

厚生労働科学研究費補助金研究事業（清水班）
「遺伝性多発性外骨腫の実態把握と遺伝子多型に関する基盤研究」
国立成育医療研究センターにおける遺伝性多発性外骨腫の実態把握
分担代表者 小崎里華
国立成育医療研究センター 遺伝診療科 医長

要旨

遺伝性多発性外骨腫は長管骨骨幹端に多発する骨腫瘍、骨変形、関節可動域制限、低身長、若年からの変形性関節症、末梢神経への圧迫症状など多彩な症状を呈する疾患であり、患者の日常生活動作(ADL)に及ぼす影響は極めて大きい。原因遺伝子*EXT1*及び*EXT2*が同定されたが、骨腫瘍の発生メカニズムは全く不明である。未だ手術以外の効果的な治療法が確立されていない。今年度の目的は、本邦での実態把握と効果的な検体収集ができる体制作りの一環として、当センターにおける研究体制を整備した。今後、収集した検体を用いて遺伝子診断を行い、さらに生化学的、組織学的検討を加え、遺伝子変異との相関関係について検討を進めていくことが課題である。また、本疾患のような遺伝性疾患について、遺伝カウンセリング体制の普及にも努めたい。

A 研究目的

1. 患者数の実態把握と検体の収集

当センターは多発性外骨腫の外科的治療としては、我が国を代表する症例数を有する医療機関である。本年度の目的は、当センターにおける患者数の実態把握と検体の収集を行うために、患者のデータベースを作成し、研究体制を整備することである。

B 研究方法

①本研究を施行するにあたり、「遺伝性多発性外骨腫の遺伝子診断に関する

基盤研究」(申請者 高山真一郎)の研究計画書を作成し、国立成育医療研究センター倫理委員会に申請し、承認された(平成22年12月2日)。

②当センターにおける多発性外骨腫患者について、データベースを構築するために、院内電子カルテを用いて、後方視的に基礎データを収集した。

③ 遺伝相談におけるクライアントのニーズを把握するため、カルテの診療記録を検討した。

C 研究結果

① 研究開始後、現在まで多発性外骨腫

患者 5家系12検体を収集した。
QiAmpDNA Blood kit を用いて
DNA抽出を行い 遺伝子解析を開
始した。また、手術時切除した腫瘍2
検体を収集した。

② 現在、当センター 整形外科及
び遺伝

診療科に受診している多発性外骨
腫患者を院内の電子カルテを用い
て、検索し、患者のデータベースを構
築した。その結果、多発性外骨腫
68症例、 遺伝診療科に6症例が受
診したことが判明した。

i)整形外科受診は、主に治療目
的であった。68症例中、家族例は
31家系 50症例(73.5%)であった。
孤発例 18例の男女比は男:女
11:7であった。

31家系 50症例において、男女比
は男:女 35:15であった。

31家系の罹患している家族(親・同
胞まで)77症例において、男女比
は 男:女 49:28であった。親由来
は父親由来17症例、母親由来13
症例 不明1症例であった。

	男	女	計
孤発例	11	7	18
家族例	35	15	50
計	46	22	68

ii)遺伝診療科受診は、遺伝相談が
目的であった。6件のうち、4件は当
センター整形外科併診であった。ク

ライアントの年齢は27-48才、受診者
の内訳は、ご夫婦 3カップル、女
性3人で、全ての症例で、クライアント
自身または配偶者が遺伝性多発性
外骨腫と診断されていた。相談内容
は、疾患情報、遺伝性、次子再発率、
出生前診断など多岐にわたっていた。

D 考察

本疾患は常染色体優性遺伝であり、
両親のいずれかが罹患している場合と、
突然変異の場合がある。疫学上、発端者
(罹患者)の約90%の患者の親は同病に
罹患し、約10%の患者は新規突然変異と
いわれている。当センターでは多発性外
骨腫症例の73.5%が家族例であり、従来
の報告より、家族例が少ない結果となっ
た。カルテ上での家族歴の記載が不十分
であったことや浸透率の低下(96%)に
より軽症-無症状例では、家族歴がないと
判断された等の可能性が考えられた。孤
発例(突然変異例)と思われる症例につ
いて、ご両親の診察・レントゲン検査を行
い、確認をすることが望ましい。その結果
により、次子再発率が異なるからである。

また、孤発例・家族例ともに疾患の発
症率に性差があり、1.5-2.3倍 男性罹患
者が多いことが判明した。理由は明らか
ではないが、女性ホルモンなどの影響が
示唆される。

遺伝相談においては、遺伝的問題で
悩んでいる罹患者(親)が、問題解決の
ために自発的に遺伝カウンセリングを希
望して受診している。クライアントの抱え
ている問題は、各症例により、様々である

が、専門家から正しい遺伝的情報を入手し、今後の家族計画に役立てたいという前向きな姿勢が見受けられた。

親が罹患している場合、次子再発率は50%である。親が非罹患の場合、次子再発率は極めて低いと考えられる。ただし、性腺モザイクの可能性はあるが、現在まで報告はない。罹患児の子供(次世代)へは50%の確率で変異アレルを受け継ぐ。親が罹患者であった場合、次世代へ及ぼす影響について、自責や罪悪感を感じていることが多い。適当な解決策は未だない現在の日本の医療状況において、医療者は、単なる治療・医療情報の提供に終始するのではなく、精神・心理的援助も含めて、医療提供を行い、QOLの向上に寄与すべきである。

我が国においては、一般社会、当事者だけではなく医療者においても遺伝学の教育は不足している。最近、臨床現場で、少しずつ遺伝カウンセリングの重要性が認識されてきている。クライアントが問題としている点について、正しく理解し、わかりやすく伝え、問題解決にむけて意志決定を行うことを支援することが重要であり、適切な遺伝カウンセリングを提供できる施設を拡充することが必要である。

E 結論

当センターは我が国を代表する多発性外骨腫の外科的治療センターである。当センターにおける患者数の実態把握と検体の収集を行うための研究体制を整備した。今後、検体収集・解析を更にすすめ、データベースへ情報蓄積し、臨床症状と原因遺伝子変異との関連の検討を進めていくことが課題である。また、本疾患も含め遺伝性疾患全般を対象とする遺伝カウンセリング体制の普及に努めたい。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

H 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

先天性多発性外骨腫の外科的治療
前腕・手関節を中心に

2011.2.26 厚労省難治性疾患克服研究事業
清水班 班会議 報告

国立成育医療研究センター
外科系専門診療部 高山真一郎

国立成育医療研究センター
整形外科で治療中のMHE

2011.2.現在

女性26名 男性46名 合計72名(親は除く)

兄弟例11組 26名

年間手術件数10-20件(2010年は18件)

MHEの好発部位

基本的には内軟骨性骨化で骨化するどの骨にも発生する。長管骨>扁平骨>短管骨>小骨の頻度
(頭蓋骨・顔面骨など膜性骨化の骨を除く)

