

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

後藤大輝

論文題目

鎖骨頭蓋骨異形成の分子遺伝学的解析

## I. 緒言

鎖骨頭蓋骨異形成は全身の骨形成異常を有する疾患で、約 20 万人に 1 人の割合で発症する常染色体優性遺伝の疾患である。臨床症状として全身の骨格異常の他に、口腔内にも多くの症状を呈することから、医科的関与に加えて歯科としての専門的な対応が必要となる。鎖骨頭蓋骨異形成の責任遺伝子は、Runt 関連転写因子 2 (RUNX 2) 遺伝子である。臨床症状に多様性を認め分子生物学的な発症機序は不明な点が多い。そこで、今回われわれは本症の発症に関与する分子作用機序を明らかにすることを目的に、本症を有する 5 症例を対象に原因遺伝子の検索と発症機構に関する分子生物学的な解析と文献的な考察を行ったので報告する。

## II. 対象および解析方法

### 1. 対象患者

愛知学院大学歯学部附属病院顎顔面外科学講座、及びその協力施設を受診し臨床的に鎖骨頭蓋骨異形成の診断のなされている患者のうち、愛知学院大学歯学部ヒト細胞組織遺伝子疫学情報倫理委員会の承認 (No. 58) に基づきインフォームド・コンセントが得られた 5 家系を対象とした。

### 2. 遺伝子変異の検索

#### 1) ゲノム DNA の抽出

抗凝血処理された血液 10 mL から DNA 採取キット (PAXgene Blood DNA Kit, PreAnalytiX)、また採血不可能な患者に対しては唾液 2 mL から DNA 採取キ

ット (Oragene, DNA Genotek) を用いてそれぞれのプロトコールに従い DNA 抽出を行った。

## 2) DNA 断片の増幅

ゲノム DNA 20 ng を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。検出された RUNX 2 の塩基置換領域を増幅範囲に含めるようにプライマーを設計した。Taq ポリメラーゼは LA-Taq (Takara) を使用し、PCR 増幅には PCR Thermal Cycler Dice (Takara) を用いた。PCR 産物は 1.5% アガロースゲルを使用して電気泳動を行い、増幅 DNA をバンドとして検出し、目的のバンドをアガロースゲルより切り出し、DNA 精製キット FAST Gene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティックス) を使用して精製した。

## (2) ダイレクトシーケンス法による塩基置換の確認

精製した PCR 産物に蛍光塩基付加溶液 (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit, Applied Biosystems) を添加後、シーケンス反応を行った。反応後、自動シーケンサー (ABI PRISM 3130, Applied Biosystems) を用い塩基配列を決定した。解析には塩基配列解析ソフトウェア (SnapGene ver. 3.2.1, GSL Biotech LLC) を用いて GenBank データベースと比較を行った。

## 3. 変異タンパク質の機能解析

### 1) 変異型 RUNX 2 タンパク質発現ベクターの構築

変異型 RUNX 2 より得られた異常タンパク質の機能解析を行うことを目的

として、RUNX 2 タンパク質発現ベクターを構築した。RUNX 2 野生型遺伝子及び RUNX 2 変異型遺伝子を FLAG タグで標識して、サイトメガロウイルス由来のプロモーターを有する哺乳類発現ベクター (pcDNA3; Plasmid Cyclic DNA, Invitrogen) に組み込んだ。大腸菌コンピテントセルを用いて作製したプラスミドを形質転換した。培養後、精製用キット Plasmid Midi Kit (QIAGEN) を用いて核酸を抽出した。

## 2) ウェスタンブロッティング

変異体 RUNX 2 タンパク質の核内における発現及び、生成されたタンパク質の相対分子量を野生型 RUNX 2 タンパク質と比較する為にウェスタンブロット解析を行った。細胞質タンパク質及び核タンパク質を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。そして抗 FLAG・M2 モノクローナル抗体を使用して一次抗体反応を行った後、HRP 含有の二次抗体と反応させた。ウェスタンブロット検出用化学反応試薬と反応後、X 線フィルムに露光しバンドを検出した。

## 3) 核局在性の解析

蛍光免疫染色を用い、野生型 RUNX 2 タンパク質と変異型 RUNX 2 タンパク質の細胞内局在性の比較を行った。蛍光免疫染色は抗 FLAG・M2 モノクローナル抗体を一次抗体として添加し、二次抗体として Cy3 標識抗マウス IgG ヤギ・モノクローナル抗体を使用した。蛍光顕微鏡 (Olympus BH-2 microscope, Olympus) で観察した後に、同一視野で得られた Cy3 及び DAPI

