

2023 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090016
參展科別 醫學與健康科學
作品名稱 基因突變與骨硬化症之相關
得獎獎項

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學
指導教師 楊偉勛、蔡任圃
作者姓名 邱子庭

關鍵詞 骨硬化症、基因突變

作者簡介



我是邱子庭，目前就讀於北一女中數理資優班三年級。對於生物充滿興趣的我很幸運能進入實驗室，並在有興趣的領域進行專題研究。實驗過程曾經遭遇一些困難與挫折，但因為教授、學長姐以及老師等許多人數不清的幫助而得以前行，完成這件作品，感激不盡。未來我們會繼續懷著熱忱，在科學的領域中探索。

摘要

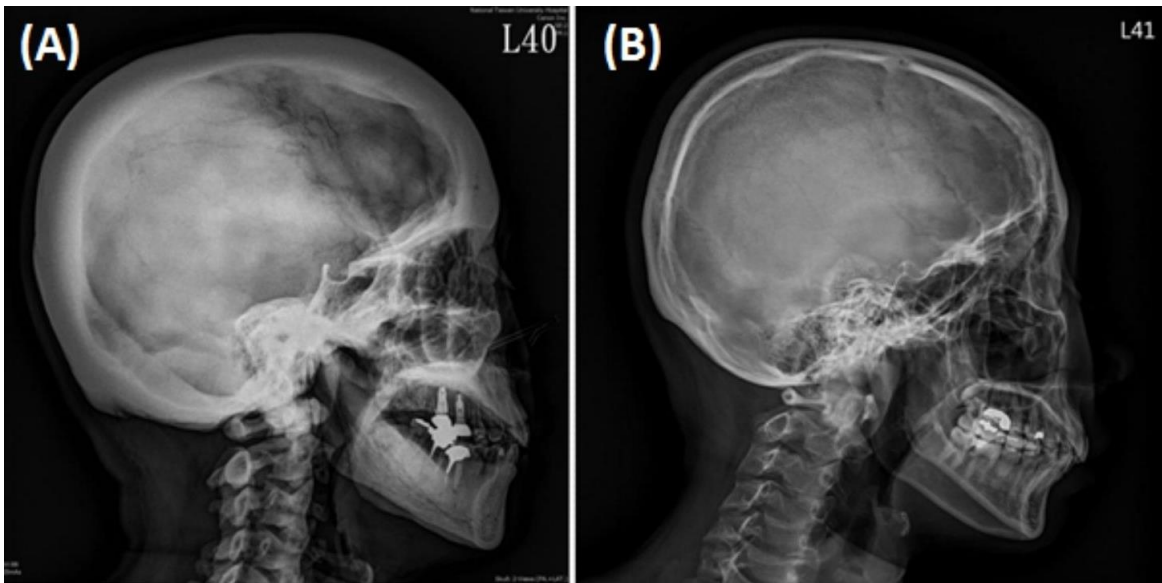
本研究由骨硬化症(osteosclerosis)個案報告開始，進行基因變異的探查，先針對骨生成主要調控機制 WNT pathway 上的 *SOST*、*LRP5*、*LRP6* 基因，進行基因定序與分析。在此 3 個基因沒有發現異常位點後，轉而以全外顯子組定序(whole exome sequencing)，進行次世代基因定序(next generation sequencing)。結果顯示病患帶有 *CTNNB1* c.1982G>A (p.Arg661Gln)之異合子(heterozygous)誤義變異(missense mutation)，並證實是 *CTNNB1* 基因的原發突變(*de novo* mutation)，該突變影響後續蛋白質表現，影響了 ICAT 對 WNT/beta-catenin 訊息傳遞鏈的抑制，繼而穩定 beta-catenin，造成骨質異常增生、並導致全身骨硬化。此案例為全世界第二例、亞洲首例的 *CTNNB1* 基因功能增強突變(gain-of-function mutation)的病例報告。

Abstract

This study started from a case report of osteosclerosis, and detecting genetic mutations. The gene sequencing and analysis were performed on the *SOST*, *LRP5*, and *LRP6* genes of the WNT pathway, the main regulatory mechanism of osteogenesis. No mutants were found in these three genes. Through whole exome sequencing of next generation sequencing, the results showed that the patient had a heterozygous missense mutation of *CTNNB1* c.1982G>A (p.Arg661Gln), and it was confirmed to be a *de novo* mutation of the *CTNNB1* gene, which affects the inhibition of ICAT on the WNT/beta-catenin signaling chain, which in turn stabilizes beta-catenin, resulting in abnormal bone hyperplasia and systemic bone sclerosis. This case is the second case in the world and the first in Asia of a gain-of-function mutation in the *CTNNB1* gene.

壹、前言

一、骨硬化症(osteosclerosis)病例介紹



圖一、骨硬化症病患(A)與健康者(B)的頭部 X 光照片

病人為 35 歲女性，因牙齒檢查時偶然發現牙槽骨及頭骨骨質增厚(如圖一 A)，而轉至台大醫院內分科門診就醫。父母為非血緣關係、健康的台灣人，無出生缺陷、發育遲緩或智能不足家族史。身體檢查時發現她身高 162 公分，體重 65 公斤，代謝生化檢查，包括白蛋白/球蛋白(4.5/2.2 g/dL)、腎功能(0.6 mg/dL、參考值 0.6~1.3)、肝功能(13 U/L、參考值 0~41)、葡萄糖 (85 mg/dL、參考值 70~100)、鹼性磷酸酶(57 IU/L、參考值 34~104)、鈣 (2.27 mmol/L、參考值 2.15~2.58)、磷(3.6 mg/dL、參考值 2.5~5)、副甲狀腺素(117.4 pg/mL、參考值 15~68.3)、25-OH Vitamin D (34 ng/dL、參考值 30~50)、生長激素 GH (7.89 ng/mL、參考值<8)、IGF-1 (126 ng/mL、參考值 71.2~234)、泌乳素 prolactin (13.09 ng/mL、5.18~26.53)、全血球及尿液檢查均未見異常。患者骨骼 X 光影像顯示全身骨質增厚(如圖二)，腰椎及股骨兩部位的骨密度 Z 值(與同齡相比)分別為 6.0 及 4.4。而頭部電腦斷層顯示頭骨廣泛性增厚和密度增加，疑雙側視神經管和內耳道狹窄。頸椎核磁共振呈現中央管狹窄及雙側椎間孔狹窄，但沒有脊髓壓迫的證據。視野及聽力檢查均未見異常。

