

図5：延長率—角度変化（正面）

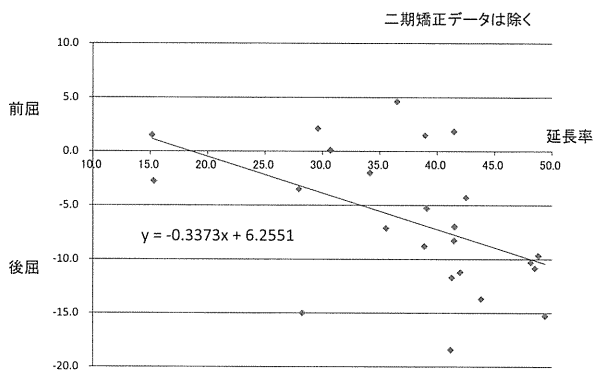


図6：延長率—角度変化（側面）

+6.2551で表される相関直線が得られる（図5・6）。ともに、柏木³⁾⁴⁾らが延長量が長くなるほど変形が強くなると報告しているように、延長率が高くなるほど外反変形、前方凸変形が出現することがわかる。

須田⁵⁾らは、8例16肢中外反変形が5例6肢（平均 $19.1 \pm 3.1^\circ$ ）、前方凸変形が5例9肢（平均 $14.5 \pm 5.4^\circ$ ）に生じ、このうち4例4肢に矯正骨切り術を行ったと報告している。単純に比較は出来ないが、自験例は外反変形平均 5.5 度（ $-6.9 \sim 20.8$ 度）、前方凸変形は平均 6.4 度（ $-4.6 \sim 18.4$ 度）であったが、矯正骨切を行った症例は無い。また、早期に積極的にリハビリを行い、尖足内反変形の矯正に努めているため、脛延長手術を行った症例が無いと思われる。

以上より、単支柱式創外固定器での下腿延長における外反変形、前方凸変形は、延長量に伴い出現しやすいと思われる。しかし、グラフ上のばらつきから、他の影響因子があると考えられ、今後の調査が必要である。

E. 結論

軟骨無形成症の単支柱型創外固定器を使用した下腿脚延長において、延長指数は外反変形、前方凸変形とは相関が無く、脛骨長に対する延長率は、外反変形、前方凸変形ともに延長率が高くなるほど、強くなる傾向が認められた。

（参考文献）

- 1) Leyes, M et al :Statistical analysis of axial deformity during distraction osteogenesis of the tibia. J Pediatr Orthop., 18: 190-197, 1998.
- 2) 鈴木茂夫ら、Unilateralfixatorによる下肢延長の問題点（52症例109下肢骨延長を振り返って）:日本創外固定・骨延長学会_第10巻69-73_1999
- 3) 柏木直也ら、achondroplasiaに対する下肢延長術 延長によるalignmentの変化の検討:日本創外固定・骨延長学会_第11巻15-21_2000
- 4) 柏木直也、軟骨無形成症における下腿延長術_日本創外固定・骨延長学会_第14巻180_2003
- 5) 須田英明ら、特発性低身長に対する両下腿同時延長術の治療効果と合併症_日本創外固定・骨延長学会_第17巻151_2006

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

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | 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

軟骨無形成症非定例の遺伝子解析

研究分担者 長谷川 奉 延 慶應義塾大学医学部小児科 准教授
共同研究者 高 木 優 樹 慶應義塾大学医学部小児科

研究要旨 臨床的には軟骨無形成症（Achondroplasia 以下ACH）の重症型と診断された男児に対しFGFR3遺伝子のhot spot解析を行ったところG380R変異を認めなかった。そこでFGFR3の全翻訳領域を解析したところ、致死型骨異形成症（Thanatophoric dysplasia 以下TD）1型のcommon mutationであるR248C変異が同定された。血液および毛根由来のDNAで変異型と野生型の比率が異なることが分かり、体細胞モザイクであることも証明された。

A. 研究目的

ACHの責任遺伝子は*FGFR3* 遺伝子であり、G380R変異が全症例の95%以上を占める。稀な変異としてG375C変異も報告されている。今回我々は、四肢短縮、顔面中央部の低形成、三叉手を認め臨床的にはACHと診断されるが、骨レントゲン所見で扁平椎の程度が強く、重症（非定型）ACHと診断した一例に対しFGFR3 遺伝子解析を行った。

B. 研究方法

1) 検体採取

患者および家族から血液（全血）を3 - 5 ml採取し、標準的な方法でDNAを抽出した。

2) 解析方法

DNAを鋳型とし、PCR直接シーケンス法による解析を行った。まずACHの既知のhot spotであるExon 8（G380R）を解析し、変異が陰性であれば全翻訳領域を解析した。

