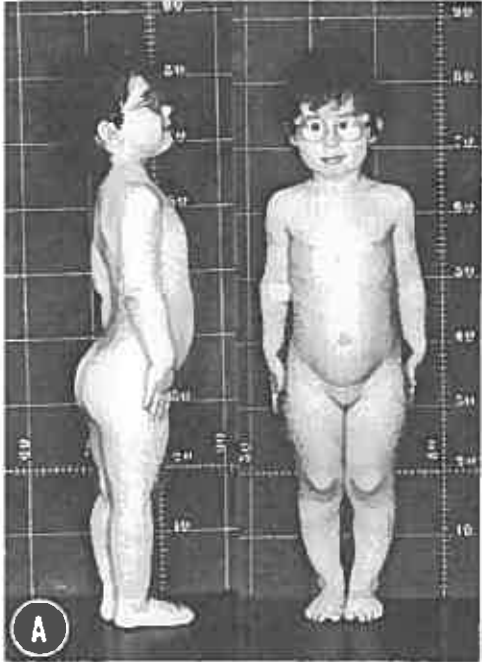


Kenny-Caffey 症候群の特徴

均整のとれた低身長
眼の異常(遠視など)



Fanconi S et al. *J Pediatr* 1986 より引用

低カルシウム血症
(副甲状腺機能低下症)



大脳基底核の石灰化

大泉門の閉鎖遅延



9歳で大泉門閉鎖未

骨膜の肥厚と髄腔の狭小化



精神発達遅滞を伴い常染色体劣性遺伝形式をとるものが KCS1 型
精神発達遅滞を伴わず常染色体優性遺伝形式をとるものが KCS2 型

ホームページ <http://kenny-caffey3.webnode.jp/>

[ホームページ](#)
[サイトマップ](#)
[RSS](#)
[印刷](#)

Kenny-Caffey症候群

メニュー

- [メインページ](#)
- [KCSの分類と症状](#)
- [KCSの原因遺伝子](#)
- [KCSの治療](#)

サイト内検索

はじめに

Kenny-Caffey症候群(KCS)は、均整のとれた低身長、長管骨の骨膜肥厚と髄質の狭小化、眼の異常、一過性の低カルシウム血症などを呈する非常にまれな疾患です。

本サイトでは、KCSに関する情報を提供し、よりたくさんの方にKCSについて詳しく知っていただくことを目的としています。

お問い合わせ先

東京大学医学部医学系研究科
 小児医学講座内分泌チーム

Kenny-Caffey症候群

メニュー

- [メインページ](#)
- [KCSの分類と症状](#)
- [KCSの原因遺伝子](#)
- [KCSの治療](#)

サイト内検索

お問い合わせ先

東京大学医学部医学系研究科
 小児医学講座内分泌チーム

[メインページ](#) > [KCSの分類と症状](#)

KCSの分類と症状

1. 低身長について

低身長は、ほぼ全員に認められる症状です。四肢短縮を伴う軟骨無形成症などと違いKCSでは均整の取れた低身長を示すことが特徴であり、成人身長は121-152cmと報告されています。成長障害は、子宮内発育遅延として胎内から生じる場合もあれば、出生時の身長、体重は正常範囲内で、その後徐々に成長障害が進行して、1歳過ぎから著明

な成長障害を認める場合もあります。KCS1型のほうが成長障害の程度が強いとされています。

■ 低カルシウム血症について

新生児期から低カルシウム血症による産粟を起こすことが多くみられます。低カルシウムの原因は副甲状腺機能低下症であると考えられています。また、KCS症例の多数例では、副甲状腺が同定されなかったことから、KCSの副甲状腺機能低下症は副甲状腺の形成障害によるものと想定されています。画像所見として、頭部CTで、副甲状腺機能低下症に伴う大脳基底核の石灰化を認めることもあります。しかしながら、副甲状腺機能低下症や低カルシウム血症が指摘されたことのない症例も存在しており、機序の詳細についてはわかっていません。

■ 画像所見

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
磯島豪、北中幸子	Kenny Caffey症候群と類縁疾患.	日本臨床	73	1959-1964	2015
Tamura M, Isojima T, Kawashima M, Yoshida H, Yamamoto K, Kitayama T, Namba N, Oka A, Ozono K, Tokunaga K, Kitanaka S	Detection of hereditary 1,25-hydroxyvitamin D-resistant rickets caused by uniparental disomy of chromosome 12 using genome-wide single nucleotide polymorphism array.	PLoS One	10	e0131157	2015
Isojima T, Kushiama R, Goishi K, Tsuchida S, Watanabe T, Takahashige N, Kitanaka S.	Mineral status of premature infants in early life and linear growth at age three.	Pediatr Int.	57	864-9	2015
Isojima T, Sakazume S, Hasegawa T, Ogata T, Nakanishi T, Nagai T, Yokoya S.	Growth references for Japanese individuals with Noonan syndrome.	Pediatr Res.	79	543-8	2016
北中幸子	小児におけるビタミンD代謝と骨	腎と骨代謝	28	209-215	2015
北中幸子	ビタミンD欠乏症の発症に関する遺伝子多型	ビタミン	89	72-74	2015

III. 研究成果の刊行物・別刷

日本臨牀 第73巻・第11号（平成27年11月号）別刷

Kenny-Caffey 症候群と類縁疾患

磯島 豪 北中幸子

Kenny-Caffey 症候群と類縁疾患

Kenny-Caffey syndrome and its related syndromes

磯島 豪 北中幸子

Abstract

Kenny-Caffey syndrome (KCS) is a very rare dysmorphic syndrome characterized by proportionate short stature, cortical thickening and medullary stenosis of tubular bones, delayed closure of anterior fontanelle, eye abnormalities, and hypoparathyroidism. Two types of KCS were known: the autosomal recessive form (KCS type 1), which is caused by mutations of the *TBCE* gene, and the autosomal dominant form (KCS type 2), which is caused by mutations of the *FAM111A* gene. *TBCE* mutation also causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism syndrome, and *FAM111A* mutation also causes gracile bone dysplasia. These two diseases can be called as KCS-related syndromes. In this article, we review the clinical manifestations of KCS and discuss its related syndromes.