四肢長管骨骨幹端付近 (大腿骨遠位・脛骨近位・上腕骨近位・前腕骨遠位)

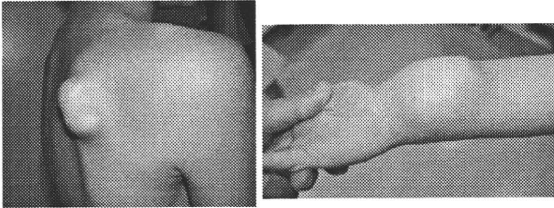
肋骨 肩甲骨 膝に多く、肘に少ない

上肢でも上腕骨近位、前腕骨遠位部、手指などが好発部位

外科的治療の適応

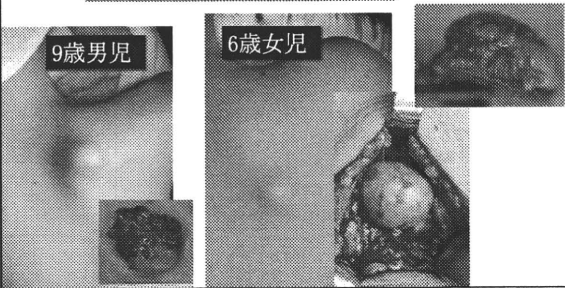
- 1.腫瘍が著しく突出(整容上の問題)
- 2.関節の変形・可動域制限
- 3.骨の成長障害(成長軟骨への影響)
- 4.疼痛・神経や血管の圧迫
- 5.成人例:変形性関節症・悪性化(軟骨肉腫)

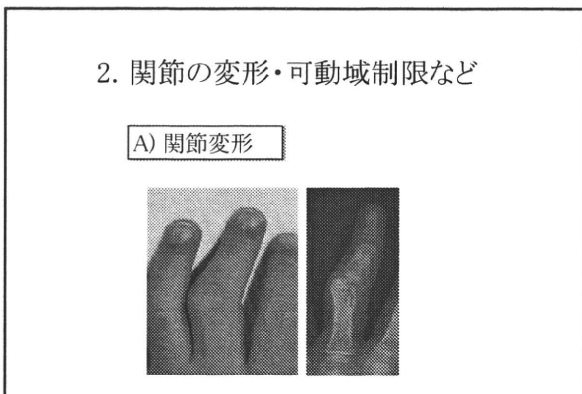
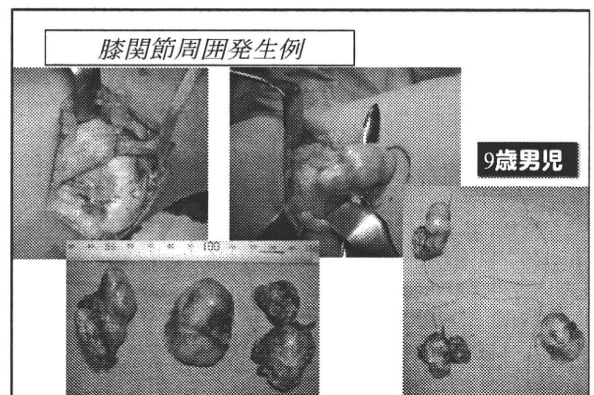
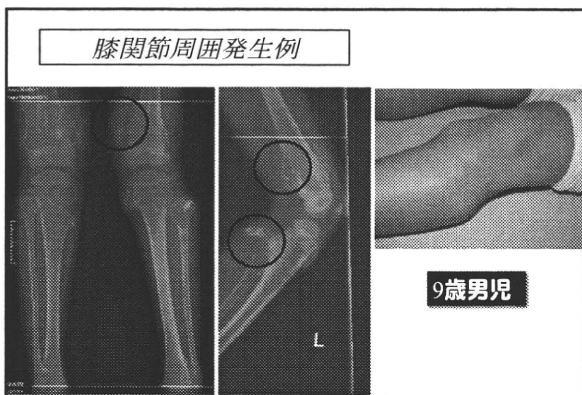
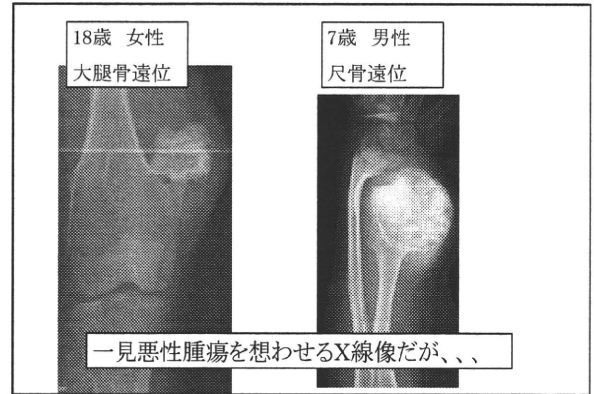
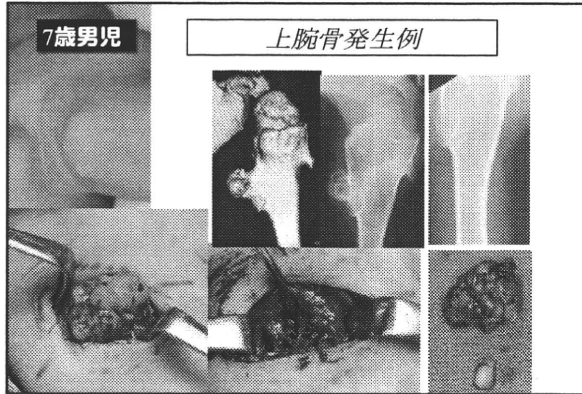
1. 腫瘍が著しく突出(整容上の問題)

