

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

ホルモンと臨床 (2004.12) 52巻増刊:140~143.

【内分泌 興味ある症例】 SOX9遺伝子に新規変異を同定した  
campomelic dysplasiaの1例

岡本年男, 長屋建, 竹田津原野, 林時仲, 向井徳男, 藤枝  
憲二

SOX9 遺伝子に新規変異を同定した  
campomelic dysplasia の 1 例

岡本年男、長屋 建、竹田津原野、  
林 時仲、向井徳男、藤枝憲二

旭川医科大学医学部小児科学講座

Toshio Okamoto, Ken Nagaya, Genya  
Takedazu, Tokitsugi Hayashi, Tokuo Mukai,  
Kenji Fujieda: A novel mutation in SOX9  
gene in a case of campomelic dysplasia.

Department of Pediatrics, Asahikawa  
Medical Collage

## はじめに

Campomelic dysplasia (CD)は、出生10万に約1人発症し、彎曲した四肢をはじめとした全身の骨格系と、その他の組織の異常を特徴とする骨系統疾患である。また、男性患者の約半数に性転換が見られる。臨床像として、大頭、眼間開離、鼻根低形成、小顎、口蓋裂、耳介異常などの特徴的顔貌や、体幹における肩甲骨の低形成、釣鐘状胸郭、11対の肋骨、腸骨低形成などが認められる。四肢では、下肢で目立つ四肢短縮と長管骨彎曲、脛骨・大腿骨前面の皮膚陥凹、内反足などが特徴的である。その他の異常として、喉頭気管軟化症、肺低形成、心奇形、水腎症、水頭症、性逆転(XY female)などがある<sup>1)</sup>。基本的に生命予後は不良で、喉頭気管軟化症や肺低形成などによる呼吸不全で新生児期から乳児期に死亡することが多いといわれているが、最近では長期生存例の報告もみられる。

1994年に、本症の責任遺伝子は17番染色体

長腕の q24.1-25.1 の領域に位置する SOX9 遺伝子であることが明らかにされ<sup>2,3)</sup>、これまでに約 30 種の変異が報告されている。

今回我々は、臨床的に CD と診断し、1 歳 7 か月時点で生存している症例において SOX9 遺伝子の解析を行い、新規変異を同定し、構造と機能に興味深い結果を得たので報告する。

#### 症例

1 歳 7 か月、女児。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：母は 35 歳、初産。胎児エコーで四肢短縮、羊水過多を指摘され、妊娠 33 週 5 日に当院産科に入院した。在胎 36 週 3 日、羊水過多のコントロール不良なため、帝王切開で出生した。出生直後から呼吸障害が強く、直ちに気管内挿管され、全身管理及び四肢短縮の精査目的に当院 NICU に入院した。Apgar score は 1 分 5 点、5 分 8 点であった。

入院時現症：出生体重 2680g (+0.5 SD)、身

長 38 cm (-3.7 SD)、頭 囲 36.5 cm (+2.4 SD) と 低身長 及 び 頭 囲 の 拡 大 を 認 め た 。 啼 泣 時 に は 陽圧 換 気 を 行 っ て も 呼 吸 音 の 減 弱 を 認 め 、 著 明な チ ア ノ ー ゼ を 呈 し た 。 心 音 は 整 で 心 雑 音 なく 、 腹 部 は 軟 で 平 坦 で あ っ た 。 顔 貌 で は 眼 間開 離 、 小 顎 、 耳 介 低 位 、 鼻 根 低 形 成 を 認 め 、四肢 で は 下 肢 の 彎 曲 ・ 短 縮 、 脛 骨 前 面 の 陥 凹 、内 反 足 を 認 め た 。 外 性 器 は 正 常 女 性 型 で あ っ た 。

入 院 時 検 査 所 見 ： 全 身 骨 レ ン ト ゲ ン 写 真 に お い て 、 長 管 骨 彎 曲 、 肩 甲 骨 の 低 形 成 、 11 対 の 肋 骨 、 腸 骨 低 形 成 を 認 め た 。 血 液 検 査 で は 特 記 す べ き 異 常 は な く 、 染 色 体 検 査 (G - b a n d) で は 46, X X で あ っ た 。 腹 部 エ コ ー に て 、 両 側 腎 盂 の 軽 度 拡 大 を 認 め た 。 頭 部 エ コ ー 及 び 心 エ コ ー で は 明 ら か な 異 常 は 認 め な か っ た 。