Key words: Kenny-Caffey syndrome, *TBCE*, *FAM111A*, short stature, hypoparathyroidism

はじめに

Kenny と Linarelli は、一過性の低カルシウム血症によるテタニーを伴い、長管骨の骨膜が肥厚した著明な低身長の子例(39歳の母は身長121 cm)を報告した¹⁾。その他の症状として、大泉門の閉鎖遅延、近視、低出生体重が認められたが、精神発達は正常であった。さらに、Caffey は、その母子例の単純X線像について詳細に報告した²⁾。文献上、これらの報告以前にも同様の報告が散見されたこともあり、均整のとれた低身長、長管骨の骨膜肥厚と髄質の狭小化、眼の異常、一過性の低カルシウム血症を伴う症候群が確立した症候群として認知されるようになり、Kenny-Caffey 症候群(KCS)と呼ばれるようになった。その後も散発例や母子例の報告が

散見されるものの、KCSは非常にまれな症候群であり、日本ではこれまで文献上数例の散発例の報告しか存在しない。

1. KCS の分類と臨床症状

KCS は、常染色体劣性遺伝の KCS1 型と常染色体優性遺伝をする KCS2 型に分類されている。Kenny と Linarelli が最初に報告した母子例は、常染色体優性遺伝形式を示す KCS2 型と考えられるが、最初に原因遺伝子が同定されたのが常染色体劣性遺伝形式を示す KCS であったため、こちらが KCS1 型と呼ばれるようになった。

KCS は、均整のとれた著明な低身長、様々な程度の低カルシウム血症(多くは、副甲状腺機能低下症)、長管骨の骨膜肥厚と髄質の狭小化、大泉門の開大と閉鎖遅延、眼の異常を伴う症候

Tsuyoshi Isojima, Sachiko Kitanaka: Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo 東京大学医学部 小児科

表 1 Kenny-Caffey 症候群 (KCS) の臨床所見のまとめ

	KCS1型	頻度 (%)	KCS2型	頻度 (%)	総数	頻度 (%)
報告例	27		37		64	
性別(男性/女性)	5/20		17/20		22/40	
遺伝形式	常染色体劣性		常染色体優性			
精神運動発達遅滞	16/19	84 %	4/31	13 %	20/50	40 %
単純 X線所見						
骨膜肥厚と髄質の狭小化	22/25	88 %	33/37	89 %	55/62	89 %
頭蓋冠の板間層欠失	17/22	77 %	20/25	80 %	37/47	79 %
大泉門閉鎖遅延	5/25	20 %	28/30	93 %	33/55	60 %
成長障害						
低身長	26/27	96 %	35/37	95 %	61/64	95 %
子宮内発育遅延	23/27	85 %	8/28	29 %	31/55	56 %
骨年齢の遅れ	13/21	62 %	12/24	50 %	25/45	56 %
成長ホルモン分泌不全症					4/17	24 %
低カルシウム血症						
低カルシウム血症	25/27	93 %	31/35	89 %	56/62	90 %
症状を伴う低カルシウム血症	24/27	89 %	30/35	86 %	54/62	87 %
副甲状腺機能低下症	18/21	86 %	22/28	79 %	40/49	82 %
特徴的な顔貌						
前額の突出	20/22	91 %	21/22	95 %	41/44	93 %
小眼症	10/14	71 %	19/27	70 %	29/41	71 %
小顎症	19/25	76 %	16/22	73 %	35/47	74 %
歯の異常	11/13	85 %	14/17	82 %	25/30	83 %
相対的大頭	2/16	13 %	18/19	95 %	20/35	57 %
小頭	16/18	89 %	14/17	82 %	30/35	86 %
眼の異常	21/27	78 %	32/36	89 %	53/63	84 %
遠視	7/20	35 %	24/30	80 %	31/50	62 %
斜視	21/27	78 %	32/36	89 %	53/63	84 %
その他						
貧血	5/9	56 %	8/19	42 %	13/28	46 %

(文献に他の報告症例を加えて作成)

群である¹⁾。新生児期から低カルシウム血症により痙攣を起し、成長障害を伴うため著明な低身長を呈する。さらに KCS1 型は、小頭を呈し精神運動発達遅滞を伴うことが多い。一方で、KCS2 型は相対的に大頭を呈し精神運動発達遅滞を伴わないことが多い。これまでに文献上 KCS として報告された症例に認められた主要な臨床症状について表 1 にまとめた²⁾。

KCS の臨床症状の中でも、低身長はほぼ全員に認められる症状である(表 1)。四肢短縮を伴う軟骨無形成症などと違い KCS では均整の取れた低身長を示すことが特徴であり、成人身長

は、121-152 cm と報告されている³⁾。成長障害は、子宮内発育遅延として胎内から生じる症例もいれば、出生時の身長、体重は正常範囲内で、その後徐々に成長障害が進行して、1歳過ぎから著明な成長障害を認めるものもある。KCS1 型では子宮内発育遅延が 85% 存在し、出生前から成長障害がみられ、出生後も成長障害が進行するのが特徴の一つであるのに対して、KCS2 型では子宮内発育遅延は 29% しか存在せず、出生後から成長障害がみられるのが特徴の一つである。さらに KCS1 型の方が成長障害の程度が強いとされている。図 1 に KCS2 型の男児例

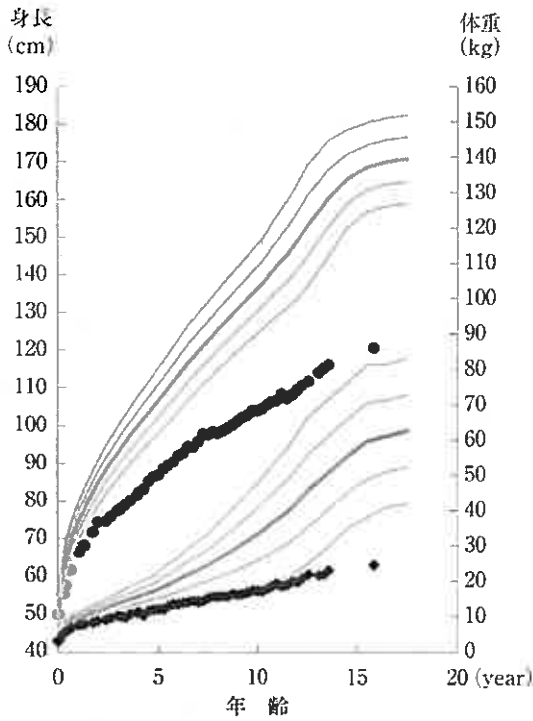


図1 Kenny-Caffey症候群2型男児の成長曲線
1歳過ぎからの著明な成長障害が認められる。

の成長曲線を示す⁹⁾。児は、出生時体重2.882g (-0.4SD)、出生時身長50.0cm (0.5SD)であったが、その後成長障害が進行して16歳で120.6cm (-8.2SD)と著明な成長障害を認めている。