3) サブクローニング

患者の毛根を採取し標準的な方法でDNAを抽出した。血液由来、毛根由来それぞれのDNAを鋳型としExon 6をPCR法で増幅した。それぞれのPCR産物で大腸菌を用いたサブクローニングを行い、変異型と野生型の比率を算出した。

（倫理面への配慮）

血液、毛根採取、遺伝子解析に関しては書面による同意を本人あるいは家族から得て行った。

C. 研究結果

1) 症例報告

症例は現在2歳男児。出生時に四肢短縮、顔面中央部の低形成を指摘された。無呼吸発作を頻回に認めたため数日間の呼吸器管理を行われた。2歳で座位は取れるが、歩行は困難であり運動発達の遅延を認めている。骨レントゲン所見は一般的なACHに特徴的な所見であったが、扁平椎の程度が強く、長管骨のmetaphyseal flaringを認めない点が非典型的であった。

2) *FGFR3* 遺伝子解析

Exon 8の解析でhot spotのG380Rが陰性であったため、全翻訳領域を解析した。Exon 6でR248Cを同定した。FGFR3 遺伝子のR248C変異はTDのcommon mutationであり、本症が致死性でないことから体細胞モザイクを疑った。両親は野生型であった。

3) サブクローニング子型表現型関連

血液由来のDNAでは変異型:野生型の比は43:57で、毛根由来DNAでは変異型:野生型の比は11:89であった。両者は統計学的有意差を伴い、体

細胞モザイクが証明された。

D. 考察

本発表は世界で初めて致死性骨異形成症変異の体細胞モザイクを異なる組織で解析して証明された非定型ACHの症例である。ACHの臨床症状を持ちながらhot spot変異陰性の場合には①全翻訳領域の解析あるいは②複数の組織での解析が必要である。

E. 結論

臨床的に重症型の軟骨無形成症（Achondroplasia 以下ACH）と診断された男児1名で*FGFR3* 遺伝子解析を行った。G380Rのhot spot解析では変異陰性であったため全翻訳領域を解析したところ、致死型骨異形成症1型のcommon mutationであるR248C変異が同定された。血液および毛根由来のDNAで変異型と野生型の比率が異なり、体細胞モザイクであることも証明された。ACHの臨床症状を持ちながらhot spot変異陰性の場合には①全翻訳領域の解析あるいは②複数の組織での解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Takagi M, Kaneko-Schmitt S, Suzumori N, Nishimura G, Hasegawa T. Atypical achondroplasia due to somatic mosaicism for the common thanatophoric dysplasia mutation R248C. *Am J Med Genet A*. 2011 Nov 21. doi: 10.1002/ajmg.a.34358. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
総合研究報告書

軟骨無形成症の病態解明

研究分担者 親 泊 政 一 徳島大学疾患ゲノム研究センター生体機能分野 教授
研究協力者 佐 藤 亮 祐 徳島大学病院整形外科

研究要旨 変異FGFR3遺伝子がどのようなメカニズムで病気の発症に関わっているかは未だ不明な点が多い。タンパク合成の工場である小胞体がこのメカニズムに関与しているのではないかと仮説を立て、研究を行った。一部の変異型では小胞体ストレスが疾患の発症に関与することが強く示唆された。

A. 研究目的

軟骨無形成症は四肢短縮型低身長をきたす骨系統疾患の中で最も代表的なものであり、FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3) の異常により発症する。FGFR3は成長軟骨において増殖軟骨細胞から前肥大軟骨細胞の細胞膜に発現し、細胞の分化・増殖を抑制することが知られている。

FGFR3 遺伝子のミスセンス変異によって重症度が異なってくるが、そのメカニズムはいまだ不明な点が多い。

前年度では現在報告されているすべての変異FGFR3 遺伝子を作成 (図1) し、前軟骨細胞培養株に遺伝子導入し、FGFR3 の局在を見た (図2)。いくつかの種類の変異型ではFGFR3 が細胞膜まで到達せずに小胞体に蓄積していることがわかった。タンパク質合成の場である小胞体に異常なタンパク質が蓄積した状態を小胞体ストレスといい、細胞はこのストレスに対する応答機構を持つ。具体的にはタンパク質の翻訳抑制、タンパク質の折り畳みを助ける分子シャペロンの誘導、