臨 床 経 過 ： 生 後 2 ～ 3 か 月 頃 ま で は 、 啼 泣 な どの 胸 腔 内 圧 上 昇 時 に 著 明 な チ ア ノ ー ゼ を 呈 し 、 そ の 都 度 用 手 換 気 を 必 要 と し た 。 気 管 支 鏡 検 査 を 施 行 し た と ころ 、 啼 泣 時 に 気 管 及 び

気管支の扁平化、狭小化を認めた。気管支造影検査でも同様の所見であった。成長とともに用手換気の回数は減少し、生後7か月で人工呼吸器を離脱したが、その後も啼泣時に回復困難なチアノーゼを認めることがあり、緊急時への対応のため、1歳時に気管切開術を施行した。微量酸素送与のみで呼吸状態は安定したため、1歳5か月時に退院し、外来にて経過観察中である。

## 方法

患者家族の十分なインフォームド・コンセントを得た上で、患者白血球より **genomic DNA** を抽出し、**PCR** 法により **SOX9** 遺伝子を増幅し、**PCR** 産物の塩基配列を **Kwok** らの報告に基づいて解析した<sup>4)</sup>。使用したプライマーを図1に示す。**Genomic DNA 100 ng** をテンプレートとし、**deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 250 μM**、**primer 0.8 μM**、**TAKARA LA Taq™ (TAKARA) 0.25 U** を加えて

PCR反応を行った。PCR反応条件は、94℃ 5分で酵素を活性化させた後に、変性94℃ 30秒、アニーリング63～68℃ 30秒、伸長72℃ 30秒を35サイクル行い、72℃ 7分で最終伸長を行った。PCR産物をExo SAP-IT™ (USB Corporation)で精製し、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用い、ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)にて、塩基配列を決定した。

## 結果

887番目にCが1塩基挿入される変異(887 ins C/296 ins C)を一方のアリルで同定した(図2)。この変異によりフレームシフトが起こり、コドン577が終止コドンとなり、SOX9遺伝子のextensionが起こると予想された(図3)。この変異は過去に報告のない新規変異であった。

## 考案

今回我々は、CDの女兒においてSOX9遺伝子の解析を行い、887 ins C/296 ins Cの新規変異を同定した。SOX9遺伝子は、SOX(SRY-related box)遺伝子の一つで、3つのexonと2つのintronからなり、SRYと約70%のホモロジーをもつDNA結合部位(HMG domain)を有する転写因子をコードする。SOX9蛋白は509アミノ酸残基からなり、コドン104-181の約80アミノ酸残基からなるHMG domainとコドン466-509のC末端約100アミノ酸残基からなる転写活性部位(transactivation domain, TA domain)を有する。

本症例で認められた変異(887 ins C/296 ins C)は、HMG domainより下流でTA domainの上流に位置する。従って、SOX9蛋白のHMG domainは正常に保たれるが、TA domainの全てが異常蛋白に変異すると予想される(図3)。Südbeckらの報告では、SOX9蛋白はコドン

1-304のみでは転写活性を持たないことが示されている<sup>5)</sup>。また McDowallらの報告では、SOX9蛋白質はコドン1-248のみではDNA結合能は有するものの、転写活性はwild typeに比べて有意に低下することが示されている<sup>6)</sup>。従ってコドン1-295のみが正常である本症例の変異でも、SOX9蛋白質のDNA結合能は保たれるものの転写活性が障害され、転写因子としての機能が損なわれることが推測される。また本症例での変異では、295個の正常アミノ酸に異常蛋白質が282個付加されることが予想されるが、このように異常蛋白質が付加してSOX9蛋白質の伸長がおこることによって、正常なHMG domainの働きにどのような影響が及ぼされるかは、大変興味深い点である。

これまで約30種のSOX9遺伝子変異が報告されており、そのうちフレームシフト変異についての報告は10種13例である(表1)。最もN末端側に見出された変異は、296番目のGが1塩基欠失するものである<sup>7)</sup>。その結果、正常

