

國立臺灣大學醫學院分子醫學研究所

在職專班遺傳諮詢組

碩士論文

Graduate Institute of Molecular Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

次世代定序在膠原蛋白病變的臨床應用

Clinical Application of Next Generation Sequencing
in the Diagnosis of Collagenopathies

郭明正

Ming-Cheng Kuo

指導教授：簡穎秀 博士

李妮鍾 博士

Advisor : Yin-Hsiu Chien, M.D, Ph.D.

Ni - Chung Lee, M.D, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July, 2019



目 錄



中文摘要	5
Abstract.....	7
第一章、研究背景與動機	9
1.1 膠原蛋白	9
1.2 膠原蛋白病變和臨床表現型	10
1.3 次世代定序在膠原蛋白病變的研究.....	11
1.4 研究動機	13
第二章、研究方法	14
第三章、結果	17
第四章、討論	26
第五章、參考文獻.....	29

圖目錄

圖 1、基因變異個數.....	32
圖 2、變異類型.....	32
圖 3、EDS 基因型.....	33
圖 4、Skeletal dysplasia 基因型.....	33
圖 5、 <i>COL1A1</i> 變異點位.....	34
圖 6、 <i>COL1A2</i> 變異點位.....	34
圖 7、 <i>COL2A1</i> 變異點位.....	35



表目錄

表 1、膠原蛋白基因與疾病列表與遺傳模式	36
表 2、次世代定序套組骨骼關節疾病	46
表 3、臨床診斷與分子診斷基因型	54
表 4、檢測結果、基因型與表現型相關性	55



中文摘要



背景

膠原蛋白是人體結締組織中含量最豐富的蛋白質，由於膠原蛋白病變是異質性遺傳疾病(heterogeneous genetic disorder)，許多不同基因變異可能造成相同類似的症狀。因此，在診斷這類疾病往往需要檢測不同基因，才能找到致病原因。傳統桑格定序(Sanger sequencing)對於處理多個基因或外顯子顯得耗費時間和成本，因此，次世代定序(Next Generation Sequencing；NGS)則能同時提供多個基因進行平行定序，具有縮短時間和降低成本的優勢。

目的

我們希望藉由次世代定序目標區間定序套組(NGS-based targeted gene panel)，對於疑似膠原蛋白病變的患者，提供精確快速有效率的臨床分子診斷，並進一步去了解膠原蛋白病變的基因型和表現型相關性。

方法

本次研究收錄從 2016 年 1 月到 2018 年 12 月這段期間，疑似膠原蛋白病變的 30 位患者，其中有 26 位患者使用次世代定序目標區間定序套組，4 位進行外顯子定序套組(Exome panel)檢測。8 例臨床診斷為 Elhers-Dalnos syndrome (EDS)，22 例臨床診斷為骨骼發育不良 Skeletal dysplasia。

結果

19 位患者有確定的分子診斷結果，診斷率為 63% (n=19/30)。8 位在臨床診斷為 EDS 患者，有 4 位找到致病變異基因，分別是 1 位 *PRDM5*(Brittle cornea syndrome 2)，2 位 *COL5A1*(Classical EDS, cEDS)和 1 位 *COL3A1*(Vascular EDS, vEDS)變異，診斷率為 50%(n= 4/8)。22 位骨骼發育不良患者，有 4 位是 *COL1A1* 和 1 位是 *COL1A2*(Osteogenesis imperfect, OI)變異，4 位是 *COL2A1* (*COL2A1*-related collagenopathy)，其他基因型包括 *SERPINF1*(OI type VI, n = 2)，*WNT1*(OI type XV, n = 1)，*ITIM5*(OI type V, n = 1)，*TRPV4*(Spondylometaphyseal dysplasia, Kozlowski 型, n = 1)和 *B3GALT6*(Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity, n = 1)，診斷率為 68%(n=15/22)。

結論

本次研究使用次世代定序骨骼關節疾病套組(OI、EDS、Osteopetrosis、Marfanoid、others)相關基因共 56 個，相較其他相關基因研究套組有較佳的分子診斷率。因此，可以做為臨床有效的診斷工具和成為診斷膠原蛋白病變的標準方法。

關鍵字：膠原蛋白、膠原蛋白病變、異質性遺傳疾病、次世代定序、目標區
間定序套組、外顯子定序套組



Abstract



Background

Collagen is the most abundant protein found in the connective tissue of the human body. Collagenopathy is a heterogeneous genetic disease, and many different genetic variations may cause similar symptoms. Sanger sequencing is too time-consuming and costly for processing multiple genes or exons. Next-generation sequencing (NGS) enables massive parallel sequencing of multiple genes at the same time, and it also has the advantage of reducing time and cost.

Aim

We try to apply the NGS-based targeted gene panel and offer accurate, fast and effective clinical molecular diagnosis for patients who were suspected with collagenopathies, and to further understand the correlation between genotypes and phenotypes.

Methods

The study was included thirty patients suspected of having collagenopathies from January 2016 to December 2018, and twenty-six of them used the NGS-based targeted gene panel. Four cases were tested by Exome panel. Eight of them were diagnosed as Ehlers-Dalnos syndrome (EDS), and the other were distinguished as skeletal dysplasia.

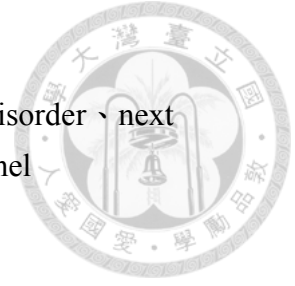
Results

There were nineteen patients with molecular diagnosis, and the diagnostic rate was 63% (n=19/30). There were four patients with genetic variations in the clinical diagnosis of EDS, including *PRDM5* (Brittle cornea syndrome 2, n=1), *COL5A1* (Classical EDS, cEDS, n=2) and *COL3A1* (Vascular EDS, vEDS, n=1) with the diagnostic yield of 50% (n=4/8). Twenty-two patients were diagnosed with skeletal dysplasia, four cases were *COL1A1* and one case was *COL1A2* (Osteogenesis imperfect, OI) variation, four cases were *COL2A1* (*COL2A1*-related collagenopathy), and other genotypes were included *SERPINF1* (OI type VI, n = 2), *WNT1* (OI type XV, n = 1), *ITIM5* (OI type V, n = 1), *TRPV4* (Spondylometaphyseal dysplasia, Kozlowski type, n = 1) and *B3GALT6* (Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity, n = 1). The diagnosis rate was 68% (n=15/22).

Conclusions

This study was utilized to fifty-six genes related to skeletal joint disease (OI, EDS, Osteopetrosis, Marfanoid, others) in the NGS-based targeted gene panel, which has a better molecular diagnostic rate than other related studies so that it can be used as a clinically effective diagnostic tool and standards for diagnosis of collagenopathies.

Keywords: collagen 、 collagenopathy 、 heterogeneous genetic disorder 、 next generation sequencing 、 NGS-based targeted gene panel 、 Exome panel





第一章、研究背景與動機

1.1 膠原蛋白

膠原蛋白是人體結締組織中存在最豐富的結構蛋白，目前文獻報告已知有 29 種不同膠原蛋白的類型(1)，膠原蛋白的基本結構是由 3 股 α 鏈圍繞組成，每一條鏈由 Gly-X-Y 重複組成，Glycine 是唯一小到足夠位於螺旋中央的胺基酸，X 通常是 Proline、Y 則常見是 Hydroxyproline，大部份是用來提供膠原蛋白的結構穩定(2)。

膠原蛋白依其結構功能可分為 9 組(表 1)，分別為：

- (1) Fibril-forming collagens: I, II, III, V, XI, XXIV, XXVII
- (2) Basement membrane collagen: IV
- (3) Microfibrillar collagen: VI, XXVIII, XXIX
- (4) Anchoring fibrils: VII
- (5) Hexagonal network-forming collagens: VIII, X
- (6) FACIT collagens: IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII, XXVI
- (7) Transmembrane collagens: XIII, XVII, XXIII, XXV
- (8) Multiplexing: XV, XVI, XVIII
- (9) Other molecules with collagenous domains: XXVI, XXVIII。

第 I 型膠原蛋白是骨骼，皮膚，肌腱，韌帶，鞏膜，角膜和血管的主要蛋白質，幾乎存在所有結締組織中。

第 II 型膠原蛋白是軟骨的主要成分，通常與第 XI 型膠原蛋白共價聯結，提供結構的穩定性和強度。第 II 型膠原蛋白主要存在關節軟骨細胞外基質，椎間盤，以及在眼睛的玻璃液，突變會導致軟骨發育不良(chondrodysplasia)和早發型骨關節炎(precocious osteoarthritis)。



第 III 型膠原蛋白是 Fibril-forming collagens，具有 homotrimer 包括 3 個 α_1 鏈，當有突變時會造成 Vascular EDS(vEDS)、血管缺陷或動脈瘤(3)。

第 V 型膠原蛋白也是 Fibril-forming collagens，負責 types I and types III collagen 的 fibrillation。當有突變時會造成 Classical EDS(cEDS)，引起皮膚過度伸展，關節過度活動。

1.2 膠原蛋白病變和臨床表現型

膠原蛋白病變(collagenopathy)是影響膠原蛋白(collagen)的異質性遺傳疾病(heterogeneous genetic disorder)。膠原蛋白病變可以依照臨床表現型來區分，有的在嬰幼兒期即表現出來；然而，一些比較輕微的患者在成年期才會顯現表現型，就臨床而言，仍然有很多表現型很難區分。

Osteogenesis imperfect (OI)是一種進行性的骨頭變形疾病，在臨床上有時在不明的情況下就發生骨折，其特徵就是骨脆性。除了骨折外，相關的 OI 的特徵包括患者與家庭成員相比之下身高較矮小，有些患者有進行性聽力損失，韌帶鬆弛，牙齒異常或藍色鞏膜。發病年齡，可從懷孕時的死胎到成人期才表現出病癥。懷孕 11-14 週雖然可以觀察到胎兒頸部半透明度增加但這是非特異性的，除非是很嚴重 OI 相關的骨骼畸形，所以藉由超音波對第 I 型 OI 的胎兒進行產前診斷是不可靠的(4)，而且剖腹產也不會減少非致死類型(第 I 型，III 型和 IV 型)的胎兒在生產時產生骨折，或無法延長致死類型胎兒的生存期(第 II 型)(5)。OI 絕大部分是由 *COL1A1* 和 *COL1A2* 突變所引起的。大多數 OI 第 I 型病患都是 *COL1A1* 的 null mutations。更嚴重的類型，如第 II，III 和 IV 是 missense mutations 是其他胺基酸取代了 Glycine，導致缺乏第 I 型膠原蛋白(6)。還有其他不同基因與 OI 有關，OI 第 I 至 V 型是體染色體顯性遺傳疾病(autosomal dominant inheritable disease；AD)，其他則是以體染色體隱性遺傳疾病(autosomal recessive inheritable disease；

AR)，還有 gonadal mosaicism 的可能性。*COL11A1* 和 *COL11A2* 的突變亦可以導致纖維軟骨形成不良(fibrochondrogenesis)(7)。