ユビキチンプロテアソーム系を用いたタンパク質分解 (ERAD)、これらで対応不能な場合にはアポトーシス (細胞死) が誘導される。
本研究では小胞体に蓄積した変異型FGFR3 が小胞体ストレスを起こし、細胞死が誘導されているのではないかと仮説を立て、それを検証する。

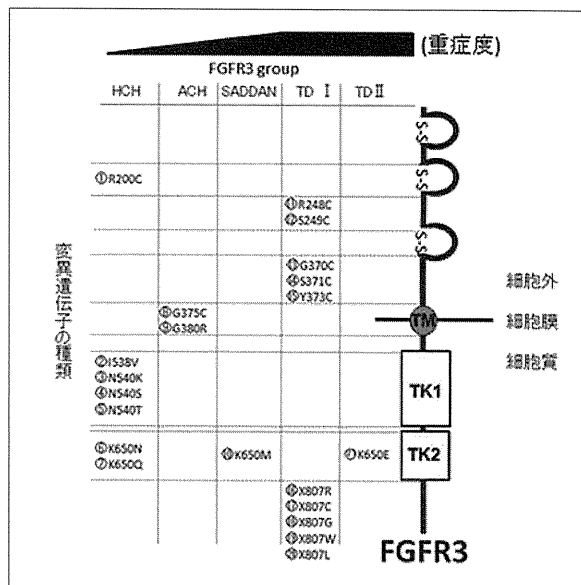


図1：変異FGFR3遺伝子と重症度

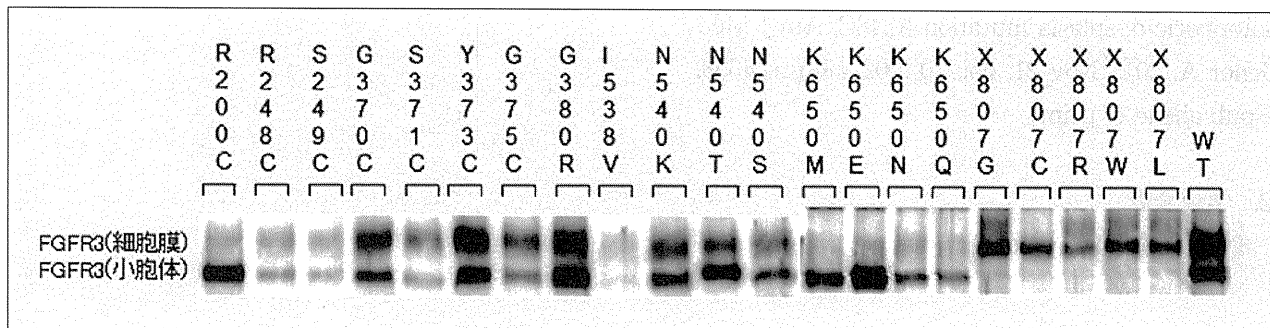


図2：各変異型FGFR3における発現パターン

B. 研究方法

小胞体ストレスにより誘導される転写因子 XBP 1 の結合配列を含んだレポーター遺伝子と変異FGFR 3 発現プラスミドを293T細胞に導入し、小胞体ストレスが起こっているかを調べた。またFGFR 3 が小胞体で受ける品質管理を評価するためにゴルジ装置への輸送をブロックするプレフェルディンAやタンパク質分解を阻害するプロテアソーム阻害剤MG132を用いてimmunoblot法で解析した。また小胞体ストレスに対する応答に対しては、野生型FGFR 3 発現細胞と変異型FGFR 3 発現細胞で、定量的RT-PCRによるCHOPの誘導を比較検討した。本研究は、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」ならびに「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」を遵守し、遺伝子組み換え実験に必要な「遺伝子組換え実験計画」の承認を徳島大学から得てから、適切な拡散防止措置がとられた徳島大学疾患ゲノム研究センターにおいて実験した。また本研究ではヒトおよび感染性や病原性を持つサンプルの解析は行わず、培養細胞を用いた解析が主となる。それゆえ、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究には該当しない。

C. 研究結果

1. 小胞体ストレスを感知するレポーターアッセイ

図1で示した21種類の変異FGFR 3 発現プラスミドおよび小胞体ストレス時に誘導される転写因子XBP 1 の結合配列を組み込んだレポーター遺伝子を293T細胞に導入したところ、小胞体局在パターンを示すR200CやX807Cなど数種類の異型FGFR 3 を発現させた細胞で、野生型FGFR 3 を発現させた場合と比較してレポーター活性が上昇していた(図3)。

