

致死性骨異形成症の類似疾患の遺伝子診断に関する研究

研究分担者 池川志郎

理化学研究所・ゲノム医科学研究センター
骨関節疾患研究チーム・チームリーダー

研究要旨

致死性骨異形成症には多くの類似疾患が存在し、正確な診断が困難で、確定診断のためには、遺伝子レベルでの診断システムを確立する必要がある。遺伝子診断システムの構築のために、致死性骨異形成症、及びその類似疾患の DNA 解析を行なった。臨床家の協力の下に、致死性骨異形成症、及びその類似疾患の表現型の詳細なデータ（臨床像、X 線像）と DNA を収集した。FGFR3 を含む既知の疾患遺伝子に変異が疑われる場合は、それらの変異解析を行ない、変異が同定された患者については、表現型データとの対応を検討した。未知の疾患遺伝子が疑われる場合には homozygosity mapping などのゲノム解析を行った。その結果、致死性骨異形成症類似疾患のひとつ、Desbuquois 骨異形成症の II 型とその亜系である Kim 型で、原因遺伝子 CANT1 を発見した。日本人には founder mutation があり、保因者頻度は 700 人に 1 人であることがわかった。致死性骨異形成症類似疾患の中には、保因者頻度がかなり高く、一般的な予想よりも発生頻度が高い疾患があり、胎児・新生児時の表現型データからは、鑑別診断は難しく、致死性骨異形成症の正確な診断のためには、類似疾患を含めた遺伝子診断法を確立する必要がある。

A. 研究目的

致死性骨異形成症は、多くの類似疾患が存在するため、正確な診断が困難である。確定診断のためには、遺伝子レベルでの診断システムを構築する必要がある。致死性骨異形成症の遺伝子診断法の確立のために、致死性骨異形成症、及びその類似疾患の DNA 解析を行う。

（臨床像、X 線像）と genomic DNA を収集した。FGFR3 を含む既知の疾患遺伝子に変異が疑われる場合は、DNA sequence 解析をはじめとする遺伝子解析を行ない、変異の同定を試みた。変異が同定された患者については、表現型のデータとの対応を検討した。未知の疾患遺伝子が疑われる場合には、homozygosity mapping などのゲノム解析により、疾患遺伝子の同定を試みた。

B. 研究方法

胎児骨系統疾患フォーラムを中心とする、臨床家の協力の下に、致死性骨異形成症、及びその類似疾患の表現型の詳細なデータ

（倫理面への配慮）

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平

成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に従っている。検体の収集を含めた研究計画については、理化学研究所、及び各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

C. 研究結果

致死性骨異形成症の類似疾患のひとつである、Desbuquois 骨異形成症の II 型とその亜系である Kim 型で、CANT1 (calcium activated nucleotidase 1) 遺伝子が、原因遺伝子であることを発見した (Furuichi et al. J Med Genet 2011)。日本には、古墳時代後期に韓国由来で伝達したと考えられる founder mutation があることがわかった (Dai et al. J Hum Genet, in press)。その保因者頻度は約 750 人に 1 人程度であった (Furuichi et al. J Med Genet 2011)。

D. 考察

致死性骨異形成症の類似疾患の中には、保因者頻度がかかなり高く、一般的な予想よりも、発生頻度が高い疾患がある事がわかった。胎児期、新生児時期の表現型の臨床像、X 線像のデータからは、それがいかに詳細なものであっても、致死性骨異形成症の診断、鑑別診断には多くの困難が伴い、類似疾患を正確に鑑別する事は困難であると考えられる。

E. 結論

致死性骨異形成症の正確な診断のためには、遺伝子レベルでの診断法を確立する必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Furuichi T, Dai J, Cho TJ, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Baynam G, Nagai T, Miyake N, Matsumoto N, Ohashi H, Unger S, Superti-Furga A, Kim OH, Nishimura G, Ikegawa S. CANT1 mutation is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant. J Med Genet. 48(1):32-7. 2011.

2. 学会発表

(招待講演のみ)

Ikegawa S. Genetic study of lumbar disc diseases. The 3rd Jishuitan Orthopedics Forum. Beijing. Apr. 24, 2010.

池川志郎. 遺伝学を用いた骨・関節疾患へのアプローチ. 第 5 回 Skeletal Research Meeting. 京都. 2010 年 6 月 12 日.

池川志郎. ゲノムから疾患へ—ヒト遺伝学 (Human Genetics) を出発点とする疾患遺伝子と分子病態の解明. 京都大学再生医科学研究所 第 1 回生命医科学セミナー. 京都. 2010 年 9 月 7 日.

池川志郎. ヒト遺伝学を出発点とする運動器疾患研究. 第 11 回運動器科学研究会. 軽井沢. 2010 年 9 月 10 日.

Ikegawa S. Genomic study of bone and joint diseases using human and mouse genetics. 10th Annual meeting of the EAUHG (East Asian Union of Human Genetics Societies). Jinan. Oct. 8, 2010.

