

## 【別紙 2】

### 審査の結果の要旨

氏名 宮本 恵成

本研究は Legg-Calvé-Perthes 病（以下 LCPD）様の症状を呈する股関節疾患と耳・脊椎・巨大骨端異形成症(oto-spondylo-megaepiphyseal dysplasia、以下 OSMED)の二つの骨関節疾患の症例について、その成因を明らかにする手がかりとしてそれぞれの症例の原因遺伝子及び遺伝子変異の探索を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 股関節痛を示す発端者の姉弟の経過と臨床・画像所見から遺伝性疾患の可能性を考え、家系解析を進めたところ、3 世代にわたる 11 名からデータを収集できた。この結果、股関節疾患に罹患している家系構成者は発端者の他に 5 名存在し、両性にわたり各世代に存在していたことから、常染色体優性遺伝の遺伝形式をとっていることが示された。
2. 罹患者の一部は典型的な LCPD の経過をたどっていたが、他の罹患者は軽度の大腿骨頭の変化のみにとどまっていた。この変化を定量的に判断するため、股関節単純 X 線写真について、大腿骨頭骨端核の高さ(EH)及び幅(EW)の計測を行った。軽症例はいずれも EW が回帰式により求められた推定値に近いのに対し、EH は明らかに小さい傾向にあった。これにより、これらの症例はいずれも正常に比べて大腿骨頭骨端核の低形成があることが示された。
3. インフォームドコンセントが得られた対象者 10 名から末梢血を採取し、ゲノム DNA を抽出して遺伝子変異の検索を実施した。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（多発性骨端異形成症の原因遺伝子である *COMP*, *MATN3*, *SLC26A2*, *COL9A1-A3*, 先天性脊椎骨端異形成症の原因遺伝子である *COL2A1*）に対して、各候補遺伝子上流および下流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、連鎖解析を行った。*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おり、*COL2A1* が原因遺伝子である可能性が高いことが示された。
4. *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。対照として 80 名のゲノムを用いて同様にシーケンスを行ったところ、この変異は存在しなかった。
5. エクソン 50 を含む PCR 産物に関して、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。これによりこの *COL2A1* 変異が疾患の原因遺伝子であると考えられた。
6. 別の症例として、両膝関節、両股関節、両肘関節の疼痛と拘縮と高度難聴を主訴とする、OSMED と診断された 22 歳女性に対して原因遺伝子の探索を試みた。患者本人及び両

親からサンプルとして血液、毛髪もしくは爪を採取し、ゲノム DNA を抽出した。PCR 及びダイレクトシーケンス法を用いて *COL2A1* の全翻訳領域及び隣接するイントロンの領域を調査した結果、患者のゲノムにおいてイントロン 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ため、突然変異であることが示された。

7. 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、患者及びコントロールのリンパ芽球様細胞とコントロールの軟骨を用いた RT-PCR を行った。正常のリンパ芽球様細胞及び軟骨を用いた RT-PCR では、予測される 354 塩基対の PCR 産物が得られた。患者のリンパ芽球様細胞を用いた RT-PCR では予測される長さに加え、300 塩基対と 246 塩基対の PCR 産物が得られた。シーケンス解析を行ったところ、300 塩基対の産物はエクソン 11 を、246 塩基対の産物はエクソン 11 と 13 を欠損していることが判明した。
8. 1 カ所のスプライスアクセプター部位の変異によって連続していない 2 つのエクソンのスキッピングが起こることはまれであり、過去の報告もわずかであった。この変異のエクソンスキッピングに対する効果を *in vitro* で確かめるために、患者のゲノムにおけるエクソン 9 - 14 の範囲をエクソントラッピングベクターへクローニングしたところ、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。

以上、本論文は LCPD 様の股関節疾患と OSMED それぞれに関して別個に遺伝子解析を行った結果、いずれも II 型コラーゲン遺伝子 (*COL2A1*) に遺伝子変異を有することを明らかにした。いずれの疾患においても *COL2A1* 変異の過去の報告はなく、未知の情報であった。本研究は今後の骨関節疾患の成因に関する研究に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値すると考えられる。