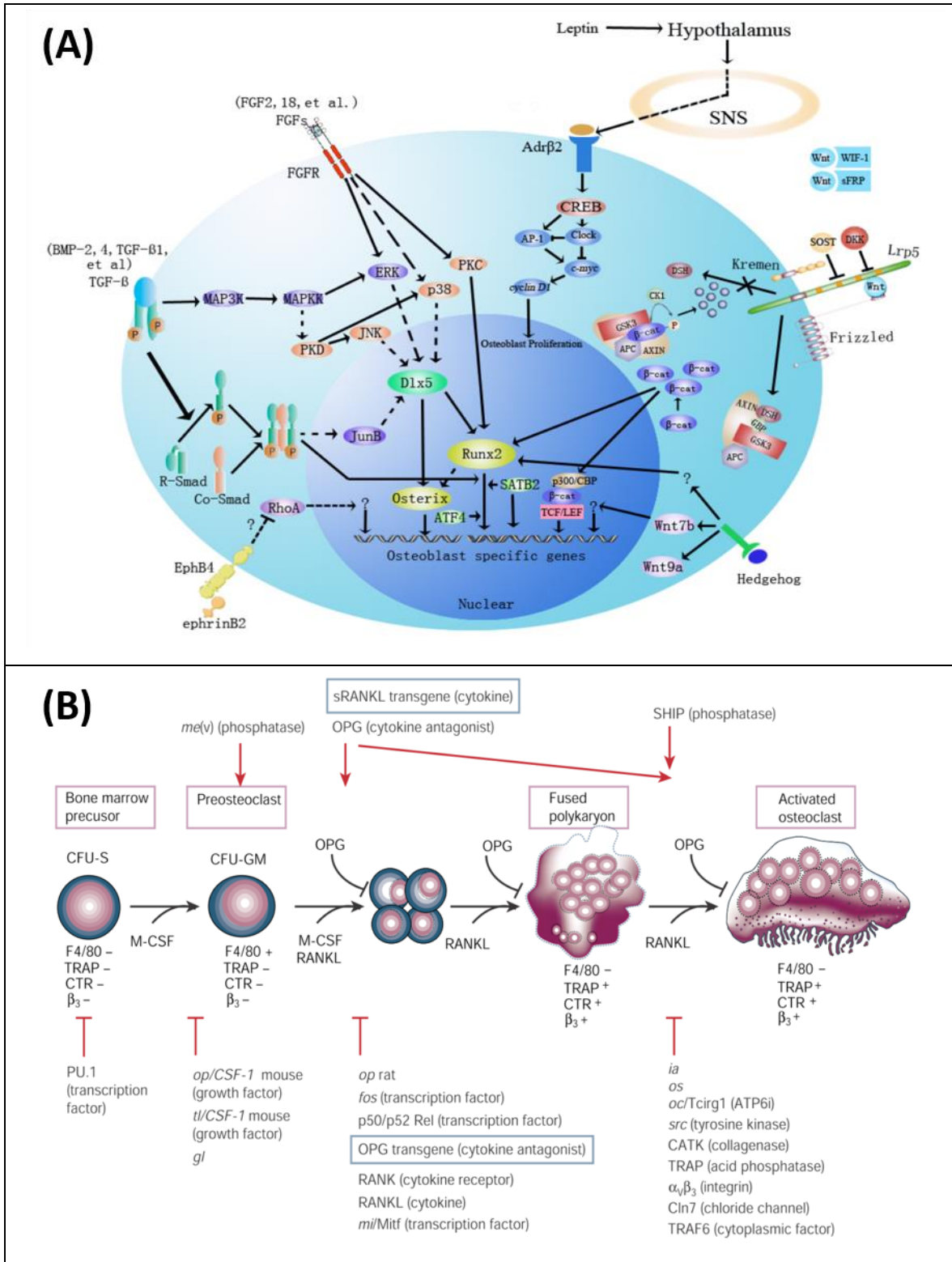


圖二、病患全身骨質增厚。

二、文獻探討

硬骨由造骨細胞(osteoblasts)、破骨細胞(osteoclast)、類骨質(osteoid)和沈積在基質內的無機礦物鹽組成(Burr & Akkus, 2014)。造骨細胞(osteoblast)來自骨髓間質幹細胞(mesenchymal stem cell)，負責製造骨基質(bone matrix)及隨後的骨礦質化過程，而形成新骨。造骨細胞分化發育過程有多種信號系統扮演重要作用(圖三 A) (Huang, Yang, Shao, & Li, 2007)，尤其是 WNT/beta-catenin 訊息傳遞鏈。造骨細胞最終分化形成骨細胞(osteocyte)，分散在整個礦化基質中，可以感知骨骼上的機械應力或骨骼中的裂縫，並啟動修補反應。骨細胞還表達幾種調節磷酸鹽代謝的因子，而控制基質礦化過程。此外，骨細胞分泌抑硬素(sclerostin)去抑制 WNT/beta-catenin 訊息傳遞鏈，進而回饋抑制造骨細胞的分化。破骨細胞是由造血幹細胞(hematopoietic stem cell)分化而來，是多核的巨噬細胞，藉由氫離子幫浦將氫離子打出細胞，營造出細胞外部酸性環境，有利釋放出的酵素溶解骨礦物質。而破骨細胞的分化發育過程，主要受巨噬細胞集落刺激因子(Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)和核因子 κ -B 受體配位蛋白 (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand,

RANKL)的活化(圖三 B) (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003)。



圖三、造骨細胞(A)和破骨細胞(B)分化的重要信號網絡。在造骨細胞發育過程中發揮重要作用的幾種信號系統包括 WNT、轉化生長因子-β (Transforming growth factor-β (TGF-β)、Hedgehog、纖維母細胞生長因子 (fibroblast growth factors, FGFs)和 ephrin 等信號通路。而巨噬細胞集落刺激因子 (M-CSF) 和核因子 κ-B 受體配位蛋白 (RANKL)對破骨細胞生成至關重要。這些圖片出自 *Frontiers*

in Bioscience. 2007;12(5):3068-3092 (Huang *et al.*, 2007) and Nature. 2003;423(5):337-342 (Boyle *et al.*, 2003)。

為了維持健康的骨骼，骨組織需要不斷更新和更換。骨重塑是一個循環過程，其中骨組織被吸收性破骨細胞(Osteoclasts)分解，然後由造骨細胞(Osteoblasts)重新形成。維持骨骼的完整性需要嚴格調節這兩種細胞類型的活動，而佔骨頭細胞超過九成的骨細胞(Osteocytes)，是造骨細胞的最終分化，分散在整個礦化基質中，負責感知骨骼上的機械應力或骨骼中的裂縫，並啟動骨重塑過程。硬化性骨發育不良(Sclerosing bone dysplasias)是一群廣泛的骨骼疾病，其特徵是病態性增加骨組織密度或骨大小，導致廣泛的組織學、放射學和臨床異常。目前已知多種致病基因和途徑 (De Ridder, Boudin, Mortier, & Van Hul, 2018)(如表一)，這些基因和途徑牽涉造骨細胞的骨形成或破骨細胞的骨吸收兩種過程。

表一、不同硬化性骨病、受影響的骨骼、遺傳方式、致病基因和信號系統的概況。

Disease	Affected bones	Inheritance	Causative gene	Effect mutation	Affected pathway/processes	Affected bone cell
Osteopetroses						
<i>OLEDAID</i>	All	XD	<i>NEMO</i>	Hypomorph	NFκB	OC-diff
<i>ARO</i>	All	AR	<i>TNSF11</i>	LOF	NFκB	OC-diff
	All	AR	<i>TNSF11A</i>	LOF	NFκB	OC-diff
	All	AR	<i>CAII</i>	LOF	Acidification	OC-act
	All	AR	<i>TCIRG1</i>	LOF	Acidification	OC-act
	All	AR	<i>CICN7</i>	LOF	Acidification	OC-act
	All	AR	<i>OSTM1</i>	LOF	Acidification	OC-act
<i>IARO</i>	All	AR	<i>PLEKHM1</i>	LOF	Autophagy	OC-act
	All	AR	<i>CICN7</i>	Hypomorph	Acidification	OC-act
<i>ADO</i>	All	AD	<i>CICN7</i>	Dom neg	Acidification	OC-act
Pycnodysostosis	All	AR	<i>CTSK</i>	LOF	Collagenase	OC-act
Osteosclerotic metaphyseal dysplasia	Long bones, vertebrae	AR	<i>LRRK1</i>	LOF	Bone resorption	OC-act
Sclerosteosis	Craniotubular bones	AR	<i>SOST</i>	LOF	WNT	OB
		AR	<i>LRP4</i>	Hypomorph	WNT	OB
Van Buchem disease	Craniotubular bones	AR	<i>SOST</i>	LOF	WNT	OB
High bone mass phenotype	All	AD	<i>LRP5</i>	GOF	WNT	OB
Worth disease	Craniotubular bones	AD	<i>LRP5</i>	GOF	WNT	OB
Endosteal hyperostosis	Craniotubular bones	AD	<i>LRP5</i>	GOF	WNT	OB
Craniodiaphyseal dysplasia	Craniotubular bones	AD	<i>SOST</i>	LOF	WNT	OB
Osteopathia striata	Craniotubular bones	XD	<i>WTX (AMER1)</i>	LOF	WNT	OB
Cranio metaphyseal dysplasia	Craniotubular bones	AD	<i>ANKH</i>	LOF	PPi	OC + OB
		AR	<i>GJA1</i>	LOF	Cellular communication	OB
Camurati–Engelmann disease	Craniotubular bones	AD	<i>TGFβ1</i>	GOF	TGFβ	OB
Osteopoikilosis	Focal lesions	AD	<i>LEMD3</i>	LOF	TGFβ	OB

Disease	Affected bones	Inheritance	Causative gene	Effect mutation	Affected pathway/process	Affected bone cell
Buschke–Ollendorff syndrome	Focal lesions	AD	<i>LEMD3</i>	LOF	TGFβ	OB
Trichodontoosseous syndrome	Craniotubular bones	AD	<i>DLX3</i>	LOF	Cellular senescence	OB
Lenz–Majewski syndrome	Craniotubular bones	AD	<i>PTDSS1</i>	LOF	PTDS	OB
Paget disease of bone (PDB)	Focal lesions	AD	<i>SQSTM1</i>	LOF	NFκB	OC
Multisystem proteinopathy with PDB	Focal lesions	AD	<i>VCP</i>	LOF	NFκB	OC
			<i>HNRNPA2B1</i>	Unknown	RNA-metabolism	OC
			<i>HNRNPA1</i>	Unknown	RNA-metabolism	OC
Juvenile PDB	All	AR	<i>TNFRSF11B</i>	LOF	NFκB	OC
Early-onset PDB	Focal lesions	AD	<i>TNFRSF11A</i>	LOF	NFκB	OC
Familial Expansile osteolysis	Focal and generalized lesions	AD	<i>TNFRSF11A</i>	LOF	NFκB	OC
Expansile skeletal hyperphosphatasia	All	AD	<i>TNFRSF11A</i>	LOF	NFκB	OC