池川志郎. ゲノムから骨へ: ゲノム医学による内軟骨性骨形成異常症の解明. 科学研究補助金 基盤 S 「内軟骨性骨形成過程における転写制御ネットワークシステムの統合的理解」公開シンポジウム: 「内軟骨形成の制御機構とその破綻」. 吹田. 2011 年 1 月 21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

胎児超音波計測による長管骨長の基準値作成

（多施設共同観察研究）

研究分担者	室月 淳	宮城県立こども病院
	澤井英明	兵庫医科大学
	山田崇弘	北海道大学
	堤 誠司	山形大学
	佐藤秀平	青森県立中央病院
	篠塚憲男	胎児医学研究所
	高橋雄一郎	長良医療センター
	早川博生	春日井市民病院
	夫 律子	クリフム夫律子マタニティクリニック

研究要旨 超音波断層法による胎児の長管骨（すなわち大腿骨 femur、脛骨 tibia、腓骨 fibula、上腕骨 humerus、尺骨 ulna、橈骨 radius）の長さについての日本人の基準値をつくり、胎児骨系統疾患などの骨病変の診断に有用な基礎資料を作成する多施設共同研究である。なお大腿骨長については日本超音波医学会によりすでに基準値がつくられているが、それ以外の胎児の脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨、橈骨の長さの基準値は、過去に海外では発表されており、本邦ではそれらが参考にされている。しかし長管骨の発達には人種差があり、日本人で決められた大腿骨長と欧米のそれを比べると、妊娠末期となると 10mm 近い差が認められている。

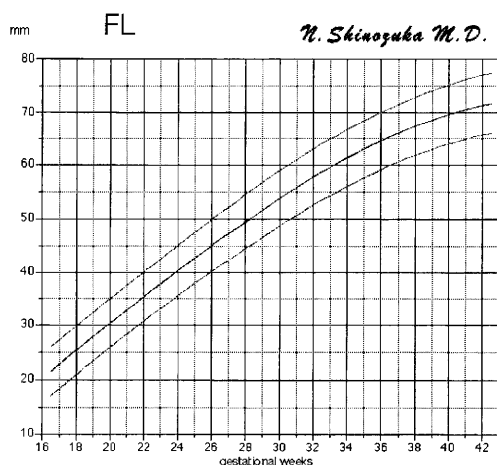
胎児骨系統疾患は骨の全身の発達成熟に何らかの異常を呈する遺伝子病である。胎児骨系統疾患は、ほとんどが子宮内か出生直後に死亡する生命予後がきわめて悪いものから、成長後の低身長が唯一の症状である予後良好のものまで非常に多彩である。胎児期に骨短縮を認める疾患は 100 種類以上あるといわれているが、ひとつひとつの疾患の発症頻度が低いため、胎児期に長管骨の短縮を認める場合、その診断に難渋することが多い。日本人胎児の長管骨の基準値を作成することにより、骨系統疾患の正確な診断の一助とする。

A. 研究目的

胎児の長管骨、すなわち大腿骨 femur、脛骨 tibia、腓骨 fibula、上腕骨 humerus、尺骨 ulna、橈骨 radius の長さについての日本人の基準値をつくり、胎児骨系統疾患などの骨病変の診断の基礎資料を作成する。

大腿骨長（以下の図 FL）については日本超音波医学会によりすでに基準値がつくられている。

それ以外の胎児の脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨、橈骨の長さの基準値は、過去に Queenan (1980)、Farrant (1981)、Jeanty



(1984)、Merz (1987)などが発表しており、本邦では今でも Jeanty や Merz の値が用いられている。しかし長管骨の発達には人種差があるのは自然であり、日本人で決められた大腿骨長と欧米のそれを比べると、妊娠末期となると 10mm 近い差が認められている。実際に Jenaty や Merz の基準値は、临床上の印象よりかけ離れた評価が出てくるのがしばしばである。

胎児骨系統疾患は骨の全身の発達成熟に何らかの異常を呈する遺伝子病である。胎児骨系統疾患は、ほとんどが子宮内か出生直後に死亡する生命予後がきわめて悪いものから、成長後の低身長が唯一の症状である予後良好のものまで非常に多彩である。胎児期に骨短縮を認める疾患は 100 種類以上あるといわれているが、ひとつひとつの疾患の発症頻度が低いため、胎児期に長管骨の短縮を認める場合、その診断に難渋することが多い。日本人胎児の長管骨の基準値を作成することにより、骨系統疾患の正確な診断の一助とする。

B. 研究方法

試験タイプ：多施設共同観察試験

【対象】

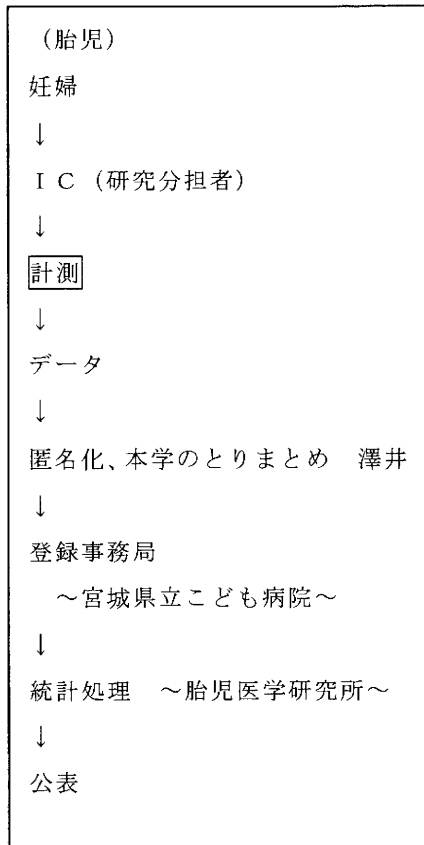
1. 妊娠16週0日より妊娠40週6日まで
2. 16歳以上45歳未満
3. 単胎である
4. 妊娠初期にCRL計測により分娩予定日