な 98 アミノ酸残基に 10 個の新しいアミノ酸が付加した、108 アミノ酸残基からなる変異蛋白が生成される。この変異蛋白は、HMG domain 及び TA domain 全てが異常蛋白に置き換わり、SOX9 蛋白の N 末端部分約 20% が保存されるのみである。この変異蛋白については、ゲルシフトアッセイにより DNA との結合能が著しく障害されることが示されている<sup>8)</sup>。また、最も C 末端側に見出された変異では、C 末端のわずか 2 アミノ酸上流で 4 塩基の挿入が起こり、その結果、正常な 507 アミノ酸残基に 49 個の新しいアミノ酸が付加した、556 アミノ酸残基からなる変異蛋白が生成される<sup>4)</sup>。この変異蛋白は約 99% のアミノ酸が正常に保たれているにも関わらず、CAT アッセイにより検討された転写活性は、wild type に比べ著しく低下することが示されている<sup>9)</sup>。なお、前者は 5 歳 3 か月時での生存が報告されているが、後者は出生後短時間で死亡している。このように、正常アミノ酸の割合と重症度と

は必ずしも関連しないといえる。一方で、コドン 246 番での変異例や、コドン 368 番での変異例では、同じ変異でありながら、性転換を認める患者と認めない患者がそれぞれ報告されている<sup>4,10)</sup>。以上のように、SOX9 遺伝子においてはその変異の位置や種類と臨床症状とは一定の相関が認められない。その理由としては正常 SOX9 遺伝子の発現量の相違や、合成される蛋白量の相違などの可能性が想定されているが、未だ不明な点が多い。性転換については、性決定・分化過程に必要な分子は SOX9 蛋白以外にも多数知られており、それらの因子が関与している可能性が考えられる。しかし、その詳細については明らかにされておらず、今後の研究成果が待たれる。

なお、CD 患児の死亡原因のほとんどが新生児早期の呼吸障害によるものであり、これまでの長期生存例の報告では呼吸障害が軽度のものが多い。本症例では、生後数か月間の呼吸障害は重篤なものであったが、成長と共に

呼吸障害は軽減し、最終的に人工呼吸器を離脱することが出来、今後の長期生存が期待できる。このように、特に生後早期に適切な呼吸管理が行われれば、長期生存例は更に増加する可能性があり、本症を診療する上で急性期の呼吸管理は極めて重要であると考えられる。

#### 結語

CDの一女兒例を経験し、SOX9遺伝子の解析を行った結果、新規変異(887 ins C/296 ins C)を同定した。この変異によりSOX9蛋白のTAdomainが全て異常蛋白に変異すると予想され、このためSOX9蛋白の転写活性因子としての機能が失われ、本症を発症したと考えられた。本症例は1歳7か月時点で生存しており、長期生存例となる可能性がある。

#### 文献

1) Houston CS, et al.: Am J Med Genet, 15:

3-28, 1983.

2) Foster JW, et al.: Nature, 372: 525-530, 1994.

3) Wagner T, et al.: Cell, 79: 1111-1120, 1994.

4) Kwok C, et al.: Am J Hum Genet, 57: 1028-1036, 1995.

5) Südbeck P, et al.: Nature Genet, 13: 230-232, 1996.

6) McDowall S, et al.: J Biol Chem, 274: 24023-24030, 1999.

7) Ninomiya S, et al.: Clin Genet, 58: 224-227, 2000.

8) 二宮伸介, 他 : 日本先天代謝異常学会雑誌, 18: 190, 2002.

9) Mayer J, et al.: Hum Mol Genet, 6: 91-98, 1997.

10) Cameron FJ, et al.: Hum Mol Genet, 5: 1625-1630, 1996.

11) Giordano J, et al.: Am J Med Genet, 98:

176-181, 2001.

