



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการโรคกระดูกเปราะชนิดใหม่:
ลักษณะทางคลินิกและตำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุ

โดย ดร.สุรัสวดี อัสวรรตน์ และคณะ
ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเวชพันธุศาสตร์
ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิถุนายน พ.ศ. 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการโรคกระดูกเปราะชนิดใหม่:
ลักษณะทางคลินิกและตำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุ

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ดร.สุรัสวดี อิศวรรณ์	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. รศ.ดร.พญ.กัญญา สุภปิติพร	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ดร.ภัทรา ยี่ทอง	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
5. นายเฉลิมพล ศรีจอมทอง	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
6. น.ส.ศิริประภา ทองกอบเพชร	คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และคณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

โรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ คือ โรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของสายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของกระดูก เซลล์ผิวหนัง และเอ็น ดังนั้นอาการแสดงของคนที่เป็นโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ที่พบได้บ่อย คือ กระดูกเปราะ แตก หักง่าย โดยเฉพาะบริเวณแขนและขา ผู้ป่วยอาจมีความผิดปกติอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ตัวเตี้ย รูปหน้าแบนกว้าง เสียงแหลมผิดปกติ ตาขาวจะเป็นสีฟ้าหรือสีเทา ฟันหักง่าย ฟันมีสีเหลืองออกน้ำตาล โรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ในบางรายอาจรุนแรงถึงขั้นอาจเสียชีวิตได้ สามารถแบ่งได้ตามแบบแผนการถ่ายทอดโรค คือ การถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น เกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *COL1A1* และ *COL1A2* การถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยเกิดจากการกลายพันธุ์ของยีน *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1* และ *OSX*

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเริ่มการศึกษาจากคนไข้เด็กชายหนึ่งซึ่งคลอดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีประวัติพบกระดูกหักหลายท่อนตั้งแต่ในครรภ์ การตรวจร่างกายและภาพถ่ายทางรังสีหลังคลอดยืนยันการหักของกระดูก แพทย์ให้การวินิจฉัยว่า เป็นโรค osteogenesis imperfecta (OI) เมื่อซักประวัติครอบครัวพบว่า มีญาติผู้ชายที่มีอาการเดียวกันอีก 5 คนในครอบครัว ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ พงสาวลีเข้าได้กับการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยบนโครโมโซม X ทั้งนี้เป็นที่น่าสนใจมากกว่า ไม่เคยมีรายงานครอบครัว OI ที่มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยบนโครโมโซม X มาก่อน ประกอบกับยังไม่เคยมีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนในโรค OI อยู่บนโครโมโซม X เลย คณะผู้วิจัยจะดำเนินการศึกษาลักษณะทางคลินิกให้ชัดเจน นอกจากนี้การศึกษาระดับ X-inactivation ในผู้หญิงที่เป็นพาหะ พบว่าผู้หญิงที่เป็นพาหะทุกรายมี skewed X-inactivation ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ชนิดใหม่นี้มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X คณะผู้วิจัยทำการศึกษาคำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคกระดูกเปราะชนิดใหม่ โดยการทำ Linkage Analysis และใช้ค่า LOD score ซึ่งบอกความเชื่อมโยงระหว่างตำแหน่งของโรคกับตำแหน่งตัวบ่งชี้ ผลปรากฏว่า microsatellite ที่ให้ค่า LOD score สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 3.31 ได้แก่ DXS987 ซึ่งมีขนาด 30 Mb คณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์เพิ่ม โดยใช้ microsatellite markers บริเวณ 30 Mb ดังกล่าว จำนวน 22 ตำแหน่ง โดยตัวบ่งชี้นี้จะมีความละเอียดเพิ่มขึ้น ทำให้ critical region ลดลงเหลือ 18.8 Mb โดยตำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคนี้อยู่บริเวณ Xp22.3-21.2 ซึ่งประกอบไปด้วยยีนจำนวนกว่า 200 ยีน คณะผู้วิจัยจะศึกษายีนที่เป็นสาเหตุของโรคด้วยเทคนิคในโครงการวิจัยต่อไป

Abstract

Osteogenesis imperfecta (OI) is a heritable disorder of connective tissue characterized by the presence of bone fragility and fractures. The clinical manifestations vary from mild to severe perinatal lethal. Associated anomalies include short stature, dentinogenesis imperfecta, and blue sclerae. The precise occurrence of OI in Thailand is not known but an estimated worldwide prevalence is between 1/25,000 to 1/100,000. OI can be divided by mode of inheritance to those inherited in an autosomal dominant fashion, including mutations in *COL1A1* and *COL1A2*, whereas mutations in collagen-modifying enzymes and chaperones (*CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, and *SERPINH1*), mineralization defect (*SERPINF1*) and a mutation in *OSX* resulted in autosomal recessive OI.