が決められている

5. 明らかな胎児奇形や発育遅延を認めない
6. 妊娠高血圧症や妊娠糖尿病などの母体合併症を認めない
7. 試験参加について本人から文書で同意が得られている

【方法】

1. 妊婦健康診査時に胎児の長管骨（大腿骨、脛骨、腓骨、上腕骨、尺骨、橈骨）の長さを計測して記録する。
2. 胎児期の長管骨はしばしば骨幹の部分しか骨化していない。その骨化部分を両端まで画面上に描出し、いちばん長いところを計測する。
3. 下腿の脛骨、腓骨、前腕の尺骨、橈骨は、それぞれ混同されて計測されることがあるので注意する。区別するために、最初に同一画面上に両方の骨と一緒に描出する。
4. 下腿では脛骨は腓骨より常に長い。腓骨は脛骨より外側に位置し、脛骨より若干薄く描出される。脛骨がより近位側に位置し、遠位側では脛骨、腓骨ともほぼ同じレベルにある。
5. 前腕では尺骨は橈骨より長い。尺骨はより近位側に位置し、より遠位側にあるのが橈骨である。
6. 長管骨の計測は画像に描出しやすい方で左右どちらでも構わない。胎児がうつ伏せか仰向けでない限り両側の長管骨をすべて描出することは難しいし、また時間的にも無駄である。
7. 胎児の計測データは、出生後に出生児の体重、身長、頭囲、腹囲のデータをあわせて事務局の宮城県立こども病院（室月 淳）に報告する。



研究者などの登録など：事務局 宮城県立こども病院（室月 淳）。

C. 研究結果
研究実施中

D. 考察
研究実施中

E. 結論
研究実施中

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
なし

8. 統計処理などは共同研究者である胎児医学研究所・篠塚憲男に委託する。

【予定登録数と研究期間】

予定登録数：一施設100計測で合計1,000計測を目標とする。

予定研究期間：平成22年年6月（倫理委員会承認後）より平成23年3月31日。

宮城県立こども病院を中心に15施設ほどこで実施中（予定を含む）である。現時点では臨床研究としての倫理審査を申請中からすでに実施中の施設もあるが完了は来年度になる予定。

【問い合わせ先】

適格基準など臨床的判断を要するもの：事務局（宮城県立こども病院 室月 淳）
記録用紙（CRF）記入など：胎児医学研究所（篠塚憲男）。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

症例の収集と診断の支援システム構築

研究分担者	室月 淳	宮城県立こども病院
	澤井英明	兵庫医科大学（研究代表者）
	山田崇弘	北海道大学
	堤 誠司	山形大学
	佐藤秀平	青森県立中央病院
	篠塚憲男	胎児医学研究所
	高橋雄一郎	長良医療センター
	早川博生	春日井市民病院
	夫 律子	クリフム夫律子マタニティクリニック
	岡本伸彦	大阪府立母子保健総合医療センター
	鬼頭浩史	名古屋大学
	長谷川奉延	慶応義塾大学
	河井昌彦	京都大学
	沼部博直	京都大学
	岡崎 伸	大阪市立総合医療センター
	宮崎 治	国立成育医療研究センター
	緒方 勤	国立成育医療研究センター
	池川志郎	理化学研究所ゲノム医科学研究センター
研究協力者	西村 玄	東京都立小児総合医療センター

研究要旨 本研究は出生前に超音波検査で指摘された骨系統疾患疑いの胎児に対してどのように診断をアプローチし、その後の妊娠管理をどのように行い、分娩方式はどのようにして決定し、新生児管理に結びつけるかについて広範な専門集団が支援するシステムを構築するものである。具体的には1) インターネット利用による胎児の骨系統疾患を診断支援するための症例検討システムの構築、2) セキュリティの充実したウェブ閲覧型システムを構築して臨床医の診断の支援、3) 過去の症例検討のとりまとめ、4) 地域ごとの診断支援システムの構築、5) 臨床医への情報提供、6) 一般の妊婦や罹患者を持つ家族への情報提供といったシステム化されたフローを構築することである。

A. 研究目的

本研究は出生前に超音波検査で指摘された骨系統疾患疑いの胎児に対してどのように診断をアプローチし、その後の妊娠管理

をどのように行い、分娩方式はどのようにして決定し、新生児管理に結びつけるかについて広範な専門集団が支援するシステムを構築するものである。

B. 研究方法

1) インターネット利用による胎児の骨系統疾患を診断支援するための症例検討システムの構築は、システムを兵庫医科大学の協力により同大学にサーバーを設置して、運営する。また専門システム開発業者とともにシステムの設計を行う。

2) 上記システムを用いて、実際に臨床医から問合せのあった症例の検討を行う。

3) 過去の症例検討のとりまとめは、上記のウェブ上のシステム構築までの段階で全国の症例を検討した2,000通以上のメールの内容の解析と症例(108症例以上)の分析を行う。

4) 地域ごとに胎児骨系統疾患に詳しい産科の専門家を配置し、地域の医療機関からの相談に乗る体制を構築する。

5) 胎児骨系統疾患フォーラムと共同で臨床医への情報提供を目的に、講演会を開催し、またホームページでの情報提供を行う。

6) 一般の妊婦や罹患児を持つ家族への情報提供をホームページを作成して行う。

C. 研究結果

1) システムの構築をすでに完了して、試行中である。今年度中にはウェブ上に匿名化して症例の経過と画像をアップして、専門家グループで討議して診断を支援するシステムが運用開始できる予定である。