低カルシウム血症については、新生児期から低カルシウム血症による痙攣を起こすものが多い(87%、表1)。また、多くの場合には、低カルシウム血症、高リン血症のときに、副甲状腺ホルモンが低値または同定できないことが多く、低カルシウムの原因は副甲状腺機能低下症であると考えられている。さらに、KCS症例の剖検例では、副甲状腺は同定されなかったことから、KCSの副甲状腺機能低下症は副甲状腺の形成障害によると想定されている¹⁰⁾。画像所見として、頭部CTにおいて副甲状腺機能低下症に伴う大脳基底核の石灰化を認めることもある(図2)。しかしながら、副甲状腺機能低下症や低カルシウム血症が指摘されたことのない症例も存在する⁹⁾。また、軽度の低マグネシウム血症を伴うことが多く¹¹⁾、二次的な副甲状腺機能低下



図2 Kenny-Caffey症候群に認められた大脳基底核の石灰化

症も疑われている。様々な程度の低カルシウム血症は、KCSの大きな特徴であり診断上重要な所見であるが、その詳細な機序については、まだ正確にはわかっていない。

KCSの診断において骨の単純X線写真での所見は重要である。図3にKCS症例に認められた骨単純X線像を示す。KCSでは大泉門の閉鎖の遅延を認めるため図3-aに示すように、2歳を超えても大泉門が開大していることが多い。この特徴は相対的な大頭を示すKCS2型では93%とよく認められるが、小頭を示すKCS1型では20%とKCS2型に比べて少ない。図3-bにみられるような頭蓋冠の板間層欠失は、KCS1型にも2型にも特徴的な所見である。さらに、KCSの骨単純X線像上最も特徴的なのは、図3-c、dに示すように、長管骨の骨膜肥厚と髄質の狭小化である。この所見は、長管骨の中心部において特に顕著に認められるが、骨端、骨幹端では普通は認められない。骨の成熟そのものは問題ないとされ、骨年齢は遅れるものもあれば、年齢相応のものも存在する。



図3 Kenny-Caffey 症候群に認められた単純X線像

- a. KCS 症例9歳時の単純X線像であるが、大泉門は閉鎖していない。
 b. 頭蓋冠の板間層欠失が認められる。
 c, d. 長管骨における骨膜肥厚と髄質狭小化が認められる。

特徴的な顔貌も KCS の特徴の一つである。具体的には、前額の突出、小眼症、小顎症、歯の異常を伴うことが多く、前述のとおり KCS1 型では小頭症を、KCS2 型では相対的大頭症を伴うことが多い。過去の文献で報告された KCS1 型と考えられる症例と KCS2 型と考えられる症例について、それぞれ図 4-a', b' に示す。

眼の異常については、最初の母子例では近視と報告されたが、その後再検査したところ遠視であったと報告された。KCS では小眼球症による遠視を認めることが多く、偽性乳頭浮腫を認

めることもある。そのほかにも、帯状角膜症、両側視神経萎縮、閉塞性緑内障、弱視などが報告されている。

その他の症状としては、貧血、肝機能障害、男性の性腺機能低下症、免疫能の異常などが挙げられる。貧血については表 1 に示すとおり 46% と比較的よく報告されている。髄質の狭小化と関係あるのかは不明であるが、鉄欠乏性貧血が特徴的とされている¹⁾。肝機能障害については、原因は不明であるが、症例報告が散見される。性腺機能低下症については、KCS 男児に

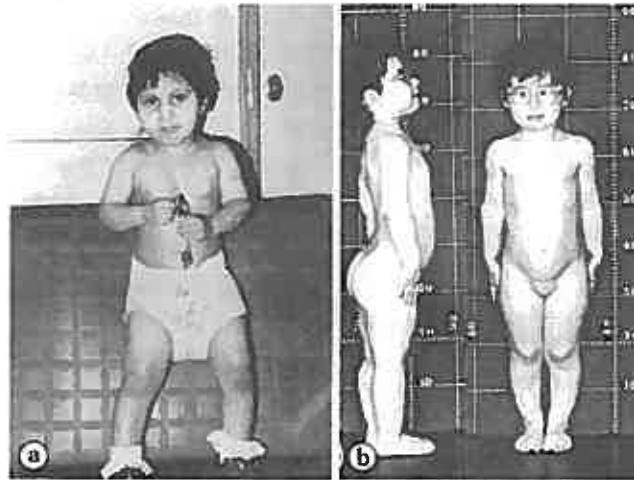


図4 Kenny-Caffey症候群の報告例

a. KCS1型(文献¹⁾より引用). b. KCS2型(文献²⁾より引用).
均整のとれた低身長、眼の異常、特徴的な顔貌を認める。

において、精巣が小さいことが報告されている¹⁾。KCSは希少疾患のため確定は難しいが、これまでKCS母子例は報告されているが、父子例は報告されておらず、男性の性腺機能低下症は存在しそうである。一方で、最初に報告された母子例において、母は3回妊娠して、2人の児を産んでおり、現在のところ女性において性腺機能低下症はないと考えられている。免疫能の異常については、KCS1型でよくみられる症状であり、繰り返す細菌感染症が特徴的で液性免疫の異常が想定されるが、細胞性免疫の異常の報告もある。

2. KCSと類縁疾患

KCS1型と hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism (HRD) 症候群は、1998年にクウェートの近親婚の8家系の連鎖解析から原因遺伝子が常染色体1q42-43にあることが報告され、2002年に tubulin chaperone E (TBCE) 遺伝子が原因であることが明らかにされた¹²⁾。多くの症例においてエクソン2の12塩基欠失が認められている。TBCEは、 α チューブリンを折りたたみ、 α - β チューブリンヘテロダイマーを形成するのに必要なシャペロンタンパクであるが、KCS1型およびHRD症候群の発症機序は