In this proposal, we propose to study an OI family with pedigree consistent with an X-linked recessive mode which has never been previously reported in the literature. This family includes at least 6 living affected male patients and at least 4 living female carriers. We visited the family members for detailed information such as history, physical examination and pedigree analysis. After informed consent, sample collection and laboratory investigations were performed. The level of X-inactivation (Xi) using a methylation assay showed that all of the four obligate carriers showed skewed X-inactivation which supported that the disease is inherited as an X-linked pattern. We further PCR-amplified X-chromosomal region using panel 28 of ABI Prism Linkage Mapping Sets-MD10 Version 2.5. Maximum LOD score using the deduced genotyping of unavailable members was 3.31 at marker DXS987. Fine mapping was performed to narrow down the critical region using additional 22 microsatellite markers, defining the critical region down to 18.8 Mb in size, which includes almost 200 genes.

Interestingly, due to the fact that there have been no reports of familial OI with X-linked inheritance, together with no genes on X chromosome were identified to be a causative gene for OI, we now narrow down the critical region into 18.8 Mb. The X-linked OI locus is now narrow down to Xp22.3-21.2. We expect to identify the causative gene in the next project by next generation sequencing which will extend the current knowledge of normal human bone development and may contribute to other forms of bone diseases.

Executive summary

ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย) โรคกระดูกเปราะชนิดใหม่: ลักษณะทางคลินิกและตำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุ

(ภาษาอังกฤษ) A new form of brittle bone disease: phenotypic characterization and chromosomal localization

ระยะเวลาโครงการ 1 ปี

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร.สุรัสวดี อิศวรรัตน์

ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 15 มิถุนายน 2554 ถึงวันที่ 14 มิถุนายน 2555

การดำเนินงานวิจัย

คณะผู้วิจัยค้นหาสมาชิกในครอบครัวโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์แบบใหม่ ทั้งที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค โดยศึกษาลักษณะทางคลินิก แบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม การตรวจร่างกาย ลักษณะทางรังสี การตรวจทางห้องปฏิบัติการทั่วไป ตลอดจนการดำเนินโรคและการถ่ายทอดของโรค พบว่าเป็นโรคที่ยังไม่ทราบยีนที่เป็นสาเหตุ คณะผู้วิจัยจึงศึกษาหาตำแหน่งของยีนด้วยวิธี linkage analysis และทำ Fine mapping เพื่อให้ได้ critical region ที่แคบที่สุดในการหา ยีนที่เป็นสาเหตุของโรคต่อไป

ผลงานวิจัยที่ได้รับ

จากการซักประวัติครอบครัวของคนไข้สามารถบ่งชี้ได้ว่าโรคกระดูกเปราะในครอบครัวนี้มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X (X-linked inheritance) โดยพบเฉพาะผู้ชายที่เป็นโรคเท่านั้น ผู้หญิงเป็นพาหะ ข้อมูลเหล่านี้เป็นหัวใจสำคัญของการสืบหา ยีนและให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์และอัตราเสี่ยงของการเกิดซ้ำ (recurrence risk) นอกจากการศึกษาลักษณะทางคลินิกแล้ว การศึกษาระดับ X-inactivation ในผู้หญิงที่เป็นพาหะ พบว่าผู้หญิงที่เป็นพาหะทุกรายมี skewed X-inactivation ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ชนิดใหม่นี้มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X คณะผู้วิจัยทำการศึกษาหาตำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคกระดูกเปราะชนิดใหม่ โดยการทำให้ Linkage Analysis และใช้ค่า LOD score ซึ่งบอกความเชื่อมโยงระหว่างตำแหน่งของโรคกับตำแหน่งตัวบ่งชี้ ผลปรากฏว่า microsatellite ที่ให้ค่า LOD score สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 3.31 ได้แก่ DXS987 ซึ่งมีขนาด 30 Mb คณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์เพิ่ม โดยใช้ microsatellite markers บริเวณ 30 Mb ดังกล่าว จำนวน 22 ตำแหน่ง โดยตัวบ่งชี้นี้จะมีความละเอียดเพิ่มขึ้น ทำให้ critical region ลดลงเหลือ 18.8 Mb โดยตำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคนี้อยู่บริเวณ Xp22.3-21.2 ซึ่งประกอบไปด้วยยีนจำนวนกว่า 200 ยีน คณะผู้วิจัยจะศึกษาหา ยีนที่เป็นสาเหตุของโรคด้วยเทคนิคในโครงการวิจัยต่อไป