(縮寫) AD: autosomal dominant 體染色體顯性遺傳,

AR: autosomal recessive 體染色體隱性遺傳,

XD: X-linked dominant 性聯顯性遺傳,

LOF: loss of function 失能,

GOF: gain of function 增能,

Dom neg: dominant negative 主要負向,

OC: osteoclast 破骨細胞,

OC-diff: osteoclast differentiation 破骨細胞分化,

OC-act: osteoclast activation 破骨細胞活性,

OB: osteoblast 造骨細胞

三、實驗動機

由於在現今的老年化社會中，隨著老年人口不斷攀升，骨質疏鬆症是很常見的病症，但相對的骨硬化症在臨床上卻極為罕見，在台灣並沒有個案報告。然而，之前針對骨硬化症的病因研究，*SOST* 失能性的基因突變，會導致抑硬素 (sclerostin)減少或失去功能，是引發骨硬化症的原因之一。這個發現促使藥廠開發抑硬素的抑制性單株抗體 (sclerostin-blocking antibody)，並給予皮下注射、取得治療骨質疏鬆症許可，可有效提升骨密度、預防骨折發生。因此，透過骨硬化症的病因研究，除了解釋骨硬化症成因外，或許還可以轉換成為治療骨質疏鬆症的治療標的。

四、研究目的

- (一)、探討基因上何種位置突變會造成骨密度異常提高
- (二)、運用不同分析方式尋找突變位置
- (三)、進一步推測突變位置和其影響機制

貳、研究方法或過程

一、抽取純化血液去氧核糖核酸 (DNA)

將病患血液,加入 6ml 的 1x RBC lysis Buffer 混合均勻,放在冰上 5~10 分鐘後,以 450g(約 3000rpm)離心 10 分鐘,儘量去除上液,留下底部的白血球細胞,再加入 Geno Maker(1ml)來溶裂細胞。

二、聚合酶連鎖反應

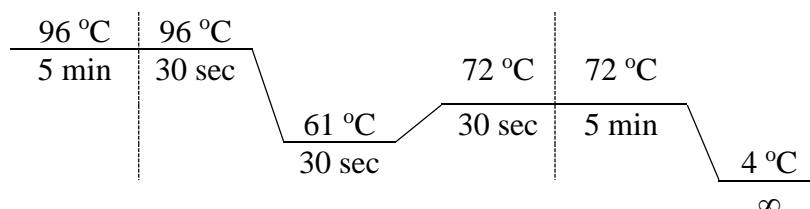
(一)設計聚合酶連鎖反應所需的引子(primers)：

先文獻選讀,再由文獻所提供的資料,並寫信跟國外學者索取實驗使用的引子對序列及聚合酶連鎖反應條件作為參考,或藉由美國 NCBI 網站,針對 *LRP5*、*LRP6* 基因的第 2、第 3、第 4 外顯子(exon)、*SOST* 基因的兩個外顯子,設計或選取適當的引子對。此外,鑑定 *SOST* 基因下游是否有 52kb 的基因缺失所需要的引子,則取用原始研究 (Balemans *et al.*, 2002)所提供的引子序列。

(二)聚合酶連鎖反應的各項條件如下：

Template	1	μL
10mM Primer-R	1	μL
10mM Primer-F	1	μL
10X Taq buffer	3	μL
2.5 mM dNTP	2	μL
Taq polymerase	0.25	μL
ddH2O	21.7	μL
	5	
Total	30	μL

1 cycle 35-40 cycles 1 cycle



吸取 primer 的 forward 和 reverse 端各 1 μL、gDNA 1 μL、master 試劑 12.5 μL 及 純水 9.5 μL 震動並以(12000rpm 室溫離心後放入機器以設定循環次數和溫度進行 PCR(進行多次並

逐步調整條件)

(三)DNA 膠體電泳：

目的是用以檢測受測 DNA 是否有突變存在，利用 agarose 膠體電泳法檢驗 PCR 的受測 DNA 片段大小是否正常。配置方法為秤量 0.5 g Agarose 及 0.5x TAE buffer 100 ml 加至燒杯中，可利用微波爐加熱至沸騰使 Agarose 溶解，待至 溶液冷卻後加入 EtBr 後稍微搖晃瓶身至均勻後倒入膠台，放上齒梳並輕蓋上鋁箔紙等待 30 分鐘凝固。30 分鐘之後確定凝固完成，將齒梳拔起將凝固完 成的膠體放入電泳槽並倒入 running buffer 至蓋過膠體，之後 loading sample、ladder，確定一切就緒後蓋上蓋子以 100 v 進行跑膠 18~20 分鐘，至完成後將膠體從電泳槽取出後放入紫外光照台，觀察白色的 DNA 片段分布，並照相存檔。

(四)定序：

利用 ABI-1200 測序儀，透過雙脫氧鏈終止法 (dideoxynucleotide chain-termination method)測定核酸序列，但只能測定長度 1000 個鹼基對(base pairs)左右或以內的基因片段。

三、全外顯子組基因定序(whole-exome sequencing; WES)

(一)原理：

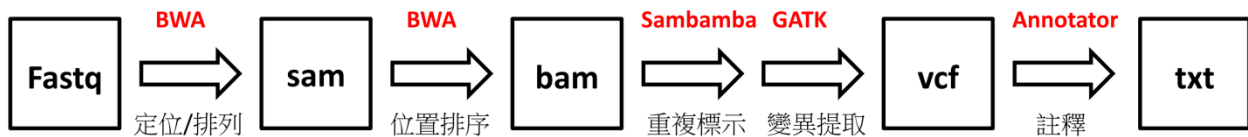
雙脫氧鏈終止法 (dideoxynucleotide chain-termination method)，為傳統核酸定序技術，又稱桑格定序(Sanger sequencing)，必須先將目標基因一段段增幅放大，一段讀長約 1000 鹼基對(base pairs)，測序完成後再進行比對，操作繁瑣且費時費工費錢。而次世代基因定序(Next generation sequencing, NGS)，以基因工程的技術將基因組核酸切成小片段，並接上轉接子(adapter)，藉由材料科學與影像系統的協助來進行快速且大量的定序，然後藉由功能強大的資訊軟硬體來進行序列的片段接合、基因組的比對與組裝。

目前次世代基因定序，主要有全基因體定序(Whole Genome Sequencing, WGS)和全外顯子組定序(Whole Exome Sequencing, WES)二種技術。而人類基因體龐大，約有 30 億個鹼基對、二萬三千個基因、180,000 個外顯子(蛋白質編碼區)，但只有不到 2%的基因體屬外顯子，然而大約 85%的疾病和外顯子基因變異有關聯 (van Dijk, Auger, Jaszczyszyn, & Thermes, 2014)。因此，全外顯子定序的效能及經濟效益高於全基因體定序，在臨床和基礎