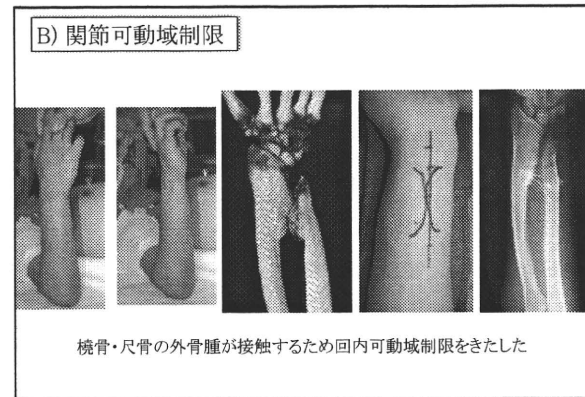
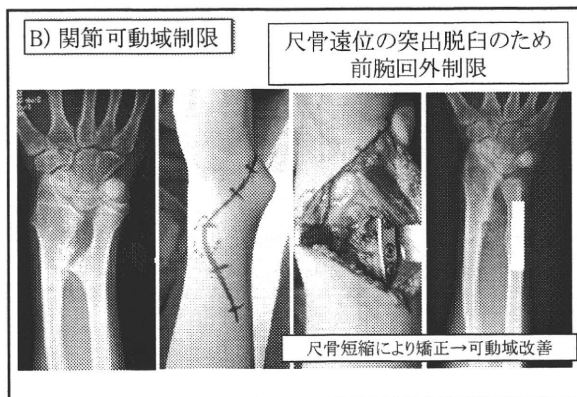
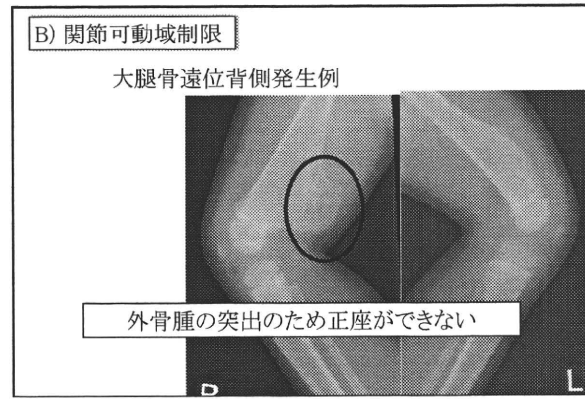
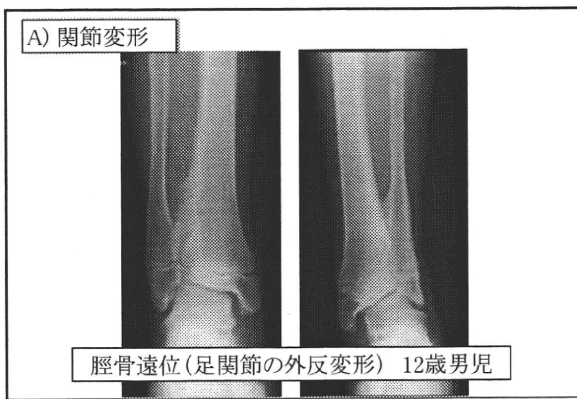
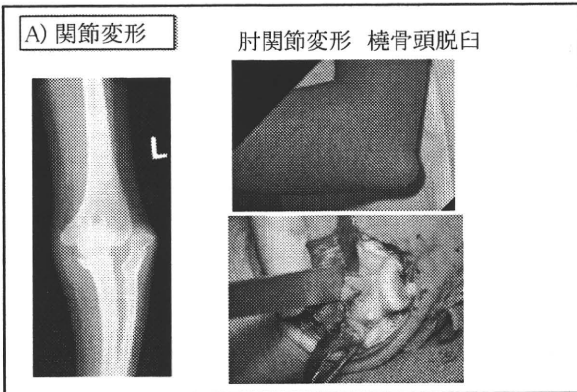


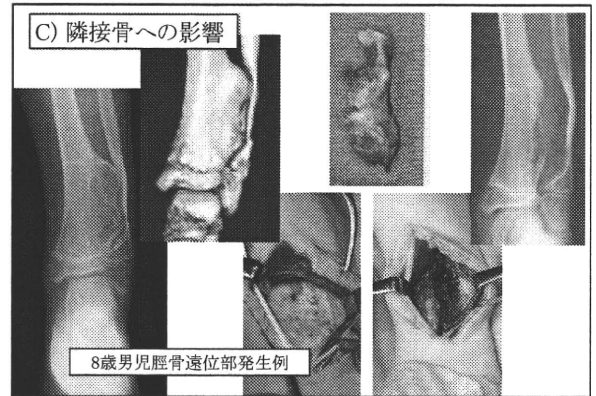
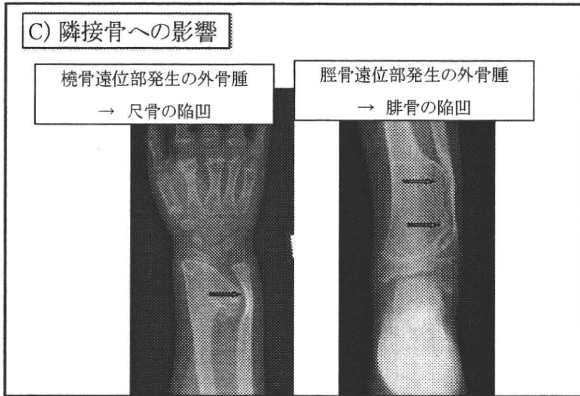
腫瘍の突出が目立つため手術を行った症例

肩甲骨発生例

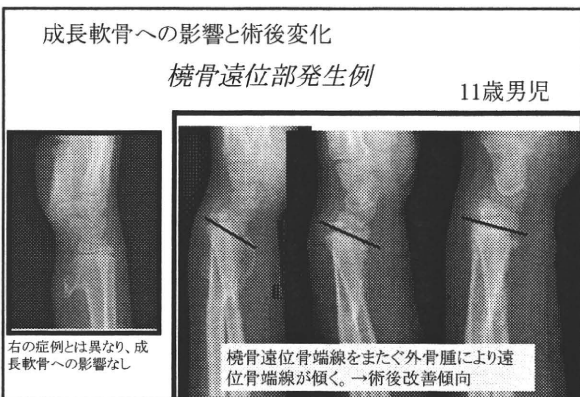
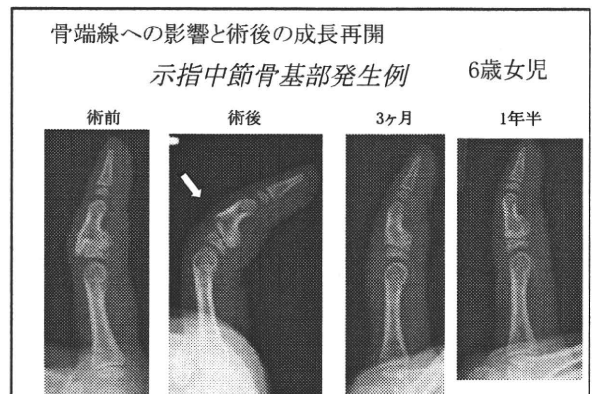




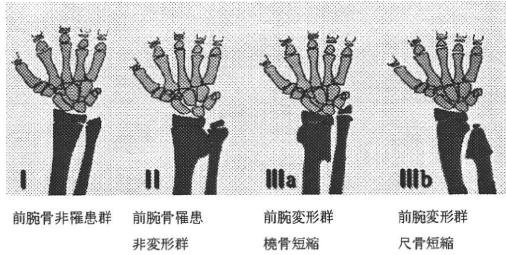




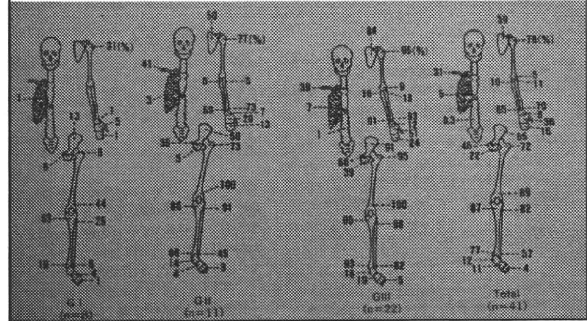
3. 骨の成長障害・彎曲変形
(骨端軟骨の成長障害)