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

โรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ (Brittle bone disease, Fragile bone disease, Osteogenesis imperfecta; OI) เกิดจากพันธุกรรมที่ถ่ายทอดแบบยีนเดี่ยว ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีการตั้งแต่วัยเด็ก เกิดจากการได้รับการถ่ายทอดสารพันธุกรรมหรือยีนที่ผิดปกติจากพ่อหรือแม่ หรืออาจจะไม่มีประวัติคนในครอบครัวเคยเป็นมาก่อน โดยมีอุบัติการณ์โดยเฉลี่ย 1 ใน 25,000 ถึง 1 ใน 100,000 ราย ในคนปกติ ถ้าเกิดการกระแทกหรือหกล้มอาจเป็นแค่แผลถลอกหรือฟกช้ำ แต่ในคนที่เปราะกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ (OI) อาจถึงขั้นกระดูกหักได้ OI เป็นโรคทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผิดปกติของสายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างหลักของกระดูก เซลล์ผิวหนัง และเอ็น ดังนั้นอาการแสดงของคนที่เป็นโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ที่พบได้บ่อย คือ กระดูกเปราะ แตก หักง่าย โดยเฉพาะบริเวณแขนและขา ผู้ป่วยอาจมีความผิดปกติอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ตัวเตี้ย รูปหน้าแบนกว้าง เสียงแหลมผิดปกติ ตาขาวจะเป็นสีฟ้าหรือสีเทา ฟันหักง่าย ฟันมีสีเหลืองออกน้ำตาล โรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ สามารถแบ่งได้ตามแบบแผนการถ่ายทอดโรค คือ การถ่ายทอดแบบลักษณะเด่น เกิดจาก การกลายพันธุ์ของยีน *COL1A1* และ *COL1A2* การถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยเกิดจาก การกลายพันธุ์ของยีน *CRTAP*, *LEPRE1*, *PPIB*, *SERPINH1*, *SERPINF1* และ *OSX* แต่ไม่เคยมีรายงานว่ามีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X มาก่อน

การตรวจวินิจฉัยก่อนคลอดสามารถทำได้โดยการตรวจ ultrasound ในกรณีที่เป็นโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์แบบรุนแรงเช่น โรคกระดูกเปราะชนิดที่ 2 โดยจะพบความผิดปกติของกระดูก คือ มีลักษณะสั้น ผิดรูป มีกะโหลกศีรษะผิดปกติ กระดูกซี่โครงหัก รวมถึงพบความผิดปกติของการเกาะของแร่ธาตุต่างๆที่เสริมความแข็งแรงให้แก่กระดูก (bone mineralization) ปัจจุบันยังไม่มีการตรวจทางชีวเคมี การรักษาโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ในปัจจุบันได้แก่ การใช้ยา Bisphosphonates เพื่อช่วยสร้างกระดูกให้แข็งแรงขึ้น การผ่าตัด และทำกายภาพบำบัด

ในการศึกษานี้ผู้วิจัย เริ่มการศึกษาจากคนไข้เด็กชายหนึ่งซึ่งคลอดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยมีประวัติพบกระดูกหักหลายท่อนตั้งแต่วัยครรภ์ ตรวจพบได้ด้วยเครื่อง ultrasound โดยสูติแพทย์ ตรวจร่างกายและภาพถ่ายทางรังสีหลังคลอดยืนยันการหักของกระดูก แพทย์ให้การวินิจฉัยว่า เป็นโรค osteogenesis imperfecta (OI) เมื่อซักประวัติครอบครัว พบว่า มีญาติผู้ชายที่มีอาการเดียวกันอีก 5 คนในครอบครัว ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ พงสาวลีเข้าได้กับการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยบนโครโมโซม X ทั้งนี้ที่น่าสนใจมากกว่า ไม่เคยมีรายงานครอบครัว OI ที่มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยบนโครโมโซม X มาก่อน ประกอบกับยังไม่เคยมีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนในโรค OI อยู่บนโครโมโซม X เลย คณะผู้วิจัยจะดำเนินการศึกษาลักษณะทางคลินิกให้ชัดเจน ศึกษาหาตำแหน่งของยีนบนโครโมโซม X

โดยใช้ microsatellite markers ในการศึกษาโครงการต่อไป จะศึกษาหา ยีนที่มีการกลายพันธุ์ในครอบครัวนี้ โดยเลือก candidate genes มาหาลำดับสารพันธุกรรมเทียบกับลำดับสารพันธุกรรมในคนปกติและในฐานข้อมูลสาธารณะ จากนั้นจึงทำการศึกษาน้ำที่ของยีนนี้ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของกระดูก

