 研究の目的

(1)日本人OI患者においてCOL1A1、COL1A2、CRTAP、LEPRE1の直接シーケンス法とMLPA法による包括的な変異解析を行い遺伝的背景を解明すること。

(2)遺伝子変異が検出された患者の臨床像を検証し、それぞれの遺伝子型と表現型の相関を解明すること。

(3)各遺伝子型と表現型とビスフォスフォネートによる治療効果との関連についての検討を行い、今後、各遺伝子型、表現型に応じたオーダーメイド治療法を確立すること。

## 3. 研究の方法

(1)東北大学病院小児科通院中、および日本国内の他施設に通院中の骨形成不全症候群の患者と家族を対象とする。

(2)患者および家族の末梢白血球から抽出したゲノムDNAを用いて遺伝子解析を行う。解析方法は直接シーケンス法およびMLPA法とした。4つの責任遺伝子の全エクソン領域に対応するプライマーを設計し、各遺伝子の全エクソンの直接シーケンスを行う。また4つの責任遺伝子の全エクソン領域に対応するMLPAプローブを設計し、MLPA解析を行う。MLPA法で欠失が検出された場合は、その断端をLong-range-PCRにて検出し、欠失の長さと同断端を確認するとともに、欠失とAlu配列との関係を明らかにし、欠失の原因を究明する。

(3)遺伝子変異が検出された患者の臨床像を

検証し、それぞれの遺伝子型と表現型の関連を明らかにする。

(4)遺伝子型と表現型とビスフォスフォネートの治療効果との関係について検討を行い、遺伝子型や表現型に応じた治療の適応や、投与方法および投与量など治療方法の算定などのオーダーメイド治療法を確立する。対象患者のほとんどは、ビスフォスホネート治療(1mg/kg、月1回)を受けた。患者の腰椎のBMDは、DXA(Hologic 4500A)を用いて、治療前と治療半年後に測定された。

## 4. 研究成果

(1)20家系22名のOIの患者(男児9名、女児13名)、I型6名、III型11名、IV型5名のCOL1A1、COL1A2変異解析を施行した。20家系中14家系の患者において、14種類の変異をヘテロ接合性に同定した。検出した変異の内訳は、10種類のミスセンス変異、2種類のナンセンス変異、2種類のフレームシフト変異であった。11種類の変異は既報の変異、3種類の変異は新規変異であった。対象患者の出身がほぼ同地域であるにも関わらず、検出された14の種類は全て、1家系毎に異なっていた。

(2)COL1A1、COL1A2何れにおいてもグリシンがセリンに置換する変異が最も多く検出された。グリシンがセリンに置換する変異を認めた患者は、他の変異が検出された患者と比較して、身長が有意に低かった。青色強膜と歯牙形成不全は、ほぼ全ての患者において認められた。

(3)ビスフォスホネート治療で全ての患者の骨密度の上昇を認めた。遺伝子型による治療効果への影響は認めなかった。

(4)COL1A2のエクソン44に変異を認めた患者において、脳内出血の合併を認めた。COL1A2のC端に近い、エクソン49に変異を有する患者において、脳内出血は過去にも報告があり、この変異と脳の血管の結合識の異常等との関連も示唆される。

(5)COL1A1、COL1A2直接シーケンス法で変異が検出されなかった患者において、

*COL1A1*、*COL1A2*のMLPA法による欠失の解析を行っている。

(6) *COL1A1*、*COL1A2*でMLPA法による欠失も検出されなかった患者においては、*CRTAP*、*LEPRE1*の解析を行う予定である。

(7) *COL1A1*、*COL1A2*のMLPA法による欠失、*CRTAP*、*LEPRE1*の変異が同定された場合は、引き続き、遺伝子型と表現型の関連の解析と、ビスフォスホネート治療効果の検討を行う。

## 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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菅野 潤子 (KANNO JUNKO)

東北大学・病院・医員

研究者番号：30509386

### (2) 研究分担者

呉 繁夫 (KURE SHIGEO)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10205221

### (3) 連携研究者

藤原 幾磨 (FUJIWARA IKUMA)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：10271909