ほとんどわかっていない。

KCS2型は、文献上報告数も少ないこともあり、長年の間原因が不明であった。2013年にスイスのグループと日本のグループがそれぞれ独立した研究により、KCS2型の原因が *FAM111A* 遺伝子の *de novo* の変異が原因であると報告した¹³⁾。さらに、2つの研究で明らかになった *de novo* 変異は、解析された9人中8人が全く同じ変異 (R569H) であり、この変異がKCS2型のホットスポットであることも同時に判明した。さらに、*FAM111A* 遺伝子は、子宮内発育遅延、著明に細い長管骨、頭蓋骨の骨化不全、顔面形成異常、脾臓の無形成を伴う予後不良の症候群である gracile bone dysplasia (osteocraniosynostosis) の原因であることも報告された¹⁴⁾。*FAM111A* 遺伝子は、全身に発現する611個のアミノ酸からなる遺伝子で、C末端にトリプシン様ペプチダーゼ相同領域をもつことが知られているが、*FAM111A* の機能についてはほとんどわかっていない。ホットスポットであるR569は、種族間であまり保存されていない場所であり、さらに興味深いことに同じ場所におけるミスセンス変異 (R569C) のSNPが1000ゲノムプロジェクトにおいて報告されていた。*In silico* 解析ではR569Hは、*FAM111A* の機能

に影響がないという予測であり、さらに、real time PCR法を用いた研究では、患者の白血球におけるFAM111Aの発現はコントロールと比較して差を認めなかった¹¹⁾。これらのことから、KCS2型はFAM111Aの変異により疾患を生じるのは、FAM111Aそのものの機能が直接失われるのではなく、特定の変異により特異的な機能異常が起こるためと推定されている。KCS1型の原因遺伝子が発見されてから10年以上経過したが、その発症機序についてはほとんどわかっていないが、FAM111Aとの関連において研究が進むことが期待されている。

劣性遺伝形式のHRD症候群の中には、TBCE遺伝子変異を伴わないものが存在し別の原因遺伝子の存在が示唆されている¹²⁾。一方で、著明な低身長で原因のわからない児を対象としてエクソームシーケンスを行ったところFAM111A

遺伝子の変異が同定されKCSと診断がついた報告も存在する¹³⁾。現在のところ、TBCE遺伝子、FAM111A遺伝子変異が原因のKCS、HRD症候群、gracile bone dysplasiaがKCSおよびKCS類縁疾患と考えられるが、今後KCSの新しい原因遺伝子が同定されれば、さらに類縁疾患が増える可能性がある。また、原因不明の低身長症や原因不明の副甲状腺機能低下症の児の中にも、TBCE遺伝子やFAM111A遺伝子の変異が見つかる可能性もある。

おわりに

KCSとKCS類縁疾患について概説した。ゲノム解析技術の進歩によって、KCSの原因遺伝子が判明したことにより、今後は原因遺伝子に基づいた症候群の理解が深まっていくものと考えられる。

■ 文 献

- 1) Kenny FM, Linarelli L: Dwarfism and cortical thickening of tubular bones: transient hypocalcemia in a mother and son. *Am J Dis Child* 111: 201-207, 1966.
- 2) Caffey JP: Congenital stenosis of medullary spaces in tubular bones and calvaria in two proportionate dwarfs, mother and son, coupled with transitory hypocalcemic tetany. *Am J Roentgen Radium Ther Nucl Med* 100: 1-11, 1967.
- 3) Moussaid Y, et al: Oral manifestations of patients with Kenny-Caffey syndrome. *Eur J Med Genet* 55: 441-445, 2012.
- 4) Larsen JL, et al: Unusual cause of short stature. *Am J Med* 78: 1025-1032, 1985.
- 5) Isojima T, et al: A recurrent de novo FAM111A mutation causes Kenny-Caffey syndrome type 2. *J Bone Miner Res* 29: 992-998, 2014.
- 6) Boynton JR, et al: Ocular findings in Kenny's syndrome. *Arch Ophthalmol* 97: 896-900, 1979.
- 7) Parvari R, et al: Parathyroid development and the role of tubulin chaperone E. *Horm Res* 67(1): 12-21, 2007.
- 8) Guo MH, et al: Whole exome sequencing to identify genetic causes of short stature. *Horm Res Paediatr* 82: 44-52, 2014.
- 9) Fanconi S, et al: Kenny syndrome: Evidence for idiopathic hypoparathyroidism in two patients and for abnormal parathyroid hormone in one. *J Pediatr* 109: 469-475, 1986.
- 10) Tahseen K, et al: Kenny-Caffey syndrome in six Bedouin sibshils: autosomal recessive inheritance is confirmed. *Am J Med Genet* 69: 126-132, 1997.
- 11) Hoffman WH, et al: Kenny-Caffey syndrome and microorchidism. *Am J Med Genet* 80: 107-111, 1998.
- 12) Parvari R, et al: Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome. *Nat Genet* 32: 448-452, 2002.
- 13) Unger S, et al: FAM111A mutations result in hypoparathyroidism and impaired skeletal development. *Am J Hum Genet* 92: 990-995, 2013.
- 14) Courtens W, et al: Hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism syndrome in a girl: A new variant not caused by a TBCE mutation-clinical report and review. *Am J Med Genet* 140A: 611-617, 2006.

RESEARCH ARTICLE

Detection of Hereditary 1,25-Hydroxyvitamin D-Resistant Rickets Caused by Uniparental Disomy of Chromosome 12 Using Genome-Wide Single Nucleotide Polymorphism Array

Mayuko Tamura¹, Tsuyoshi Isojima¹, Minae Kawashima², Hideki Yoshida³, Keiko Yamamoto⁴, Taichi Kitaoka⁴, Noriyuki Namba⁴, Akira Oka¹, Keiichi Ozono⁴, Katsushi Tokunaga², Sachiko Kitanaka^{1*}

1 Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan,

2 Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan,

3 Department of Pediatrics, North Medical Center, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Japan,

4 Department of Pediatrics, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

* sachi-ky@umin.ac.jp



OPEN ACCESS

Citation: Tamura M, Isojima T, Kawashima M, Yoshida H, Yamamoto K, Kitaoka T, et al. (2015) Detection of Hereditary 1,25-Hydroxyvitamin D-Resistant Rickets Caused by Uniparental Disomy of Chromosome 12 Using Genome-Wide Single Nucleotide Polymorphism Array. *PLoS ONE* 10(7): e0131157. doi:10.1371/journal.pone.0131157

Editor: Klaus Brusgaard, Odense University Hospital, DENMARK

Received: January 31, 2015

Accepted: May 31, 2015

Published: July 8, 2015

Copyright: © 2015 Tamura et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data except for SNP array data are within the paper and its Supporting Information files. Although we could not obtain informed consent for depositing SNP array data, the de-identified participant-level dataset is available upon request to corresponding authors, and with an appropriate approval of human genomic DNA research ethics committee of institutions to which researchers involved in the data analyses belong. A minimized, anonymous dataset can be provided on request to any researcher.