研究中越來越普遍。

(二)全外顯子組基因定序數據分析流程(包括以下步驟及其使用軟體)：

理論上次世代基因定序可以精確到每個鹼基對，但因資料龐大，後續須進行一系列的資料分析，才能運用到臨床或研究上。常用的定序數據分析流程如下圖四：



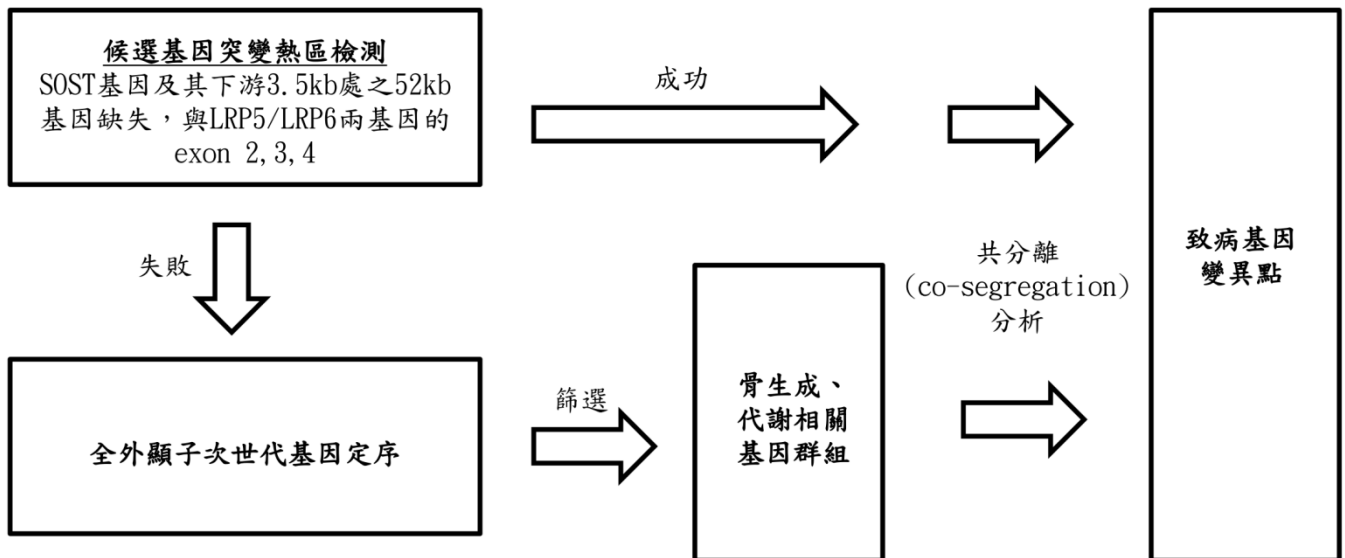
圖四、NGS 定序數據分析流程

- (1) 原始讀序的前處理 (pre-processing of raw reads)，並將讀序定位到參考基因組上 (mapping reads onto a reference genome): 通過序列拼接，將 fastq 文件轉換為 fasta 文件，通過短序列比對將 fastq 與 fasta 文件合併為 bam 文件。如利用 Burrows Wheeler Aligner (BWA)軟體進行序列比對。
- (2) 排列後處理 (post-alignment processing): 比對到參考基因組之後，對於一些未比對上的序列、重複序列 (duplicate marking)、比對到基因組多個位置的序列，我們仍然需要進一步過濾，來保證分析結果的可靠性。可以使用 sambamba 過濾比對後的 sam/bam 文件。
- (3) 鹼基質量校正(Base quality recalibration):會先根據原始 bam 文件中的鹼基質量值計算出系統誤差的分佈，再綜合多個樣本的模型，生成一個總的模型，最後根據計算的模型對鹼基質量進行校正，藉此鑑定變異位點、消除因儀器導致的系統偏差。例如測序找到一個位點，其鹼基和參考基因組上的鹼基不同，但是其質量值比總體模型所預測的質量明顯低，此時可以視為是一個測序錯誤，而非真正的變異位點。這步驟常使用 GATK 套件的 BQSR 軟體。
- (4) 基因變異提取(variant calling): 通過變異檢測，將 bam 文件中突變位點提取出來，轉換為記載變異資訊的 vcf (variant call format)文件。使用 GATK 的 HaplotypeCaller。
- (5) 基因變異的註釋(effect annotation of the found variants): 這步驟使用 Annotator。

四、研究架構圖

疾病分析

廣泛性骨密度增加、骨厚度增加



圖五、研究架構圖。

目前臨床檢測上常見的方式：第一階段先用候選基因方法(candidate-gene approach)尋找突變，如果找不到，接下來第二階段再以全外顯子定序或全基因體定序來尋找與疾病相關突變，因為候選基因方法價格便宜、分析快，而且根據前人研究挑選出與疾病有關的基因，更容易找到目標突變位置。

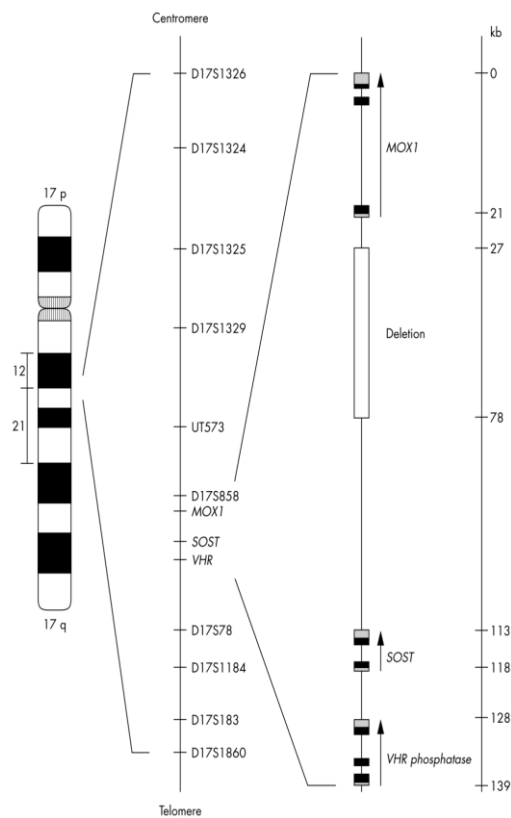
五、候選基因突變熱區檢測

全身廣泛性骨硬化症(osteosclerosis)，在全世界是極罕見、進行性的骨發育不良病症，主要特徵是全身骨硬化和骨質增生，包括顱骨、下頷骨、鎖骨、肋骨和長骨骨幹等，尤其顱骨與下頷骨。

依據目前的研究報告，發病機制主要是因 *SOST*、*LRP5*、*LRP6* 基因變異，導致 WNT 訊息傳遞鏈不正常活化，繼而使造骨細胞活性增加，引起骨質不受控制地增生。

(一)基因變異在外顯子區域之外：

引發廣泛性骨硬化的疾病中，**van Buchem disease(VBD)**是一種體染色體隱性遺傳的骨骼疾病，其特徵是骨骼生長不受抑制，尤其是在下頷骨、顱骨和肋骨。受影響的第一個症狀通常是耳聾和面部癱瘓，這是由於生長的骨骼擠壓神經而引起的。目前的研究已知是染色體**17q**上、**SOST**基因下游距離約**35 kb**處出現長達**52kb**的同型合子(homozygous)基因缺失(如圖六)，而影響**SOST**基因轉錄抑硬素(sclerostin)蛋白。**van Buchem disease**主要發生在荷蘭裔，加上台灣曾受荷蘭佔領、少數台灣人具有荷蘭血統。這是目前廣泛性骨硬化的疾病中，唯一已知基因變異不在外顯子區域。



圖六、**SOST**基因下游距離約**35 kb**處出現長達**52kb**的同型合子(homozygous)基因缺失(白框處)，導致**van Buchem disease**的廣泛性骨硬化。右邊的軸代表距離，以**kb**為單位。(圖片來源：**Balemans et al., 2002**)

鑑定 *SOST* 基因下游是否有 52kb 的基因缺失所需要的引子(見表二)，則取用前人研究 (Baemans *et al.*, 2002)所提供的引子序列。有 52kb 基因缺失時會出現 700 bp 的 PCR 產物，沒有 52kb 基因缺失則出現 1200 bp 的 PCR 產物，異型合子(heterozygous)基因缺失則會同時出現 700bp 與 1200 bp 的 PCR 產物。

(二)變異在 *SOST*、*LRP5*、*LRP6*等基因的外顯子區域：

硬化症是由 *SOST* 基因的純合突變引起的體染色體隱性遺傳疾病。寫信跟國外學者索取實驗使用的引子對序列及聚合酶連鎖反應條件(Whyte *et al.*, 2019)，並藉由美國 NCBI 網站，找尋人類 *LRP5*、*LRP6*、*SOST* 全基因序列，並針對 *LRP5*、*LRP6* 基因的第 2、第 3、第 4 表現子(exon)，*SOST* 基因的兩個表現子，設計或選取適當的引子對。

表二、針對候選基因突變熱區進行聚合酶連鎖反應之引子序列及條件。

Primers	Forward (5'→3') Reverse (5'→3')	溫度	片段(b.p.)
LRP5-exon2	CATCCCAGGGCTGTGTATCT	58	543
	ACTTGGGCTCATGCAAATTC		
LRP5-exon3	GAAACCATACCTGTTGGTTATTTCC	58	498
	CACAGACCCTGACGCTGTTC		
LRP5-exon4	GAT GGC TCC TCC ACC CCG CT	62	250
	GCG CCC CAG CCG GCA CT		
LRP6-exon2	GCT CAC TTA AAC CGA TTT G	58	551
	GTG GTG TAT GTC AGT GGA GA		
LRP6-exon3	CAA GTG TGA GCC ACT GCG	58	425
	TCT TCC CCT CTG GCA CTT AG		
LRP6-exon4	AAT GGG AGA GGT GAC GTT AT	58	336
	AAG CCA GAC ATT AGA GTG CT		
SOST52kb-F1	CAGAAGACAGGCAGATTTTGG	58.5	1.2k
SOST52kb-R1	AGAGGCCATCTCAGCTTGG	58.5	
SOST52kb-R2	AGGTGGGAACCTATCCGTGC		

