



Title	Novel mutations of the cathepsin K gene in patients with pycnodysostosis and their characterization
Author(s)	藤田, 良
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42578">https://hdl.handle.net/11094/42578</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ふじ 藤 田 よし 良
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 1 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Novel mutations of the cathepsin K gene in patients with pycnodysostosis and their characterization (濃化異骨症におけるカテプシンK遺伝子異常とその機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 秀樹  (副査) 教 授 越智 隆弘 教 授 米田 悦啓

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

濃化異骨症 (pycnodysostosis) は、骨硬化症、易骨折性を主病変とし、低身長、指趾末節骨末端の融解などを特徴とする常染色体劣性の遺伝形式を示す極めてまれな骨系統疾患である。1995年に linkage analysis により、本疾患の原因遺伝子が染色体の 1q21 の位置にあることが報告され、続いて1996年には、本疾患が破骨細胞に特異的に発現しているシステインプロテアーゼであるカテプシンK (CK) 遺伝子の変異によるものであることが報告された。我々は本邦における4例の pycnodysostosis 患者に対し CK 遺伝子の解析を行い、発見した新しい異常遺伝子について細胞生物学的機能解析を行った。

#### 【方法】

典型的な表現型を示す pycnodysostosis 4 症例について、患者末梢血から genomic DNA を抽出し、カテプシンK遺伝子の塩基配列を決定した。症例4については家族の解析も行った。同時に、コントロールとして正常80例についても解析を行った。新しいタイプの遺伝子異常を示した症例4においては、骨折部の仮骨および骨髓血より誘導した破骨細胞様細胞より RNA を抽出し、これらの RNA より RT-PCR 法により CK c-DNA を得て、塩基配列を決定した。

この症例4由来の変異を持つ CK-cDNA より PCR 法をもちいた点変異導入により正常 CK-cDNA を得て、両者に FLAG epitope tag をつけ、発現ベクター pcDNA3.1 に組み込んだ。これらを COS-7 細胞に強制発現させ、CKm-RNA 発現を RT-PCR 法により解析し、CK 蛋白発現を抗 FLAG 抗体を用いた免疫染色およびウエスタンブロッティングにより解析した。

#### 【成績】

遺伝子解析を行った4例全例にカテプシンK遺伝子変異を認めた。症例1では、ヌクレオチド935番のCがTへ変異しており、アミノ酸277番のアラニン (GCG) がバリン (GTG) へと変異していた。症例2と3では、ヌクレオチド531番のTが欠失しており、そこからフレームシフト変異がおこり、160番目のコドンがストップコドンとなっていた。症例4では、ヌクレオチド131番のCのTへの変異がみられた。これはシグナルペプチド部分の9番のロイシン (CCA) のプロリン (CTA) への変異にあたる。両親は変異型と正常型の heterozygous であり、妹は、正常型の homozygous であった。正常80例では、この変異は認められなかった。患者 CK-cDNA、正常 CK-cDNA 導入細胞

では、m-RNA の発現はいずれも認められたが、蛋白の発現は、正常カテプシンK導入細胞では免疫染色により細胞質に認められたが、患者CK-cDNA 導入細胞では発現が認められなかった。ウエスタンブロッティングにて、患者CK-cDNA を導入した細胞では、正常CK-cDNA を導入した細胞に比べ蛋白発現は著しく減少していた。

#### 【総括】

解析した4例は、それぞれカテプシンK遺伝子の異なる部位の異常を示したが、すべて臨床的には pycnodysostosis の典型例であった。この結果は、カテプシンKが pycnodysostosis の原因遺伝子であることを裏付けるものである。症例1は、過去に報告のある遺伝子異常であったが、症例2、3及び4は、今まで報告のない、新規の遺伝子異常であった。特に、症例4は、今まで全く報告のないカテプシンK のシグナルペプチド遺伝子の異常であった。

COS7を用いた強制発現実験により、症例4でみられたシグナルペプチド部分の遺伝子異常によりカテプシンK の m-RNA が発現されても、蛋白産生が障害されることが証明された。これは、シグナルペプチドの疎水性塩基配列による $\alpha$ -ヘリックス構造が、herical-breaking residue である Pro により破綻されるため、蛋白の小胞体内輸送が妨げられたことによると考えられる。このため、本症例ではカテプシンKの機能異常を来し、pycnodysostosis に至ったと考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

濃化異骨症 (Pycnodysostosis) は、極めて珍しい骨系統疾患のひとつであり、その原因遺伝子であるカテプシンKは、骨吸収を行ううえで最も重要な働きをされるとされるプロテアーゼである。本研究においては、日本における Pycnodysostosis (濃化異骨症) 患者の遺伝子解析が初めて行われ、3つの異なる遺伝子異常が同定され、そのうち2つは新規の遺伝子異常であった。この結果は、濃化異骨症 (Pycnodysostosis) が、遺伝学的に homogeneous な疾患であることを裏付けるものであった。

また、シグナルペプチド部分の hydrophobic core 部分にミスセンス変異を示した1例においては、培養細胞を用いた遺伝子導入実験が行われ、この変異が生じることにより m-RNA が合成されても蛋白合成が障害されることが証明された。

シグナルペプチド部分の遺伝子変異により起こった疾患の報告は数少なく、本研究により、シグナルペプチドの構造、機能を知るうえで、新たな知見が示されたといえる。

以上のことから、本研究は学位の授与に値すると考えられる。