การศึกษาลักษณะทางคลินิก และการหาตำแหน่งของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์แบบใหม่นี้ จะช่วยให้เข้าใจพยาธิสภาพของการเกิดโรคมายิ่งขึ้น ที่สำคัญและจะส่งผลกระทบมากกว่านั้น คือ ทำให้เข้าใจกระบวนการสร้างกระดูกปกติมากขึ้น และอาจส่งผลให้เกิดความเข้าใจถึงกลไกการเกิดโรคกระดูกชนิดอื่น ๆ ที่พบได้บ่อยกว่าในประชากรทั่วไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- ศึกษาลักษณะทางคลินิกของคนไข้โรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์แบบใหม่ (X-linked OI) รวมทั้งประวัติ แบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม การตรวจร่างกาย ลักษณะทางรังสี การตรวจทางห้องปฏิบัติการทั่วไป วิธีการตรวจวินิจฉัย ตลอดจนการดำเนินโรค
- ศึกษาหาตำแหน่งของยีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์แบบใหม่นี้

ระเบียบวิธีวิจัย

1. Phenotypic characterization

ค้นหาสมาชิกในครอบครัวที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค ให้ได้สมาชิกในครอบครัวมากพอที่จะคำนวณ LOD Score แล้วมากกว่า 3 (อย่างน้อย 12 คน) ซึ่งอาจกระจายกันอยู่ในหลายตำบล อำเภอและจังหวัด คณะผู้วิจัยจะเดินทางไปตรวจเยี่ยมผู้ป่วยถึงบ้าน โดยสำหรับทุกสมาชิก จะถามประวัติ และตรวจร่างกายอย่างละเอียด ตรวจระดับชีวเคมี (รวมทั้ง alkaline phosphatase, calcium, phosphorus, Vitamin D, และการตรวจ Bone Mass Density (BMD)) และพาผู้ป่วยมาตรวจทางรังสีและเก็บตัวอย่างเลือดที่โรงพยาบาลใกล้เคียง

2. Pedigree analysis

การซักประวัติของครอบครัว และประวัติการเป็นโรคของบุคคลในครอบครัวมีความสำคัญอย่างยิ่ง ทั้งนี้ก็เพื่อให้ทราบถึงแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโรค ซึ่งข้อมูลเหล่านี้เป็นหัวใจสำคัญของการสืบหา ยีนที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์และอัตราเสี่ยงของการเกิดซ้ำ (recurrence risk) ในบุตรคนต่อไปและในหมู่ญาติพี่น้อง

จากการทบทวนวรรณกรรมโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์นี้ ไม่เคยมีรายงานคนไข้ที่มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X (X-linked) มาก่อน โดยเห็นได้จากการที่มีแต่ผู้ชายที่เป็นโรคเท่านั้น ผู้หญิงเป็นพาหะโดยที่ตัวเองไม่เป็นโรค แต่มีพี่ชายหรือน้องชายเป็นโรค และมีลูกชายเป็นโรค ไม่มีประวัติพ่อที่มีลูกชายเป็นโรคมาก่อน ดังนั้นการศึกษานี้จึงเป็นการรายงานครอบครัวโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ที่มีการถ่ายทอดบนโครโมโซมเป็นครั้งแรก

3. การสกัด DNA, RNA จากเลือดและกระดาศกรอง; เลือดที่ได้จากสมาชิกในครอบครัวจะถูกนำมาสกัด DNA และในคนไข้จะถูกนำมาสกัดทั้ง RNA และ DNA โดยใช้ชุด Kit (Qiagen kit)

4. การศึกษา X-inactivation เป็นการวิเคราะห์ภาวะที่โครโมโซม X ของผู้หญิงที่มีอยู่ 2 แท่งนั้น มีการทำงานอย่างสมดุลหรือไม่ หรือมีการเลือกการทำงานของโครโมโซม X แท่งใดแท่งหนึ่งอย่างจำเพาะ ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคที่มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X ในผู้หญิง