COL2A1 突變導致嬰兒期身材矮小包括 spondyloepiphyseal dysplasia congenita (SEDC)、Spondyloepimetaphyseal dysplasia (SEMD) 和 Kniest 發育不良。這些病症有許多表現型特徵，例如新生兒呼吸窘迫，嬰兒肌張力低下，面部扁平，高度近視有視網膜分離的風險。最嚴重的是在子宮內就發現第 II 型膠原蛋白病變，死亡通常與形成小而異常的胸腔和肺發育不全有關。

Achondrogenesis type 2 和 hypochondrogenesis 可經由胎兒超音波鑑別診斷，雖然非常罕見但已有報告發表與患病胎兒父母親的生殖或體細胞鑲嵌型(germline or somatic mosaicism)有關(8)。另一種致命的 *COL2A1* 突變 Platyspondylic lethal skeletal dysplasia Torrance type 是一種嚴重的骨骼生長障礙(9)。

Kniest 發育不良的特點是啞鈴形的長骨縮短 (10)。引起 SEDC 和 SEMD 的膠原蛋白突變通常會影響三螺旋結構域的 heterozygous missense mutations (11)。

COL2A1 突變也會引起家族性的早發型骨關節炎和股骨頭缺血性壞死(Aseptic necrosis of femoral head; ANFH)，但具有這些表現型的個體並沒有發生眼睛併發症，身材矮小或面部畸形。已發現 *COL2A1* 中的 Glycine-to-Serine mutations 與 ANFH 有關(12)。

Classical EDS (cEDS)是由 *COL5A1* 或 *COL5A2* 的突變所引起，Vascular EDS (vEDS) 是由 *COL3A1* 的突變，Arthrochalasia EDS (aEDS)是由 *COL1A1* 和 *COL1A2* 突變所造成。

Classical EDS (cEDS)臨床主要診斷標準包括過度伸展的皮膚以及由 Beighton 評分測定關節是否過度伸展性。次要診斷標準包括組織過度伸展和無力的各種表



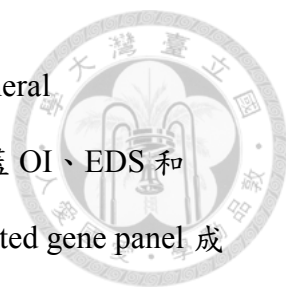
現(13)。cEDS 的主要特徵有關節鬆弛型，身材矮小，骨質減少，增加骨折的風險。

Cardiac valvular EDS (cvEDS)是由 homozygous or compound heterozygous mutations *COL1A2* 突變導致，其特徵是關節過度活動，皮膚過度伸展，容易瘀傷，肌肉和肌腱撕裂，心瓣膜功能不全和閉鎖不全 (14)。

Vascular EDS (vEDS)是第 III 型膠原蛋白的突變，最常見的突變是在 Gly-X-Y 結構中，Glycine 被較大的胺基酸取代(15)。vEDS 是嚴重且會危及生命，因為組織脆弱性增加大血管和臟器破裂出血的風險。診斷標準包括妊娠期間的動脈，腸道和子宮的破裂以及患者家族史。其他診斷標準包括半透明的皮膚，薄唇，小下巴，大眼睛，老化外觀的手，小關節的過度活動，肌肉和肌腱破裂，容易瘀傷和復發性關節脫位。動脈破裂最常發生在中型血管中，例如腎或肝動脈(16)。

1.3 次世代定序在膠原蛋白病變的研究

膠原蛋白病變的各種臨床病徵經常重疊出現，藉由分子診斷可以區分出不同的疾病，除了幫助父母對於患病胎兒懷孕的決策參考，提高產前諮詢準確性，也可以避免減少侵入性的診斷。但是，由於牽涉基因數多，因此使用次世代基因定序技術，例如全外顯子定序(Whole exome sequencing; WES)和目標區間定序(Targeted Sequencing)，用來診斷異質性遺傳疾病像膠原蛋白病變，是一種創新並且可行的臨床操作方式。但是如果知道臨床上與疾病相關的基因，次世代定序目標區間定序是較佳的選擇，因為最佳覆蓋深度(depth of coverage)為 300 倍，高於全外顯子定序可提供的覆蓋率，至少覆蓋 99%的目標鹼基；而且，次世代定序目標區間定序的主要優點是可以個人化套組(即包含某些基因和序列外顯子，特定內含子區域的可能性，啟動子區或 3'UTR) (17)。例如美國貝勒醫學院學者 James T. Lu 使用 NGS -based targeted gene panel 包含 9 個 OI 相關基因，21 個 low bone



mineral density(LBMD) diseases 相關基因，和 14 個 high bone mineral density(HBMD) diseases 相關基因檢測低及高骨質密度的患者涵蓋 OI、EDS 和 osteopetrosis (OPT)等遺傳疾病，結果顯示通過 NGS -based targeted gene panel 成功驗證出 6 名已知突變患者的突變。此外有 4 位沒有先前分子診斷的 OI 或 OPT 患者中，藉由 NGS 也能夠檢測致病變異。因此，NGS 提供了一種快速而準確的方法，可以在大多數遺傳性高或低骨質密度患者中進行分子診斷 (18)。

1.4 研究動機

由於膠原蛋白病變具有遺傳異質性又牽涉大量的基因，而且臨床表現症狀又與多種疾病症狀重疊，例如有些 OI 病患有明顯的臨床表現特徵，但 *COL1A1* 或 *COL1A2* 卻沒有找到變異點。目前已有文獻研究，對於 Skeletal disorders 設計 309 個相關疾病 gene panel ，在 36 例具有已知特定疾病臨床表徵，其中 8 例突變有分子診斷確認，診斷率為 22%(n=8/36) (19)。因此，本研究希望找到更合適和有效的 gene panel 方式能夠提高分子診斷率，藉此幫助臨床醫師有更多的診斷方式。



第二章、研究方法

2.1 研究對象

從 2016 年初到 2018 年底，歷時 2 年，總共收錄 30 個患者，由臨床醫師判斷疑似 OI 或 EDS 膠原蛋白病變的患者。


2.2 研究方法與步驟

從週邊白血球中提取基因組 DNA 後，用分光光度計測量來 DNA 濃度。NGS 定序基本原理及操作流程，主要可分為樣本庫製備(library preparation)、樣本庫擴增(library amplification)、定序反應(sequencing reaction)及數據分析(data analysis)等四個步驟。

以次世代定序法作為基因分析，並進行目標區域(基因編碼區以及 exon-intron 涵蓋 20bp 的交界區)建庫後進行高通量定序。以次世代定序骨骼關節疾病套組 (OI, EDS, Osteopetrosis, Marfanoid, others) 相關基因共 56 個，OI (19 genes): *PLOD2, SERPINF1, COL1A1, COL1A2, MBTPS2, PLS3, PPIB, IFITM5, CRTAP, LEPRE1, SERPINH1, FKBP10, SP7, BMP1, TMEM38B, WNT1, SPARC, P4HB, SEC24D*，EDS (13 genes): *TNXB, B4GALT7, SLC39A13, COL5A1, COL5A2, COL3A1, ADAMTS2, PLOD1, ZNF469, FKBP14, CHST14, DSE, B3GALT6*，Osteopetrosis (6 genes): *IKBKG, TNFRSF11A, TCIRG1, TNFSF11, CLCN7, OSTM1*，Marfan syndrome (7 genes): *FBNI, FBN2, CBS, TGFBR1, TGFBR2, SMAD3, ACTA2*，others (11 genes): *FLNA, FLNB, RIN2, LRP5, XYLT2, COL2A1, TRAPPC2, TRPV4, CREB3L1, TGFB2, TGFB3* 等為目標基因 (表 3)。

2.3 生物資訊分析

定序使用 Illumina MiSeq，建庫方式為 Captured-based method，目前已知成功捕獲目標區域比例約 98%，分析軟體為(w)ANNOVAR。定序後的 raw data 以



BWA 進行分析並比對參考序列(reference sequence; hg19)，儲存成 BAM 格式的檔案後，再以 GATK4.0 進行 Variant calling 後得到 Variant Call Format(VCF)格式的檔案。之後用(w)ANNOVAR 進行 annotation，並比對 ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>)、dbSNP(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>)等特定資料庫來釐清是否具致病性。


檢測結果去除人口資料庫中出現頻率>1%的變異點，剩餘的變異點再用上述文獻資料庫比對，輔以電腦預測軟體分析，例如 SIFT 和 PolyPhen-2，用來預測變異點位對於蛋白質的影響，來判斷是否具有致病性。報告變異的檢測品質必須符合標準，若有需要則用傳統 DNA 桑格定序進行驗證。

依照 The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) 孟德爾疾病相關的基因變異可分為 5 類：1、pathogenic，2、likely pathogenic，3、variant uncertain significance(VUS)，4、likely benign 5、benign。

當患者檢測出 de novo variants，需要檢測提供精卵的父母，若父母測定結果無相同變異時，且患者符合 de novo variants 特徵，其表現型也符合變異基因異常所引起的症狀，才可以歸類為 autosomal dominant 強的致病證據。

就 autosomal recessive 疾病而言，兩個 heterozygous variants 則需要檢測患者父母基因，來確定變異的排列方式是 in cis 或 in trans，當兩個 heterozygous variants，已知其中一個變異為致病變異，當另一個待分類變異與致病變異呈現 in trans 的方式排列，則視為待分類變異的中等致病證據。若待分類變異與多個已知致病變異均呈現 in trans 的方式排列，則視為強的致病證據。

當已知致病變異與另一個待分類變異排列呈現 in cis 時，待分類變異則可視為良性的支持證據。



若發生在 autosomal recessive 致病基因上的兩個 heterozygous variants 的致病性均未知，那麼確定排列方式是 in cis 或 in trans，無法判斷其中任一變異是致病性。但是兩個變異排列是 in cis，則該基因兩個 heterozygous variants 均受到影響的可能性則會降低。

所以經由父母的基因型來分析患者是否是 de novo variants，或由患者的父母，兄弟姊妹或患者的孩子來確定 autosomal recessive 疾病的 homozygous 或 heterozygous 變異，皆是 family co-segregation analysis 使用時機(20)。

至於 variant uncertain significance(VUS)是否會引起疾病，在於 VUS 可能隨著更多佐證出現會再重新分類。如果確定某種變異可能是良性或良性的，則減少遺傳所帶來的風險。但是變異重新被歸類為可能致病性或致病性，有遺傳相同變異風險的家庭成員則可以針對已知特定變異進行檢測，來採取措施降低患病風險或預防未來疾病可能發生的醫療。因此，無論何種遺傳模式仍要持續追蹤，或是與有症狀的家族成員進行基因型比對。

第三章、結果



診斷率

收錄 30 位患者中，有 8 例臨床診斷為 Elhers-Dalnos syndrome，22 例臨床診斷為骨骼發育不良 Skeletal dysplasia(表 4)。共有 29 位患者使用 NGS-based targeted gene panel，1 位患者直接使用 Exome panel 操作，另外 3 位則是在 NGS panel 沒有得到答案之後，再進一步檢驗 Exome panel。分別是 patient 1、patient 15 和 patient 17，結果臨床解釋為 ACMG uncertain significance、uncertain significance 和 likely pathogenic。