2) 来年度から運用開始予定である。

3) 過去の症例をとりまとめて日本周産期学会にて発表した。

4) 研究班の研究分担者の属する施設を中心に、北海道、東北、東京、神奈川、東海、近畿、中国、四国においてほぼ中心的なセンター施設を選定した。九州地区を選定中であり、全国を網羅できる体制を今年度中に構築する予定である。

5) 12月12日(日)に本研究班会議と胎児骨系統疾患フォーラムが共催して、一般臨床医を含めた医師を対象に第3回胎児骨系統疾患フォーラムを開催し、致死性骨異形成症を含めた胎児骨系統疾患の新生児管理について集中的な情報提供と討議を行った。

また、本研究班で致死性骨異形成症のホームページ www.thanatophoric.com を作成し骨系統疾患の情報を提供し、診断や治療に取り組む産科医や小児科医などからの問い合わせを受け付ける体制を作った。すでに地域の病院(産科)から1件の問い合わせがあり、上記の地域診断支援システム(予定)に紹介して対応した。

6) 前記の第3回胎児骨系統疾患フォーラムにおいて一般市民を対象に公開講演会を開催した。

D. 考察

本研究においては今年度で個別に体制はほぼ完成した。次年度からの運用においてははかにかこれらを有機的に結びつけて実施するかが鍵と考えられる。

E. 結論

出生前に超音波検査で指摘された骨系統疾患疑いの胎児に対してどのように診断をアプローチし、その後の妊娠管理をどのように行い、分娩方式はどのようにして決定し、新生児管理に結びつけるかについて広範な専門集団が支援するシステムを構築した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。) なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
研究分担報告書

胎児CTの実施のための撮影基準の作成

研究分担者	宮崎 治	国立成育医療研究センター
	澤井英明	兵庫医科大学（研究代表者）
	室月 淳	宮城県立こども病院
研究協力者	西村 玄	東京都立小児総合医療センター
	永松洋志	国立成育医療研究センター
	嶋田彩乃	国立成育医療研究センター
	堀内哲也	国立成育医療研究センター
	島貫義久	宮城県立こども病院
	佐々木清昭	宮城県立こども病院
	谷 千尋	広島大学
	木口雅夫	広島大学

研究要旨 胎児骨格 CT はここ数年行われるようになった新しい診断方法であるが、昨今 CT の X 線被ばくに対する問題意識が高まっている。そこで胎児 CT 検査に関する調査を施行することとした。胎児骨格 CT について、その施行頻度、適応、撮影方法、胎児被ばく線量などを調査し、本邦での胎児 CT の動向を知る必要がある。またその結果から胎児 CT 撮影方法の標準化が設定できることを目指している。この調査は無作為に医療施設に送るのではなく、本研究班の研究者や、胎児骨系統疾患ネットワーク、過去に国内の学会の抄録等を頼りに抽出した施設（参考資料：調査協力施設一覧）に依頼することで効率的にデータを収集し、解析する。

A. 研究目的

胎児CTの実施は得られる情報が多い反面、被曝の問題が避けられない。今後胎児CTが適正に実施されるために、現状の調査を行い、分析する。

B. 研究方法

胎児 CT サブグループの長期的目的は2つあり、まず胎児 CT 撮影の後方視調査（平成 22 年）を行い、胎児 CT 撮影ガイドライン作成（平成 23 年）を行い、Diagnostic

Reference Level (DRL) 設定（平成 23 年）を行う。短期計画としては本年度に後方視サーベイ調査票を作成し、全国調査を実施する、回収、集計、解析を今年度中に行うこととした。

調査の対象医療機関は胎児骨系統疾患フォーラムと学会発表等から抽出した施設のうち調査協力に承諾が得られた 18 施設に対してアンケートを送付した。

調査内容は 3 つのカテゴリーに分け、1) 産科的総論：適応、倫理、informed consent

関連（澤井、室月）、2）CT撮影・3Dプロトコル技術（永松、嶋田、佐々木、木口）被ばく線量関連（堀内）、3）放射線診断結果、診断的価値（宮崎、島貫、谷）と分担した。

C. 研究結果

研究実施中

D. 考察

研究実施中

E. 結論

研究実施中

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T*	Heterozygous <i>Orx2</i> mutations are associated with variable pituitary phenotype	<i>J Clin Endocrin of Metab</i>	95 (2)	756-764	2010
Dateki S, Fukami M, Uematsu A, K'iii M, Iso M, One M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Ogata T*	Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 7 1 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with <i>LHX4</i> deletion	<i>J Clin Endocrin Metab</i>	95 (8)	4043-4047	2010
Kagami M, O'sullivan M J, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T	The IG-DMR and the <i>MEG3</i> -DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers.	<i>T PLoS Genet</i>	6 (6)	100992	2010
Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T	Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Sliver-Russell Syndrome-like Phenotype.	<i>J Med Genet</i> 47	47(11)	782-785	2010
Kato H, Yoshida R, Tsukamoto K, Suga H, Eto H, Higashino T, Araki J, Ogata T, Yoshimura K	Familial cases of atypical clinical features genetically diagnosed as LEOPARD syndrome (multiple lentiginos syndrome)	<i>Int J Dermatol</i>	152A (12)	3189-3192	2010

