

論文の内容の要旨

論文題目 Legg-Calvé-Perthes 病を含む股関節病変が多発した家系と、
耳・脊椎・巨大骨端異形成症患者における II 型コラーゲン
遺伝子変異の同定

氏名 宮本 恵成

第 1 部 Legg-Calvé-Perthes 病(LCPD)を含む股関節病変が多発した家系における II 型コラーゲン遺伝子
変異の同定

<背景・目的>

Legg-Calvé-Perthes 病（以下 LCPD）は、2 歳から骨端線閉鎖前までの小児に発症し、当該股関節の疼痛と跛行を生じる。特徴的なことは、単純 X 線写真において罹患側大腿骨の近位骨端核が扁平化した像が観察されることである。経過とともに骨端核は分節化し、2～5 年の経過で修復される。本邦での発生率は、小児 10 万人に対し 0.9 人と報告されている。多くの症例は孤発例だが、複数の罹患者を含む家系も報告されており、本邦においても複数の報告がある。また別のコホート研究では罹患者の第 1 度近親における LCPD の発生率は 2.5 % であり、一般集団における発生率の 35 倍と報告されている。これまでに LCPD 孤発例を対象とした研究から、血液凝固第 V 因子や β フィブリノーゲン遺伝子における多型が発症と相関する可能性が指摘されている。しかしエビデンスとして強力な、家系内での多発例を対象とした原因遺伝子の研究は、これまでに報告されていない。

本研究の目的は、LCPD を含む股関節病変が多発した家系を対象として遺伝子解析を行い、LCPD の原因遺伝子を探索し、LCPD の病因解明および新しい治療法の開発につなげることである。

<発端者の所見>

発端者 1 13 歳女性

【主訴】両股関節痛、跛行、右股関節の可動域制限【現病歴】12 歳時に誘因なく右股関節痛が出現し

た。跛行があり、右股関節の動きが悪いことにも気づいた。また数か月後から、左股関節痛も出現した。【身体所見】身長 150 cm(-0.4 SD)、体重 45 kg (+0.3 SD)であった。股関節可動域は内外旋の軽度制限を認め、Fabere test 陽性であった。逃避性跛行もみられた。四肢大関節の変形、指趾・顔貌の異常、硝子体変性、網膜変性、聴覚障害等は認めなかった。【検査所見】MRI T1 強調像で両側大腿骨頭の前後外側に低信号域が描出され、その範囲は右側で広がった。

発端者 2 13 歳男性：発端者 1 の弟

【主訴】両股関節痛【現病歴】数カ月前から、誘因なく両股関節痛が出現した。【身体所見】身長 165.5 cm (+0.8 SD)、体重 50 kg (-0.1 SD)であった。股関節可動域では内外旋の軽度制限があり Fabere テスト陽性であった。骨系統疾患の関与を示唆する前述のような身体所見は認めなかった。【検査所見】股関節単純 X 線写真では、両側大腿骨頭の軽度扁平化が見られた。MRI T1 強調像では、両側大腿骨頭の前後外側に低信号域が描出された。

<家系解析>

発端者 2 名が同朋であることから、家系解析を行うこととした。LCPD 罹患が疑われる者は、発端者 2 名以外に 5 名あった。発端者の祖父は、両側の人工股関節全置換術を 60 歳時に受けていた。発端者の伯母は 15 歳時より股関節疾患を指摘されており、両側の人工股関節全置換術を 42 歳時に受けていた。発端者の父親は 5 歳 6 カ月時に右股関節痛を自覚した。7 歳時の X 線写真において右大腿骨頭骨端核の扁平化と分節化を指摘され、LCPD と診断された。9 歳時には左大腿骨頭骨端核にも同様の変化を指摘された。発端者の従兄は 12 歳時に右股関節痛を自覚。股関節単純 X 線写真において、右大腿骨頭の骨端核の扁平化と分節化が認められ、LCPD と診断された。発端者の従妹には股関節痛などの既往はないが、股関節単純 X 線写真において、発端者 1 と同様な大腿骨頭の低形成がみられた。LCPD に罹患した既往を持つか、関連が疑われる骨変化を示す家系構成者は、両性にわたり各世代に存在していた。この事実は常染色体優性遺伝の形質を持つ遺伝性疾患と合致すると考えられた。さらに単純 X 線写真において明らかな骨頭の変化を認めなかった 3 症例に対して、骨頭径を計測する事で骨端核形成異常の有無を確認した。これによりこれらの 3 症例はいずれも正常に比べて骨端核の低形成があると考えられた。

<遺伝子解析>

連鎖解析のために、大腿骨頭の骨端形成にかかわると考えられる候補遺伝子 (*COL2A1*, *COL9A1-A3*, *MATN3*, *COMP*, *DTDST*) に対して、各候補遺伝子に隣接するマイクロサテライトマーカー 13 カ所を選択した。*COL2A1* の隣接マーカー (D12S85, D12S368) のあるハプロタイプが表現型と完全連鎖していた。他の候補遺伝子に関してはこのような連鎖は見られず、LOD score の値も低かった。*COL2A1* 遺伝子の全翻訳領域と隣接するイントロン領域における変異を PCR-ダイレクトシーケンス法にて解析した結果では、罹患者のゲノムにおいてエクソン 50 にヘテロの変異 (c.3508G>A) を発見した。また、変異と表現型との共分離を Hpy99I による PCR-RFLP 法を用いて解析したところ、検査できた家系構成