## Legend

### 図 2

887番目にCが1塩基挿入される新規変異(887 ins C/296 ins C)が一方のアリルで同定された。

### 図 3

HMG domainは正常に保たれるが、TA domainの全てが異常蛋白に変異し、転写活性が障害されると考えられた。

Exon1:	1F	5'-GCTTCTCGCCTTTCCCGGCC-3'
	1R	5'- TTGTTCTTGCTGGAGCCG -3'
	2F	5'- AGGACTCCGCGGGCTCGC -3'
	2R	5'- GGGGCAAATCAGCCCTGACCAG -3'
Exon2:	3F	5'- GGATTTCACTGACCCCTCTC -3'
	3R	5'- CTGCCCGTTCTTCACCGACTTC -3'
	4F	5'- GCGCGTGCAGCACAAGAAGG -3'
	4R	5'- CCACGAAGAATCTCCCAGGC -3'
Exon3:	5F	5'- GTCTGCACAGCCCTTGTTG -3'
	5R	5'- TTGGAGATGACGTCGCTGCTC -3'
	6F	5'- GCAGCGACGTCATCTCCAAC -3'
	6R	5'- TCCGTCTTGATGTGCGTTCGC -3'
	7F	5'- CCACAGGCGCACACGCTGAC -3'
	7R	5'- GGTGCCCTGGCCTGCCGCGTG -3'
	8F	5'- CTCGCCCAACAGATCGCCTA -3'
	8R	5'- GGCCATCTTCGCCCTTCGTGG -3'

図1 SOX9遺伝子解析におけるPCRプライマー

Mutant protein



3' - T A C T G G **G** T C A A A C T C - 5'  
A T G A C C C A G T T T G A G  
Val(298) Pro(297) Asp(296) Phe(295) Glu(294)

Wild type

3' - G T A C T G G T C A A A C T C - 5'  
C A T G A C C A G T T T G A G  
Tyr(298) Gln(297) Asp(296) Phe(295) Glu(294)

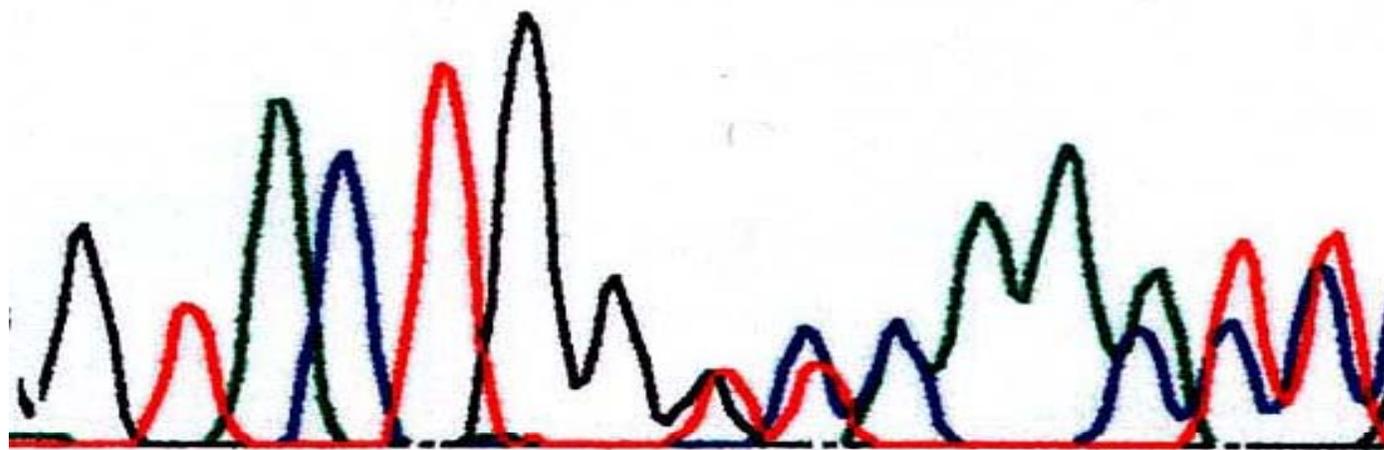
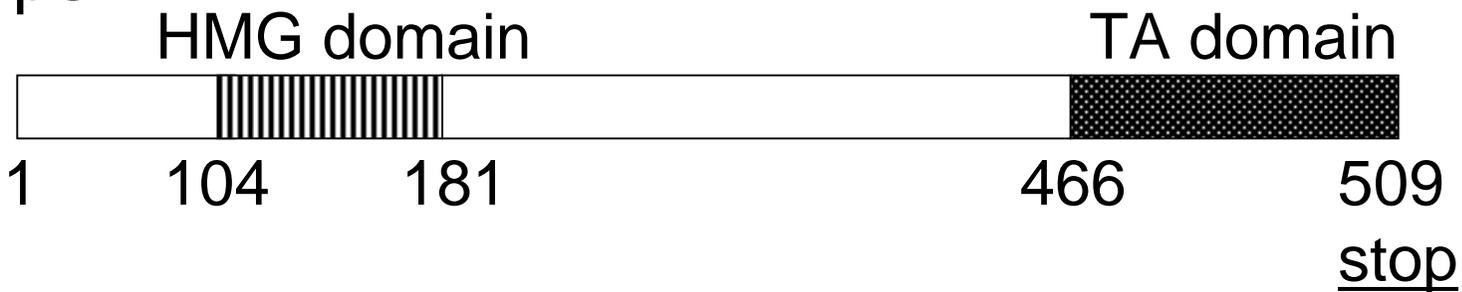