前腕骨末梢の所見による分類 (Taniguchi 1995)



前腕骨分類と部位別頻度 (Taniguchi 1995)

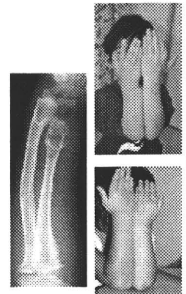


橈骨と尺骨遠位部の外骨腫

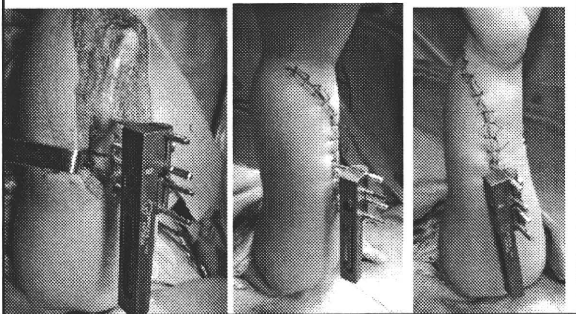


尺骨延長の目的

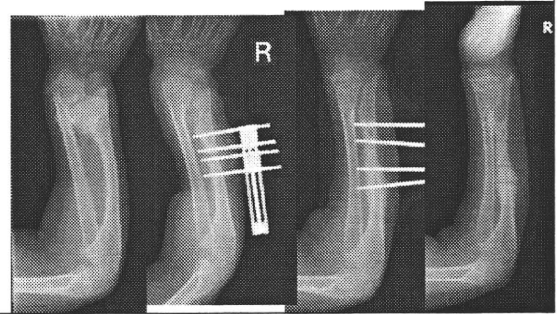
1. 橈尺骨の長さの差のために生じた手関節の尺屈変形および不安定性解消
2. 尺骨に牽引され生じた橈骨の彎曲変形および短縮の改善(橈骨の外骨腫が存在しなくても、骨間膜に牽引されて橈骨が短縮する)

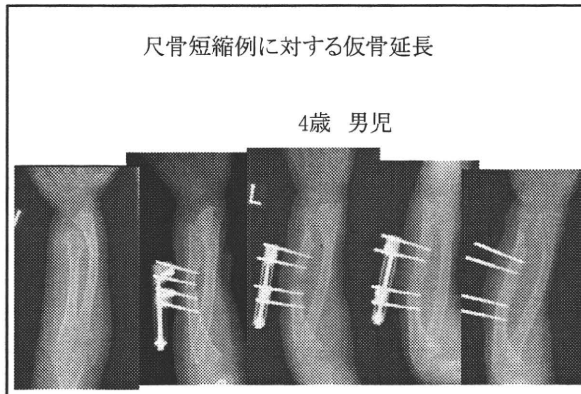


尺骨短縮例に対する仮骨延長



尺骨短縮例に対する仮骨延長





MHE 尺骨延長施行症例 (2003-2007)

手技 外骨腫切除 & 尺骨延長
(創外固定(小林メディカルM103)を用いた仮骨延長)

9例11肢 (男性7例、女性2例) 2011/02現在では21例23肢

手術時年齢4~13歳 (平均7.8歳)

術後経過観察期間 6~39ヵ月 (平均16ヵ月)

Group I :5肢 Group II :6肢

橈骨頭脱臼例は含まれていない

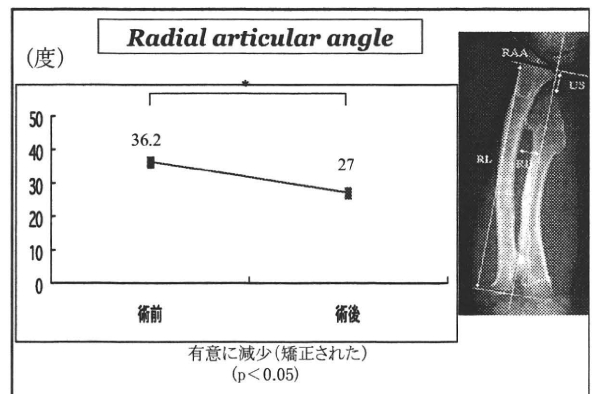
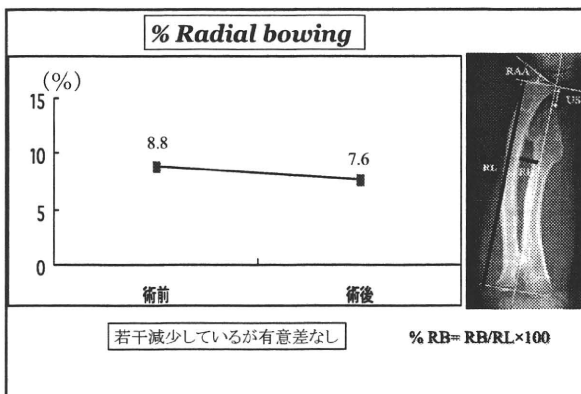
検討項目

