

201238014A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(難病関係研究分野)

全ゲノムエクソン配列解析法による

先天性内分泌疾患の分子基盤の解明

(H23-実用化(難病)-一般-014)

平成24年度総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 奉延

平成25年5月

## 平成 24 年度研究班構成員名簿

区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	長谷川 奉延	慶應義塾大学医学部小児科学教室	教授
研究分担者	石井 智弘	慶應義塾大学医学部小児科学教室	助教
研究分担者	鳴海 覚志	慶應義塾大学医学部小児科学教室	特任助教
研究分担者	古川 徹	東京女子医科大学統合医科学研究所	教授
研究分担者	安達 昌功	神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科	部長
研究分担者	長谷川 行洋	東京都立小児総合医療センター内分泌代謝科	部長
研究分担者	荒木 俊介	産業医科大学医学部小児科	助教

-----

# 目次

I.	総括研究報告書	1
	長谷川奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室・教授	
II.	分担研究報告書	
1.	先天性内分泌疾患ゲノム DNA 検体収集	5
	石井智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室・助教	
	荒木俊介 産業医科大学医学部小児科・助教	
	安達昌功 神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科・部長	
	長谷川行洋 東京都立小児総合医療センター内分泌代謝科・部長	
2.	ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた高速・包括的な 先天性内分泌疾患遺伝子解析系「Endocrinome システム」の運用	7
	鳴海覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室・特任助教	
	長谷川奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室・教授	
3.	全ゲノムエクソン配列 (エクソーム) 解析による 先天性内分泌疾患 5 種の新規責任遺伝子の探索	10
	鳴海覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室・特任助教	
	古川徹 東京女子医科大学統合医科学研究所・教授	
4.	新規の先天性副腎低形成症・責任遺伝子 (A 遺伝子) の検証解析	13
	鳴海覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室・特任助教	
	石井智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室・助教	
5.	既知遺伝子変異陽性の先天性内分泌疾患の臨床像解析	15
	鳴海覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室・特任助教	
	荒木俊介 産業医科大学医学部小児科・助教	
6.	ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の新規診断法の開発	20
	鳴海覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室・特任助教	
7.	マウス各種内分泌組織の特異的マーカーによる発現マップの作成と 先天性副腎低形成症の新規候補遺伝子 (C 遺伝子) の発現パターンの解析	23
	石井智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室・助教	
8.	社会へ向けての研究成果の発信 (ウェブサイト・プレスリリース)	27
	鳴海覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室・特任助教	
	長谷川奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室・教授	

9. 社会へ向けての研究成果の発信	
(サイエンススクール・公開市民講座・患者会での講演) ……	30
長谷川奉延    慶應義塾大学医学部小児科学教室・教授	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……	33
IV. 研究成果の刊行物・別冊 ……	35

# I. 総括研究報告書

## 全ゲノムエクソン配列解析法による先天性内分泌疾患の分子基盤の解明

研究代表者 長谷川 奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室 教授

### 研究要旨

1. 先天性内分泌疾患ゲノム DNA 検体収集、2. ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた高速・包括的な先天性内分泌疾患遺伝子解析系「Endocrinome システム」の運用、3. 全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析による先天性内分泌疾患 5 種の新規責任遺伝子の探索、4. 新規の先天性副腎低形成症・責任遺伝子（A 遺伝子）の検証解析、5. 既知遺伝子変異陽性の先天性内分泌疾患の臨床像解析、6. ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の新規診断法の開発、7. マウス各種内分泌組織の特異的マーカーによる発現マップの作成と先天性副腎低形成症の新規候補遺伝子（C 遺伝子）の発現パターンの解析、について大きな成果が得られた。また、ウェブサイト・プレスリリースおよびサイエンススクール・公開市民講座・患者会での講演を通じて研究成果を社会へ向けて発信した。

### 研究分担者

石井 智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室  
・助教  
鳴海 寛志 慶應義塾大学医学部小児科学教室  
・特任助教  
古川 徹 東京女子医科大学統合医科学研究所  
・教授  
安達 昌功 神奈川県立こども医療センター  
内分泌代謝科・部長  
長谷川行洋 東京都立小児総合医療センター  
内分泌代謝科・部長  
荒木 俊介 産業医科大学医学部小児科・助教