の2つの画像を画像解析ソフト(Photo Shop CS6 Adobe)を用い重ね合わせを行いタンパク質の核局在性を検討した。

#### 4) ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイ

変異体 RUNX 2 の転写活性を測定するために、RUNX 2 の転写活性を特異的に検出するレポーターベクター (p60SE2-luc) を用いた。ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイは、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) のプロトコールに従って行った。RUNX 2 結合プロモーター配列、RUNX 2 の発現ベクター (wild type、mutation) をそれぞれヒト胎児腎細胞由来細胞 (HEK293 細胞) に導入させ 24 時間後に細胞を採取し、発光量をルミノメーター (GENE LIGHT 55、ニチオン) にて測定した。

### III. 結果

#### 1. 遺伝子変異の検索

鎖骨頭蓋骨異形成の5症例うちの4症例に RUNX 2 遺伝子に c.90\_91insC、c.473C>T[A158E]、c.659C>T[T220I]、c.1056G>A[W352X]の変異を認めた。

1症例については RUNX 2 遺伝子のエクソン領域に変異を認めなかった。

c.473C>T[A158E]のミスセンス変異は新規の遺伝子変異であり、他の変異は過去に報告があった。

#### 2. 変異タンパク質機能解析の結果

##### 1) タンパク質発現の比較

ウェスタンブロットの結果、A158E 変異型タンパク質と野生型タンパク質

に顕著な差はみられなかった。この結果から A158E アミノ酸変異が起きてもタンパク質の発現、相対分子量には大きな差は無い事が示された。

## 2) 核局在性の比較

蛍光染色法の結果 A158E 変異型タンパク質も野生型と同様に核に局在を認め、野生型タンパク質と顕著な差はみられなかった。

## 3) 転写制御活性の比較

ルシフェラーゼ・レポーター・アッセイの結果、野生型 RUNX 2 タンパク質は反応させるタンパク質濃度依存的にルシフェラーゼの発現量が増加するものの、A158E を有する変異 RUNX 2 タンパク質ではルシフェラーゼの発現量に大きな変化を認めなかった。このことより、アミノ酸変異により RUNX 2 タンパク質の転写活性が低下していることが示された。

## IV. 考 察

### 1. RUNX 2 の機能と構造について

RUNX 2 は、未分化間葉系細胞を骨芽細胞系列に向かわせる分化決定因子であるとともに、骨格の発生において多くの機能を持つ転写因子である。RUNX 2 は正常な表現型のためには一定以上の発現量が必要と考えられている。ヒト RUNX 2 遺伝子は機能ドメインである RUNT ドメインは、ショウジョウバエの体節形成遺伝子 runt に高いホモロジーを持つ。本研究においても 1 症例は RUNT ドメイン前のフレームシフト変異で 2 症例は RUNT ドメイン内のミスセンス変異を生じており RUNT ドメイン内での変異がその疾患発生

について重要で有る事を示している。機能解析の結果から、A158E 変異は生成されるタンパク質の分子量および、核局在性は野生型 RUNX2 タンパク質との顕著な差は見られなかったが、転写活性の低下がみられた。これは、RUNT ドメインの微小な立体構造の変化が起こることで転写活性の低下につながったものと考えられる。また、1 症例については RUNX2 遺伝子のエクソン領域に変異を認めなかった。これは RUNX2 遺伝子の調節領域に変異が存在する可能性ないしは、別の調節系が関与している可能性が考えられる。

## 2. 鎖骨頭蓋骨異形成の表現型について

鎖骨頭蓋骨異形成は、多数の表現型があり、鎖骨の低形成や少数の過剰歯にとどまるものから重篤な全身骨格の異形成に至るものまで多岐にわたる。RUNT ドメイン内変異を持つ症例は比較的重度の表現型を示すことが多いが、A158E 変異は比較的軽微な表現型であった。この表現系の不一致は、2つの可能性が考えられる。過去の報告で同一家系内での表現型が大きく異なることもある。このことから表現型が、RUNX 2 上の調節領域または RUNX 2 と相互作用する他の遺伝子における突然変異によって引き起こされる可能性があること、もう一つは、A158E 変異は RUNT ドメインに存在しているが、RUNT ドメインは DNA に結合する上で、CBF  $\beta$  によって安定化される際に構造的な修復が行われる。そのため、生体内では生理学的な活性をいくらか回復し得る可能性があるため比較的軽度の表現型を呈した可能性が考えられる。

## V. 結 語

鎖骨頭蓋骨異形成 5 症例の RUNX 2 の遺伝子解析の結果、以下の結論を得た。孤発性の鎖骨頭蓋骨異形成 1 症例から、新規の Ara158Glu のアミノ酸置換を伴う遺伝子変異を発見した。さらに、これらのアミノ酸変異により、RUNX 2 転写抑制機能が低下することを生化学的に検証し、疾患との関連を説明できた。これら一連の研究結果は RUNX 2 の変異に起因する鎖骨頭蓋骨異形成の分子病理学の理解を深める知見である。しかし、本研究で発症の原因が同定できなかった多くの症例の病因探索や、既知の遺伝子変異の機能解析などが今後の重要な課題であると考えられる。