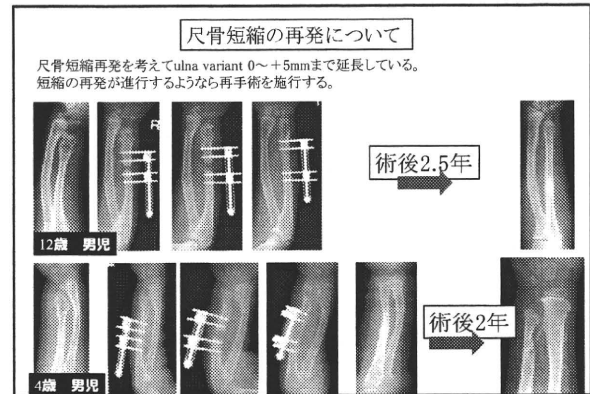
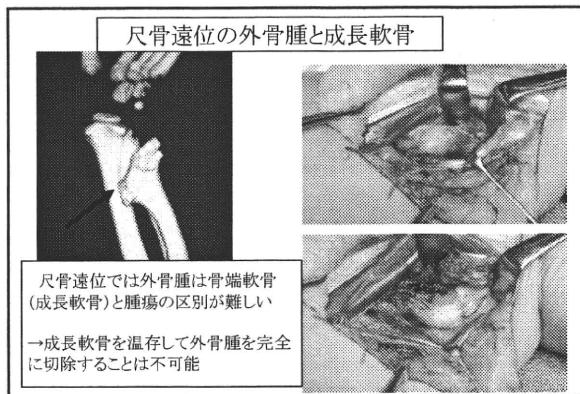
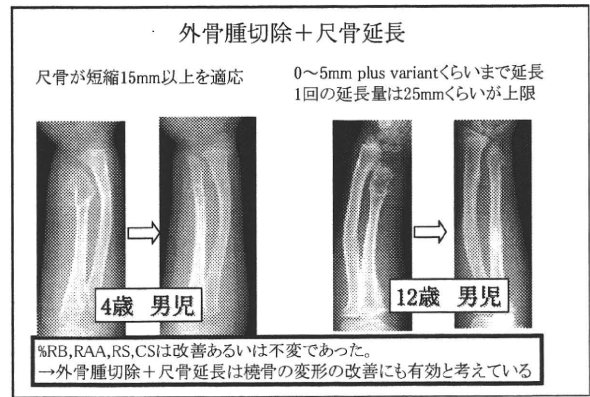
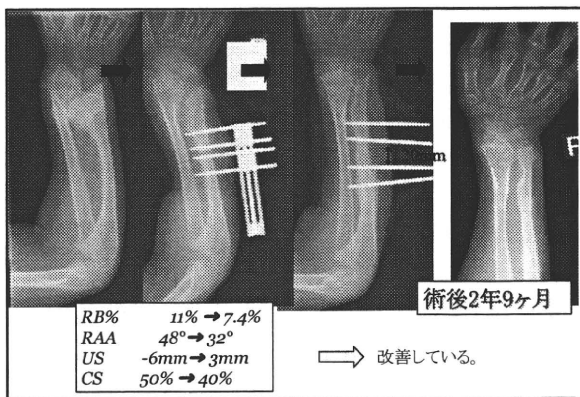
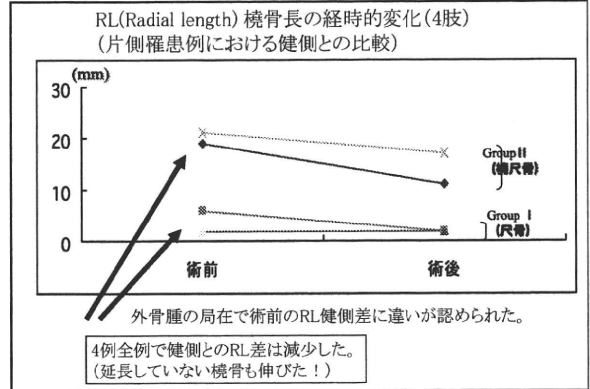
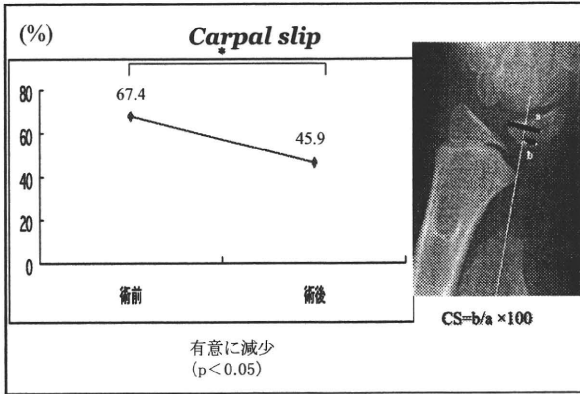
- X線所見(術前及び最終診察時)
 - <1> % Radial bowing (%RB) 橈骨の彎曲変形
 - <2> Radial articular angle(RAA) 橈骨遠位関節面の傾斜
 - <3> Carpal slip(CS) 手根骨の尺側偏位
(Wilcoxon signed ranked test, $p=0.05$)
- 健側とのRadial length(RL)の差の経時的変化 (4肢)
(Group I : 2肢, Group II : 2肢)

CS(Carpal slip)= $b/a \times 100$

RL(Radial length) 橈骨長
RB(Radial bowing) $\%RB=RB/RL \times 100$ 橈骨の彎曲
RAA(Radial articular angle) 橈骨関節面の傾き
US(Ulnar shortening) 尺骨短縮量

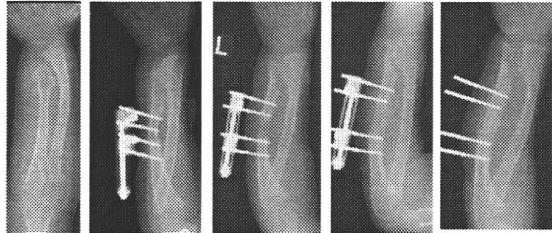
(Ishikawa J. et al, 2007より)





尺骨延長のタイミング

著しい変形が生じる前の手術が望ましい。
変形の進行があれば年齢に関わらず手術を行う。
複数回の手術をさけるために手術時期を遅らせるのは疑問



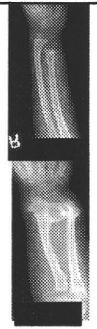
4歳 男児

橈骨の短縮について

Group I : 術前健側とのRL差小, US 平均 11mm
Group II : 術前健側とのRL差大, US 平均 6.2mm

・手関節の変形は患者の愁訴として最も多いが、
Group II にみられる橈骨の短縮も伴う尺骨の短縮では
手関節の変形は肉眼上わかりにくい。

・そのためGroup II では手関節の変形は
軽度なために、健側とのRL差の拡大が
見逃されやすいのでは・・



特にGroup II では手関節の変形だけでなく、健側との前腕長差にも
注意し、拡大するようなら手術をしたほうがいい。

前腕変形に対する尺骨延長 まとめ

多発性骨軟骨性外骨腫症に対して外骨腫切除及び尺骨延長を施行し、治療結果をパラメーターを用いて検討した。

尺骨遠位のみでなく橈骨の遠位尺側にも外骨腫がある場合、
健側に対し橈骨長が短い傾向があった。

尺骨延長は橈骨の変形も改善する有効な手術であるが、外骨腫の
完全な切除は困難で、尺骨短縮の再発は生じる。

前腕の変形・短縮が進行するようであれば、年齢に関わらず
延長術を検討する。

今回の報告のまとめ

国立成育医療研究センターにおける、先天性多発性
外骨腫症の外科的治療の概略を報告した。

上肢では、尺骨遠位の成長障害による手関節変形・
機能障害が高頻度で見られ、尺骨延長術は有用な
治療法である。

厚生労働科学研究費補助金研究事業（清水班）
「遺伝性多発性外骨腫の実態把握と遺伝子多型に関する基盤研究」

分担研究員 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター
センター長 成松 久
研究員 後藤 雅式

A. 研究目的

遺伝性多発性外骨腫の原因として **EXT1**、**EXT2** が知られている。しかし、患者の両遺伝子を解析しても多型が見つからない場合も多く、未だに遺伝子多型と疾患との関連が明らかになっていない。さらに、本疾患は 5-20%の頻度で悪性へ転化し軟骨肉腫を生じることが知られているが、原因やメカニズムは不明である。そこで、本邦の患者並びにその家族を対象に、遺伝子多型情報を収集することを目的とし、患者会、医療機関と共同で研究を開始した。