SOST-exon1	CTGAGGGGAAACATGGGACCAGC	60	510
	CAGGCAAGACTGTTCCCTCGACCA		
SOST-exon2	CAAAAGCCTCTGGAGACAGG	55*	832
	CTCCTCTGAAGTGGGACCAG		
SOST-exon2'	ACAGGGTGCGCAGGAGAGCTT	58	243
	CCCATCGGTCACGTAGCGGG		
SOST-exon3	ACTTCACCCGCTACGTGACCGA	55*	469
	CACGCGCAGAGGACAGAAATGT		
exon2'F-3R	ACAGGGTGCGCAGGAGAGCTT	55*	686
	CACGCGCAGAGGACAGAAATGT		

*Tag for GC rich: Hotstart and dreamtag

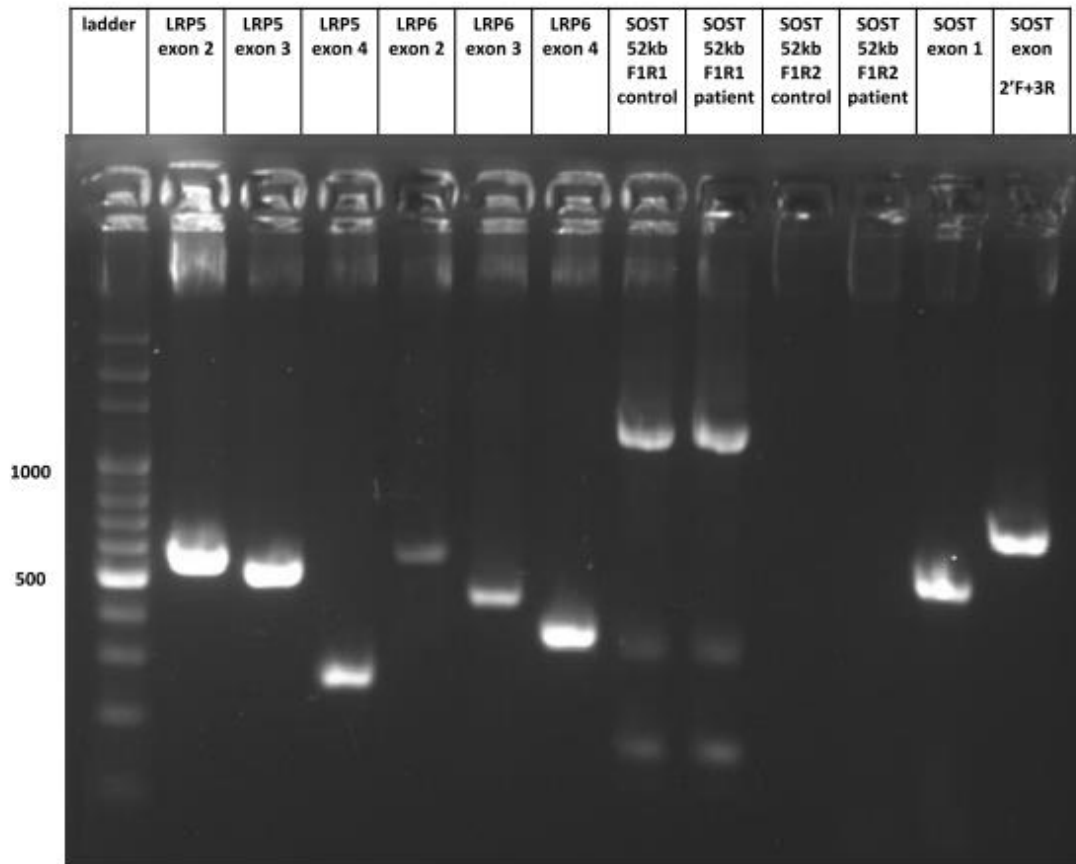
六、全外顯子組基因定序

骨硬化症個案報告開始，進行基因變異的探查，先針對骨生成主要調控機制 WNT 訊息傳遞鏈上的 *SOST*、*LRP5*、*LRP6* 基因，進行基因定序與分析。若在此 3 個基因沒有發現異常位點後，將改以全外顯子組基因定序(whole exome sequencing) 探查基因變異所在。

參、研究結果與討論

一、非外顯子突變檢測及候選基因突變熱區定序

(一)聚合酶連鎖反應之結果：



圖七、聚合酶連鎖反應之照膠結果。

(二)結論：

聚合酶連鎖反應發現 *SOST* 基因下游並沒有該 52kb 的基因缺失。而將 *SOST*(2 個外顯子)、*LRP5* (第 2、3、4 外顯子)、*LRP6* (第 2、3、4 外顯子) 經聚合酶連鎖反應後的產物送桑格基因定序(Sanger sequencing)，也沒有發現異常位點。

二、全外顯子組定序分析

利用 Agilent SureSelect Human All Exon V6 檢驗試劑套組進行目標區域的富集(enrichment)，以基因密碼區及外顯子-內含子交界區為目標區域，運用捕捉的方式(captured-based method)、可捕獲 99%的標準外顯子組序列區域；富集後進行高通量定序，平台為 Illumina NovaSeq 6000、分析軟體為 BWA-GATK-ANNOVAR、所比對之人類參考染色體版本為 GRCh37 與 GRCh38。

(一)找尋可能的致病變異點：

病患的全外顯子組定序分析，共鑑識 552,048 個單核苷酸多型性(single nucleotide polymorphism，SNP)或片段序列的插入與刪除(insertions and deletions，InDels)等變異點。

去除在基因體累計數據庫 (Genome Aggregation Database，gnomAD)中，對偶基因型頻率(allele frequency)最大值>1%之變異點；亦去除 ClinVar 臨床基因檢測資料庫報導 良性(Benign)/可能良性(likely benign) 之變異點。剩餘變異點與文獻資料比對，同時也使用電腦預測軟體 SIFT 及 Polyphen-2，預測變異點對蛋白質所造成之後果，依照其比對與預測結果來判斷是否具致病性。

(二)可能的致病變異點整理

按上述流程，發現有 14 個基因變異點。可能的致病變異點整理如下表(表三)。

表三、全外顯子組定序得到的變異位點。

Gene	Physical Position	Transcript	Exon / Intron	Nucleotide (AAchange)	Zygosity	MAF/TW	SIFT/ Polyphen-2	GERP	ClinVar	ACMG	OMIM phenotype	Inheritance
TMCO1	GRCh37 1:165737988 GRCh38 1:165768751	NM_019026.4	Exon 1	c.A154G p.M52V	Het	0.0006/ NA	0.0/ 0.924	5.15	NA	VUS	Craniofacial dysmorphism, skeletal anomalies, and mental retardation syndrome	AR
ANAPC1	GRCh37 2:112619981 GRCh38 2:111862404	NM_022662.4	Exon 10	c.C1247T p.T416M	Het	0.0028/ 0.000535	0.019/ 0.431	4.75	NA	VUS	Rothmund-Thomson syndrome, type 1	AR
CKAP2L	GRCh37 2:113514311 GRCh38 2:112756734	NM_152515.5	Exon 4	c.T637C p.S213P	Het	0.0032/ 0.002	0.026/ 0.763	2.07	NA	VUS	Filippi syndrome	AR
CTNNB1	GRCh37 3:41278106 GRCh38 3:41236615	NM_001904.4	Exon 13	c.G1982A p.R661Q	Het	NA/ NA	0.004/ 0.999	4.82	NA	VUS	Exudative vitreoretinopathy 7; Neurodevelopmental disorder with spastic diplegia and visual defect (Mental retardation, autosomal dominant 19)	AD
COL10A1	GRCh38 6:116121895	NM_000493.4	Exon 3	c.C221G p.P74R	Het	NA/ NA	0.004/ 0.938	4.66	NA		Metaphyseal chondrodysplasia, Schmid type	AD
SFRP4	GRCh37 7:37955934 GRCh38 7:37916332	NM_003014.4	Exon 1	c.G206C p.C69S	Het	NA/ NA	0.001/ 1.0	4.36	NA	VUS	Pyle disease	AR
WHRN	GRCh38 9:114423397	NM_015404.4	7	c.G1543A p.D515N	Het	0.0045/ 0.0025	0.007/ 0.999	3.86	Uncertain		Usher syndrome, type 2D; Deafness, autosomal recessive 31	AR
PCDH15	GRCh37 10:55591228 GRCh38 10:53831468	NM_001142763.2 NM_033056.4	Exon 30	c.G4049A p.R1350H	Het	0.0006/ NA	0.004/ 1.0	5.75	Uncertain	VUS	Deafness, autosomal recessive 23; Usher syndrome, type 1F; Usher syndrome, type 1D/F, digenic	AR/Digenic
CEP290	GRCh37 12:88505514 GRCh38 12:88111737	NM_025114.3	Exon 21	c.A2174C p.E725A	Het	0.0013/ 0.0015	0.042/ 0.997	5.79	Conflictin g	VUS	Leber congenital amaurosis 10; Meckel syndrome 4; Senior-Loken syndrome 6; Joubert syndrome 5; Bardet-Biedl syndrome 14	AR
BMP4	GRCh37 14:54417492 GRCh38 14:53950774	NM_001202.6	Exon 4	c.G485A p.R162Q	Het	0.0026/ 0.0015	0.004/ 1.0	4.31	NA	VUS	Microphthalmia, syndromic 6; Orofacial cleft 11	AD
TICRR	GRCh37 15:90169263 GRCh38 15:89626032	NM_152259.4	Exon 21	c.C5573T p.T1858I	Het	0.0006/ NA	0.003/ 0.956	3.97	NA	VUS	Acrocallosal Syndrome and Meier-Gorlin Syndrome	AR
AXIN1	GRCh37 16:341269 GRCh38 16:291269	NM_003502.4	Exon 9	c.C2215T p.R739C	Het	0.0019/ 0.0025	0.001/ 0.999	3.57	NA	VUS	Caudal duplication anomaly	AD/ Methylation