Suzumori N*, Ogata T, Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Sugiura-Ogasawara M.	Prenatal diagnosis of paternal uniparental disomy 14: delineation of further patient	<i>Am J Med Genet A</i>	152A	3189-3192	2010
Inoue H*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K.	Identification and functional analysis of novel human growth hormone-releasing hormone receptor (<i>GHRHR</i>) gene mutations in Japanese subjects with short stature	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	NOV 17.	1365-2265	2010
Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Matsubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T	Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes	<i>J Hun Genet</i>	56 (1)	91-93	2011
Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Morichi H, Ogata T	Identification of chromosome 15q terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis	<i>Endocr J</i> (accepted)			
Miyazaki O*, Nishimura G, Kagami M, Ogata T	Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14.	<i>Ped Radiol</i> (accepted).			
Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC	Uniparental disomy and human disease: an overview.	<i>Am J Med Genet C (Seminars in Medical Genetics)</i>	154C (3)	329-334	2010
Furuichi T, Dai J, Cho TJ, Sakazume S, Ikema M, Matsui Y, Baynam G, Nagai T, Miyake N, Matsumoto N, Ohashi H, Unger S, Superti-Furga A, Kim OH, Nishimura G, Ikegawa S.	CANT1 mutation is also responsible for Desbuquois dysplasia, type 2 and Kim variant.	<i>J Med Genet.</i>	48(1)	32-37	2011

Wada R, Sawai H, Nishimura G, Isono K, Minagawa K, Takenobu T, Harada K, Tanaka H, Ishikura R, Komori S.	Prenatal diagnosis of Kniest dysplasia with three-dimensional helical computed tomography.	J Matern Fetal Neonatal Med.	Jan 20.	Epub ahead of print	2011
Watanabe A, Karasugi T, Sawai H, Naing BT, Ikegawa S, Orimo H, Shimada T.	Prevalence of c.1559delT in ALPL, a common mutation resulting in the perinatal (lethal) form of hypophosphatasia in Japanese and effects of the mutation on heterozygous carriers.	J Hum Genet.	56(2):	166-8.	2011
Yamada T, Nishimura G, Nishida K, Sawai H, Omatsu T, Kimura T, Nishihara H, Shono R, Shimada S, Morikawa M, Mizushima M, Yamada T, Cho K, Tanaka S, Shirato H, Minakami H.	Prenatal diagnosis of short-rib polydactyly syndrome type 3 (Verma-Naumoff type) by three-dimensional helical computed tomography.	J Obstet Gynaecol Res.	37(2)	151-5.	2011
Sago H, Hayashi S, Saito M, Hasegawa H, Kawamoto H, Kato N, Nanba Y, Ito Y, Takahashi Y, Murotsuki J, Nakata M, Ishii K, Murakoshi Y	The outcome and prognostic factors of twin-twin transfusion syndrome following fetoscopic laser surgery.	Prenat Diagn.	30	1185-91	2010
Kitoh H, Kaneko H, Kondo M, Yamamoto T, Ishiguro N, Nishimura G	Spondylometaphyseal dysplasia with cone-rod dystrophy.	Am J Med Genet A.	Mar 15.	Epub ahead of print	2011
Nakashima Y, Haga N, Kitoh H, Kamizono J, Tozawa K, Katagiri T, Susami T, Fukushi J, Iwamoto Y.	Deformity of the great toe in fibrodysplasia ossificans progressiva.	J Orthop Sci.	15(6)	804-9	2010

<p>Nishimura G, Dai J, Lausch E, Unger S, Megarbané A, Kitoh H, Kim OH, Cho TJ, Bedeschi F, Benedicenti F, Mendoza-Londono R, Silengo M, Schmidt-Rimpler M, Spranger J, Zabel B, Ikegawa S, Superti-Furga A.</p>	<p>Spondylo-epiphyseal dysplasia, Maroteaux type (pseudo-Morquio syndrome type 2), and parastremmatic dysplasia are caused by TRPV4 mutations.</p>	<p>Am J Med Genet A.</p>	<p>152A(6) :</p>	<p>1443-9.</p>	<p>2010</p>

IV. 研究成果の刊行物・別冊

SHORT COMMUNICATION

Prevalence of c.1559delT in *ALPL*, a common mutation resulting in the perinatal (lethal) form of hypophosphatasia in Japanese and effects of the mutation on heterozygous carriers

Atsushi Watanabe^{1,2}, Tatsuki Karasugi³, Hideaki Sawai⁴, Banyar Than Naing², Shiro Ikegawa³, Hideo Orimo² and Takashi Shimada^{1,2}

Hypophosphatasia (HPP) is an inherited disorder caused by mutations in *ALPL* that encodes an isozyme of alkaline phosphatase (ALP), TNSALP. One of the most frequent *ALPL* mutations is c.1559delT, which causes the most severe HPP, the perinatal (lethal) form (pl-HPP). c.1559delT has been found only in Japanese and its prevalence is suspected to be high; however, the allele frequency of c.1559delT in Japanese remains unknown. We designed a screening system for the mutation based on high-resolution melting curve analysis, and examined the frequency of c.1559delT. We found that the c.1559delT carrier frequency is 1/480 (95% confidence interval, 1/1562–1/284). This indicates that ~1 in 900 000 individuals to have pl-HPP caused by a homozygous c.1559delT mutation. In our analysis, the majority of c.1559delT carriers had normal values of HPP biochemical markers, such as serum ALP and urine phosphoethanolamine. Our results indicate that the only way to reliably detect whether individuals are pl-HPP carriers is to perform the *ALPL* mutation analysis.