B. 研究方法

(1) **EXT1**、**EXT2** 遺伝子のエクソン領域の増幅

医療機関（岐阜大学）から送られてきた、患者並びにその家族の血液から単離したゲノム DNA（匿名化済み）を用い、遺伝性多発性外骨腫の原因遺伝子だと考えられている **EXT1**、**EXT2** 遺伝子のエクソン領域の塩基配列を解析した。このとき、エクソン/イントロンジャンクション領域の配列も対象とした。

なお、プライマーの塩基配列（表 1 参照）及び PCR 反応条件については岐阜大学で既に検討を行っており、その情報をもとに若干の修正を加え使用した。アガロースゲル電気泳動で増幅断片を確認したのち、Promega 社の Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System で PCR 断片を精製し塩基配列解析に用いた。

(2) 塩基配列解析

上記 PCR 増幅断片を鋳型とし、PCR プライマーを用いてシーケンシング反応を行った。反応には ABI 社の BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit を用い、ABI 社の PRISM 3100 Genetic Analyzer を用いて解析を行った。得られた結果を日立ソリューションズ社の SEQUENCHER によって、正常 **EXT1** 或いは **EXT2** 遺伝子の塩基配列と比較を行った。

なお、産業技術総合研究所での研究には、「ヒト由来試料実験計画」を作成し倫理委員会の承認を得たのち実施した。

表 1 使用したプライマー(1)

gene	exon	primer name	sequence
EXT1	CpG island	hE1CpGf1	CAAAGCATCTTTCTCTAGGCG
		hE1CpGr1	CTCACAAATCCCTGCATCTCTC
		hE1CpGf2	GGGTTATGAATGGGCGCAGC
	Exon 1	hE1E1f1	CGAGCGCAGGAGTAAACACC
		hE1E1r1	CGTTTTTTGGCCTGCATGTG
		hE1E1f2	GAGCTGAAAGTGTGATTGG
		hE1E1r2	GAGACTCTGCACTTTGGATC
		hE1E1f3	CCTCTTTGTCCTGAGTCTGG
		hE1E1r3	CCATCCCCCAACTTCACACC
		Exon 2	hE1E2f1
	hE1E2r1		GAGAGGTGATAATGTTAAACCC
	Exon 3	hE1E3f1	CTGATTGGAACAGCTTCTGCTG
		hE1E3r2	TGAAAGTTTGGACGGGGCAGC
	Exon 4	hE1E4f1	GTGCATCTCTTGTGTTTACAG
		hE1E4r1	GCTGAGAGAAGTGTATAAAGG
	Exon 5	hE1E5f1	CCTTCCAAATATCATCAGG
		hE1E5r2	GGCCTTTAGTTCTGTATGAC
	Exon 6	hE1E6f2	GAGCAAGGAGGAGTAATTTTC
		hE1E6r2	ATAACAGGTAAGGAGGGCGG
	Exon 7	hE1E7f3	AAGAGGCTTTGGGTTGGAGG
		hE1E7r2	AAGTGCCCCATGGAGAAAC
Exon 8	hE1E8f2	GGGAGAATTGTCCTGAAAAC	
	hE1E8r3	ATCGTGCAACATGAGGTGAC	
Exon 9	hE1E9f2	TTAGTGGGGAGAAGGTAATG	
	hE1E9r2	TTCTATTATGCAGCAGCC	
Exon 10	hE1E10f2	GTCTCAGAAGTCCACTTGTC	
	hE1E10r2	ACGTGAGTCCTCATTACCTG	
Exon 11	hE1E11f1	CCTTGCACTTCTCTCATCATTATCC	
	hE1E11r2	GAAGAGAGAGCAGCTTGACC	

表 1 使用したプライマー(2)

gene	exon	primer name	sequence
EXT2	Exon 1	hE2E1f1	GCCTGAATATAAGCACCTAC
		hE2E1r1	AAAAGCGGGCAGTCATTGTC
	Exon 2	hE2E2f1	TCAAGTGCATTTGCCATCC
		hE2E2r1	CCCTTCCCTTTAGTTCCTG
	Exon 3	hE2E3f1	GGCTTGGGGATCCTTGATAG
		hE2E3r1	ACTTCTAAATCTTCAGGAGG
	Exon 4	hE2E4f1	ACTCTGTAAACGTTAGCTGG
		hE2E4r1	AGGACCCTACCCTGTAACCTG
	Exon 5	hE2E5f1	TCAGTGGAGGTGAAGACTGG
		hE2E5r2	CATAGGCCAAGCAGCTTTGC
	Exon 6	hE2E6f1	GTATTGCTTGGCGTCAACCC
		hE2E6r1	GTAGTAGTCTTGAACCAGG
	Exon 7	hE2E7f1	GGATGTTGTTTCTGCTTGTG
		hE2E7r1	ACTCAGGCATTGAGCTCCTG
	Exon 8	hE2E8f1	CCTGGAGTTGACTATGATAG
		hE2E8r1	TTATGCTGCCCTTATCAGGC
	Exon 9	hE2E9f1	CATGTTTGGGTTTGCTGACG
		hE2E9r1	AAATGGAGGCATGCTGTCTC
	Exon 10	hE2E10f1	GGATAACAAGCTGATTCTCCC
		hE2E10r1	GCACACCTTTTGGACTCTAC
	Exon 11	hE2E11f1	TGGAACATCTCCAGAATCCC
		hE2E11r1	AAGCCCTCTTGGCAGGTATG
	Exon 12	hE2E12f1	TATGAGAGAAAGCTTGTCCTC
		hE2E12r1	CCAATGTGACCGCATCAATC
	Exon 13	hE2E13f1	CATGCAACATCTCAGCTTAC
		hE2E13r1	ACTATGGCTACCAGCTGCTG
	Exon 14	hE2E14f1	CAGACTGTGGCTACTTGAGC
		hE2E14r1	AGTAGGTCAACCTTCCACCC

C. 研究結果

(1) EXT1、EXT2 遺伝子のエクソン領域の増幅

岐阜大学から送られた 38 検体について表 1 に示したプライマーで EXT1、EXT2 のエクソンを中心に PCR 増幅を行ったところ、1 つの検体の EXT1 第 1 エクソンを除き、予定の長さの断片が増幅された（データは省略）。増幅されなかった検体については、プライマーのアニーリング部位に多型があるか、エクソン領域に増幅を妨げる何らかの配列が存在することが考えられるが、今回は詳細な検討は割愛した。

(2) 塩基配列解析

増幅された全ての断片について塩基配列解析を行った。その結果、11 家系（17 検体）で明確にヘテロの多型が認められた。代表的な多型例（EXT1 exon6、サンプル 3a, 3b, 3c, 3d）を図 1 に示す。3a、3b、3c の 3 名は中央赤丸の T が欠失しているため、2 本の波が重なって見える。同一の塩基欠失は 14a でも見られたが、同一の多型が複数の家系で見られるケースはほかにはなかった。なお、ヒト多型データベースや論文を検索した結果、少なくともこの多型に関する限り、欧米やアジアで多数の報告があった。