臨床診斷為 EDS 病患中，共發現 1 位 *PRDM5*(Brittle cornea syndrome 2)，2 位 *COL5A1*(EDS 第 I 型)和 1 位 *COL3A1*(EDS 第 IV 型)變異，診斷率為 50% (n=4/8)。至於臨床診斷為 Skeletal dysplasia 患者中，共發現 4 位 *COL1A1* 和 1 位 *COL1A2*(Osteogenesis imperfect, OI)變異，4 位 *COL2A1* (*COL2A1*-related collagenopathy)變異，以及 *SERPINF1*(OI type VI，n = 2)，*WNT1*(OI type XV，n = 1)，*IFITM5*(OI type V，n = 1)，*TRPV4*(Spondylometaphyseal dysplasia，Kozlowski 型，n = 1)和 *B3GALT6*(Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity，n = 1) 變異，診斷率為 68%(n=19/22) (圖 1)。30 位患者共有 19 位獲得分子診斷結果，診斷率為 63%(n=19/30)。



來自 17 個家族的這 19 位患者，其中有 5 位(來自 4 個家族)屬於 autosomal recessive(family13 的 Patient 13 和 Patient 14 皆是 p.Glu27Glyfs*37 變異)，有 14 名(來自 13 個家族)屬於 autosomal dominant。整體而言，出現不同基因變異的種類(n=20)，分別有 single nucleotide variant，n=13(65%)、splice site variant，n=6(30%)、duplication，n=1(5%) (圖 2)。

Ehlers-Dalnos syndrome 基因變異

EDS 基因型分別為 *COL5A1* 50%、*COL3A1* 25%和 *PRDM5* 25% (圖 3)。

COL5A1 variant

Patient 18 的 *COL5A1* 基因序列第 4720 個核苷酸出現 Heterozygous，核苷酸序列改變 NM_000093.4(*COL5A1*):c.4720C>T，導致第 1574 個胺基酸改變，形成 nonsense mutation，關於 *COL5A1* 的 p.(Gln1574*)已有相關報導(21)。在 Osteogenesis imperfecta variant database (<https://eds.gene.le.ac.uk/home.php>)中，判定 Pathogenic，Patient 18 臨床表現型為 EDS，分子確診為 EDS type I。

Patient 30 的 *COL5A1* 基因序列第 1389+5 個核苷酸位於第 9 個內含子核苷酸序列改變 NM_000093.4(*COL5A1*): c.1389+5G>A，造成 splice site variant。

Patient 30 臨床表現型為 EDS type III，分子確診為 EDS type I。

關於基因 *COL5A1* 上的 c.1389+5G>A 遺傳變異沒有相關報導，如果是此變異所造成的患病，沒有患病的父母應該就沒有帶有此種變異基因，在同一個家系裡，應有相同表現型有相同基因型，不同表現型有不同基因型的明確區分，如果父母其中帶有相同變異，就要考慮是否是輕微表現型或不完全的外顯性，可將遠親納入判斷，因為遠親不太可能同時具有該疾病和變異。

COL3A1 variant

Patient 22 的 *COL3A1* 基因序列第 2824-10 個核苷酸位於第 39 個內含子出現 Heterozygous 核苷酸序列改變 NM_000090.3 (*COL3A1*): c.2824-10T>G，導致 Splicing，Patient22 臨床表現型為 EDS，分子確診為 EDS type IV。

PRDM5 variant

Patient 1 的 *PRDM5* 基因序列第 106 個核苷酸出現 Homozygous，核苷酸序列改變 NM_018699 (*PRDM5*): c.106G>A，導致第 36 個胺基酸改變，形成 single nucleotide variant，Patient 1 臨床表現型為 EDS，分子確診為 Brittle cornea syndrome 2。



Skeletal dysplasia 基因變異


Skeletal dysplasia 基因型為 *COL1A1* 29%、*COL2A1* 29%、*COL1A2* 7%、*SERPINF1* 7%、*WNT1* 7%、*IFITM5* 7%、*TRPV4* 7%和 *B3GALT6* 7%(圖 4)。

COL1A1 variant

Patient 8 NM_000088 (*COL1A1*) : c.661G>C,p.Gly221Arg、Patient 11 NM_000088 (*COL1A1*) : c.2461G>A,p.Gly821Ser、Patient 19 NM_000088 (*COL1A1*) : c.2236G>T, p.Gly746Cys，形成 Missense mutation，而 Patient 28 NM_000088 (*COL1A1*) : *COL1A1* c.3046-1G>A 導致 Splice site 變異(圖 5)。

Patient 8 的 *COL1A1* 基因序列第 661 個核苷酸出現 Heterozygous，核苷酸序列改變 NM_000088 (*COL1A1*) : c.661G>C，導致第 221 個胺基酸改變，形成 Missense mutation，關於 *COL1A1* 的 p.Gly221Arg 在 Osteogenesis imperfecta variant database(<https://oi.gene.le.ac.uk/home.php>)為 Clinical significance pathogenic，Patient 8 臨床表現型為 Skeletal dysplasia，分子確診為 OI type I。

Patient 11 的 *COL1A1* 基因序列第 2461 個核苷酸出現 Heterozygous，核苷酸序列改變 NM_000088 (*COL1A1*) : c.2461G>A，導致第 821 個胺基酸改變，形成 Missense mutation，Patient 11 臨床表現型為 Skeletal dysplasia，分子確診為 OI type I。



Patient 19 的 *COL1A1* 基因序列第 2236 個核苷酸出現 Heterozygous，核苷酸序列改變 NM_000088 (*COL1A1*)：c.2236G>T，導致第 746 個胺基酸改變，形成 Missense mutation，Patient 19 臨床表現型為 Skeletal dysplasia，分子確診為 OI type III。

Patient 28 的 *COL1A1* 基因序列第 3046-1 個核苷酸出現 Heterozygous，核苷酸序列改變 NM_000088 (*COL1A1*)：*COL1A1* c.3046-1G>A 導致 Splice site 變異，Patient 28 臨床表現型為 Skeletal dysplasia，分子確診為 OI。

COL1A2 variant

Patient 15 為 NM_000089(*COL1A2*)：c.3355G>C 位於第 49 個內含子核苷酸序列改變，接近 c-propeptide cleavage site，在 Osteogenesis imperfecta variant database 中，描述 p.Ala1119Thr 患者具有高度平均身高和高骨密度 OI，符合高骨密度的 OI 的致病變異(圖 6)。

COL2A1 variant

Patient 10 NM_001844.4(*COL2A1*)：c.1529G>A、Patient 12 NM_001844.4(*COL2A1*)：c. 1636 G>A、Patient 24 NM_001844.4(*COL2A1*)：c. 2149 G>A，形成 single nucleotide variant。Patient 17 NM_001844.4(*COL2A1*)：c.840+5G>A，導致 Splicing(圖 7)。




Patient 10 的 *COL2A1* 基因序列第 1529 個核苷酸出現 Heterozygous，核苷酸序列改變 NM_001844.4(*COL2A1*)：c.1529G>A，導致第 510 個胺基酸改變，形成 single nucleotide variant，關於 *COL2A1* 的 p.Gly510Asp 已有報導(22) Skeletal dysplasia 與 *COL2A1* 中的致病變異 p.Gly510Asp 具有相關性。

Patient 10 臨床表現型為 Skeletal dysplasia，分子確診為 *COL2A1*-related skeletal dysplasia。

Patient 12 的 *COL2A1* 基因序列第 1636 個核苷酸出現 Heterozygous 核苷酸序列改變 NM_001844.4(*COL2A1*)：c. 1636 G >A，導致第 546 個胺基酸改變，形成 single nucleotide variant，關於 *COL2A1* 的 p.Gly546Ser 已有報導(23)，在 ClinVar 判定為 Clinical significance Pathogenic/Likely pathogenic。Patient12 臨床診斷為 Hypochondroplasia，分子確診為 *COL2A1*-related skeletal dysplasia。

Patient 17 的 *COL2A1* 基因序列第 840+5 個核苷酸位於第 13 個內含子出現 Heterozygous，核苷酸序列改變 NM_001844.4(*COL2A1*)：c.840+5G>A，導致 Splicing，Patient 17 臨床診斷為 Skeletal dysplasia，分子確診為 *COL2A1*-related skeletal dysplasia。



Patient 24 的 *COL2A1* 基因序列第 2149 個核苷酸出現 Heterozygous，核苷酸序列改變 NM_001844.4(*COL2A1*): c. 2149 G>A，導致第 717 個胺基酸改變，形成 single nucleotide variant，關於 *COL1A1* 的 p.Gly717Ser 此變異在 ClinVar 判定為 Clinical significance pathogenic，臨床表現型為 Avascular necrosis of the head of femur。Patient 24 臨床診斷為 Achondropalsia，分子確診為 *COL2A1*-related skeletal dysplasia。

SERPINF1 variant

Patient 13 和 Patient 14 是兄妹，父母沒有近親關係，在 *SERPINF1* 基因序列在第 2 個 exon 第 72 個核苷酸序重複序列改變 NM_002615.6(*SERPINF1*): c.72dupC(p.Glu27Glyfs*37)，造成 frameshift mutation(24)，Osteogenesis imperfecta type VI with severe bony deformities 與 *SERPINF1* 基因中的致病變異有相關性，此變異為 Pathogenic。



WNT1 variant

Patient 7 的 *WNT1* 基因序列第 104+1 個核苷酸位於第 1 個內含子核苷酸序列改變 NM_005430.3 (*WNT1*): c.104+1G>A，造成 Splicing 和第 105 個核苷酸出現核苷酸序列改變 NM_005430.3 (*WNT1*): c.105G>A 導致 p.Trp*35，經過 family-trio analysis，兩個不同變異點位分別來自患者為 heterozygous carriers 的雙親。Patient 7 臨床診斷為 OI type III，分子確診為 OI type XV。

IFITM5 variant

Patient 16 的 *IFITM5* 在 5' untranslated region (UTR) single point mutation，導致 New upstream start codon，ClinVar 判 NM_001025295.2(*IFITM5*):c.-14C>T 判定為 Pathogenic/Likely pathogenic，Patient 16 臨床表現型為 Skeletal dysplasia，分子確診為 OI type V。

TRPV4 variant

Patient 5 的 NM_021625.4(*TRPV4*): c.1781G>A，基因序列第 1781 個核苷酸出現 Heterozygous，核苷酸序列改變，導致第 594 個胺基酸改變，形成 single nucleotide variant，關於 *TRPV4* 的已有報導(25)。在 ClinVar 判定 NM_021625.4 (*TRPV4*):c.1781G>A (p.Arg594His)判定為 Pathogenic，Patient 5

臨床表現型為 Skeletal dysplasia，分子確診為 Spondylometaphyseal dysplasia,

Kozlowski type。

B3GALT6 variant

Patient 21 的 *B3GALT6* 基因序列出現 NM_080605 (*B3GALT6*) : c.200C>T


與 c.694C>T 改變。關於 c.200C>T (p.Pro67Leu) 已有相關報導(26)，在 ClinVar

判定為 Pathogenic，Patient 21 臨床表現型為 Skeletal dysplasia，分子確診為

SEMD with joint laxity。



第四章、討論




本次研究收錄的 30 位患者中，共有 19 人獲得分子診斷結果，分子診斷結果診斷率為 63%(n=19/30)。其中包括 4 名 EDS 患者分別有 *PRDM5*、*COL5A1* 和 *COL3A1* 突變，以及 15 位 Skeletal dysplasia 患者分別有 *COL1A1*、*COL1A2*、*COL2A1*、*SERPINF1*、*WNT1*、*IFITM5*、*TRPV4* 和 *B3GALT6* 突變。在 29 位使用以 56 個相關基因次世代定序骨骼關節疾病套組(OI, EDS, Osteopetrosis, Marfanoid, others)檢驗的個案，有 16 位得到分子診斷的結果，診斷率為 55% (n=16/29)。