Journal of Human Genetics (2011) 56, 166–168; doi:10.1038/jhg.2010.161; published online 23 December 2010

Keywords: *ALPL*; c.1559delT; perinatal form of hypophosphatasia; serum alkaline phosphatase; skeletal dysplasia; urine phosphoethanolamine

INTRODUCTION

Hypophosphatasia (HPP) is an inherited disorder characterized by defective mineralization of the bone and low activity of alkaline phosphatase (ALP; EC 3.1.3.1).^{1,2} HPP is a clinically heterogeneous disease and classified into five forms according to severity and age of onset: perinatal (lethal), infantile (OMIM 241500), childhood (OMIM 241510), adult (OMIM 146300) and odontohypophosphatasia.¹ All forms of HPP display reduced activity of unfractionated serum ALP and the presence of either one or two pathologic mutations in *ALPL*, the gene encoding an ALP isozyme (TNSALP).

The perinatal (lethal) form of HPP (pl-HPP) is the most severe HPP with an autosomal recessive mode of inheritance. pl-HPP is more common in Japan than in other countries.³ Parents of pl-HPP are heterozygous carriers of *ALPL* mutations. They show no clinical symptoms, but have reduced serum ALP activity and increased urinary phosphoethanolamine (PEA).^{4–8}

ALPL is the only gene known to be associated with HPP.¹ More than 200 *ALPL* mutations have been described, accounting for most phenotype variabilities.⁹ HPP is frequently caused by p.E191K and

p.D378V in Caucasians,¹ whereas p.F327L¹⁰ and c.1559delT^{10,11} are more common in Japanese.¹ To date, c.1559delT has only been found in Japanese.¹¹ Some patients with pl-HPP are homozygous for c.1559delT, with parents who are heterozygous carriers for the mutation but with no evidence of consanguinity.^{12,13}

To identify c.1559delT genotype and to examine its frequency in Japanese, we designed a screening system based on a high-resolution melting curve analysis.¹⁴ In addition, we examined serum ALP activity and urine PEA in heterozygous c.1559delT carriers to determine whether these markers can identify the HPP carriers.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the Institutional Genetic Research Ethics Committee at Nippon Medical School and RIKEN, Center for Genomic Medicine. Blood samples were collected under written informed consents from 3844 healthy Japanese without HPP and its related findings confirmed by orthopedic surgeons. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using standard protocols. The c.1559delT genotype screening was performed by the small amplicon genotyping method based on high-resolution melting curve

¹Division of Clinical Genetics, Nippon Medical School Hospital, Tokyo, Japan; ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan; ³Laboratory for Bone and Joint Diseases, Center for Genomic Medicine, RIKEN, Tokyo, Japan and ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan

Correspondence: Dr A Watanabe, Division of Clinical Genetics, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5 Sendagi Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan.

E-mail: aw3703@nms.ac.jp

Received 17 October 2010; revised 23 November 2010; accepted 24 November 2010; published online 23 December 2010

analysis.¹⁴ PCR primers for c.1559delT were designed to flank the mutation leaving only single base, including the mutation between the primers: 5'-TT TAAATCTCGCGCTGGCCCTCTACCC-3' (forward) and 5'-TTTAAATTCC CTCAGAACAGGACGCTC-3' (reverse). PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 45 cycles at 94°C for 30 s and annealing at 67°C for 30 s. After PCR, high-resolution melting was performed in a 96-well plate LightScanner (Idaho Technology, Salt Lake City, UT, USA), which collected data from 55°C to 97°C at a ramp rate of 0.10°Csec⁻¹. The observed number of c.1559delT carriers was divided by the total number of individuals tested to determine the carrier frequency. Serum ALP activity and urine PEA were measured in c.1559delT-heterozygous parents of pl-HPP patients.

RESULTS

Three *ALPL* c.1559delT genotypes (wt/wt, wt/c.1559delT and c.1559delT/c.1559delT) were distinguished by the modified small amplicon genotyping method (Figure 1). A heterogeneous c.1559delT mutation (wt/c.1559delT) was detected in 8 of 3844 healthy Japanese subjects, indicating a carrier frequency of 1/480 in the Japanese population (95% confidence interval, 1/1562–1/284).

The numerical value of ALP activity and urinary PEA varied in heterozygous c.1559delT carriers in parents of perinatal HPP patients. The majority of heterozygous c.1559delT carriers had normal levels of both ALP activity (five out of six males and three out of four females) and urinary PEA (three out of six males and four out of five females) (Figure 2).