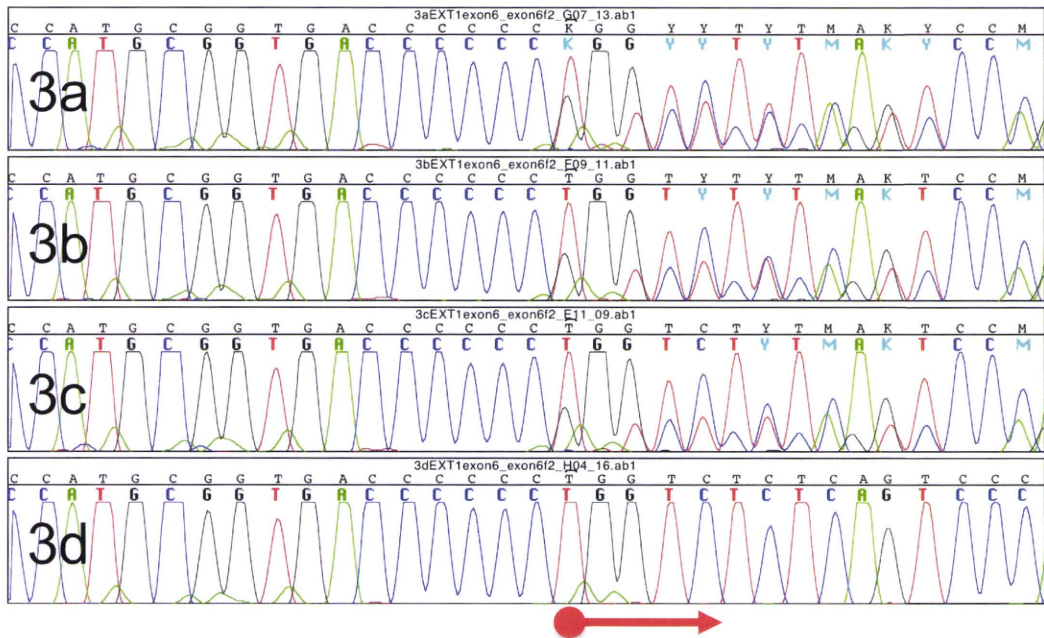


図 1 代表的な多型例

表 2 今回見つかった多型

サンプル名	遺伝子	エクソン	多型の種類	
1a, 1c	EXT2	6	ミスセンス	C339F
2a, 2b, 2c, 2d	EXT1	6	フレームシフト(1 nt Δ)	T488～
3a, 3b, 3c	EXT1	6	フレームシフト(1 nt Δ)	L490～
4a	EXT1	8	フレームシフト(1 nt Δ)	F550～
6a	EXT1	5	フレームシフト(2 nt Δ)	R433～
7a	EXT2	5	ミスセンス	R297H
8b (, 8d)	EXT1	1	ナンセンス	Q27X
11a	EXT1	2	ミスセンス	R341S
	EXT2	2	ミスセンス	R128W
13a	EXT2	8	ナンセンス	W429X
14a	EXT1	6	フレームシフト(1 nt Δ)	L490～
16a	EXT2	3	ミスセンス	R182W

今回見つかった全ての多型を表 2 にまとめた。ミスセンス変異が 5 家系、1 塩基欠失によるフレームシフトが 4 家系、ナンセンス変異が 2 家系、2 塩基欠失によるフレームシフトが 1 家系存在した。このうち 1 家系 (11a) では 2 か所のミスセンス変異が見られた。なお、8d に関しては、片側の塩基配列を解析した限り 8b と同一の多型が存在するようには見えたものの、もう一方の鎖の塩基配列解析が不十分なため、さらに詳細な解析が必要であると考えている。同様に、17a, 17b でも多型候補が見つかったが、解析が不十分であるため表 2 には記載しなかった。

一方、遺伝子別では、EXT1 が 7 家系、EXT2 では 5 家系に多型が認められた。なお、1 家系 (11a) については両遺伝子に多型が見られた。

D. 考察

今回の検討では、17 家系中 11 家系で明確な多型が見つかった。これらの多型が患者にのみ存在すれば、疾患の原因である可能性が高いと考えられる。我々はブラインドで遺伝子解析をしたため、患者特異的な多型かどうかのコメントはできない。今後は、医療機関に情報を渡し、結果の分析を引き継いでもらうことになる。

今回見つかった多型のうち、家系 2 並びに 14a で見られた 1 塩基欠失と同様の多型の報告が多数存在する。この多型はアジアのみならず欧米でも見られる

ため、EXT1 塩基欠失のホットスポットである可能性がある。今後、検体数が増えた場合、同様の多型がどの程度検出できるかにも着目したい。

6家系で多型が見つからない理由としては、単純に塩基配列解析の精度が低いこと、他の遺伝子に原因がある場合、PCR プライマーのデザインの問題などが考えられる。他の原因遺伝子候補としては、ヘパラン硫酸合成に関与する硫酸基転移酵素や他の糖転移酵素が容易に想像される。このうち他の糖転移酵素 (EXTL1、EXTL2、EXTL3) については *in vitro* で弱い活性しか検出されておらず、生体内での機能は明確ではない。よって、もし次なる原因遺伝子を探索するとすれば、13 種類の硫酸基転移酵素遺伝子がターゲットになると考えられる。

PCR プライマーに関しては、基本的にイントロンにプライマーを設定しているため、多型の頻度は高いと考えられる。その場合、一方の対立遺伝子は増幅されないので、複数セットの PCR プライマーを用いて遺伝子解析を行う必要がある。

一方、今回いくつかのミスセンス変異が見つかった。立体構造に寄与すること多い Cys にアミノ酸置換が見られたケースもあるが、現状ではこれらのアミノ酸置換により活性の変化を予想することはできない。今後は、アミノ酸置換酵素を生産し、これらの組換え酵素の *in vitro* での活性測定を行い、多型が活性に及ぼす影響を検討する必要があると思われる。

E. 結論

今回の検討で、11 家系に何らかの多型が見つかった。ミスセンス多型に関しては、酵素活性と多型の関係は明らかになっていないが、患者特異的な多型であれば遺伝性多発性外骨腫の原因である可能性はある。今後は、継続して他の家系のサンプル解析を行う。

F. その他

論文発表 なし

学会発表 なし

特許出願 なし

厚生労働科学研究費補助金研究事業（清水班）

「遺伝性多発性外骨腫の実態把握と遺伝子多型に関する基盤研究」

分担研究項目「ヘパラン硫酸（HS）の生化学的解析に関する研究」

「病的組織の生化学的および病理学的解析を行う。悪性化する患者の頻度と部位、そしてその原因となる多型を見だし、その表現型としてのヘパラン硫酸の異常を生化学的に解析する。」

