

論文の内容の要旨

論文題目 偽性軟骨無形成症および多発性骨端異形成症における
遺伝子変異の検出に関する研究

氏名 馬淵 昭彦

緒言

偽性軟骨無形成症及び多発性骨端異形成症は、共に骨端の異形成を特徴とする疾患群である。いずれも、軽症型と重症型に分類されるが、明確な基準は存在していない。両疾患は、重症から軽症まで多様な臨床像をとる明瞭に区分できない連続した一つの病態であると考えられている。COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein)は、特有な 8 つの繰り返し構造から構成される Calmodulin-like repeats (CLR)ドメインをもつ細胞外基質タンパクである。この COMP 遺伝子は、偽性軟骨無形成症と多発性骨端異形成症の疾患原因遺伝子であることが報告されている。既報の COMP 遺伝子の変異は単一ではなく、その一方で偽性軟骨無形成症と多発性骨端異形成症の病態は多様性に富むため、変異の遺伝子型と表現型は一定の関係にある可能性がある。しかしながら、COMP 遺伝子変異の臨床像との関係は未だ不明の点が多い。また、多発性骨端異形成症には、遺伝的異質性があり他に 5 つの疾患原因遺伝子が知られている。その一つ、MATN3 (matrilin-3)は、比較的最近同定され、軟骨特異的に発現する遺伝子である。MATN3 もまた変異好発部位、臨床像との関係等不明の点が多い。

変異の種類、型について多くの情報を蓄積することは、これらを用いた遺伝子変異の検出を簡便化させるための道筋を開くことになる。既知の変異が見つかった場合、その診断

は確実である。一方、遺伝子情報以外の補助診断が存在する場合、これらを組み合わせることでその診断妥当性はより高くなる。COMP では、血清及び関節液中での検出が可能であるため、これを用いた診断法を検討することで臨床応用への道が開かれる可能性がある。

本研究では、偽性軟骨無形成症、多発性骨端異形成症の簡便で効率の良い遺伝子変異の検出に資するため、COMP 遺伝子と MATN3 遺伝子に関して新規変異の同定とその妥当性を評価し、変異の部位と臨床像との相関関係を検討した。更に血中 COMP 濃度と遺伝子変異との関係を明らかにすることを目的とした。

方法

東京大学医学部附属病院整形外科等の施設を外来受診し、経過観察されている患者を対象とした。偽性軟骨無形成症7例、多発性骨端異形成症17例に対して新規変異の同定を行った。各参加施設及び理化学研究所の倫理委員会の承認のもと研究を行った。実施内容に関し説明は文書を用いて行い、その後すべての対象者及び家族から書面で同意を得た。ゲノム DNA を得るため、末梢血、頭髮もしくは爪を採取した。また、末梢血から EB ウイルス感作リンパ球を樹立、培養し、RNA を抽出、逆転写を行って得た cDNA を解析用の試料とした。PCR-ダイレクトシーケンスを行い対象者の塩基配列を決定した。必要な場合、変異アレルをサブクローニングした。シーケンスが正確か否かを制限酵素法及び TaqMan 法で確かめた。多型解析では、NED でラベルした蛍光プライマーを使用し多型を含む領域を増幅、これを泳動しアレルを同定した。MATN3 遺伝子における変異と多型の連鎖を確かめるため、両領域を含む PCR を行い、各々のアレルを決定した。血漿 COMP 濃度は、ウサギ由来抗ヒト COMP ポリクロナール抗体がプレート上にコーティングされている enzyme immunoassay kit を使用して測定した。

結果

COMP 遺伝子では、偽性軟骨無形成症7例の全例で、多発性骨端異形成症では17例中6例で遺伝子変異を同定した。変異が同定された13例の内訳は、新規変異が9例、既報の変異4例であった。偽性軟骨無形成症における新規変異は、ミスセンス変異3例、欠失変異1例、計4例であった。欠失変異の1例は、第9エクソンから第9イントロンまでの533塩基に及ぶ大きな欠失であり、cDNA の解析から第9エクソン全体がスキップし、第1、第2 CLRドメインを構成する33アミノ酸が欠失するインフレーム欠失変異となっていた。多発性骨端異形成症における COMP 遺伝子の変異は、インフレーム欠失変異が2例、ミスセンス変異が3例、一塩基挿入変異が1例であった。一塩基挿入変異例は、C末端ドメイ

ン内の第 18 エクソンに変異が生じており、次に続くコドンを停止コドンとさせるため、短縮型タンパクとなることが予想された。*COMP* 遺伝子の変異検出率は、今回の方法では、偽性軟骨無形成症では 100%であったのに対し、多発性骨端異形成症では 35%にとどまった。