DISCUSSION

Based on our results, we estimated the frequency of c.1559delT-homozygous individuals (for example, those with pl-HPP) to be 1/900 000. Previous studies showed that all Japanese pl-HPP patients carried the c.1559delT mutation in at least one allele; half (10/20) were homozygous for c.1559delT and half (10/20) were compound heterozygous for c.1559delT,^{9–13,15} which gives a pl-HPP prevalence of 1/450 000 for patients that are homozygous or compound heterozygous for c.1559delT mutation. The other common mutation on *ALPL* in Japan, p.F327L, is a mild allele whose product retained ~70% of its enzymatic activity. Patients compound heterozygous for c.1559delT and p.F327L are not associated with pl-HPP.¹⁰

Biochemical markers, serum ALP activity and urinary PEA levels fell within their normal ranges in the majority of the c.1559delT carriers examined in this paper, whereas heterozygous carriers of the severe forms in other *ALPL* mutations were reported to have reduced serum ALP activity and increased urinary PEA.^{4–8} Some possible reasons why c.1559delT carriers display normal marker levels are as follows: the first is the protein properties caused by the different mutation positions. The c.1559delT mutation causes a frameshift downstream of codon L503, resulting in the elimination of the termination codon at 508 and the addition of 80 amino acids at the C-terminus. The mutant protein forms an aggregate that is polyubiquitinated and then degraded in the proteasome. However, the aggregates possess enzyme activity, and may, therefore, influence physiological processes before their destruction.¹⁶ Second, serum ALP activity is affected by some other factors. The genetic modifier of ALP is reported to have a potential influence on serum ALP activity.¹⁷ Total ALP value is also elevated by some environmental factors, in vitamin D deficiency² or in the third trimester of gestation by the increasing placental ALP, which is not affected by TNSALP.¹⁸ Recently, it was shown that patients who are homozygous for the c.1559delT mutation differed in the severity of HPP, including both their symptoms and serum ALP activity.¹⁵

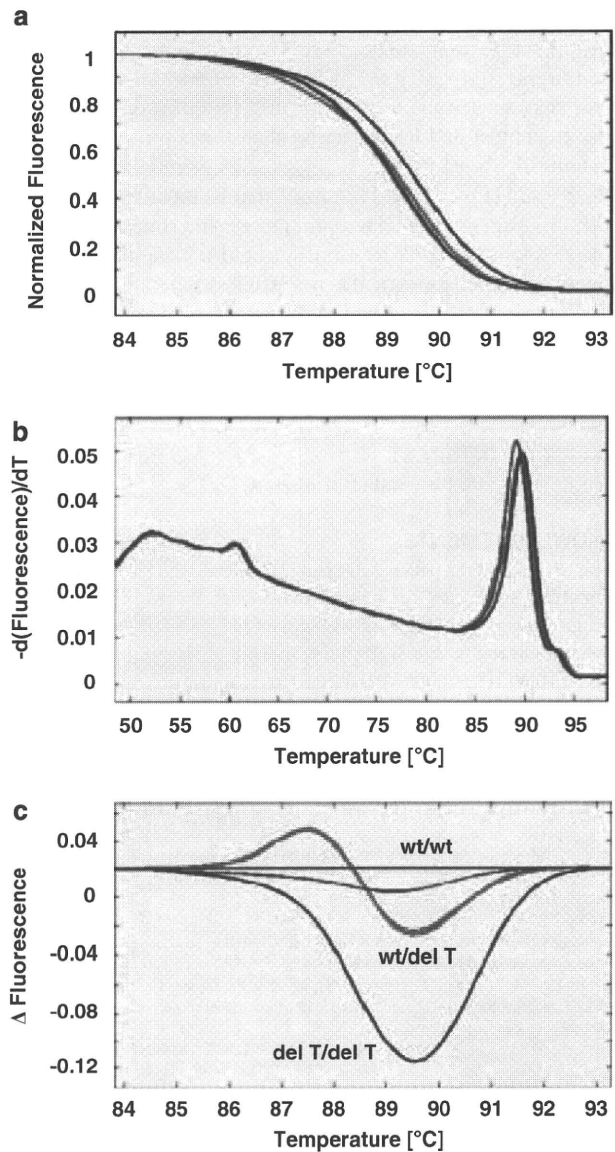


Figure 1 Identification of c.1559delT mutation in *ALPL* by small amplicon genotyping (SAG) method. (a) Normalized fluorescence plots. (b) $-d(\text{fluorescence})/dT$ plot. (c) The corresponding fluorescence difference plots. Wild-type (wt/wt) samples are in gray; samples heterozygous for c.1559delT (wt/c.1559delT) are in red; and samples homozygous for c.1559delT (c.1559delT/c.1559delT) are in blue. The three genotypes were clearly distinguishable in the SAG method.

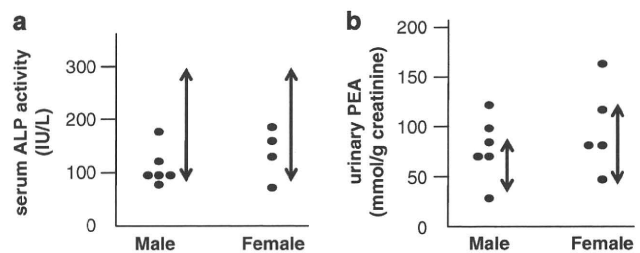


Figure 2 Biochemical marker levels in heterozygous carriers of the *ALPL* c.1559delT mutation. The serum ALP activity (a) and urinary PEA (b) levels in the majority of heterozygous carriers (wt/c.1559delT) fell within normal ranges (indicated by arrows).

Thus, the only way to reliably detect the pl-HPP carriers is to perform the *ALPL* mutation analysis. The small amplicon genotyping method in this study using the high-resolution melting curve analysis is a one-step, single-tube method for detection of specific mutations and faster, simpler and less expensive than the approaches requiring separations or labeled probes.¹⁹

The screening for c.1559delT in *ALPL* may be useful for diagnosis of pl-HPP in Japanese to provide optimum genetic counseling for fetal skeletal dysplasia. pl-HPP occasionally could not be diagnosed with sonographic examination in the first trimester because incomplete ossification is an usual finding at this stage of development.²⁰ To diagnose pl-HPP, collaborations between obstetricians and clinical geneticists are important and could provide support for parents of prenatal patients suspected of having skeletal dysplasia.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank all the patients and family members who participated in this study, and all the clinicians for referring the families. We thank Hitomi Kondo for technical assistance. This work was supported by a Grant-in-Aid for Research on intractable disease from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (Project no. 095/2010).