Abstract

Context

Hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D-resistant rickets (HVDRR) is an autosomal recessive disease caused by biallelic mutations in the vitamin D receptor (VDR) gene. No patients have been reported with uniparental disomy (UPD).

Objective

Using genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) array to confirm whether HVDRR was caused by UPD of chromosome 12.

Materials and Methods

A 2-year-old girl with alopecia and short stature and without any family history of consanguinity was diagnosed with HVDRR by typical laboratory data findings and clinical features of rickets. Sequence analysis of *VDR* was performed, and the origin of the homozygous mutation was investigated by target SNP sequencing, short tandem repeat analysis, and genome-wide SNP array.

Results

The patient had a homozygous p.Arg73Ter nonsense mutation. Her mother was heterozygous for the mutation, but her father was negative. We excluded gross deletion of the father's allele or paternal discordance. Genome-wide SNP array of the family (the patient and her parents) showed complete maternal isodisomy of chromosome 12. She was successfully treated with high-dose oral calcium.

Funding: This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from Japan Society for the Promotion of Science (to T.I. and S.K., grant number 23591489), and for Research on Intractable Diseases from the Ministry of Health, Labor and welfare (to K.O.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions

This is the first report of HVDRR caused by UPD, and the third case of complete UPD of chromosome 12, in the published literature. Genome-wide SNP array was useful for detecting isodisomy and the parental origin of the allele. Comprehensive examination of the homozygous state is essential for accurate genetic counseling of recurrence risk and appropriate monitoring for other chromosome 12 related disorders. Furthermore, oral calcium therapy was effective as an initial treatment for rickets in this instance.

Introduction

Hereditary 1,25-dihydroxyvitamin D ($1,25[\text{OH}]_2\text{D}$)-resistant rickets (HVDRR) (OMIM #277440), also known as vitamin D-dependent rickets type 2A (VDDR 2A), is a rare disorder characterized by early onset rickets, hypocalcemia, and secondary hyperparathyroidism, and alopecia when severe [1]. Patients with HVDRR have high circulating levels of $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, and are resistant to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ treatment. Elevated $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ levels differentiate HVDRR from 1α -hydroxylase deficiency, which is known as vitamin D-dependent rickets type 1A [2].

HVDRR is caused by mutations in the vitamin D receptor (VDR) gene on chromosome 12q13.11 [3]. HVDRR shows autosomal-recessive inheritance and the patients usually have biallelic mutations in the VDR inherited from each parent. Because of the rarity of the disease, most cases arise in consanguineous families and have homozygous mutations [4]. VDR is a member of the steroid/nuclear receptor superfamily of ligand-activated transcription factors, and it is composed of an N-terminal DNA binding domain (DBD) and a C-terminal ligand-binding domain (LBD) [5]. Patients with a mutation in the DBD usually show severe vitamin D resistance associated with alopecia [6], whereas those with a mutation in the LBD show various degrees of vitamin D unresponsiveness and can occasionally respond to high-dose vitamin D. Patients with alopecia showing resistance to high-dose vitamin D therapy usually require intravenous calcium infusions to treat clinically overt rickets at their first presentation [6].

Some recessive disorders have been reported to be caused by uniparental disomy (UPD) of a single parent allele with a mutation [7]. UPD refers to a condition in which both homologues of a chromosomal region or segment are inherited from only one parent. To date, most cases of UPD have been found in imprinting diseases such as Prader-Willi syndrome, and the incidence of UPD of any chromosome is estimated to be as frequent as 1 per 3,500 live births [8,9]. Conversely, UPD causing recessive diseases have only been reported in a limited number of cases. Moreover, no cases have been reported in HVDRR and complete isodisomy of chromosome 12 is extremely rare [7,10,11].

In this report, we used genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) array analysis to determine whether HVDRR was caused by UPD of chromosome 12. Furthermore, we observed the effectiveness of high oral calcium therapy for the treatment of rickets in this severe HVDRR patient.

Materials and Methods

Clinical case

A 2-year 1-month-old girl presented to hospital with fever, at which point she was noted to have short stature, alopecia (Fig 1), and gait instability. Her parents were non-consanguineous



Fig 1. Alopecia and Rickets in the Proband at Presentation. (A) Alopecia. (B,C) A bone roentgenogram of the arm (B) and legs (C) showing cupping, fraying, and flaring at the end of the long bones.

doi:10.1371/journal.pone.0131157.g001

and approximately 30 years old when she was born. She had no family history of rickets or unresolved pain. Her mother got a natural conception, and the pregnancy and delivery was uneventful. Her birth weight was 2,868 g (-0.8 standard deviations [SD]), birth length 51 cm (+0.6 SD), gestational age 41 weeks. She had no episode of convulsion and her psychomotor development was normal until she started walking alone at 1 year 3 months of age, but she could not run by age 2. Her body height at presentation was 74.8 cm (-3.5 SD), and her body weight, 9.7 kg (-1.2 SD). She had symptoms of rickets such as bow-legs and enlargement of the limb joints, but had no other external malformation, dysmorphic features, or ataxia. Her verbal developmental quotient (DQ) was 81 and cognitive DQ 94.

Laboratory data revealed hypocalcemia (7.7; reference: 8.5–10.5 mg/dL), hypophosphatemia (3.0; reference: 4.5–6.5 mg/dL), markedly elevated levels of serum alkaline phosphatase (8,891; reference: 300–1,239 IU/L), and intact parathyroid hormone (PTH) levels (576; reference: 10–65 pg/mL). Her serum 1,25(OH)₂D level was high (137; reference: 20–70 pg/mL) with a normal 25(OH)D level (20.1 ng/mL). Serum levels of fibroblast growth factor 23 (FGF23) were

low (<10 pg/mL), and a bone roentgenogram showed characteristic findings of rickets (Fig 1). From these findings, she was clinically diagnosed as having HVDRR.

VDR gene analysis

We obtained written informed consent for DNA analysis from the parents, and the Ethics Committee of The University of Tokyo approved the study. Genomic DNA was extracted from peripheral white blood cells of the patient and parents using a QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The entire coding region and exon-intron boundaries of the *VDR* were amplified from the genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) using the specific primers (S1 Table). PCR products were subsequently sequenced using an ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) and the forward and reverse primers from the PCR amplification. Direct sequencing in both directions was performed on an autosequencer (PE Applied Biosystems 3130x1, Genetic Analyzer).