2. FGFR 3 の品質管理

野生型のFGFR 3 を前軟骨細胞培養株に導入し、プロテアソーム阻害剤処理した場合および同剤を処理しなかった場合の発現パターンをimmunoblot法でみると薬剤を処理した場合が処理しなかった場合と比較してFGFR 3 の強い発現パ

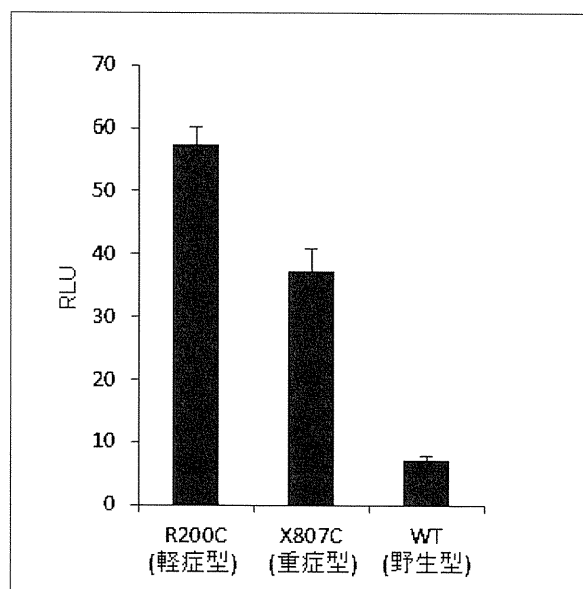


図3：レポーターアッセイ

ターンを示した(図4)。またレポーターアッセイでレポーター活性が上昇していたR200CやX807C変異型では野生型と比較して薬剤処理による発現の差が大きかった(図5)。

3. 定量的RT-PCR

定量的RT-PCRで、アポトーシス(細胞死)のマーカーであるCHOPの発現をみるとR200CやX807C変異型FGFR 3 を導入した細胞では野生型FGFR 3 を導入した場合と比較して高い発現を示した(図6)。

D. 考察

軟骨無形成症の発症メカニズムは成長軟骨におけるFGFR 3 遺伝子の変異によるFGFR 3 からのシグナルの過剰によるJAK/STAT pathwayとMAPK pathwayの恒常的活性化であると従来から言われているが、シグナル過剰説だけでは完全には重症度の違いを説明できない。

生体内の膜タンパク質や分泌タンパク質は細胞内小器官である小胞体でつくられるが、近年、小胞体はタンパク合成の静的な場でなく、タンパク質の翻訳抑制や分解、タンパクの折りたたみの促進、細胞死の誘導など小胞体でのタンパク質の品質管理を行う動的な場であることがわかってきた。しかも小胞体機能の破綻(小胞体ストレス)とさまざまな疾患の発症との関係が注目されている。細胞外基質を盛んに産生する成長軟骨細胞は発達した小胞体を持つことから、小胞体ストレス