NF1	GRCh38 17:3122645 6	NM_001042492 .2	18	p.G675R	Het	0.0006/ 0.0005	0.011/ 0.448	4.93	Uncertain		Neurofibromatosis type 1, Neurofibromatosis- Noonan syndrome; Watson syndrome	AD
TRIM37	GRCh37 17:5711918 8 GRCh38 17:5904182 7	NM_015294.6	Exon 17	c.C1739T p.A580V	Het	0.0039/ 0.00350 4	0.002/ 0.617	5.57	Likely_B	VUS	Mulibrey nanism	AR

(縮寫) AA: Amino acid 胺基酸, B: Benign 良性, Conflicting: Conflicting interpretations of pathogenicity 對致病性的相互矛盾的解釋, D: Damaging 破壞性, Het: Heterozygous 異型合子, Hom: Homozygous 同型合子, Hem: Hemizygous 半合子, MAF: maximal minor variant allele frequency 最大次要對偶基因變異頻率, NA: Not available 無資料, P: Probably damaging 可能破壞性, TW: Taiwan 台灣, T: Tolerated 可忍受的, VUS: variant of uncertain significance 意義不確定的變異

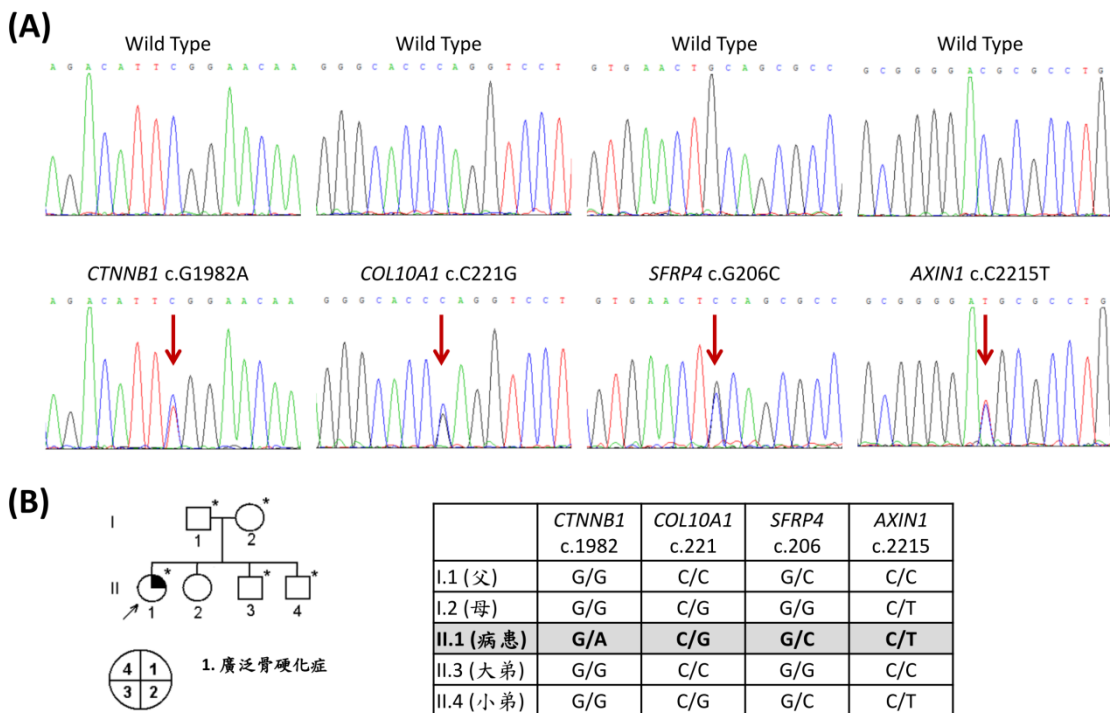
三、共分離(co-segregation)分析

第一個階段的 **candidate gene approach** 無法成功找到罹病基因。透過第二階段的 **WES** 研究，再以對偶基因型頻率篩選出 **14** 個基因。根據基因變異文獻報告表現型症狀及其遺傳模式，且由於骨硬化症是極為罕見的疾病，至今的文獻報告也全是體染色體顯性遺傳，其對偶基因頻率必然在萬分之一以下，且為顯性遺傳，按此原則篩選剩下 **4** 個基因變異位點，分別是 **CTNNB1 c.G1982A(p.R661Q)**、**SFRP4 c.G206C(p.C69S)**、**AXIN1 c.C2215T(p.R739C)**及 **COL10A1 c.C221G(p.P74R)**為可能的罹病基因變異。前三個基因轉譯後的蛋白分別是 **Beta-catenin**、**Secreted frizzled related protein 4**、**Axin 1**，是 **WNT/beta-catenin** 訊息傳遞鏈中的關鍵作用蛋白，而 **COL10A1** 基因轉譯 **X 型膠原蛋白 alpha 鏈 (alpha chain of type X collagen)**，雖然不是骨頭主要的第一型膠原蛋白，但其變異後所報告過的臨床表現仍是骨病變有關的軟骨發育不良，所以最後選擇這 **4** 個基因變異位點進行共分離分析。所謂的共分離，是指有病的病人與家屬帶著罹病基因變異，而沒病的家屬不帶有罹病基因變異，滿足這要點的突變位點即可能為致病位點。

針對這 **4** 個基因變異位點設計聚合酶連鎖反應所需的引子，如表四。

表四、可疑位點候選基因及其聚合酶連鎖反應所需的引子序列和作用條件。

Primers	Forward (5'->3')	Reverse (5'->3')	Annealing Temp	產出
CTNNB1-exon13	TTTTCTCAAGGGCCTTTTT	CAAGCCAGGGAAACATCAAT	58	274
COL10A1-exon3	TGGTAGCCATGGTTTTGTGA	TCCCTGTTGTCCAGGTTTTTC	58	546
SFRP4-exon1	ATAAATAGGGTCCC GCAATG	CCTCCCTCCATCCTTCCTAC	58	782
AXIN1-exon9	GCAGTATCGGGTACCACCAA	GAGACAGGAGAAGGCTCTCG	58	487



圖八、共分離分析結果。(A)上層是野生型基因序列提供比較。箭頭表示變異位點。除 *CTNNB1* 基因是反向定序外，其他三個基因是正向定序。(B) 桑格定序用於檢查病患和其家屬，在全外顯子組定序所找出的四個基因變異情況，以進一步確認全外顯子組定序結果，並評估確定的變異是否來自於父或母任一方。