本次研究 22 例臨床診斷為骨骼發育不良 Skeletal dysplasia 與 collagen type 1、collagen type 2 和 collagen type 11 有關，*COL1A1* 和 *COL1A2* 大約 85~90% 是由結構或定量突變所造成，其中 Glycine 被取代引起的三螺旋區域發生鹼基取代突變，合成產生具有結構異常的膠原分子，而大多數 OI 病例是 *COL1A1* 和 *COL1A2* 的 α_1 和 α_2 鏈的基因的序列變異的結果，而鹼基取代就是最常見的變異形式。本研究的 *COL1A1* 和 *COL1A2* 患者共有 5 名，而且 80%(n=4/5) 為鹼基取代，與文獻的觀察吻合(27)。

本次研究中的 19 位確認有分子診斷結果的患者，共有 12 人臨床診斷在確認分子診斷後，需要進一步修正，主要出現在骨骼發育不良組。顯示膠原蛋白病變的特性，不同基因變異可能造成相同類似的症狀。因此，在診斷這類疾病往往需要檢測不同基因，才能找到正確的變異基因。

本研究的診斷率達 63%(n=19/30)，扣除家族個案外，診斷率仍達 61% (n=17/28)。單以本研究使用的基因套組而言，診斷率可達 55%(n=16/29)。先前的研究的診斷率，約在 10%~22% 左右(19)。本研究使用了類似 Capture of the sequences 方式，相類似的讀深，平均讀深達 500X，因為本研究使用的 56 個目標基因，僅有 30 個基因與先前研究相同，但新增了 26 個涵蓋 OI, EDS,



Osteopetrosis, Marfanoid, others 的基因，因此得以多檢出 *COL5A1*、*COL3A1*、*SERPINF1*、*WNT1*、*B3GALT6* 基因相關的 Classical EDS、EDS type IV、OI type VI、OI type XV、Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity 疾病患者的分子診斷，使得本研究使用的 NGS 基因套組表現出較佳的檢出率。

本研究中，尚有 11 個人未獲得結果，可能原因如下：

一、此方法僅能檢測出單一核苷酸或是小片段，若突變本身是大片段變異或其他複雜性結構變異或鑲嵌型則無法測出。

二、突變發生在未分析區域(如 promoter、intron)則無法偵測到。

三、突變發生在相關基因 56 個外之其他基因則無從得知結果。

雖然次世代定序可以藉由定序深度和兩端定序片段的結果來預測結構變異，但沒有很高的敏感度和特異性，仍需要藉由經驗和其他方法加以輔助排除。因此，未來可以藉由定序讀取長度的增加，提高辨識結構變異的可能性，增加定序深度和數目，比較出不同深度的明顯差異，找出大片段的缺失或插入，用以改善結構變異辨識能力的不足。

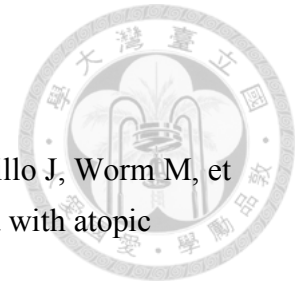
結論：

次世代基因定序技術已經對於罕見疾病像膠原蛋白病變，無論在基因數量和成本效率上已做出革命性的改變，由於膠原蛋白病變是異質性遺傳疾病，並且臨床表現的症狀常相互重疊出現，次世代基因定序技術（全外顯子定序或目標區間定序套組）能夠有機會分析出確定的區域或整個外顯子用來定序找出導致疾病的基因，次世代基因定序技術提供了在單一反應中對多個基因組區域和多個患者同時進行定序的可能性。本次研究使用次世代定序骨骼關節疾病套組(OI、EDS、Osteopetrosis、Marfanoid、others)相關基因共 56 個，相較其他相關基因研究套組

有較佳的分子診斷率。因此，可以做為臨床有效的診斷工具和成為診斷膠原蛋白病變的標準方法。



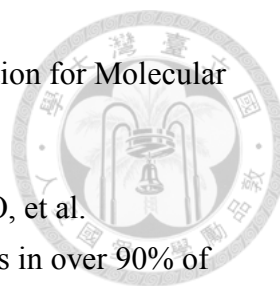
第五章、參考文獻



1. Söderhäll C, Marenholz I, Kerscher T, Rüschemdorf F, Esparza-Gordillo J, Worm M, et al. Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS biology*. 2007;5(9):e242.
2. Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas P. The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis international*. 2006;17(3):319-36.
3. Germain DP. Clinical and genetic features of vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Annals of vascular surgery*. 2002;16(3):391-7.
4. Viora E, Sciarrone A, Bastonero S, Errante G, Botta G, Franceschini P, et al. Osteogenesis imperfecta associated with increased nuchal translucency as a first ultrasound sign: report of another case. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. 2003;21(2):200-2.
5. Cubert R, Cheng EY, Mack S, Pepin MG, Byers PH. Osteogenesis imperfecta: mode of delivery and neonatal outcome. *Obstetrics & Gynecology*. 2001;97(1):66-9.
6. Byers PH. Osteogenesis imperfecta: perspectives and opportunities. *Current Opinion in Pediatrics*. 2000;12(6):603-9.
7. Jobling R, D'Souza R, Baker N, Lara-Corrales I, Mendoza-Londono R, Dupuis L, et al. The collagenopathies: review of clinical phenotypes and molecular correlations. *Current rheumatology reports*. 2014;16(1):394.
8. Faivre L, Merrer ML, Douvier S, Laurent N, Thauvin-Robinet C, Rousseau T, et al. Recurrence of achondrogenesis type II within the same family: evidence for germline mosaicism. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2004;126(3):308-12.
9. Kannu P, Bateman J, Savarirayan R. Clinical phenotypes associated with type II collagen mutations. *Journal of paediatrics and child health*. 2012;48(2):E38-E43.
10. Gilbert-Barnes E, Langer Jr LO, Opitz JM, Laxova R, Sotelo-Arila C. Kniest dysplasia: radiologic, histopathological, and scanning electronmicroscopic findings. *American journal of medical genetics*. 1996;63(1):34-45.



11. Wilkin DJ, Artz AS, South S, Lachman RS, Rimoin DL, Wilcox WR, et al. Small deletions in the type II collagen triple helix produce Kniest dysplasia. *American journal of medical genetics*. 1999;85(2):105-12.
12. Miyamoto Y, Matsuda T, Kitoh H, Haga N, Ohashi H, Nishimura G, et al. A recurrent mutation in type II collagen gene causes Legg-Calve-Perthes disease in a Japanese family. *Human genetics*. 2007;121(5):625-9.
13. Beighton P, Paepe AD, Steinmann B, Tsipouras P, Wenstrup RJ. Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. *American journal of medical genetics*. 1998;77(1):31-7.
14. Schwarze U, Hata R-I, McKusick VA, Shinkai H, Hoyme HE, Pyeritz RE, et al. Rare autosomal recessive cardiac valvular form of Ehlers-Danlos syndrome results from mutations in the COL1A2 gene that activate the nonsense-mediated RNA decay pathway. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;74(5):917-30.
15. Pepin M, Schwarze U, Superti-Furga A, Byers PH. Clinical and genetic features of Ehlers–Danlos syndrome type IV, the vascular type. *New England Journal of Medicine*. 2000;342(10):673-80.
16. De Paepe A, Malfait F. The Ehlers–Danlos syndrome, a disorder with many faces. *Clinical genetics*. 2012;82(1):1-11.
17. Cortini F, Marinelli B, Pesatori AC, Seia M, Seresini A, Giannone V, et al. Clinical Application of NGS Tools in the Diagnosis of Collagenopathies. *Exploratory Research and Hypothesis in Medicine*. 2017;2(3):57-62.
18. Sule G, Campeau P, Zhang V, Nagamani S, Dawson B, Grover M, et al. Next-generation sequencing for disorders of low and high bone mineral density. *Osteoporosis International*. 2013;24(8):2253.
19. Polla DL, Cardoso MT, Silva MC, Cardoso IC, Medina CT, Araujo R, et al. Use of targeted exome sequencing for molecular diagnosis of skeletal disorders. *PloS one*. 2015;10(9):e0138314.
20. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of



the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in medicine*. 2015;17(5):405.

21. Symoens S, Syx D, Malfait F, Callewaert B, De Backer J, Vanakker O, et al. Comprehensive molecular analysis demonstrates type V collagen mutations in over 90% of patients with classic EDS and allows to refine diagnostic criteria. *Human mutation*. 2012;33(10):1485-93.
22. Heinrich T, Nanda I, Rehn M, Zollner U, Ernestus K, Wirth C, et al. Co-Occurrence of Reciprocal Translocation and COL2A1 Mutation in a Fetus with Severe Skeletal Dysplasia: Implications for Genetic Counseling. *Cytogenetic and genome research*. 2015;145(1):25-8.
23. Al Kaissi A, Laccone F, Karner C, Ganger R, Klaushofer K, Grill F. Hüftdysplasie und Morbus Scheuermann bei einem Mädchen mit Typ-II-Kollagenopathie. *Der Orthopäde*. 2013;42(11):963-8.
24. Cho SY, Ki C-S, Sohn YB, Kim SJ, Maeng SH, Jin D-K. Osteogenesis imperfecta Type VI with severe bony deformities caused by novel compound heterozygous mutations in SERPINF1. *Journal of Korean medical science*. 2013;28(7):1107-10.
25. Dai J, Kim O, Cho T-J, Schmidt-Rimpler M, Tonoki H, Takikawa K, et al. Novel and recurrent TRPV4 mutations and their association with distinct phenotypes within the TRPV4 dysplasia family. *Journal of medical genetics*. 2010;47(10):704-9.
26. Vorster A, Beighton P, Ramesar R. Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity (Beighton type); mutation analysis in eight affected South African families. *Clinical genetics*. 2015;87(5):492-5.
27. Forlino A, Marini JC. Osteogenesis imperfecta. *The Lancet*. 2016;387(10028):1657-71.