5. การทำ Linkage Analysis; หรือการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างตำแหน่งของโรคกับตำแหน่งตัวบ่งชี้ (marker) ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ microsatellite marker โดยหลักการของการทำโดยย่อคือ ในคนปกติทั่วไปจะมีส่วนของ DNA เรียงตัวซ้ำๆกันเป็นจำนวนชุดที่แตกต่างกัน ในทางนิติเวชศาสตร์สามารถอาศัยความหลากหลายเหล่านี้เป็นตัวบอกความแตกต่างระหว่างบุคคลหรือใช้พิสูจน์บุคคล ความหลากหลายของ DNA นี้มีหลายรูปแบบ และ DNA ที่รูปแบบหลากหลายมากที่สุดเรียกว่า microsatellite คณะผู้วิจัยใช้ microsatellite เป็นตัวบ่งชี้ในการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างตำแหน่งของโรค เนื่องจากโรคนี้มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X (X-linked) ผู้วิจัยจึงใช้ microsatellite บนโครโมโซม X เท่านั้น ได้แก่ panel 28 ของ ABI Prism Linkage Mapping Sets-MD10 Version 2.5. เพื่อศึกษาว่าตัวบ่งชี้ใดที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งของโรคมากที่สุด โดย microsatellite นี้มีระยะห่างแต่ละอันโดยเฉลี่ยที่ 10 cM อย่างไรก็ตาม หลังจากได้ช่วงในขั้นแรกแล้ว อาจมีอินที่อยู่วิเวณนี้เป็นจำนวนมาก จำเป็นทำการทดลองโดยใช้ตัวบ่งชี้ที่มีระยะห่างกันน้อยลง ซึ่งจะทำให้ได้ช่วงแคบลง และมีจำนวน candidate gene ลดลงด้วย ทำให้ง่ายต่อการศึกษาต่อไป

6. การคำนวณ LOD Score คือวิธีการสถิติที่ใช้ในการบอกระดับนัยสำคัญ (p value) ของความเชื่อมโยงระหว่างตำแหน่งของโรคกับตำแหน่งตัวบ่งชี้ ค่า LOD score ที่ได้จากการคำนวณคือ ความเป็นไปได้ที่ตำแหน่งของโรคอยู่ใกล้กับตำแหน่งของตัวบ่งชี้ การแปลผลจะขึ้นอยู่กับค่าที่ได้ดังนี้ คือ ค่า LOD Score ที่มากกว่า 3 แปลว่า โอกาสที่ขึ้นก่อโรคจะอยู่ใกล้กับตำแหน่งของตัวบ่งชี้มีมากกว่าโอกาสจากความบังเอิญ 10^3 เท่า ในขณะที่ LOD Score ที่น้อยกว่า -2 เป็นการปฏิเสธ linkage ส่วน LOD Score ที่มีค่าระหว่าง -2 ถึง 3 ไม่สามารถสรุปผลได้ ในการทดลองนี้จะใช้โปรแกรม MLINK ในการคำนวณ

ผลการดำเนินงาน

คณะผู้วิจัยทำการศึกษาลักษณะทางคลินิกและการหาตำแหน่งของยีนของโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์แบบใหม่ โดยเริ่มการศึกษาจากคนไข้ได้รายหนึ่งซึ่งคลอดที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตรวจร่างกายและภาพถ่ายทางรังสีหลังคลอดยืนยันว่า เป็นโรค osteogenesis imperfecta (OI) เมื่อซักประวัติครอบครัว พบว่า มีญาติผู้ชายที่มีอาการเดียวกันอีก 5 คนในครอบครัว ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ พงสาวลิเข้าได้กับการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยบนโครโมโซม X ทั้งนี้เป็นที่น่าสนใจมากกว่า ไม่เคยมีรายงานครอบครัว OI ที่มีลักษณะการถ่ายทอดแบบลักษณะด้อยบนโครโมโซม X มาก่อน ประกอบกับยังไม่เคยมีรายงานยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างคอลลาเจนในโรค OI อยู่บนโครโมโซม X เลย คณะผู้วิจัยจึงเดินทางไปยังจังหวัดนครราชสีมา เพื่อไปพบกับครอบครัวของคนไข้และญาติ ซึ่งกระจายอยู่ในหลายตำบล อำเภอ ในจังหวัดนครราชสีมา โดยสมาชิกของครอบครัวและญาติที่ผู้วิจัยพบ มีจำนวน 18 ราย สมาชิกทุกคนได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกายอย่างละเอียด และขอเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อนำไปสกัด DNA, RNA และตรวจระดับชีวเคมี (เช่น alkaline phosphatase, calcium, phosphorus, Vitamin D, Lipid profile)