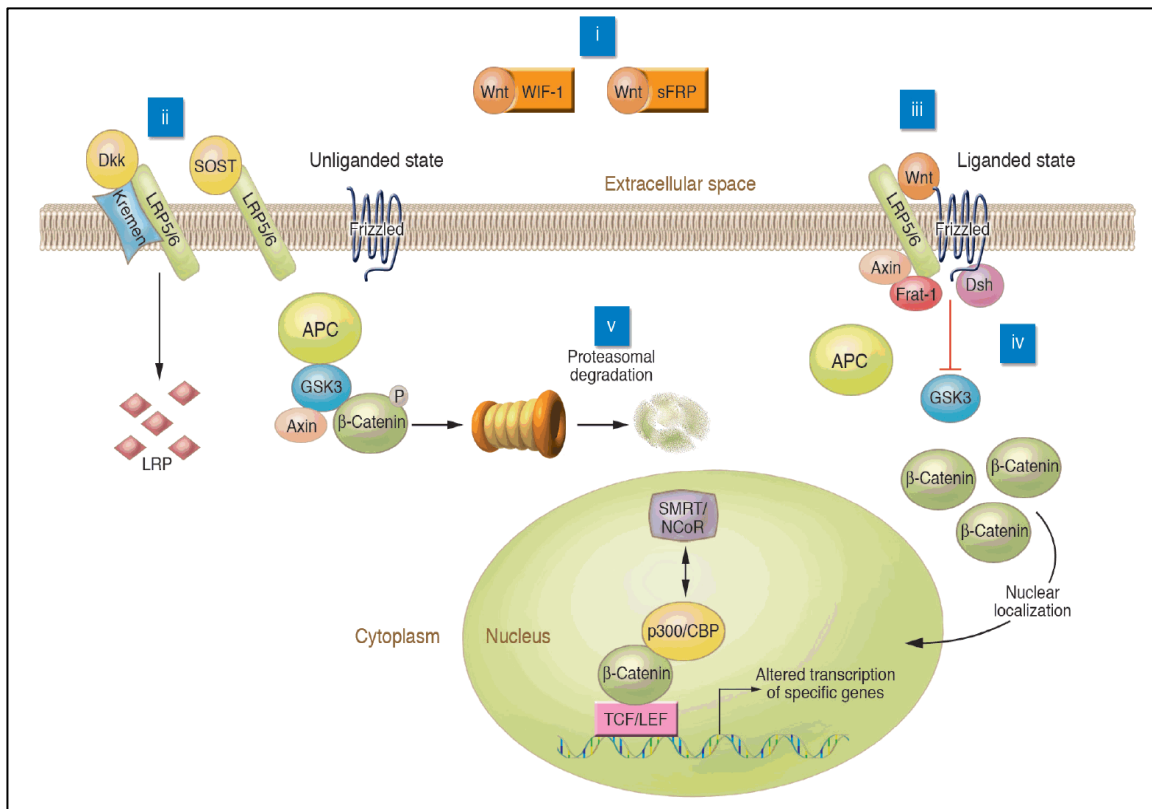
桑格定序結果證實患者存在 *CTNNB1* 異合子基因變異(cDNA 序列第 1982 位置的 G 轉位 (transition) 成 A)，並顯示父母及兩位弟弟皆正常，表明該變異是原發突變 (de novo mutation)。該變異將導致 beta-catenin 胺基酸序列的第 661 位置，由精胺酸 Arginine 改變成麩醯胺酸 Glutamine。

共分離分析結果顯示。僅有 **CTNNB1 c.G1982A (p.Arg661Gln)** 滿足共分離原則，有病的人帶著罹病基因變異，而沒病的家屬則不帶有該罹病基因變異，因此僅 **CTNNB1 c.G1982A (p.Arg661Gln)**可能為致病位點。

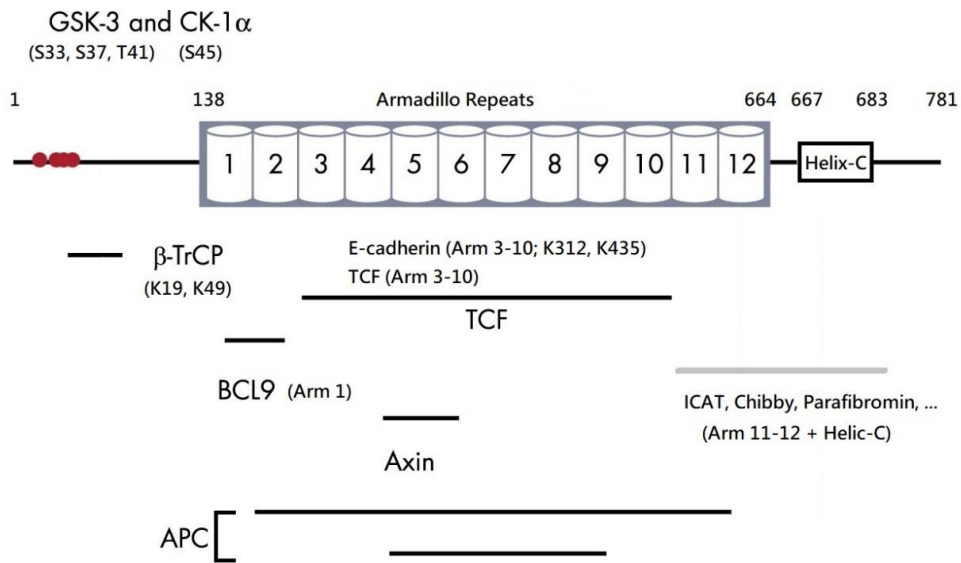
四、討論

個案之 **CTNNB1** 基因(NM_001904.4) 序列在第 1982 個核苷酸出現異型合子(heterozygous)核苷酸序列改變 (c.1982G>A)，導致蛋白質序列第 661 個胺基酸發生改變 (p.Arg661Gln)。此變異點的「對偶基因型頻率」(allele frequency) 在基因體定序計畫 Genome Aggregation Database (gnomAD) 東亞地區的正常族群中未被報導過；在臺灣人體生物資料庫 Taiwan BioBank 中未被報導過；在疾病資料庫 ClinVar 中之致病性記錄為「無資料」，亦即未報導過此變異位點。且此變異點之 SIFT 為 D，PolyPhen-2 為 D，預測此變異點可能會影響蛋白質功能。另外，GERP 值為 4.82(大於 4.4)，表示跨物種的 DNA 核酸序列在此位點是很保守而一致的。因此 **CTNNB1 c.G1982A (p.Arg661Gln)** 極可能為致病位點，

CTNNB1 基因編碼製造 beta-catenin 蛋白，而 beta-catenin 是 WNT 訊息傳遞鏈的關鍵組成部分。在造骨細胞中，WNT 訊息傳遞鏈是造骨細胞成熟與分化的主要參與者。在沒有 WNT 訊息傳遞鏈的情況下，**AXIN**、**APC** 和 **GSK3B** 會形成複合物，促進 beta-catenin 氮端特定位置的絲胺酸和蘇胺酸磷酸化、隨後泛素化(ubiquitination)而被蛋白酶體(proteasome)分解。在 WNT 配體存在的情況下，beta-catenin 不會被磷酸化與泛素化，而在細胞核中積累，充當 TCF/LEF 轉錄因子的共活化劑(co-activator)，從而活化 WNT 響應基因(Wnt responsive genes)，如圖九。



圖九：WNT 訊息傳遞鏈 (WNT signaling in osteoblasts)。



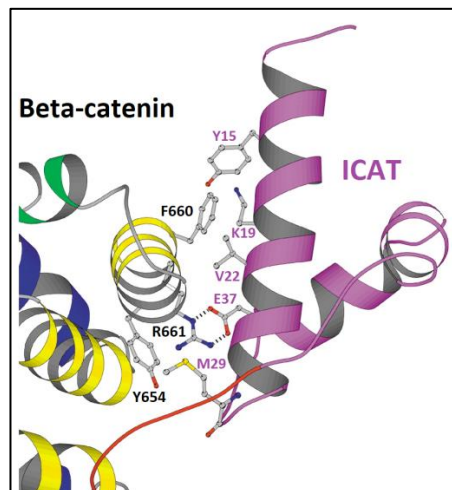
Post-translational modifications to stabilize beta-catenin
(1) Phospholation: JNK2 (S191, S605), AKT (S552), PKA (S675)
(2) Acetylation: CBP (K49), p300 (K346)
(3) Ubi (K394)

圖十、Beta-catenin 的主要結構及其與其他轉錄因子交互作用處。

圖片修改自 Tianru Jin, Endocrine Reviews 2016;37(3):254-277

Beta-catenin 的主要結構 (如圖十) (Jin, 2016), 包括有 140 個胺基酸的氮端次單元(N-terminal domain)、中央區為 12 個重複的犢独結構(armadillo 12 repeats)、以及一個由約 100 個胺基酸組成的碳端次單元(C-terminal domain)。中央的犢独結構區可結合 cadherins, TCF, APC, 與 Axin 等轉錄活化因子(transcriptional coactivators), 而兩側的氮端及碳端次單元為轉錄活化區(transcription activation domains)。大部分的轉錄活化因子, 都與犢独結構區及氮端或碳端次單元同時結合; 但某些只與犢独結構區結合, 如 CBP/p300、Brg-1、TBP, 只與碳側的犢独結構 11 與 12 結合。此外, 絕大多數的轉錄因子與 beta-catenin 交互作用後, 是促進 WNT 響應基因的表現。