研究分担者：愛知医科大学医学部・先端医学医療研究拠点 拠点長 木全弘治

研究要旨

血液（血漿と細胞成分の2画分）について、生化学的にヘパラン硫酸含量とコンドロイチン硫酸含量を測定する方法をまず、健常人のそれについて確立した。ヘパラン硫酸含量とコンドロイチン硫酸含量の比が個人差を越えてほぼ一定であり、この比からHME遺伝子異常を検知する生化学的な方法の確立の可能性が出てきた。

A. 研究目的

遺伝性多発性骨腫（HME）の原因遺伝子はヘパラン硫酸（HS）糖鎖の合成酵素である *EXT1* 及び *EXT2* である。マウスを用いた研究から、どちらの遺伝子も欠陥をホモにもつ個体は致死に到るが、一方に欠陥をもつヘテロ変異体は正常である。最近の解析でこれにヘテロ接合性欠損（LOH）が後天的に stochastic に生じて変異がホモになり、表現型が表れることが示唆された。従って、*EXT1* 及び *EXT2* に変異による活性低下があるかどうかを調べることで、この疾患の予測に重要となる。

今回、我々は二つの方法で変異の可能性を検出する方法の開発を試みた。

B. 研究方法

1) 血液中（血漿及び血球細胞表面）の HS 含量低下の測定による

血液を血漿及び血球細胞表面由来に分けて HS 含量を生化学的に解析し、これらのコンドロイチン硫酸（CS）含量を対照にする。ヘテロ個体では、Heterozygous levels of EXT により、身体中で、また採取の容易な血液で HS/CS 比が低下すると予測される。

2) EXT の活性解析による

患者の EXT1 または EXT2 の遺伝子変異の解析後、見つかった変異を導入した酵素を発現させ、GlcA 転移活性、GlcNAc 転移活性を測定する（基質はオリゴヘパロサン）。しかし、触媒部位に変異がある場合は活性低下が期待できるが、他のステム領域などに変異がある場合は検出できない。また酵素のトポロジーに関連する部位の変異も検出できないと思われ、このような場合には以下の方法で対応する。対策：1) 変異を導入した酵素遺伝子を CHO-pgsD(EXT1null)などの細胞に transfection して HS 合成活性を調べる（変異導入±cDNA の組み合わせ）。

2) Heterozygosity が活性に影響している可能性を CHO-pgsD(EXT1null)に野生と変異導入 EXT1 の単独発現と両発現の場合で活性を比較する。

（倫理面への配慮）

本学で直接に患者血液を採取することはない。しかし、ヒト血液を取り扱うので、本学の倫理委員会に申請し、許可された。

C. 研究結果

今年度は、正常者の血液 10ml を用いて、方法 1) による解析方法の確立を行った。以下には、数回の試行実験により確立できたと思われる方法の詳細（添付図を参照）を記載する。血液を得たら 4 mM になるように K_3EDTA を加えて、血漿(3ml)と細胞成分(7ml)に分け、各々を 0.4MKOH 溶液にする。37°C、24 h のアルカリ処理で β -エリミネーション反応させる。酢酸添加による中和後に DNase-1 消化、ついでプロテナーゼ K 消化を 45°C、40 h 行い、グリコサミノグリカン (GAG) を遊離させた。100°C 3 分間加熱によりこれらの酵素を失活させた後、遠心により上清を回収した。3 倍量の 95%エタノールを加えて、攪拌後 0°C に 30 分間放置、ついで遠心して沈殿を回収する。沈殿を水に溶解後、1.3%KOH を含む 95%エタノールを 3 倍量加えて、同様にしてエタノール沈殿を 3 回繰り返す、エタノール可溶性の低分子を除去する。最終沈殿を 0.2MNaCl/0.01%TritonX-100/0.02M トリス塩酸バッファー pH7.5 に溶かし、DEAE-Sephacel カラム (300 μ l、0.2MNaCl/0.01%TritonX-100/0.02M トリス塩酸バッファー pH7.5 で平衡化) に充填し、GAG を DEAE-Sephacel に選択的に吸着させる。カラム 10 倍量の 0.2MNaCl/0.01%TritonX-100/0.02M

トリス塩酸バッファー pH7.5 でカラムを洗浄後、カラム 3 倍量の 2M NaCl/0.01% TritonX-100/0.02M トリス塩酸バッファー pH7.5 で吸着 GAG を遊離する。溶離液を分子量 5,000 カットの Centrifugal filter devices(Ultrafree-MC, Amicon)にセットし、遠心により NaCl と TritonX-100 を除去し、フィルター上部に GAG を残す。3 倍量の 0.02M トリス塩酸バッファー pH7.5 を加えて、遠心を 3 回繰り返す。ヘキサロン酸含量にして 1nmol GAG 当たり 0.1mU のコンドロイチナーゼ ABC を含む 0.05M トリス塩酸バッファー pH7.2-0.1% BSA 溶液、またはヘパリナーゼ I, II, III を各 0.1mU、0.05mU、0.1mU を含む 0.05M トリス塩酸バッファー pH7.2-1mM CaCl₂-0.1% BSA 溶液 100 μ l をフィルター上部に加えて、そのまま 37°C, 60 分反応させた。遠心により消化低分子産物をフィルター底部容器に回収し、それぞれの消化物をポスト蛍光ラベル法で検出する高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (DOCOSIL カラム(Senshu Pak)) で展開し、CS と HS の定量的、組成分析を行う。

この方法により、数名の健常者の血液より得た血漿成分と細胞成分について、HS 含量、CS 含量は個人差が著しかったが、HS/CS 含量比は血漿成分で期待したように 0.82 ± 0.13 で安定していた。しかし細胞成分では、このような結果は得られなかった。

D. 考察

血液には多量の蛋白質、脂質、糖質を含む。従って、この材料を用いての HS と CS の解析は予想外に難しいものであった。特に最初の試行実験では、DEAE-Sephacel カラムによる選択的な GAG の単離過程を加えていなかった為に HPLC による分析は特に細胞成分について夾雑物によりほとんど不可能であった。DEAE-Sephacel カラムの平衡バッファーに Tritonx-100 の界面活性剤を加えて、脂質の夾雑を除去できる条件を加えて信頼できる結果が得られるようになった。本研究の特徴は HS/CS 比を取ったことで、血液中の CS はほとんどがインター- α -トリプシンインヒビター由来の低硫酸化されたもので、肝臓疾患がない限りでは、その血液中濃度はかなり一定しており、HS 含量と対照させたことは、HS 含量の変動を知るには良い方策であったと考えられる。細胞成分については、今のところ満足する結果が得られていないが、脂質の除去過程が鍵を握るものと、再度、試行し、解析方法の確立を目指している。