圖 1、基因變異個數

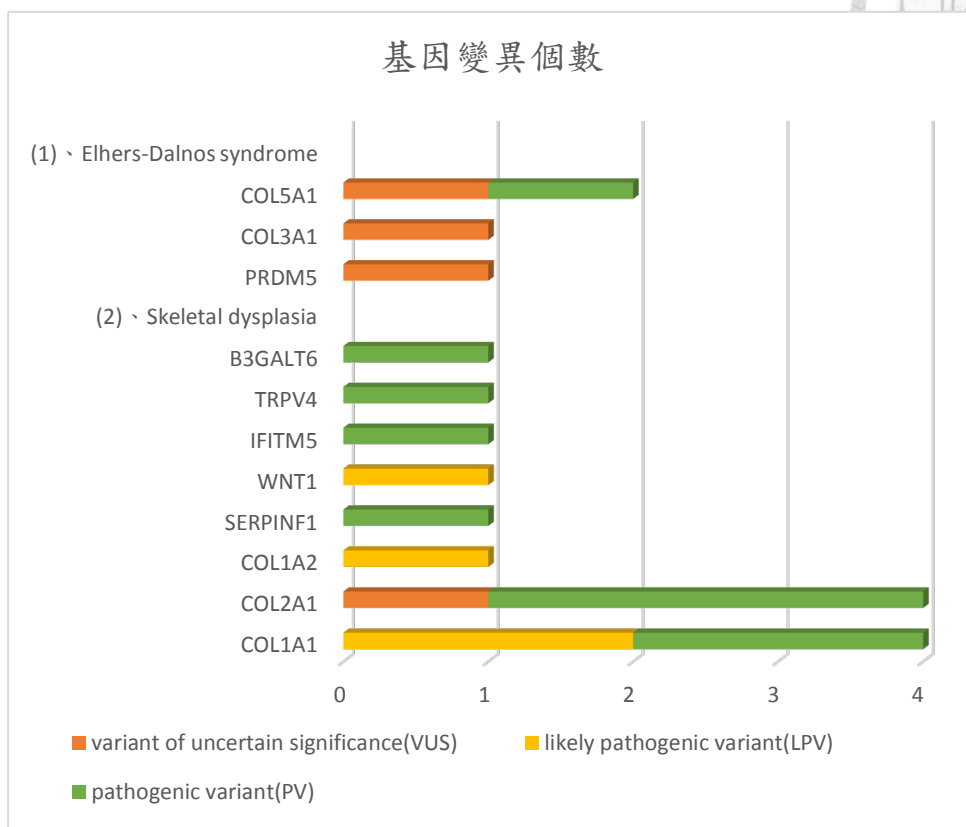


圖 2、變異類型

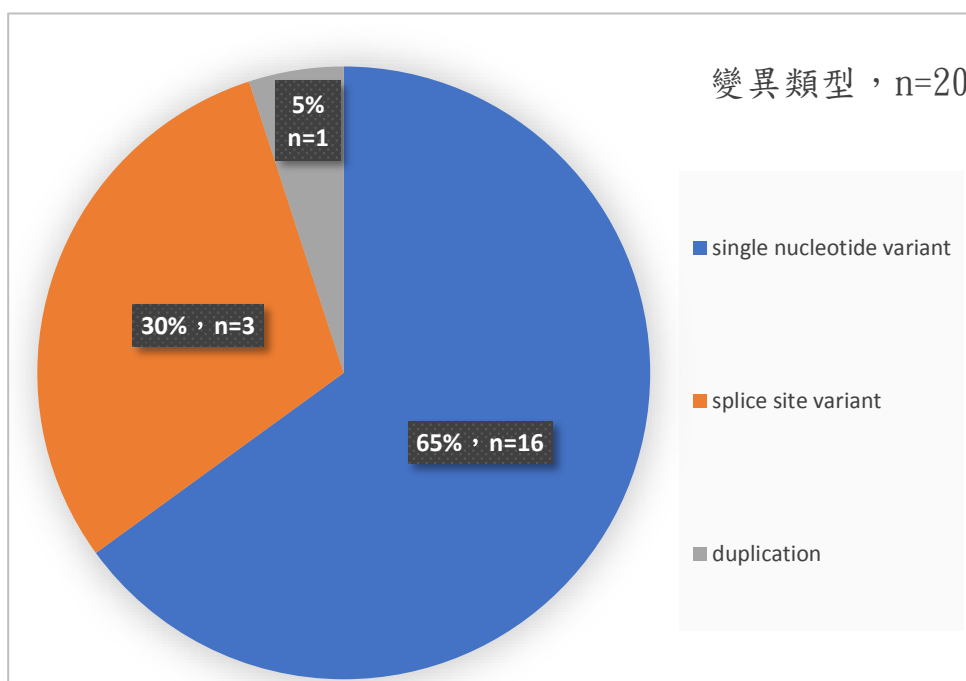




圖 3、EDS 基因型

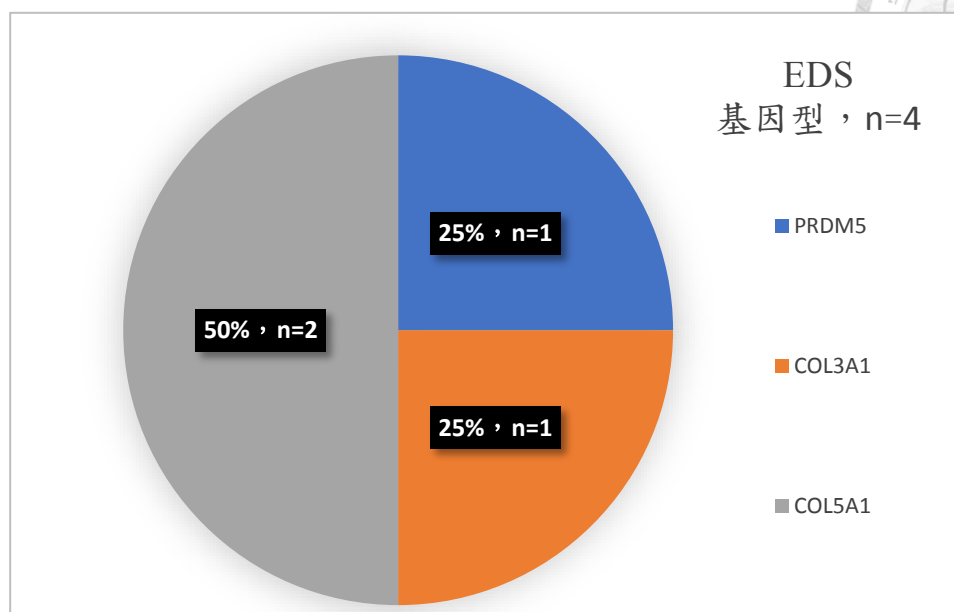


圖 4、Skeletal dysplasia 基因型

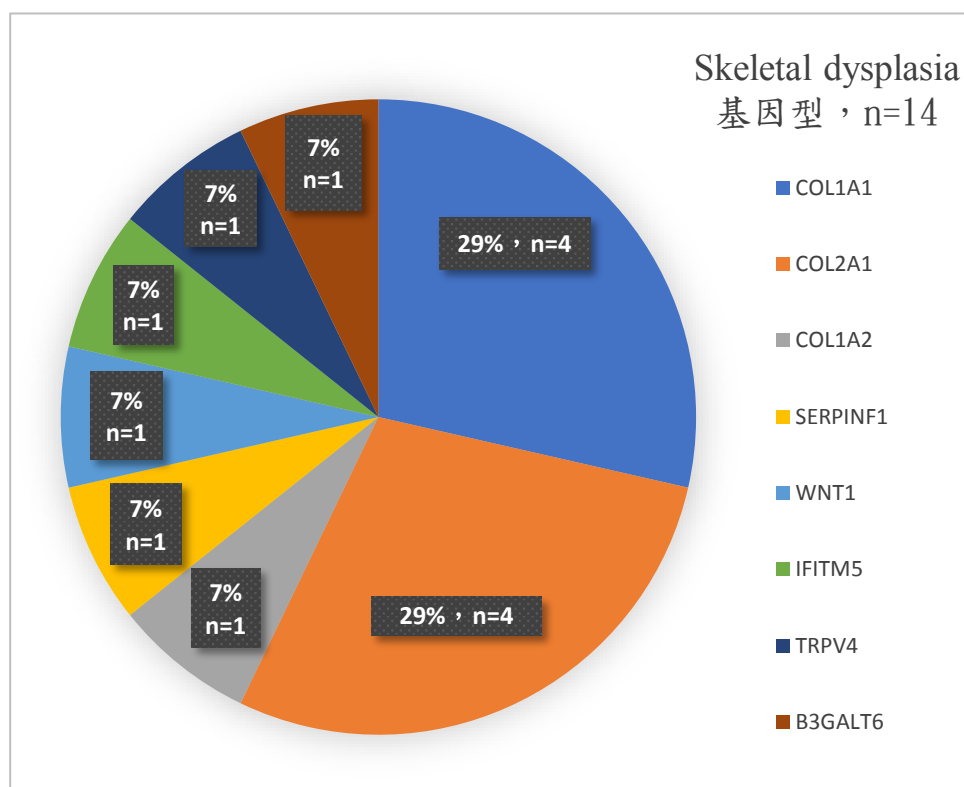




圖 5、COL1A1 變異點位

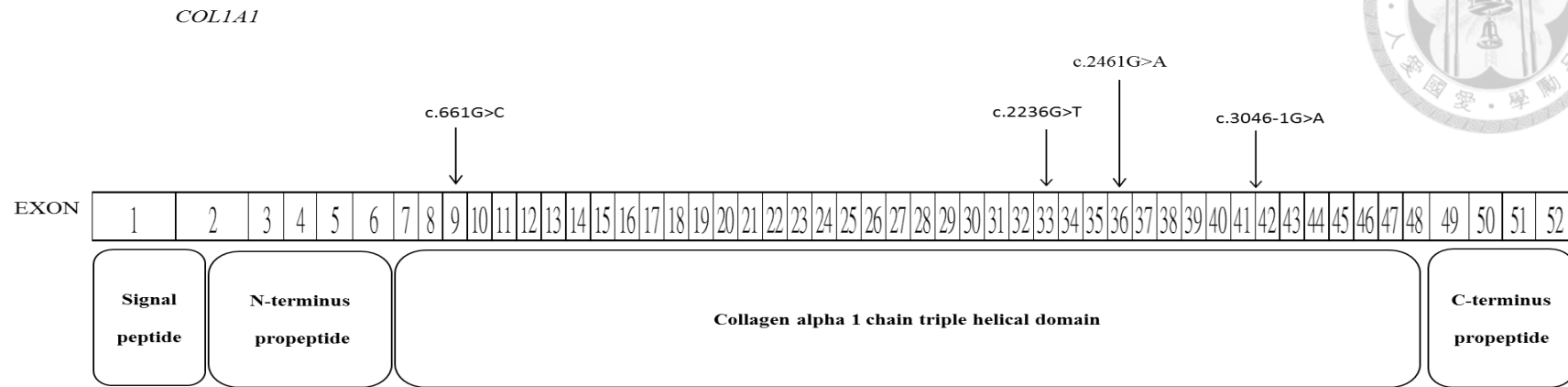


圖 6、COL1A2 變異點位

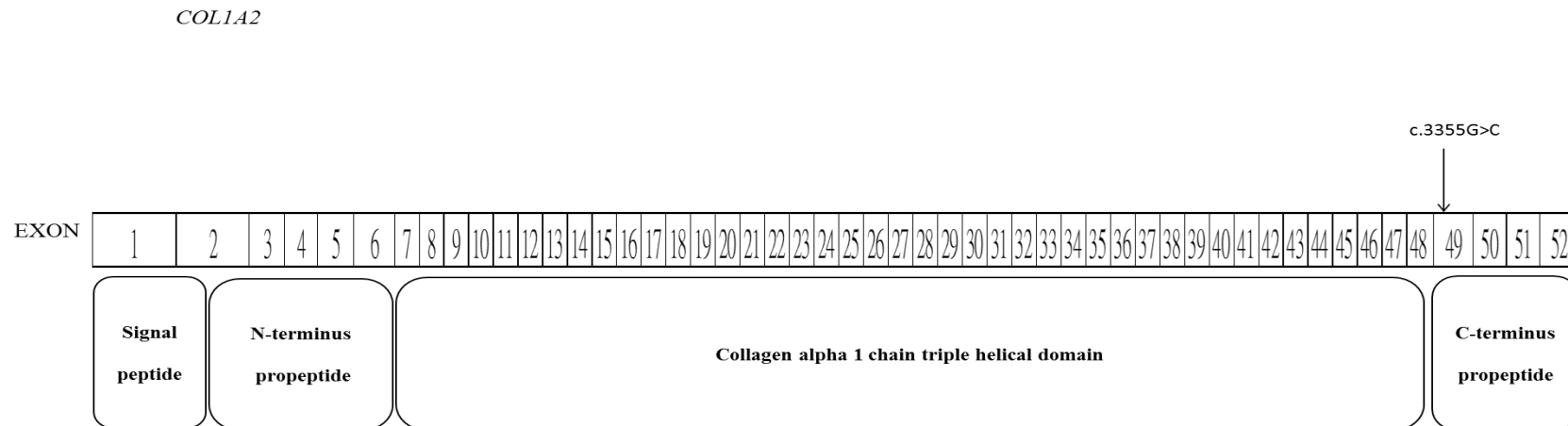




圖 7、COL2A1 變異點位

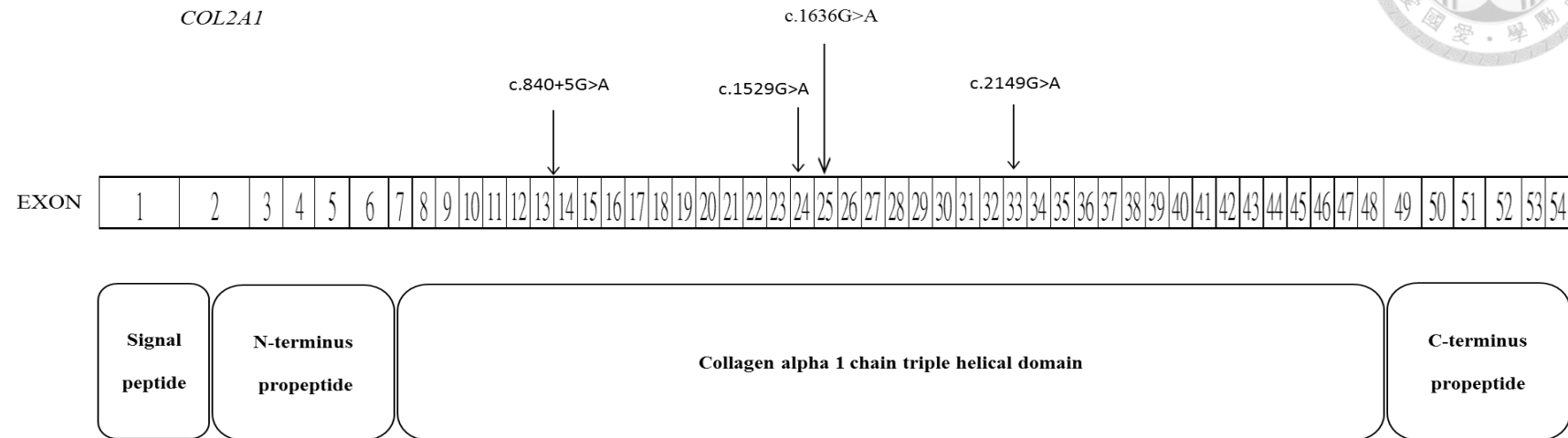




表 1、膠原蛋白基因與疾病列表與遺傳模式

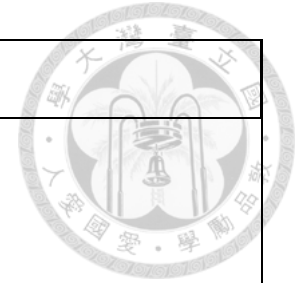
type	Molecular composition	Genes (genomic localization)	Phenotype	Phenotype OMIM number	Inheritance	Associated disease
(1) Fibril-forming collagens: I, II, III,V, XI,XXIV, XXVII						
I	[$\alpha_1(I)$] ₂ $\alpha_2(I)$	COL1A1(17q21.31–q22)	Caffey disease	114000	AD	Most connective tissue, skin, tendon, bone, ligament
			Ehlers-Danlos syndrome, arthrochalasia type, 1	130060	AD	
			Osteogenesis imperfecta, type I	166200	AD	
			Osteogenesis imperfecta, type II	166210	AD	
			Osteogenesis imperfecta, type III	259420	AD	
			Osteogenesis imperfecta, type IV	166220	AD	
			{Bone mineral density variation QTL, osteoporosis}	166710	AD	
		COL1A2 (7q22.1)	Ehlers-Danlos syndrome, arthrochalasia type, 2	617821	AD	



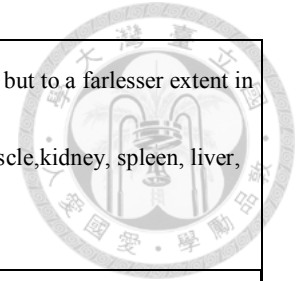
		<i>COL1A2</i> (7q22.1)	Ehlers-Danlos syndrome, cardiac valvular type	225320	AR	
			Osteogenesis imperfecta, type II	166210	AD	
			Osteogenesis imperfecta, type III	259420	AD	
			Osteogenesis imperfecta, type IV	166220	AD	
			{Osteoporosis, postmenopausal}	166710	AD	
II	$[\alpha_1(\text{II})]_3$	<i>COL2A1</i> (12q13.11–q13.2)	Achondrogenesis, type II or hypochondrogenesis	200610	AD	Cartilage, nucleus pulposus, vitreous, cornea, inner ear
			Avascular necrosis of the femoral head	608805	AD	
			Czech dysplasia	609162	AD	
			Epiphyseal dysplasia, multiple, with myopia and deafness	132450	AD	
			Kniest dysplasia	156550	AD	
			Legg-Calve-Perthes disease	150600	AD	
			Osteoarthritis with mild chondrodysplasia	604864	AD	



II	[$\alpha_1(\text{II})$] ₃		Platyspondylic skeletal dysplasia, Torrance type	151210	AD	
			SED congenita	183900	AD	
			SMED Strudwick type	184250	AD	
			Spondyloepiphyseal dysplasia, Stanescu type	616583	AD	
			Spondyloperipheral dysplasia	271700	AD	
			Stickler syndrome, type I, nonsyndromic ocular	609508	AD	
			Stickler syndrome, type I	108300	AD	
			Vitreoretinopathy with phalangeal epiphyseal			
III	[$\alpha_1(\text{III})$] ₃	<i>COL3A1</i> (2q31)	Ehlers-Danlos syndrome, vascular type	130050	AD	skin, vessel wall, reticular fibres of most tissues (lungs, liver, spleen, etc.)
			Polymicrogyria with or without vascular-type EDS	618343	AR	
V	$\alpha_1(\text{V})$, $\alpha_2(\text{V})$, $\alpha_3(\text{V})$	<i>COL5A1</i> (9q34.2– q34.3)	Ehlers-Danlos syndrome, classic type, 1	130000	AD	lung, cornea, bone, fetal membranes; together with type I collagen
		<i>COL5A2</i> (2q31)	Ehlers-Danlos syndrome, classic type, 2	130010	AD	



		<i>COL5A3</i> (19p13.2)				