Analysis of common gene polymorphisms

Common SNPs in the *VDR* (rs10735810, rs7975232, rs2853562, rs731236, rs12717991), other genes on chromosome 12 (rs2259820, rs2464196, rs1169289, rs1169288, rs1169301, rs1169304, rs10877012), and other chromosomes (rs4588, rs7041, rs116930, rs1155563, rs2060793, rs3829251, rs6013897, rs6599638, rs10741657, rs12785878, rs17217199) were analyzed by sequencing the PCR products as previously reported [12,13]. Short tandem repeat (STR) analysis was performed using AmpFLSTR Identifiler kit (Identifiler, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), which included 16 STR markers (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, Amelogenin, D5S818, and FGA), according to the manufacturer's protocol.

Genome-wide SNP array

Using of the Affymetrix Axiom ASI 1 array (Affymetrix, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions, we genotyped a total of 600,307 SNPs for the three individuals. Genotype calls were determined using the Genotyping Console 4.1.4 software with the Birdseed v2 algorithm provided by the manufacture. In addition to data from the patient and her parents, we also used 474 Japanese individuals to ensure reliable genotype calling. Signal intensities for alleles A and B were observed by using Affymetrix Power Tools [14]. B allele frequency was calculated by using of the intensities of both alleles: $BAF = B / (A + B)$.

Results

Identification of the *VDR* mutation

Sequencing the *VDR* in the patient revealed a single homozygous base pair substitution, c.217C>A (Fig 2A). This substitution was predicted to result in a nonsense mutation p.Arg73-Ter, which is a premature stop codon in the DBD (Fig 2B). This mutation has been reported in 5 other patients with HVDRR and is functionally inactive [15–18]. From these findings, we considered that HVDRR in this patient was caused by a homozygous nonsense mutation in the *VDR*.

Analysis of the genesis of homozygosity

Most cases of homozygosity among rare mutations are caused by consanguinity, but the parents in this case denied consanguinity; therefore, we performed a genetic analysis of the parents. The mutation was heterozygous in the mother only, and was not present in the father (Fig 2A).

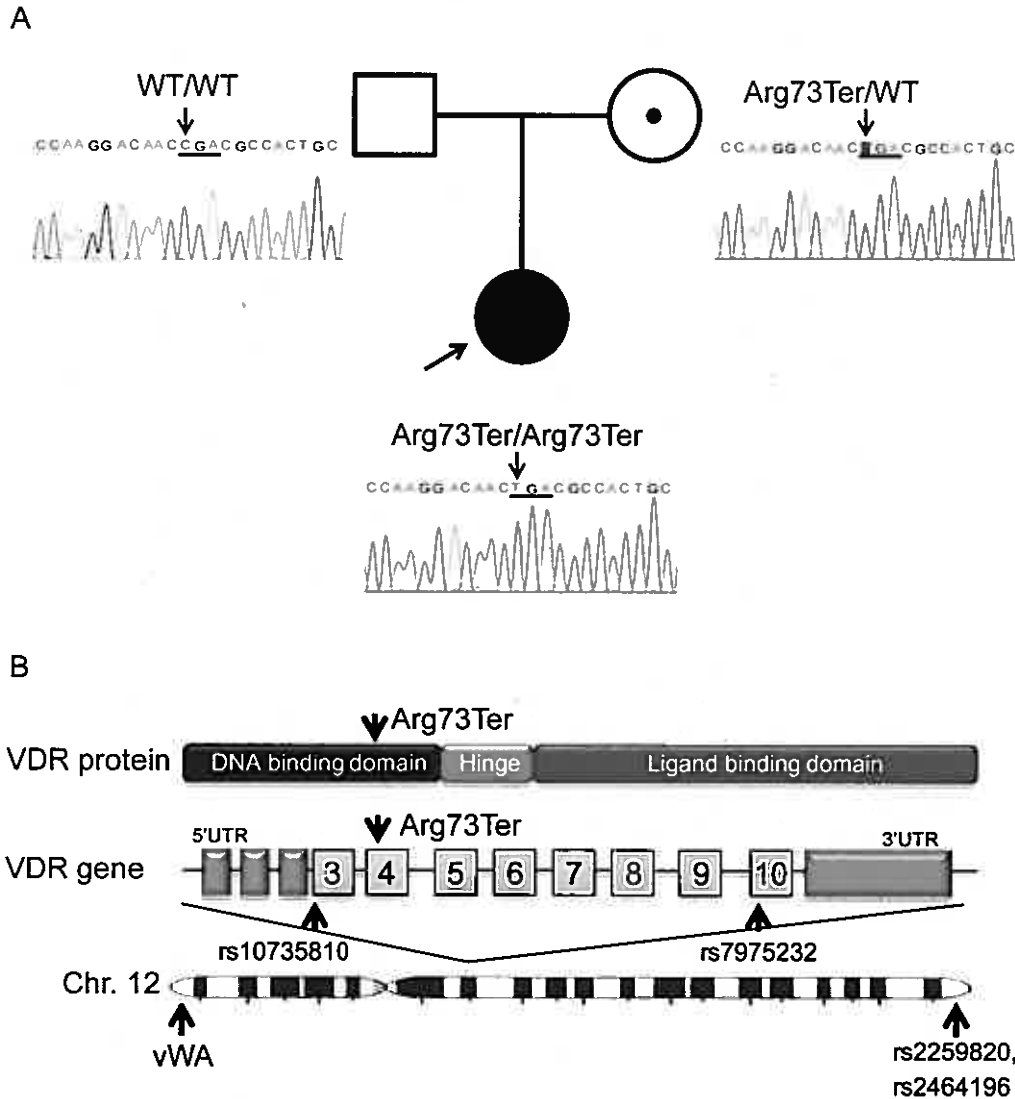


Fig 2. VDR Analysis of the Proband and her Parents, with the Position of the Target SNPs on Chromosome 12. (A) Proband pedigree with chromatograms of the VDR mutation. The VDR analysis showed a homozygous Arg73Ter mutation in the proband, a heterozygous mutation in the mother, and no mutation in the father. Mutations were checked by bidirectional sequencing. A black symbol indicates the proband, a dot symbol indicates a carrier, a square indicates a male, and a circle indicates a female. (B) Diagram of the VDR protein and gene, and chromosome 12 with positions of the mutation and the sequence-analyzed SNPs. The nonsense mutation, Arg73Ter, is located in the DNA binding domain of the VDR protein in exon 4. The indicated common SNPs were analyzed in the family; vWA indicates the position of a marker included in the STR analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0131157.g002

To assess the possibility of a gross deletion around the mutation in the father's allele, we sequence-analyzed several common target SNPs in the VDR, in other genes on chromosome 12, and in other chromosomes studied in our laboratory. Table 1 shows the results of the SNPs which identify the parental origin of the proband's allele. Two SNPs in the VDR, one near the mutation (rs10735810) and another within approximately 20 kb (rs7975232) (Fig 2B), demonstrated homozygous alleles in the proband that were derived only from the mother (Table 1). Moreover, another 2 SNPs located at the opposite end of the long arm of chromosome 12

Table 1. Sequence Analysis of the Common Target SNPs that Could Identify Parental Origin.