นอกจากการตรวจดังกล่าวแล้ว เฉพาะคนไข้ที่เป็นโรคกระดูกเปราะยังได้รับการเอกซเรย์ร่างกายที่โรงพยาบาลประจำอำเภอด้านขุนทดเพิ่มเติมอีกด้วย จากการซักประวัติครอบครัวของคนไข้สามารถบ่งชี้ได้ว่าโรคกระดูกเปราะในครอบครัวนี้มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X (X-linked inheritance) โดยพบเฉพาะผู้ชายที่เป็นโรคเท่านั้น ผู้หญิงเป็นพาหะโดยที่ตัวเองไม่เป็นโรค แต่มีพี่ชายหรือน้องชายเป็นโรค และมีลูกชายเป็นโรค ไม่มีประวัติพ่อที่มีลูกชายเป็นโรคมาก่อน นอกจากนี้การศึกษาระดับ X-inactivation ในผู้หญิงที่เป็นพาหะ ผลการทดลองพบว่าผู้หญิงที่เป็นพาหะทุกรายมี skewed X-inactivation ซึ่งเป็นการสนับสนุนว่าโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์ชนิดใหม่นี้มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X ข้อมูลเหล่านี้เป็นหัวใจสำคัญของการสืบหาตำแหน่งที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์และอัตราเสี่ยงของการเกิดซ้ำ (recurrence risk) ในบุตรคนต่อไปและในหมู่ญาติพี่น้อง

คณะผู้วิจัยทำการศึกษาค้นหาตำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคกระดูกเปราะชนิดใหม่ โดยการทำ Linkage Analysis หรือการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างตำแหน่งของโรคกับตำแหน่งตัวบ่งชี้ (marker) ซึ่งในการทดลองนี้จะใช้ microsatellite markers โดยใช้ panel 28 ของ ABI Prism Linkage Mapping Sets-MD10 Version 2.5 โดย microsatellite markers นี้มีระยะห่างแต่ละอันโดยเฉลี่ยที่ 10 cM วิธีการสถิติที่ใช้ในการบอกระดับนัยสำคัญ (p value) ใช้ค่า LOD score ซึ่งบอกความเชื่อมโยงระหว่างตำแหน่งของโรคกับตำแหน่งตัวบ่งชี้ ผลปรากฏว่า microsatellite ที่ให้ค่า LOD score สูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 3.31 ได้แก่ DXS987 ซึ่งมีขนาด 30 Mb คณะผู้วิจัยจึงทำการวิเคราะห์เพิ่ม โดยใช้ microsatellite markers บริเวณ 30 Mb ดังกล่าวจำนวน 22 ตำแหน่ง โดยตัวบ่งชี้นี้จะมีความละเอียดเพิ่มขึ้น ทำให้ critical region ลดลงเหลือ 18.8 Mb โดย

ตำแหน่งของยีนที่เป็นสาเหตุของโรคนี้อยู่บนบริเวณ Xp22.3-21.2 ซึ่งประกอบไปด้วยยีนจำนวนกว่า 200 ยีน
คณะผู้วิจัยจะศึกษาหายีนที่เป็นสาเหตุของโรคด้วยเทคนิคในโครงการวิจัยต่อไป

Output ที่ได้จากโครงการ

- พบว่าโรคกระดูกเปราะกรรมพันธุ์แบบใหม่นี้ มีการถ่ายทอดบนโครโมโซม X องค์ความรู้นี้จึงเป็นประโยชน์ต่อคนไข้และครอบครัว โดยแพทย์สามารถให้คำปรึกษาแนะนำทางพันธุศาสตร์ที่เหมาะสมให้กับครอบครัวนี้ได้
- นำผลงานดังกล่าวสามารถนำไปสอนนิสิต และไปเสนอในงานประชุม เมธีวิจัยอาวุโส สกว.
- พัฒนาระบบการใหม่ระดับห้องปฏิบัติการ 1 กระบวนการ คือ การศึกษา linkage analysis ด้วย microsatellite บน chromosome X
- พัฒนานักวิจัยหลังปริญญาเอก 1 คน ได้แก่ ดร.สุรัสวดี อิศวรรัตน์
- ผลิตนักวิจัยใหม่ ระดับปริญญาเอก 1 คน ได้แก่ น.ส.ภัทรา ยีทอง
- ผลงานวิจัยเพื่อส่งเสริมพลังในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

ภาคผนวก

ร่างผลงานวิจัยเพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

(เนื่องจากผลงานยังอยู่ในระหว่างการพิจารณา ข้อมูลเฉพาะบางอย่างจึงยังไม่สามารถเปิดเผยได้)

Title: An X-linked osteogenesis imperfecta locus is on Xp22.3-21.2.

Surasawadee Ausavarat^{1,2}, Wayne Cabral³, Patra Yeetong^{1,2,4}, Chalurmpon Srichomthong^{1,2},
Joan C Marini^{3*}, Kanya Suphapeetiporn^{1,2*}, Vorasuk Shotelersuk^{1,2}

¹*Center of Excellence for Medical Genetics, Department of Pediatrics,*

Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

²*Excellence Center for Medical Genetics, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red
Cross, Bangkok, 10330, Thailand*

³*Bone and Extracellular Matrix Branch, National Institute of Child Health and Human
Development, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*

⁴*Inter-Department Program of Biomedical Sciences, Faculty of Graduate School,
Chulalongkorn University*

Corresponding author: Kanya Suphapeetiporn, M.D., Ph.D. Head of Division of Medical
Genetics and Metabolism, Department of Pediatrics, Sor Kor Building 11th floor, King
Chulalongkorn Memorial Hospital, Bangkok 10330, Thailand.