偽性軟骨無形成症のうち重症型では、インフレーム欠失変異が過半を占め、ミスセンス変異は2例のみであった。軽症型の偽性軟骨無形成症では、全例がミスセンス変異であり、挿入もしくは欠失型変異は同定されなかった。多発性骨端異形成症では、変異の種類に一定の関係は認められなかった。第7 CLR ドメイン内に変異を持つものは、他の CLR ドメイン内に変異をもつものに比べ有意に ($p = 0.0003$)強い低身長を呈していた。また、身長が -6 S.D. 以下の偽性軟骨無形成症では一例を除き、第7 CLR ドメインにあるアスパラギン酸の5回繰り返し部位に変異が存在していた。一方、多発性骨端異形成症では、この繰り返し部位に変異は認められなかった。

MATN3 遺伝子では、多発性骨端異形成症 17 例中 5 例で変異を同定した。同定された変異はすべて第2 エクソン内のミスセンス変異であり、新規変異は1例であった。3例は、同一の p.T120M 変異であり、またその隣のアミノ酸残基にも変異が同定された。

p.T120M 変異のうち一例で、家系内の配偶子分離の確認を行ったところ不完全浸透を示した。非血縁者 400 例にはこのアレルを検出できなかった。このアレルと多発性骨端異形成症との間に関連がないという帰無仮説のもと検定を行うと、 $p = 4.7 \times 10^{-5}$ となり仮説は棄却された。従ってこのアレルは、多発性骨端異形成症との関連は存在するが、浸透率は比較的低い (63%)と判断された。

MATN3 遺伝子のイントロン3ある CA リポートを用いて直接ハプロタイプを決定したところ、p.T120M 変異ではいずれもアレル7であった。家系検体を用いた解析でも、p.T120M アレルとアレル7は、同一ハプロタイプにあると推定された。

COMP 遺伝子に変異のある偽性軟骨無形成症6例、*COMP* 遺伝子に変異のある多発性骨端異形成症7例、*COMP* 遺伝子に変異のない多発性骨端異形成症8例、対照 47 例の血漿 *COMP* 濃度を測定した。*COMP* 遺伝子に変異のある群 (*COMP* 群; 計 13 例)での血漿 *COMP* 濃度は、 $0.67 \pm 0.15 \mu\text{g/ml}$ と対照 ($1.42 \pm 0.35 \mu\text{g/ml}$)に比べ有意に ($p < 0.0001$)低下していた。*COMP* 群を偽性軟骨無形成症群、及び多発性骨端異形成症にそれぞれわけて検定しても、血漿 *COMP* 濃度は、有意に ($p < 0.0001$)低下していた。*COMP* 群の中では、偽性軟骨無形成症群と多発性骨端異形成症で血漿 *COMP* 濃度に差はみられなかった。また、多発性骨端異形成症で *COMP* 遺伝子に変異のない群の血漿 *COMP* 濃度は、対照と同程度で、多発性骨端異形成症で *COMP* 遺伝子に変異のある群と比較すると、有意に ($p = 0.001$)高

かった。

対照群では、血漿 COMP 濃度は、20 歳以下では年齢に応じて低下し、それ以降では、徐々に上昇する傾向にあった。同様の傾向は、COMP 群でも観察された。従って、血漿 COMP 濃度を年齢で層別化し比較した。どの年齢層でも、COMP 群では血漿 COMP 濃度が対照群と比較して有意に (20 歳未満: $p = 0.003$ 、20 - 40 歳: $p = 0.007$ 、41 - 65 歳: $p = 0.002$) 低下していた。また、20 歳以下の多発性骨端異形成症で COMP 遺伝子に変異のない群では、正常と比べ有意な差は観察されなかった

考案

大多数の骨系統疾患は遺伝性疾患であり、多くが単一の遺伝子に異常が存在する。このため、補助診断として遺伝子を用いた診断が可能であり、その重要性は今後高まることが予想されている。特に、本研究で対象とした多発性骨端異形成症では診断に難渋することがあるため、診断確定のための一項目となりうる。しかしながら、現時点における遺伝子変異の検出は、対象とする遺伝子全体を検査せねばならず効率の面で現実的でない。従って、効率良く遺伝子変異の検出を行うためには、系統的な解析方法の確立が望まれる。

本研究で以下のことを示したと考えられる。第一に、変異の多様性を掌握するため、COMP 遺伝子及び MATN3 遺伝子に、エクソンがスキップする大きな欠失変異やフレームシフト、停止コドンが出現する変異などこれまで報告のない多種の新規変異を同定したことである。第二に、COMP 遺伝子の変異の位置が身長を基準とした臨床像と一定の関係にあることが示唆されたことである。第三に、血漿中の COMP 濃度が、COMP 遺伝子変異の有無と関連し有意に低下したことを示し、血漿 COMP 濃度を測定することで、何が原因遺伝子であるかを判断する手がかりとなる可能性を示したことである。

これらの知見を組み合わせることで、より効率的かつ系統的な遺伝子変異の検出が可能であると考えられた。