Gene	SNP	Location	Proband	Father	Mother
VDR	rs10735810	12q13.11	CC	TT	CT
VDR	rs7975232	12q13.11	GG	TT	GG
HNF1A	rs2259820	12q24.31	CC	TT	CC
HNF1A	rs2464196	12q24.31	GG	AA	GG
NADSYN1	rs3829251	11q13.4	GA	GG	AA
GC	rs7041	4q13.3	TG	TG	GG
GC	rs1155563	4q13.3	CT	CC	TT

doi:10.1371/journal.pone.0131157.t001

(rs2259820, rs2464196) (Fig 2B) were also homozygous and derived only from the mother. However, SNPs on chromosomes 4 and 11 showed a normal pattern of allele inheritance from the parents. These results indicated that at least the long arm of chromosome 12 consists of alleles derived only from the mother. G-banding karyotype analysis of the proband revealed a normal 46,XX karyotype without monosomy of 12q. These findings suggested that gross deletion of the father's allele was unlikely.

Next, we assessed the biological paternity by conventional STR analysis. STRs located on chromosomes other than 12 confirmed that the father was the biological father. Interestingly, the STR of a gene located on the short arm of chromosome 12 (vWA; 12p12-pter) showed a homozygous maternal allele (proband 19; father 14, 16; mother 16, 19). Taken together, these findings eliminated the possibility of a gross deletion and paternal discordance, and suggested that *de novo* mutation was unlikely. Finally, maternal UPD of the entire chromosome 12 was suggested.

Detection of UPD by genome-wide SNP array

For the evaluation of UPD, we conducted a genome-wide SNP array of the proband and the parents. The overall call rates were 99.47%, 99.64%, and 99.57% for the proband, the father, and the mother, respectively. All chromosomes other than chromosome 12 showed a normal homo/heterozygous pattern. There were 29,197 SNPs on chromosome 12 on the array, of which 13,940 SNPs showed multiple genotypes among the trio of samples (proband, mother, and father). The proband was called homozygous for 13,848 SNPs and heterozygous for 92 SNPs; however, we found that these heterozygous SNPs were miss-calls caused by the genotype calling algorithms, and the proband was considered homozygous for all SNPs on chromosome 12. After linkage disequilibrium pruning (LD pruning) with 474 samples, a total of 8,933 SNPs remained [19,20], except for bad clusters. Fig 3 shows the B allele frequencies for chromosome 12, which represents the distribution of each proband, maternal, and paternal allele. On chromosome 12, the allele segregation revealed to be composed of only homozygous AA and BB combinations, and no AB combinations (loss of heterozygosity). Allele segregation of chromosome 12 showed a heterozygous pattern in her parents. In the proband's diagram, the pink spots represent the maternal SNPs (1,514 SNPs) and the blue spots, paternal (none) (Fig 3). It was obvious that all of the homozygous SNPs on chromosome 12 derived from the mother. Moreover, the 2 alleles in the proband were 100% identical to those in the mother by identical-by-descent analysis, whereas none were identical to those in the father [21]. The signal intensity of chromosome 12 was sufficient to conclude that the chromosome was diploid, compared with other chromosomes. Thus, we concluded that the proband had complete maternal uniparental isodisomy of chromosome 12 with a nonsense mutation.