- 1 Mornet, E. Hypophosphatasia. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **22**, 113–127 (2008).
- 2 Whyte, M. P. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr. Rev.* **15**, 439–461 (1994).
- 3 Satoh, N., Murotsuki, A. & Sawai, H. The birth prevalence rates for skeletal dysplasia in the registration system of the Japan Forum of Fetal Skeletal Dysplasia. *J. Jan. Perinat. Neonat. Med.* **45**, 1005–1007 (2009) (Japanese).
- 4 Gehring, B., Mornet, E., Plath, H., Hansmann, M., Bartmann, P. & Brenner, R. E. Perinatal hypophosphatasia: diagnosis and detection of heterozygote carriers within the family. *Clin. Genet.* **56**, 313–317 (1999).
- 5 Spentchian, M., Merrien, Y., Herasse, M., Dobbie, Z., Gläser, D., Holder, S. E. *et al.* Severe hypophosphatasia: characterization of fifteen novel mutations in the *ALPL* gene. *Hum. Mutat.* **22**, 105–106 (2003).
- 6 Zankl, A., Mornet, E. & Wong, S. Specific ultrasonographic features of perinatal lethal hypophosphatasia. *Am. J. Med. Genet.* **146A**, 1200–1204 (2008).
- 7 Sergi, C., Mornet, E., Troeger, J. & Voigtlaender, T. Perinatal hypophosphatasia: radiology, pathology and molecular biology studies in a family harboring a splicing mutation (648+1A) and a novel missense mutation (N400S) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (*TNSALP*) gene. *Am. J. Med. Genet.* **103**, 235–240 (2001).
- 8 Mornet, E., Taillandier, A., Peyramaure, S., Kaper, F., Muller, F., Brenner, R. *et al.* Identification of fifteen novel mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase (*TNSALP*) gene in European patients with severe hypophosphatasia. *Eur. J. Hum. Genet.* **6**, 308–314 (1998).
- 9 The Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase Gene Mutations Database. http://www.sesep.uvsq.fr/O3_hypo_mutations.php.
- 10 Michigami, T., Uchihashi, T., Suzuki, A., Tachikawa, K., Nakajima, S. & Ozono, K. Common mutations F310L and T1559del in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene are related to distinct phenotypes in Japanese patients with hypophosphatasia. *Eur. J. Pediatr.* **164**, 277–282 (2005).
- 11 Orimo, H., Goseki-Sone, M., Inoue, M., Tsubakio, Y., Sakiyama, T. & Shimada, T. Importance of deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in Japanese patients with hypophosphatasia. *J. Bone Miner. Metab.* **20**, 28–33 (2002).
- 12 Watanabe, A., Yamamasu, S., Shinagawa, T., Suzuki, Y., Takeshita, T., Orimo, H. *et al.* Prenatal genetic diagnosis of severe perinatal (lethal) hypophosphatasia. *J. Nippon Med. Sch.* **74**, 65–69 (2007).
- 13 Sawai, H., Kanazawa, N., Tsukahara, Y., Koike, K., Udagawa, H., Koyama, K. *et al.* Severe perinatal hypophosphatasia due to homozygous deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue nonspecific alkaline phosphatase gene. *Prenat. Diagn.* **23**, 743–746 (2003).
- 14 Gundry, C. N., Dobrowolski, S. F., Martin, Y. R., Robbins, T. C., Nay, L. M., Boyd, N. *et al.* Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3401–3408 (2008).
- 15 Nakamura-Utsunomiya, A., Okada, S., Hara, K., Miyagawa, S., Takeda, K., Fukuhara, R. *et al.* Clinical characteristics of perinatal lethal hypophosphatasia: a report of 6 cases. *Clin. Pediatr. Endocrinol.* **19**, 7–13 (2010).
- 16 Komaru, K., Ishida, Y., Amaya, Y., Goseki-Sone, M., Orimo, H. & Oda, K. Novel aggregate formation of a frame-shift mutant protein of tissue-nonspecific alkaline phosphatase is ascribed to three cysteine residues in the C-terminal extension. Retarded secretion and proteasomal degradation. *FEBS J.* **272**, 1704–1717 (2005).
- 17 Kamatani, Y., Matsuda, K., Okada, Y., Kubo, M., Hosono, N., Daigo, Y. *et al.* Genome-wide association study of hematological and biochemical traits in a Japanese population. *Nat. Genet.* **42**, 210–215 (2010).
- 18 Whyte, M. P., Landt, M., Ryan, L. M., Mulivor, R. A., Henthorn, P. S., Fedde, K. N. *et al.* Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy. *J. Clin. Invest.* **95**, 1440–1445 (1995).
- 19 Vossen, R. H., Aten, E., Roos, A. & den Dunnen, J. T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* **30**, 860–866 (2009).
- 20 Tongsong, T. & Pongsatha, S. Early prenatal sonographic diagnosis of congenital hypophosphatasia. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **15**, 252–255 (2000).