XI	α_1 (XI)	<i>COL11A1</i> (1p21)	Fibrochondrogenesis 1	228520	AR	cartilage, vitreous body
			Marshall syndrome	154780	AD	
		<i>COL11A1</i> (1p21)	Stickler syndrome, type II	604841	AD	
			{Lumbar disc herniation, susceptibility to}	603932		
	α_2 (XI)	<i>COL11A2</i> (6p21.3)	Deafness, autosomal dominant 13	601868	AD	
			Deafness, autosomal recessive 53	609706	AR	
			Fibrochondrogenesis 2	614524	AR, AD	
	Otospondylomegaepiphyseal dysplasia, autosomal dominant		184840	AD		
	Otospondylomegaepiphyseal dysplasia, autosomal recessive		215150	AR		
	α_3 (XI)					



XXIV	$[\alpha_1(\text{XXIV})]_3$	<i>COL24A1</i>				Predominantly in bone, but to a far lesser extent in the brain, and ovary muscle, kidney, spleen, liver, lung testis,
XXVI I	$[\alpha_1(\text{XXVII})]_3$	<i>COL27A1</i>	Steel syndrome	615155	AR	Adults: cartilage. Children and adolescents: epiphyseal growth plate. During embryonic and fetal development: endochondral bone, lungs, ear, colon, retina, cornea, and major arteries of the heart.
(2) Basement membrane collagen:IV						
IV	$[\alpha_1(\text{IV})]_2\alpha_2(\text{IV}); \alpha_1-\alpha_6$	<i>COL4A1</i> (13q34)	Retinal arteries, tortuosity of	180000	AD	basement membranes
			Angiopathy, hereditary, with nephropathy, aneurysms, and muscle cramps	611773	AD	



			Brain small vessel disease with or without ocular anomalies	175780	AD
			Schizencephaly	269160	
			{Hemorrhage, intracerebral, susceptibility to}	614519	
		<i>COL4A2</i> (13q34)	Brain small vessel disease 2	614483	AD
			{Hemorrhage, intracerebral, susceptibility to}	614519	
			Alport syndrome 2, autosomal recessive	203780	AR
		<i>COL4A3</i> (2q36–q37)	Alport syndrome 3, autosomal dominant	104200	AD
			Hematuria, benign familial	141200	AD
			Alport syndrome 2, autosomal recessive	203780	AR
		<i>COL4A4</i> (2q36–q37)	Hematuria, familial benign	141200	AD
		<i>COL4A5</i> (Xq22.3)	Alport syndrome 1, X-linked	301050	XLD
		<i>COL4A6</i> (Xp22.3)	Deafness, X-linked 6	300914	XLR
(3) Microfibrillar collagen: VI, XXVIII, XXIX					



VI	$\alpha_1(VI)$,	<i>COL6A1</i> (21q22.3)	Bethlem myopathy 1	158810	AR, AD	widespread: dermis, cartilage, placenta, lungs, vessel wall, intervertebral disc
	$\alpha_2(VI)$,		Ullrich congenital muscular dystrophy 1	254090	AR, AD	
VI	$\alpha_3(VI)$	<i>COL6A2</i> (21q22.3)	Myosclerosis, congenital	255600	AR	
			Bethlem myopathy 1	158810	AR, AD	
	<i>COL6A2</i> (21q22.3)	Ullrich congenital muscular dystrophy 1	254090	AR, AD		
		Bethlem myopathy 1	158810	AR, AD		
		<i>COL6A3</i> (2q37)	Dystonia 27	616411	AR	
			Ullrich congenital muscular dystrophy 1	254090	AR, AD	
XXIX	$[\alpha_1(XXIX)]$	<i>COL29A1</i> (3q22.1)				skin, lung, and the gastrointestinal tract
(4) Anchoring fibrils: VII						
VII	$[\alpha_1(VII)]_3$	<i>COL7A1</i> (3p21.3)	EBD inversa	226600	AR	skin, dermal– epidermal junctions; oral mucosa, cervix
			EBD, Bart type	132000	AD	
			EBD, localisata variant			
			Epidermolysis bullosa dystrophica, AD	131750	AD	