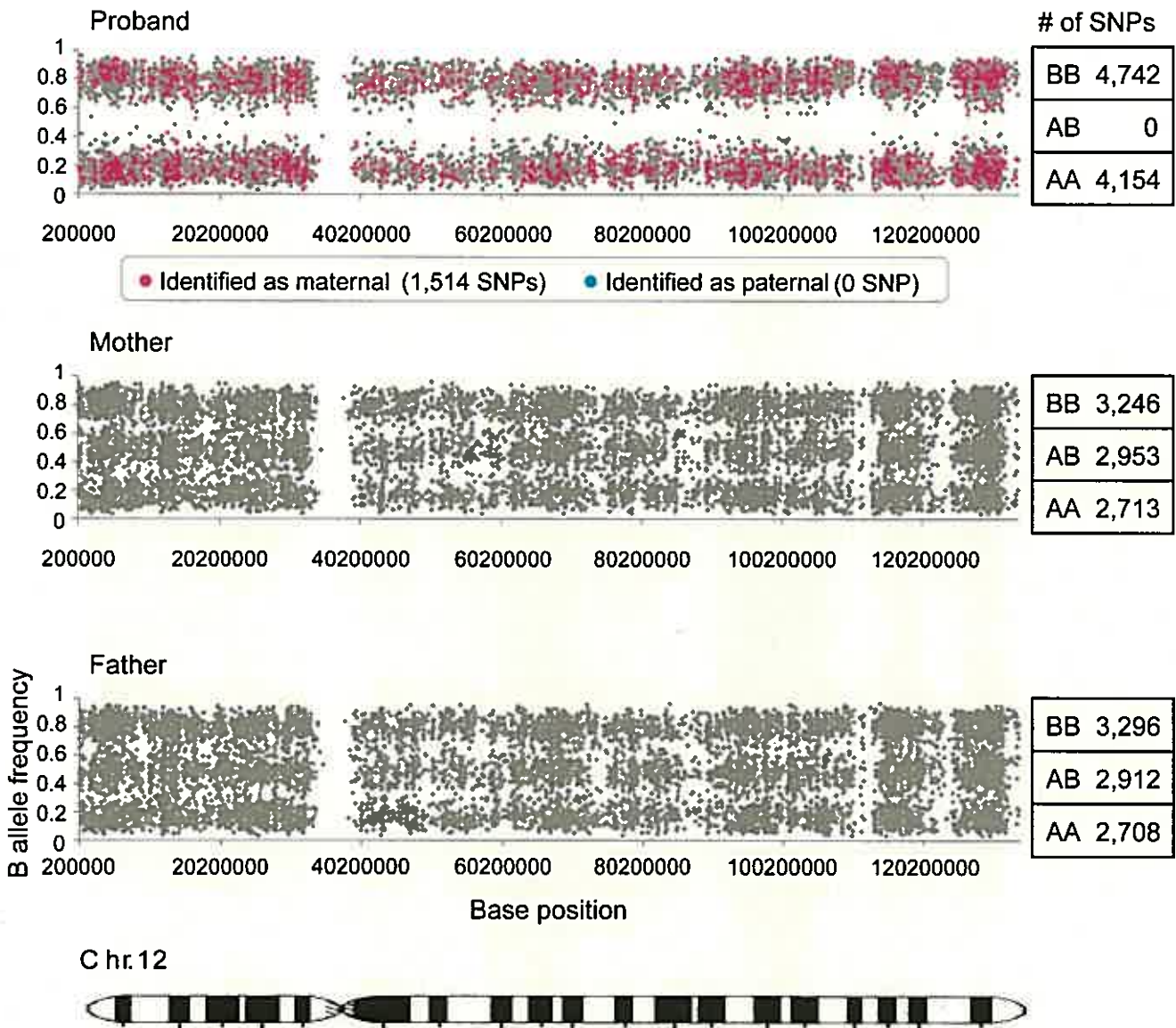


Fig 3. Genome-wide SNP Array Indicating Complete Maternal Isodisomy of Chromosome 12. B allele frequencies of chromosome 12 in the proband, the mother, and the father are shown. Allele segregation in the proband comprised AA (4,154 SNPs) and BB (4,742 SNPs) homozygotes only, and loss of heterozygosity (AB; 0 SNP). The parental allele segregation of chromosome 12 showed a heterozygous pattern. All other chromosomes had normal homo/heterozygous patterns. In the diagram for the proband, the pink spots (1,514 SNPs) represent SNPs identified as maternal, with no evidence of paternal SNPs (which would be blue).

doi:10.1371/journal.pone.0131157.g003

Clinical course

Initial treatment with increasing amounts of alfacalcidol up to 5 µg/kg/day with oral calcium 60 mg/kg/day failed to improve her symptoms. After detecting the *VDR* mutation, she was admitted to another hospital for further treatment. After increasing her oral elemental calcium (calcium lactate) dose to 300 mg/kg/day (divided 3 times), her serum calcium and PTH levels improved (Fig 4A). The oral calcium was subsequently reduced to 240 mg/kg/day when high

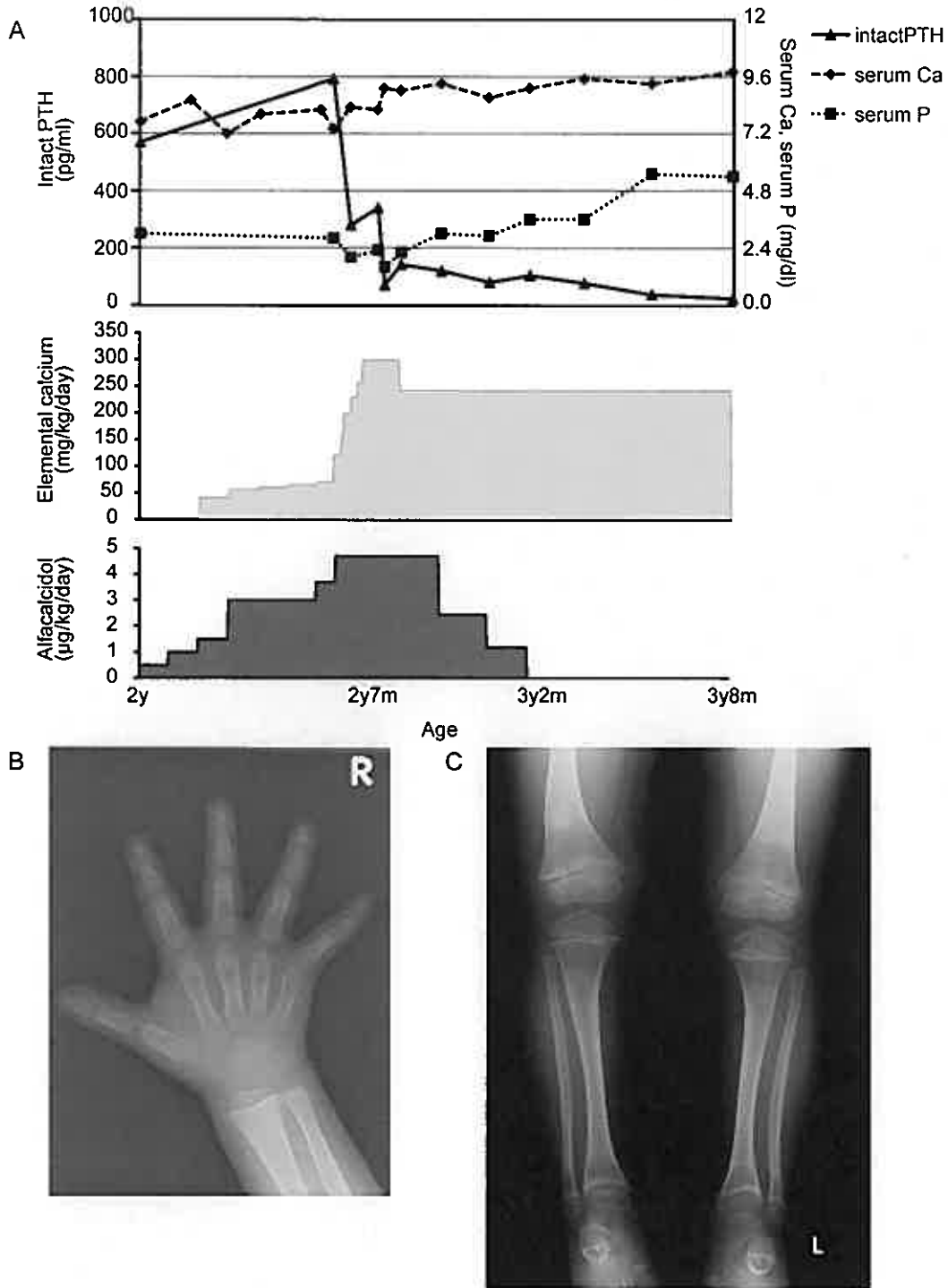


Fig 4. After Treatment with High-dose Oral Calcium Supplementation. (A) Treatment course and laboratory data are shown. (B) Bone roentgenogram at 3 years and 8 months of age, showing markedly improved signs of rickets.

doi:10.1371/journal.pone.0131157.g004