者 10 名のうち罹患者 7 名は全員この変異を持ち、正常者 3 名は全員この変異を持っていなかった。

<考察>

我々は今回の家系において、II 型コラーゲン遺伝子の変異を発見した。この変異 (c.3508G>A, p.G1170S) はミスセンス変異であり、II 型コラーゲンの基本構造である Gly-X-Y triple-helix repeat におけるグリシンをセリンに変える。このようなアミノ酸変化は II 型コラーゲンの構造を大きく変化させ、その正常な機能を減弱させるものと推測される。本ミスセンス変異が、この家系内の股関節変化と共分離すること、また健常人 3 名には認められないことから、LCPD を含む股関節所見の原因となっているものと考えられる。COL2A1 変異が LCPD の発症に関わる機序として、コラーゲン異常により関節軟骨や軟骨下骨の脆弱性が生じ、骨頭の軟骨下における疲労骨折が起きやすくなるという仮説が考えられる。

II 型コラーゲン異常症は成長期の小児において大腿骨近位骨端に異常をきたすさまざまな骨格異形成の原因となる。これらの疾患における骨端異形成は基本的に先天性、対称性及び進行性であり、視覚および聴覚の異常を伴うことが多い。典型的には今回の家系でみられたような再生の過程は見られない。この家系における罹患者はいずれも正常身長であり、明らかな視覚・聴覚の異常を認めなかった。したがって、今回の家系で発見された COL2A1 変異は、これまでに知られている II 型コラーゲン異常症とは明らかに異なる性質の症状をもたらしている。

本家系内の罹患者は、同じ変異をもつにもかかわらず、表現型は経過と重症度においてそれぞれ異なっている。また、今回の研究で同定した COL2A1 変異は、最近 Liu らが成人発症特発性大腿骨頭壊死症(以下 ION)の台湾人 2 家系において発見した変異と同一のものであった。この家系における罹患者はいずれも成人発症 ION で、LCPD の症状を示したものはいなかった。このような同一の変異を持つ罹患者の臨床的な経過が家系内、及び家系間で異なる事に関しては、環境要因や他の遺伝的要因が影響している可能性が考えられる。

<まとめ>

LCPD の病態を含む常染色体優性遺伝の股関節病変が多発した日本人家系において、COL2A1 のミスセンス変異を同定した。LCPD の原因として COL2A1 遺伝子の異常はこれまで知られていなかった。したがって、特に家族発症例や両側発症例において、この COL2A1 遺伝子変異が一定の頻度で存在する可能性がある。LCPD 患者における大規模な COL2A1 変異の検索を行い、頻度や予後を調査することは有用と考えられる。

第 2 部 II 型コラーゲンに遺伝子変異のある oto-spondylo-megaepiphyseal dysplasia (OSMED) の

1 例について

<背景・目的>

耳・脊椎・巨大骨端異形成症(oto-spondylo-megaepiphyseal dysplasia、以下 OSMED)は顔面中央部の低形成、重篤な感音性難聴と変形性関節症の早期発症が特徴的な、比較的まれな骨系統疾患である。典

型的には巨大な骨端が小児期にあり、成人期にはより目立たなくなることが少なくない。これまで本疾患の原因として *COL11A2* における変異が報告されている。

本研究では *OSMED* 患者における *COL2A1* 変異を初めて同定したので報告する。

<発端者の所見>

患者は 22 歳の日本人女性であった。主訴は両膝関節、両股関節、両肘関節の疼痛と拘縮であった。身長 155 cm (-0.1 SD)、体重 47 kg (-0.8 SD) であった。2 歳時より両側性の感音性難聴に罹患していた。網膜剥離や硝子体・網膜変性の所見は無かった。単純 X 線写真では膝関節と股関節に早期発症の変形性関節症を認め、骨端の拡大と脊椎の扁平化を伴っていた。

<遺伝子解析>

患者の DNA を用いて *COL2A1* の全翻訳領域及び隣接するイントロンのダイレクトシーケンシングを行った。その結果、イントロン 10 のスプライスアクセプター部位における c.709 -2A>G のヘテロ変異を同定した。この変異は、表現形が正常である両親の DNA には存在しなかった。このスプライスアクセプター部位の変異が転写にもたらす効果を確認するために行った、患者のリンパ芽球様細胞を用いて *COL2A1* の RT-PCR を行った。その結果、予測される長さに加えて、エクソン 11 のみを欠損している産物とエクソン 11 と 13 を欠損している産物が得られた。*in vitro* での効果を確認するために、エクソン 9-14 のゲノム DNA をエクソントラッピングベクターへクローニングし、培養細胞内で発現させた。変異型のベクターからはエクソン 11 のみを欠失した短い mRNA が産生され、他の長さの産物は確認できなかった。

<考察>

スプライスに影響する *COL2A1* 変異は複数あり、ほとんどが *Stickler* 骨異形成症 I 型か *Kniest* 骨異形成症となる。本研究における患者では正常身長、高度な感音性難聴、骨端の拡大及び硝子体・網膜変性がないことより *OSMED* の表現型を示していると考えられる。これらの表現型は *Kniest* 骨異形成症や *Stickler* 骨異形成症としては典型的ではない。今回のエクソントラッピングの実験ではエクソン 11 のみのスキッピングが認められたが、患者のリンパ芽球様細胞ではエクソン 11 のみとエクソン 11 及び 13 のスキッピングが認められた。*in vivo* で複数エクソンのスキッピングが起こるためにはゲノム上のエクソン 9-14 以外の部分が必要か、あるいは細胞・組織特異的な何らかの要素によって制御されている可能性もある。いずれのスキッピングにおいても、異常な *COL2A1* タンパクが産生され、*OSMED* の原因となっているものと考えられる。

<まとめ>

今回の *OSMED* における *COL2A1* の新規変異の発見は、*OSMED* における遺伝的異質性の存在を確実とするものである。*OSMED* を含む II 型及び XI 型コラーゲン異常症における、遺伝子型と表現型の関連性をさらに解析する必要があると考えられる。