相對地, ICAT (Inhibitor of beta-Catenin And Tcf-4)抑制 beta-catenin 和 TCF/LEF 轉錄因子的交互作用會降低 WNT 響應基因的表現。交互作用後, 絕大多數是促進 WNT 響應基因的表現。ICAT 則干擾、阻斷這些因子與 Beta-catenin 的交互作用, 繼而抑制 WNT 響應基因的表現, 作為 WNT 訊息傳遞鏈的抑制劑存在。



圖十一、ICAT 結合 Beta-catenin 的第 11 與第 12 個犢独結構

圖片源自 Graham, Mol Cell. 2002 Sep;10(3):563-71

ICAT (Inhibitor of beta-Catenin And Tcf-4), 又名 beta-catenin-interacting protein 1, 由 *CTNNBIP1* 基因編碼製造的蛋白, 於細胞核內結合 beta-catenin, 阻止 beta-catenin 和主要的轉錄活化因子 TCF/LEF 之間的相互作用, 而作為 WNT 訊息傳遞鏈的負調節劑。Beta-catenin 的第 11、12 個犢独結構是 ICAT 結合的必要區域 (Tago *et al.*, 2000) (如圖十一), 而位於 beta-catenin 第 12 個犢独結構的 phe660 (F660)與 Arg661, 是 ICAT 能否結合上 beta-catenin 最關鍵的位置 (Daniels & Weis, 2002; Graham, Clements, Kimelman, & Xu, 2002), phe660 參與

beta-catenin 和 ICAT 之間的疏水性，而 Arg661 則提供正電荷讓 beta-catenin 和 ICAT 之間形成氫鍵連接。

Beta-catenin 的 R661 精胺酸(arginine)側鏈帶正電荷，而 ICAT 的 E37 麩胺酸(glutamate)側鏈帶負電荷，這兩種胺基酸之間最可能的相互作用是離子鍵，即正負電荷相吸之引力。之前研究證實 ICAT 的 E37 由原本的麩胺酸(glutamate)改變成丙胺酸(alanine)，會消除 ICAT/beta-catenin 之間的作用 (Tago *et al.*, 2000)，使得 ICAT 無法結合 beta-catenin。本研究的 beta-catenin R661 的精胺酸被麩醯胺酸取代，而麩醯胺酸為不帶電的極性胺基酸，無法與 ICAT 的 E37 麩胺酸(glutamate)形成離子鍵，影響 ICAT 與 beta-catenin 之間的作用，失去 ICAT 對於 WNT 訊息傳遞鏈的抑制，繼而活化 WNT 訊息傳遞鏈。鑑於 WNT 訊息傳遞鏈對骨恆定具有關鍵影響、及 WNT 訊息傳遞鏈的活化可導致其他骨質增生疾病，故判定此研究所報告的 CTNNB1 突變可能是造成廣泛骨硬化症的原因，待後續的功能性實驗來證實。

到目前為止，全世界僅有一例因 CTNNB1 基因異型合子誤義變異 (CTNNB1 c.131C>T; p.Pro44Leu) 原發突變，而引起廣泛骨硬化症的個案(Peng *et al.*, 2020)，該病例的誤義變異造成 beta-catenin 第 44 個胺基酸由正常的脯胺酸(Proline)改變成白胺酸(Leucine)，而相鄰的第 45 個胺基酸(絲胺酸 Serine)是 beta-catenin 氮端次單元進行磷酸化的關鍵位置，而 p.Pro44Leu 的變異造成氮端次單元磷酸化減少，繼而穩定 beta-catenin。而本研究報告了一名在 CTNNB1 基因 (p.R661Q) 中具有異合子誤義變異且為原發突變的台灣患者。該患者具有廣泛骨硬化症表型，這是全世界第二例、亞洲首例的 CTNNB1 基因功能增強突變(gain-of-function mutation) 的病例。

肆、結論與應用

- 一、本研究發現病患帶有 *CTNNB1* c.1982G>A (p.Arg661Gln) 之異合子(heterozygous)誤義變異(missense mutation)，並證實是 *CTNNB1* 基因的原發突變(de novo mutation)。本研究擴展了 *CTNNB1* 基因的突變譜，增強了對該表現型的理解。據我們所知，這是全世界第二例、亞洲首例的 *CTNNB1* 基因功能增強突變(gain-of-function mutation) 的病例報告。
- 二、我們發現突變並非出現在 *LRP5*、*LRP6*、*SOST* 等候選基因突變熱區，而是出現在 *CTNNB1* c.1982G>A (p.Arg661Gln)，並影響後續蛋白質表現。Beta-catenin 的 R661，是 ICAT 與 beta-catenin 之間交互作用的關鍵位置，而 p.Arg661Gln 的變異影響 ICAT 對 WNT/beta-catenin 訊息傳遞鏈的抑制，繼而穩定 beta-catenin，造成骨質異常增生、並導致全身骨硬化。

伍、參考資料

- Balemans, W., Patel, N., Ebeling, M., Van Hul, E., Wuyts, W., Lacza, C., . . . Van Hul, W. (2002). Identification of a 52 kb deletion downstream of the SOST gene in patients with van Buchem disease. *J Med Genet*, *39*(2), 91-97. doi:10.1136/jmg.39.2.91
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, *423*(6937), 337-342. doi:10.1038/nature01658
- Burr, D. B., & Akkus, O. (2014). Chapter 1 - Bone Morphology and Organization. In D. B. Burr & M. R. Allen (Eds.), *Basic and Applied Bone Biology* (pp. 3-25). San Diego: Academic Press.
- Daniels, D. L., & Weis, W. I. (2002). ICAT inhibits beta-catenin binding to Tcf/Lef-family transcription factors and the general coactivator p300 using independent structural modules. *Mol Cell*, *10*(3), 573-584. doi:10.1016/s1097-2765(02)00631-7
- De Ridder, R., Boudin, E., Mortier, G., & Van Hul, W. (2018). Human Genetics of Sclerosing Bone Disorders. *Curr Osteoporos Rep*, *16*(3), 256-268. doi:10.1007/s11914-018-0439-7
- Graham, T. A., Clements, W. K., Kimelman, D., & Xu, W. (2002). The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Mol Cell*, *10*(3), 563-571. doi:10.1016/s1097-2765(02)00637-8
- Huang, W., Yang, S., Shao, J., & Li, Y. P. (2007). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*, *12*, 3068-3092.
- Jin, T. (2016). Current Understanding on Role of the Wnt Signaling Pathway Effector TCF7L2 in Glucose Homeostasis. *Endocr Rev*, *37*(3), 254-277. doi:10.1210/er.2015-1146
- Peng, H., Jenkins, Z. A., White, R., Connors, S., Hunter, M. F., Ronan, A., . . . Robertson, S. P. (2020). An Activating Variant in CTNNB1 is Associated with a Sclerosing Bone Dysplasia and Adrenocortical Neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab*, *105*(3). doi:10.1210/clinem/dgaa034
- Tago, K., Nakamura, T., Nishita, M., Hyodo, J., Nagai, S., Murata, Y., . . . Akiyama, T. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev*, *14*(14), 1741-1749.
- van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., & Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet*, *30*(9), 418-426. doi:10.1016/j.tig.2014.07.001
- Whyte, M. P., McAlister, W. H., Zhang, F., Bijanki, V. N., Nenninger, A., Gottesman, G. S., . . . Mumm, S. (2019). New explanation for autosomal dominant high bone mass: Mutation of low-density lipoprotein receptor-related protein 6. *Bone*, *127*, 228-243. doi:10.1016/j.bone.2019.05.003

【評語】 090016

此作品以 WES 找到骨質硬化個案中，CTNNB1 c.G1982A 形成的 missense mutation p.Arg661Gln 突變可能為發病成因。此突變發生在腎臟與大腸組織中已有數例報導，此突變可能降低與 ICAT 的蛋白交互作用，而減少其抑制作用，導致 beta-catenin 路徑過度活化，此推論需要進一步證據支持。本研究具有臨床應用價值潛力，若能證明其因果關係，可作為骨質硬化症的遺傳篩檢指標。本篇研究找出個案骨硬化症的突變基因為 CTNNB1 基因，是亞洲首例 CTNNB1 基因突變引發之骨硬化症，在討論中有提到可能的相關致病機制，但缺乏功能性研究證實，使得此篇研究還在初期階段，如能發現新的致病機制將會擴增對骨硬化症的了解。