VII	[α_1 (VII)] ₃	COL7A1 (3p21.3)	Epidermolysis bullosa dystrophica, AR	226600	AR	
			Epidermolysis bullosa pruriginosa	604129	AR, AD	
			Epidermolysis bullosa, pretibial	131850	AR, AD	
			Toenail dystrophy, isolated	607523	AD	
			Transient bullous of the newborn	131705	AR, AD	
(5) Hexagonal network-forming collagens:VIII,X						
VIII	[α_1 (VIII)] ₂ α_2 (VIII)	COL8A1 (3q12– q13.1)				endothelial cells, Descemet's membrane
		COL8A2 (1p34.3– p32.3)	Corneal dystrophy, Fuchs endothelial, 1	136800	AD	
			Corneal dystrophy, posterior polymorphous 2	609140	AD	
X	[α_3 (X)] ₃	COL10A1 (6q21– q22.3)	Metaphyseal chondrodysplasia, Schmid type	156500	AD	hypertrophic cartilage
(6) FACIT collagens:IX, XII, XIV,XVI, XIX, XX,XXI, XXII,XXVI						
IX	α_1 (IX) α_2 (IX)	COL9A1 (6q13)	Epiphyseal dysplasia, multiple, 6	614135	AD	cartilage, vitreous humor, cornea
			Stickler syndrome, type IV	614134		
	α_3 (IX)	COL9A2 (1p33– p32.2)	Stickler syndrome, type V	614284	AR	



			Epiphyseal dysplasia, multiple, 2	600204	AD	
		COL9A3(20q13.33)	Epiphyseal dysplasia, multiple, 3, with or without myopathy	600969	AD	
			{Intervertebral disc disease, susceptibility to}	603932		
XII	[α ₁ (XII)] ₃	COL12A1 (6q12– q13)	Ullrich congenital muscular dystrophy 2	616470		perichondrium, ligaments, tendon
			Bethlem myopathy 2	616471	AD	
XIV	[α ₁ (XIV)] ₃	COL9A1 (8q23)	Epiphyseal dysplasia, multiple, 6	614135	AD	dermis, tendon, vessel wall, placenta, lung
			Stickler syndrome, type IV	614134		
XIX	[α ₁ (XIX)] ₃	COL19A1 (6q12– q14)				human rhabdomyosarcoma
XX	[α ₁ (XX)] ₃	COL20A1 (20q13.33)				corneal epithelium, embryonic skin, sternal
XXI	[α ₁ (XXI)] ₃	COL21A1 (6p12.3– 11.2)				blood vessel wall
XXII	[α ₁ (XXII)] ₃	COL22A1(8q24.2-q24.3)				heart , skeletal muscle
(7) Transmembrane collagens:XIII, XVII, XXIII, XXV						
XIII	[α ₁ (XIII)] ₃	COL13A1 (10q22)	Myasthenic syndrome, congenital, 19	616720	AR	epidermis, hair follicle, endomysium



XVII	[α_1 (XVII)] ₃	<i>COL17A1 (10q24.3)</i>	Epidermolysis bullosa, junctional, localisata	226650	AR	dermal– epidermal junctions
			Epidermolysis bullosa, junctional, non-Herlitz	226650	AR	
			Epithelial recurrent erosion dystrophy	122400	AD	
XXIII	[α_1 (XXIII)] ₃	<i>COL23A1 (5q35.3)</i>				Lung, cornea, skin, tendon, amnion
XXV	[α_1 (XXV)] ₃	<i>COL25A1 (4q25)</i>	Fibrosis of extraocular muscles, congenital, 5	616219	AR	collagen-like amyloidogenic component is
(8) Multiplexins: XV, XVI, XVIII						
XV	[α_1 (XV)] ₃	<i>COL15A1 (9q21– q22)</i>				fibroblasts, smooth muscle cells, kidney
XVI	[α_1 (XVI)] ₃	<i>COL16A1 (1p34)</i>				fibroblasts, amnion, keratinocytes
XVIII	[α_1 (XVIII)] ₃	<i>COL18A1 (21q22.3)</i>	Knobloch syndrome, type 1	267750	AR	lungs, liver
(9) Other molecules with collagenous domains: XXVI, XXVIII						
XXVI	[α_1 (XXVI)] ₃	<i>COL26A1 (7q22.1)</i>				testis, ovary
XXVIII	[α_1 (XXVIII)] ₃	<i>COL28A1 (7p21.3)</i>				peripheral nerves surrounding most

表 2、次世代定序套組骨骼關節疾病

基因 類型	染色體 位置	表現型	表現型 OMIM number	遺傳 模式
Osteogenesis imperfecta (<i>19 genes</i>)				
<i>PLOD2</i>	chr3q24	Bruck syndrome 2	609220	AR
<i>SERPINF1</i>	chr17p13.3	Osteogenesis imperfecta, type VI	613982	
<i>COL1A1</i>	chr17q21.33	Caffey disease	114000	AD
		Ehlers-Danlos syndrome, arthrochalasia type, 1	130060	AD
		Osteogenesis imperfecta, type I	166200	AD
		Osteogenesis imperfecta, type II	166210	AD
		Osteogenesis imperfecta, type III	259420	AD
		Osteogenesis imperfecta, type IV	166220	AD
		{Bone mineral density variation QTL, osteoporosis}	166710	AD
<i>COL1A2</i>	chr7q21.3	Ehlers-Danlos syndrome, arthrochalasia type, 2	617821	AD
		Ehlers-Danlos syndrome, cardiac valvular type	225320	AR
		Osteogenesis imperfecta, type II	166210	AD
		Osteogenesis imperfecta, type III	259420	AD
		Osteogenesis imperfecta, type IV	166220	AD
		{Osteoporosis, postmenopausal}	166710	AD
<i>MBTPS2</i>	chrXp22.12	Olmsted syndrome, X-linked	300918	XLR

		IFAP syndrome with or without BRESHECK syndrome	308205	XLR
		Keratosis follicularis spinulosa decalvans, X-linked	308800	XLR
		Osteogenesis imperfecta, type XIX	301014	XLR
<i>PLS3</i>	chrXq23	Bone mineral density QTL18,osteoporosis	300910	XLD
<i>PPIB</i>	chr15q22.31	Osteogenesis imperfecta, type IX	259440	AR
<i>IFITM5</i>	chr11p15.5	Osteogenesis imperfecta, type V	610967	AD
<i>CRTAP</i>	chr3p22.3	Osteogenesis imperfecta, type VII	610682	AR
<i>LEPRE1</i>	chr1p34.2	Osteogenesis imperfecta, type VIII	610915	AR
<i>SERPINH1</i>	chr11q13.5	Osteogenesis imperfecta, type X	613848	AR
		{Preterm premature rupture of the membranes, susceptibility to}	610504	
<i>FKBP10</i>	chr17q21.2	Bruck syndrome 1	259450	AR
		Osteogenesis imperfecta, type XI	610968	AR
<i>SP7</i>	chr12q13.13	Osteogenesis imperfecta, type XII	613849	AR
<i>BMP1</i>	chr8p21.3	Osteogenesis imperfecta, type XIII	614856	AR
<i>TMEM38B</i>	chr9q31.2	Osteogenesis imperfecta, type XIV	615066	
<i>WNT1</i>	chr12q13.12	Osteogenesis imperfecta, type XV	615220	AR
		{Osteoporosis, early-onset, susceptibility to, autosomal dominant}	615221	
<i>SPARC</i>	chr5q33.1	Osteogenesis imperfecta, type XVII	616507	AR
<i>P4HB</i>	chr17q25.3	Cole-Carpenter syndrome 1	112240	AD

<i>SEC24D</i>	chr4q26	Cole-Carpenter syndrome 2	616294	AR
Ehlers-Danlos syndrome (13 genes):				
<i>TNXB</i>	chr6p21.33- p21.32	Ehlers-Danlos syndrome, classic-like, 1	606408	AR
		Vesicoureteral reflux 8	615963	AD
<i>B4GALT7</i>	chr5q35.3	Ehlers-Danlos syndrome, spondylodysplastic type, 1	130070	AR
<i>SLC39A13</i>	chr11p11.2	Ehlers-Danlos syndrome, spondylodysplastic type, 3	612350	AR
<i>COL5A1</i>	chr9q34.3	Ehlers-Danlos syndrome, classic type, 1	130000	AD
<i>COL5A2</i>	chr2q32.2	Ehlers-Danlos syndrome, classic type, 2	130010	AD
<i>COL3A1</i>	chr2q32.2	Ehlers-Danlos syndrome, vascular type	130050	AD
		Polymicrogyria with or without vascular-type EDS	618343	AR
<i>ADAMTS2</i>	chr5q35.3	Ehlers-Danlos syndrome, dermatosparaxis type	225410	AR
<i>PLOD1</i>	chr1p36.22	Ehlers-Danlos syndrome, kyphoscoliotic type, 1	225400	AR
<i>ZNF469</i>	chr16q24.2	Brittle cornea syndrome 1	229200	AR
<i>FKBP14</i>	chr7p14.3	Ehlers-Danlos syndrome, kyphoscoliotic type, 2	614557	AR
<i>CHST14</i>	chr15q15.1	Ehlers-Danlos syndrome, musculocontractural type 1	601776	AR
<i>DSE</i>	chr6q22.1	Ehlers-Danlos syndrome, musculocontractural type 2	615539	AR
<i>B3GALT6</i>	chr1p36.33	Ehlers-Danlos syndrome, spondylodysplastic type, 2	615349	AR

		Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity, type 1, with or without fractures	271640	AR
Osteopetrosis (6 genes):				
<i>IKBKG</i>	chrXq28	Ectodermal dysplasia and immunodeficiency 1	300291	
		Ectodermal, dysplasia, anhidrotic, lymphedema and immunodeficiency	300301	
		Immunodeficiency 33	300636	XLR
		Immunodeficiency, isolated	300584	
		Incontinentia pigmenti	308300	XLD
		Invasive pneumococcal disease, recurrent isolated, 2	300640	
<i>TNFRSF11A</i>	chr18q21.33	Osteolysis, familial expansile	174810	AD
		Osteopetrosis, autosomal recessive 7	612301	AR
		{Paget disease of bone 2, early-onset}	602080	AD
<i>TCIRG1</i>	chr11q13.2	Osteopetrosis, autosomal recessive 1	259700	AR
<i>TNFSF11</i>	chr13q14.11	Osteopetrosis, autosomal recessive 2	259710	AR
<i>CLCN7</i>	chr16p13.3	Osteopetrosis, autosomal dominant 2	166600	AD
		Osteopetrosis, autosomal recessive 4	611490	AR
<i>OSTM1</i>	chr6q21	Osteopetrosis, autosomal recessive 5	259720	AR
Marfan syndrome (7 genes):				
<i>FBNI</i>	chr15q21.1	Acromicric dysplasia	102370	AD
		Ectopia lentis, familial	129600	AD
		Geleophysic dysplasia 2	614185	AD