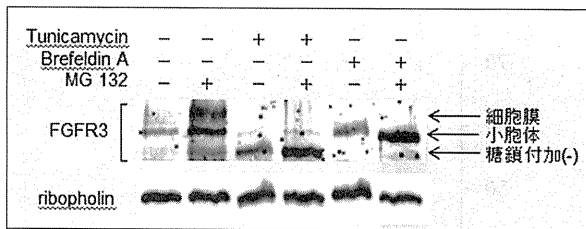


図4：野生型FGFR3における品質管理

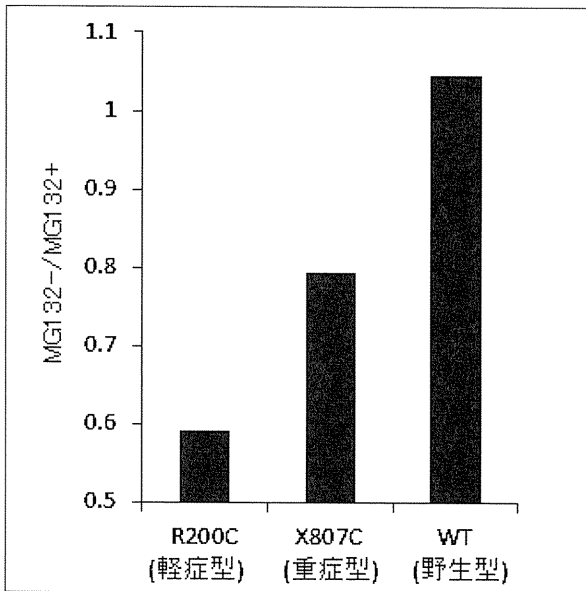


図5：変異型FGFR3の分解

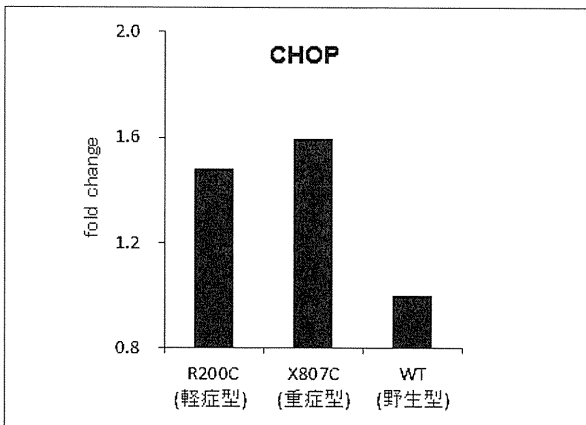


図6：細胞死の誘導因子CHOPの発現

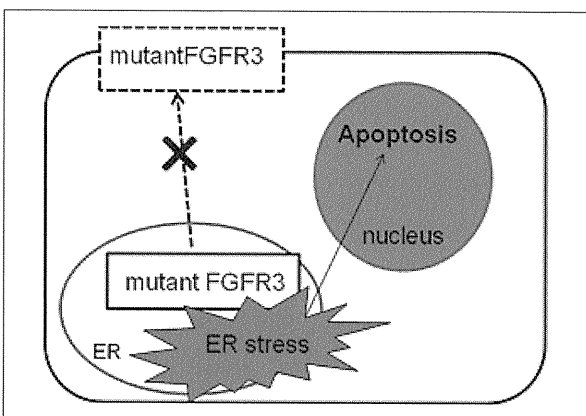


図7：小胞体ストレス仮説

応答が軟骨細胞の機能発現に重要な働きをしていることが予想される。そのため、FGFR3 変異による内的な要因、それに低酸素や栄養飢餓、力学的負荷などの外的な要因が加わり小胞体の機能障害をきたしているのではないかと考えられる。細胞膜に発現するFGFR3の構造は細胞外のイムノグロブリン様ドメイン、細胞膜のトランスメンブレンドメイン、細胞内の2つのチロシンキナーゼドメインからなる。このような膜タンパク質が機能を果たすには適切な高次構造を形成する必要がある。興味深いことに図3より変異の入っていない野生型FGFR3においてさえ小胞体の品質管理により多くが分解機構に回されていることがわかる。そのため、変異型FGFR3においては変異による高次構造の異常が小胞体ストレスを惹起することが示唆される(図7)。定量的RT-PCRにおいても小胞体に発現する変異型FGFR3を導入した場合に細胞死マーカーであるCHOPの誘導がかかることから数種類の変異型FGFR3が小胞体ストレスを引き起こしていることが強く示唆された。

現在、軟骨無形成症の治療は低身長に対しては仮骨延長術、脊柱管狭窄症に対して除圧や固定などの脊椎手術、重症型の重篤な呼吸不全に対しては人工呼吸器を用いた呼吸管理を対症療法が主である。また成長ホルモンの投与や動物実験レベルではCNP (C型ナトリウム利尿ペプチド) の強発現によるFGFR3シグナルの抑制が一定の効果を示すことが報告されているが、本質的な治療は未だ開発されていない。FGFR3 変異遺伝子による小胞体ストレスの関与が明らかになれば、遺伝子診断により小胞体ストレスが重症化に関わることが予測される患者には、小胞体ストレスを抑える化学シャペロンを投与するなどの、テーラーメイドで病態に即した全く新しい治療法の開発に繋がると考えられる。

E. 結論

FGFR3 遺伝子変異の部位によっては変異型FGFR3が小胞体に蓄積し、小胞体ストレスが起こっていることがわかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. miRNAを介した小胞体ストレス応答制御機構と非古典的小胞体ストレス応答 第84回日本生化学会大会 京都市 2011.9.22.
2. Non-coding RNAsを介した小胞体ストレス応答制御, 第6回 小胞体ストレス研究会 岡山 2011.10.28.
3. Non-coding RNAsを介した小胞体ストレス応答制御 第6回臨床ストレス 応答学会大会 名古屋市 2011.11.4

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧

研究分担者：長谷川 奉 延

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
Takagi M, Kaneko-Schmitt S, Suzumori N, Nishimura G, Hasegawa T	Atypical achondroplasia due to somatic mosai- cism for the common thanatophoric dysplasia mutation R248C.	Am J Med Genet A. [Epub ahead of print]			2011