Tel: 662-256-4989; Fax: 662-256-4911; e-mail: kanya.su@chula.ac.th

*Corresponding author: Joan C. Marini, MD., Ph.D. the Bone and Extracellular Matrix
Branch, NICHD, National Institutes of Health, Bldg. 10, Rm. 10N260, 9000 Rockville Pike,
Bethesda, MD 20892. E-mail: oidoc@helix.nih.gov

Key words: osteogenesis imperfecta, X-linked osteogenesis imperfecta

Abstract

Some patients with osteogenesis imperfecta (OI), a brittle bone disease, do not have mutations in known genes, hindering the accurate genetic counseling to the family and the development of specific treatment.

We studied 18 members with six affected in a large OI family inherited in an X-linked recessive manner. X-inactivation assay showed that all four obligate carriers had skewed X-inactivation supporting that the disease is inherited as an X-linked pattern. Using 40 markers on chromosome X for linkage analysis, we found a maximum LOD score of 3.31 on chromosome Xp22.3-21.2. In conclusion, clinical and radiographic features, collagen biochemistry of a new type of OI inherited in an X-linked recessive mode is described.

Background

Osteogenesis imperfecta (OI) or brittle bone disease is characterized by low bone mass and reduced bone material strength resulting in bone fragility and susceptibility to fractures. Clinical severity ranges from subclinical to lethal. In a majority, the causative defects are directly related to type I collagen, including insufficient protein quantity, primary structure abnormalities, post-translational modifications, folding, intracellular transport or matrix incorporation.¹ It is genetically heterogeneous. Most patients have autosomal dominant defects in *COL1A1* or *COL1A2*, with more than 1,500 identified mutations.² A minority of OI cases is inherited in an autosomal recessive manner. They have mutations in genes encoding proteins involved in collagen prolyl 3-hydroxylation (*CRTAP*^{3,4}, *LEPRE1*⁵

and *PPIB*^{6,7}), helical folding (*FKBP10*⁸ and *SERPINH1*⁹), or mineralization defect (*SERPINF1*¹⁰). Recently, a mutation in *OSX*¹¹ have been identified.

Here, we study six patients with OI in a family inherited in an X-linked manner. Using linkage analysis, we successfully identify a locus of X-linked osteogenesis imperfecta.

Methods

Clinical descriptions

A Thai newborn was born at 39 weeks gestation by Cesarean section due to multiple fractures of long bones detected since four months pregnant, with Apgar scores at 1 and 5 minutes of 7 and 9, respectively. At birth, his length was 45 cm, head circumference 34 cm, anterior fontanelle 5x5cm and was found to have fractures of ribs, humeri, femori, and tibiae. Family history showed that there were totally 12 affected members with seven living. We were able to do clinical assessment and obtain blood samples from 18 members with six affected.

DNA extraction

This protocol was approved under the Institutional Review Board of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University. After written informed consents were obtained, high molecular weight DNA was extracted from leukocytes of all available family members using 5Prime (Gaithersburg,MD, USA) and Qiagen kit (Gaithersburg,MD, USA) according to the manufacturer instruction.

X-inactivation assay

Eight female members (III1, III5, III7, IV1, IV5, IV7, IV9, IV10) and one unaffected male (IV8) were subjected to X-inactivation analysis. A total of 500 ng blood –derived DNA was digested with 10 U of the methylation-sensitive enzyme *HpaII* at 37°C for 16 hour and

enzyme-inactivated at 95°C for 10 min. The first exon of Androgen receptor gene (AR) was amplified using fluorescently labeled forward primer FAM-5'-cgcgagtgatccagaaccc-3' and reverse primer 5'-gttgctgttcctcatccagg-3' in digested and undigested DNA template. The polymorphic CAG repeats in the AR gene were used to identify parental chromosomes. Methylation differences were analysed based on peak heights in the PCR product by Genemapper version 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Linkage analysis

We PCR-amplified X-chromosomal microsatellite markers using panel 28 of ABI Prism Linkage Mapping Sets-MD10 Version 2.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Additional 22 polymorphic microsatellite markers were used for fine mapping on chromosome Xp22 betweenand All fluorescently labeled primers were typed on an ABI Prism 3100 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) with Genemapper version 3.7. For genetic mapping, MLINK program was used to calculate two-point linkage analysis with the following model: X-linked recessive with high penetrance, disease and normal allele frequencies were set at 0.01 and 0.99.