		Marfan lipodystrophy syndrome	616914	AD
		Marfan syndrome	154700	AD
		MASS syndrome	604308	
		Stiff skin syndrome	184900	AD
		Weill-Marchesani syndrome 2, dominant	608328	AD
<i>FBN2</i>	chr5q23.3	Contractural arachnodactyly, congenital	121050	AD
		Macular degeneration, early-onset	616118	AD
<i>CBS</i>	chr21q22.3	Homocystinuria, B6-responsive and nonresponsive types	236200	AR
		Thrombosis, hyperhomocysteinemic	236200	AR
<i>TGFBR1</i>	chr9q22.33	Loeys-Dietz syndrome 1	609192	AD
		{Multiple self-healing squamous epithelioma, susceptibility to}	132800	AD
<i>TGFBR2</i>	chr3p24.1	Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis, type 6	614331	
		Esophageal cancer, somatic	133239	
		Loeys-Dietz syndrome 2	610168	AD
<i>SMAD3</i>	chr15q22.33	Loeys-Dietz syndrome 3	613795	AD
<i>ACTA2</i>	chr10q23.31	Aortic aneurysm, familial thoracic 6	611788	AD
		Moyamoya disease 5	614042	
		Multisystemic smooth muscle dysfunction syndrome	613834	AD
others (11 genes):				

<i>FLNA</i>	chrXq28	FG syndrome 2	300321	XL
		Cardiac valvular dysplasia, X-linked	314400	XLR
		Congenital short bowel syndrome	300048	XLR
		Frontometaphyseal dysplasia 1	305620	XLR
		Heterotopia, periventricular, 1	300049	XLD
		Intestinal pseudoobstruction, neuronal	300048	XLR
		Melnick-Needles syndrome	309350	XLD
		Otopalatodigital syndrome, type I	311300	XLD
		Otopalatodigital syndrome, type II	304120	XLD
		Terminal osseous dysplasia	300244	XLD
<i>FLNB</i>	chr3p14.3	Atelosteogenesis, type I	108720	AD
		Atelosteogenesis, type III	108721	AD
		Boomerang dysplasia	112310	AD
		Larsen syndrome	150250	AD
		Spondylocarpotarsal synostosis syndrome	272460	AR
<i>RIN2</i>	chr20p11.23	Macrocephaly, alopecia, cutis laxa, and scoliosis	613075	AR
<i>LRP5</i>	chr11q13.2	Exudative vitreoretinopathy 4	601813	AR, AD
		Hyperostosis, endosteal	144750	AD
		Osteopetrosis, autosomal dominant 1	607634	AD
		Osteoporosis-pseudoglioma syndrome	259770	AR
		Osteosclerosis	144750	AD

		Polycystic liver disease 4 with or without kidney cysts	617875	AD
		van Buchem disease, type 2	607636	AD
		[Bone mineral density variability 1]	601884	AD
		{Osteoporosis}	166710	AD
<i>XYLT2</i>	chr17q21.33	Spondyloocular syndrome	605822	AR
		{Pseudoxanthoma elasticum, modifier of severity of}	264800	AR
<i>COL2A1</i>	chr12q13.11	Achondrogenesis, type II or hypochondrogenesis	200610	AD
		Avascular necrosis of the femoral head	608805	AD
		Czech dysplasia	609162	AD
		Epiphyseal dysplasia, multiple, with myopia and deafness	132450	AD
		Kniest dysplasia	156550	AD
		Legg-Calve-Perthes disease	150600	AD
		Osteoarthritis with mild chondrodysplasia	604864	AD
		Platyspondylic skeletal dysplasia, Torrance type	151210	AD
		SED congenita	183900	AD
		SMED Strudwick type	184250	AD
		Spondyloepiphyseal dysplasia, Stanescu type	616583	AD
		Spondyloperipheral dysplasia	271700	AD
		Stickler syndrome, type I, nonsyndromic ocular	609508	AD

		Stickler syndrome, type I	108300	AD
		Vitreoretinopathy with phalangeal epiphyseal dysplasia		
<i>TRAPPC2</i>	chrXp22.2	Spondyloepiphyseal dysplasia tarda	313400	XLR
<i>TRPV4</i>	chr12q24.11	Avascular necrosis of femoral head, primary, 2	617383	AD
		Brachyolmia type 3	113500	AD
		Digital arthropathy-brachydactyly, familial	606835	AD
		Hereditary motor and sensory neuropathy, type IIc	606071	AD
		Metatropic dysplasia	156530	AD
		Parastremmatic dwarfism	168400	AD
		Scapuloperoneal spinal muscular atrophy	181405	AD
		SED, Maroteaux type	184095	AD
		Spinal muscular atrophy, distal, congenital nonprogressive	600175	AD
		Spondylometaphyseal dysplasia, Kozlowski type	184252	AD
		[Sodium serum level QTL 1	613508	
<i>CREB3L1</i>	chr11p11.2	Osteogenesis imperfecta, type XVI	616229	AR
<i>TGFB2</i>	chr1q41	Loeys-Dietz syndrome 4	614816	AD
<i>TGFB3</i>	chr14q24.3	Arrhythmogenic right ventricular dysplasia 1	107970	AD
		Loeys-Dietz syndrome 5	615582	AD

AD :

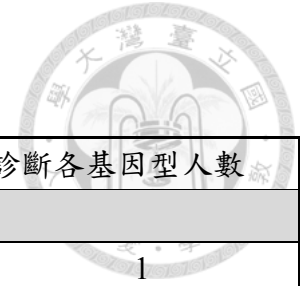


表 3、臨床診斷與分子診斷基因型

臨床診斷	分子診斷基因型	各項臨床診斷人數	分子診斷各基因型人數
(1)、EDS		8	
	<i>PRDM5</i> (Brittle cornea syndrome 2)		1
	<i>COL5A1</i> (Classical EDS)		2
	<i>COL3A1</i> (Vascular EDS)		1
(2)、Skeletal dysplasia		22	
	<i>COL1A1</i> (Osteogenesis imperfect, OI)		4
	<i>COL2A1</i> (<i>COL2A1</i> -related collagenopathy)		4
	<i>COL1A2</i> (Osteogenesis imperfect, OI)		1
	<i>SERPINF1</i> (OI type VI)		2
	<i>WNT1</i> (OI type XV)		1
	<i>IFITM5</i> (OI type V)		1
	<i>TRPV4</i> (Spondylometaphyseal dysplasia , Kozlowski type)		1
	<i>B3GALT6</i> (Spondyloepimetaphyseal dysplasia with joint laxity)		1

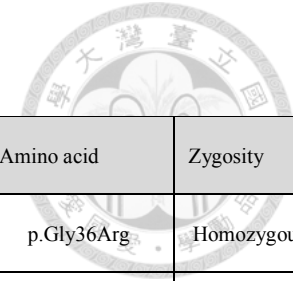


表 4、檢測結果、基因型與表現型相關性

Family	Patient	Initial presentation	Clinical diagnosis	Molecular diagnosis	Gene	NM	Exon/Intron	Nucleotide	Amino acid	Zygoty
1	1	EDS	EDS VI	Brittle cornea syndrome 2	<i>PRDM5</i>	NM_018699	Exon 2	c.106G>A	p.Gly36Arg	Homozygous
16	18	EDS	EDS type I	EDS type I	<i>COL5A1</i>	NM_000093	Exon 62	c.4720C>T	p.Gln1574X	Heterozygous
18	20	EDS	-	-	<i>COL3A1</i> / <i>FLNB</i>	NM_000090.3/ NM_001457.3	Exon43	<i>COL3A1</i> <i>FLNB</i> c.2263A>C	p.L1021I/p.S755R	-
20	22	EDS	EDS type IV	EDS type IV	<i>COL3A1</i>	NM_000090.3	Intron 39	c.2824-10T>G	Splicing	Heterozygous
21	23	EDS	-	-	-	-	-	-	-	-
25	27	EDS	-	EDS type II	<i>COL5A2</i>	NM_000393.3	Exon 28	c.3091C>T	p.Pro1031Ser	Heterozygous
27	29	Marfan syndrome/ EDS	-	-	-	-	-	-	-	-
28	30	EDS type III	-	EDS type I	<i>COL5A1</i>	NM_000093	Intron 9	c.1389+5G>A	Splicing	Heterozygous

2	2	Skeletal dysplasia	-	-	-	-	-	-	-	-
3	3	Skeletal dysplasia	-	-	-	-	-	-	-	-
4	4	Skeletal dysplasia	-	-	-	-	-	-	-	-
5	5	Skeletal dysplasia	Skeletal dysplasia	Spondylometaphyseal dysplasia, Kozlowski type	<i>TRPV4</i>	NM_021625.4	Exon 11	c.1781G>A	p.Arg594His	Heterozygous
6	6	Skeletal dysplasia	-	-	-	-	-	-	-	-
7	7	Skeletal dysplasia	OI type III	OI type XV	<i>WNT1</i>	NM_005430.3	Intron1/ Exon 2	c.104+1G>A / c.105G>A	Splicing/p.Trp35*	Compound heterozygous
8	8	Skeletal dysplasia	OI type I	OI type I	<i>COL1A1</i>	NM_000088	Exon 9	c.661G>C	p.Gly221Arg	Heterozygous
9	9	Skeletal dysplasia	-	-	-	-	-	-	-	-
10	10	Skeletal dysplasia	Skeletal dysplasia	COL2A1-related skeletal dysplasia	<i>COL2A1</i>	NM_001844.4	Exon 24	c.1529G>A	p.Gly510Asp	Heterozygous
11	11	Skeletal dysplasia	OI type I	OI type I	<i>COL1A1</i>	NM_000088	Exon 36	c.2461G>A	p.Gly821Ser	Heterozygous

12	12	Skeletal dysplasia	Hypochondroplasia	COL2A1-related skeletal dysplasia	<i>COL2A1</i>	NM_001844.4	Exon 25	c.1636G>A	p.Gly546Ser	Heterozygous
13	13	Skeletal dysplasia	OI type III	OI type VI	<i>SERPINF1</i>	NM_002615.6	Exon 2	c.72dupC	p.Glu27Glyfs*37	Homozygous
13	14	Skeletal dysplasia	OI type III	OI type VI	<i>SERPINF1</i>	NM_002615.6	Exon 2	c.72dupC	p.Glu27Glyfs*37	Homozygous
14	15	Skeletal dysplasia	Osteopetrosis	High BMD OI	<i>COL1A2</i>	NM_000089	Exon 49	c.3355G>C	p.Ala1119Pro	Heterozygous
15	16	Skeletal dysplasia	OI type III	OI type V	<i>IFITM5</i>	NM_001025295	Intron 1	c.-14C>T	Splicing	Heterozygous
15	17	Skeletal dysplasia	Skeletal dysplasia	COL2A1-related skeletal dysplasia	<i>COL2A1</i>	NM_001844.4	Intron 13	c.840+5G>A	Splicing	Heterozygous
17	19	Skeletal dysplasia	OI type III	OI type III	<i>COL1A1</i>	NM_000088	Exon 33	c.2236G>T	p.Gly746Cys	Heterozygous
19	21	Skeletal dysplasia	Skeletal dysplasia	SEMD with joint laxity	<i>B3GALT6</i>	NM_080605	Exon1/Exon 1	c.200C>T / c.694C>T	p.Pro67Leu / p.Arg232Cys	Compound heterozygous
22	24	Skeletal dysplasia	Achondroplasia	COL2A1-related skeletal dysplasia	<i>COL2A1</i>	NM_001844	Exon 33	c.2149G>A	p.Gly717Ser	Heterozygous
23	25	Skeletal dysplasia	-	-	-	-	-	-	-	-

24	26	Skeletal dysplasia	-	-	-	-	-	-	-
26	28	OI	-	OI	<i>COL1A1</i>	NM_000088	Intron 41	c.3046-1G>A	Splicing Heterozygous