図2 SOX9遺伝子解析の結果

Wild type



Mutant protein

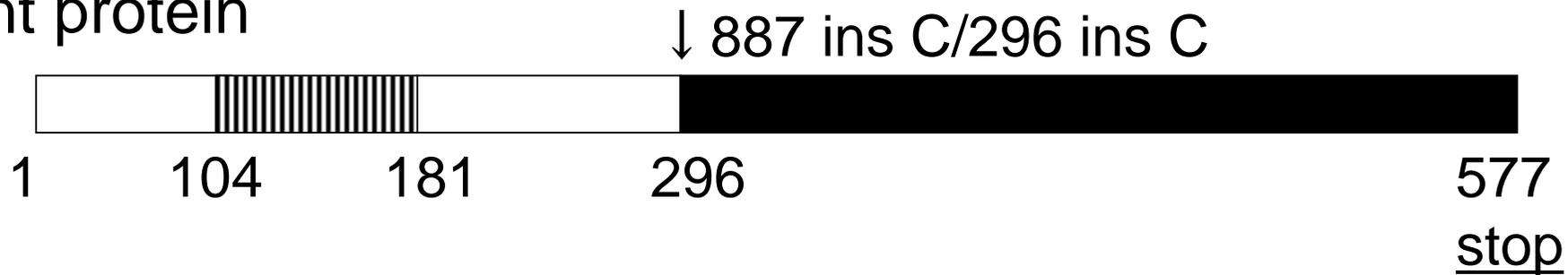


図3 Predicted SOX9 protein

表1 過去のフレームシフト変異の報告

Mutation and Codon position	Type of mutation	Genotype/ Phenotype	Survival time	References
98 del G	truncation	46,XY/F	alive(5y3m)	Ninomiya et al., 2000 <sup>9)</sup>
246 ins C	truncation	46,XY/H	early	Cameron et al., 1996 <sup>10)</sup>
246 ins C	truncation	46,XY/F	T19wk	Cameron et al., 1996 <sup>10)</sup>
246 ins C	truncation	46,XX/F	T19wk	Cameron et al., 1996 <sup>10)</sup>
261 ins G	truncation	46,XY/F	N.I.	Foster et al., 1994 <sup>2)</sup>
277 del 10bp	truncation	46,XX/F	10w	Mayer et al., 1997 <sup>9)</sup>
286 ins 4bp	truncation	46,XY/F	N.I.	Foster et al., 1994 <sup>2)</sup>
296 ins C	extension	46,XX/F	alive(1y7m)	自験例
329 ins G	extension	46,XY/F	N.I.	Wagner et al., 1994 <sup>3)</sup>
357 del 43bp	truncation	46,XY/F	2d	Mayer et al., 1997 <sup>9)</sup>
368 ins A	extension	46,XY/F	6h	Kwok et al., 1995 <sup>4)</sup>
368 ins A	extension	46,XY/M	shortly	Kwok et al., 1995 <sup>4)</sup>
485 ins G	extension	46,XX/F	5y	Giordano et al., 2001 <sup>11)</sup>
507 ins 4bp	extension	46,XY/F	shortly	Kwok et al., 1995 <sup>4)</sup>

Phenotype: F, female; M, male; H, hermaphroditism

Survival time: T19wk, terminated at 19 weeks gestation; N.I., not indicated