Results

X-inactivation assay

The level of X-inactivation (Xi) using a methylation assay showed that all of the four obligate carriers showed skewed X-inactivation which supported that the disease is inherited as an X-linked pattern. Of note, one of the possible carriers (IV9) also had preferential X allele expression.

Linkage analysis

Maximum LOD score using the deduced genotyping of unavailable members was 3.31, defining the critical region from markers to Haplotypes were consistent with affection or carrier status in all individuals tested.

Discussion

Our proband had prenatal fractures, low bone mass and low BMD consistent with a diagnosis of OI. Pedigree analysis showed that all affected members were male and related by unaffected female carriers, consistent with an X-linked recessive inheritance. With thousands of patients have been clinically and molecularly characterized, an X-linked inheritance had never been reported. We therefore performed an X-inactivation assay, which showed that all four obligate carriers had skewed X-inactivation, supporting our hypothesis that the responsible gene is on the X chromosome.

We then performed a linkage analysis and assigned the X-linked OI locus to a region on Xp22.3-21.2

Conclusions

We have characterized clinical, radiographic and biochemical features and OI locus with a new mode of inheritance.

Conflict of interest

All authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

This study was supported by the Thailand Research Fund, National Science and Technology Development Agency, the 90th Anniversary of the Chulalongkorn University

fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund), the National Research University Project, office of the Higher Education Commission (HR1163A).

Authors' contribution

SA carried out sample collections, designed experiments and performed linkage analysis. WC performed and JCM supervised the collagen biochemical analysis. PY performed X-inactivation analysis and help interpretation of linkage analysis. CS carried out sample preparation. KS and VS carried out sample collections, designed, and supervised experiments. JCM, KS, VS participated in the writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, Marini JC. New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:540-57.
2. Marini JC, Forlino A, Cabral WA, et al. Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Human mutation* 2007;28:209-21.
3. Barnes AM, Chang W, Morello R, et al. Deficiency of cartilage-associated protein in recessive lethal osteogenesis imperfecta. *The New England journal of medicine* 2006;355:2757-64.
4. Morello R, Bertin TK, Chen Y, et al. CRTAP is required for prolyl 3- hydroxylation and mutations cause recessive osteogenesis imperfecta. *Cell* 2006;127:291-304.

5. Cabral WA, Chang W, Barnes AM, et al. Prolyl 3-hydroxylase 1 deficiency causes a recessive metabolic bone disorder resembling lethal/severe osteogenesis imperfecta. *Nature genetics* 2007;39:359-65.
6. Barnes AM, Carter EM, Cabral WA, et al. Lack of cyclophilin B in osteogenesis imperfecta with normal collagen folding. *The New England journal of medicine* 2010;362:521-8.
7. van Dijk FS, Nesbitt IM, Zwikstra EH, et al. PPIB mutations cause severe osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics* 2009;85:521-7.
8. Alanay Y, Avaygan H, Camacho N, et al. Mutations in the gene encoding the RER protein FKBP65 cause autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics* 2010;86:551-9.
9. Christiansen HE, Schwarze U, Pyott SM, et al. Homozygosity for a missense mutation in SERPINH1, which encodes the collagen chaperone protein HSP47, results in severe recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics* 2010;86:389-98.
10. Becker J, Semler O, Gilissen C, et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics* 2011;88:362-71.
11. Lapunzina P, Aglan M, Temtamy S, et al. Identification of a frameshift mutation in Osterix in a patient with recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics* 2010;87:110-4.

กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องได้แก่

รายงานความก้าวหน้าของโครงการแบบปากเปล่าในการอบรมและประชุมวิชาการ Clinical and Molecular Genetics: From Basic to Advanced Applications จัดโดยกลุ่มเมธีวิจัยอาวุโส สกว.- (ศ.นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์) วันที่ 12 กรกฎาคม 2554 ณ ห้องประชุมมงคลนาวิน ตึก ศ.ก. โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
ปัญหาและอุปสรรค

ไม่มี

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

กำลังอยู่ระหว่างการร่างผลงานวิจัยเพื่อส่งตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ
การเชื่อมโยงกับต่างประเทศ

Joan C. Marini, MD., Ph.D. the Bone and Extracellular Matrix Branch, NICHD, National Institutes of Health, Bldg. 10, Rm. 10N260, 9000 Rockville Pike, Bethesda, MD 20892. E-mail: oidoc@helix.nih.gov