本年度（3 年計画の 2 年目）は、解析対象の設定（ゲノム DNA 検体収集および既知の責任遺伝子変異の同定・臨床像の検討・機能解析）、全ゲノムエクソン配列解析による候補責任遺伝子の同定、候補責任遺伝子における検証実験（家系解析、発現部位の解析、など）、次世代シーケンサーを用いた疾患の新規診断方法開発、を行う。さらに研究成果を社会に向けて発信する。

### B. 研究方法

1. 日本小児内分泌学会の承認のもと全国規模での先天性内分泌疾患のゲノム DNA 検体収集を行った。

2. 昨年度の本研究で構築した先天性内分泌疾患・関連遺伝子を超高速解析可能な「Endocrinome システム」を用いて患者 311 例を解析し、既知責任遺伝子同定を試みた。

3. 発症機序不明の先天性内分泌疾患 5 種（先天性下垂体機能低下症、先天性甲状腺機能低下症、先天性カルシウム代謝異常、先天性副腎低形成、

### A. 研究目的

本研究の目的は、全ゲノムエクソン配列解析法を用いて先天性内分泌疾患の新規責任遺伝子を同定し、本疾患の分子病態を解明することである。その必要性は、本疾患が低身長、肥満、知能障害、不完全な性成熟、不妊などを介して生涯にわたる QOL 低下と後遺症を残す難治性疾患であり、患者数が少なく希少性の高い疾患であるためである。

性分化疾患)の患者計58例に対して全ゲノムエクソン配列解析(エクソーム解析)を行った。

4. 先天性副腎低形成において同定された候補責任遺伝子「A 遺伝子」において、家系解析を行った。また「A 遺伝子」の組織発現および細胞内発現を解析した。

5. 既知責任遺伝子の新たな変異を同定した際には詳細な臨床像検討および機能解析を行った。

6. ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の新規診断法を開発した。

7. 先天性副腎低形成症で新たに同定した新規候補遺伝子Cの胎生期マウスでの発現パターンを解析した。

8. ウェブサイト・プレスリリースを用いて、研究成果を社会へ向けて発信した。

9. サイエンススクール・公開市民講座・患者会での講演を通じて、研究成果を社会へ向けて発信した。

【倫理面への配慮】本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得た。また血液採取、遺伝子解析に関しては書面による同意を本人あるいは家族から得てから行った。

## C. 研究結果

1. 先天性内分泌疾患ゲノムDNA検体収集：1年間でおおよそ450検体を収集し、先天性内分泌疾患総ゲノムDNA検体はおおよそ950となった。

2. 311例を解析し、78名(25%)で変異を同定した。

3. 先天性内分泌疾患5種に対するエクソーム解析により計199種の候補遺伝子を同定した。

4. 先天性副腎低形成計6名において候補責任遺伝子「A 遺伝子」変異陽性例を同定した。患者はいずれもヘテロ接合であり、その両親には変異を認めなかった。リアルタイムRT-PCR解析では、副腎を含む複数の組織でA 遺伝子は高発現であ

った。発現実験では、A たんぱく質は細胞内で顆粒状に局在した。

5. 既知の遺伝性先天性内分泌疾患である、PAX8 異常症(先天性甲状腺機能低下症)、DUOX2 異常症(先天性甲状腺機能低下症)、NR5A1 異常症(性分化疾患)、LHX4 異常症(先天性下垂体機能低下症)に関する新規の臨床的知見を得た。

6. 次世代シーケンサーにより、McCune-Albright 症候群における従来法の100倍の変異検出感度を持つ新規診断法を開発した。

7. 先天性副腎低形成症で新たに同定した候補遺伝子Cのマウス副腎皮質での発現が副腎皮質被膜下の前駆細胞と合致した。

8. 研究班のウェブサイトを開設し、一般市民向けの成果紹介を開始し、継続した。また、新規性の高い研究成果の論文発表においては、大学のプレスリリースを利用した。

9. 中学3年生を対象としたサイエンススクールを2回、一般市民を対象とした公開市民講座を1回、患者会での講演を2回行った。

## D. 考察

1. 先天性内分泌疾患総ゲノムDNA検体おおよそ950は世界的に見ても屈指の小児内分泌疾患ゲノムDNA数である。

2. 世界初の先天性内分泌疾患を対象とした高速かつ包括的な遺伝子解析系である「Endocrinome システム」を用いることにより、解析精度を犠牲にすることなく既知責任遺伝子の高速解析が可能である。

3. 同定した199種の候補遺伝子について、現在検証解析を通じて、真の責任遺伝子絞り込みを行っている。

4. 「A 遺伝子」は先天性副腎低形成の新規責任遺伝子と考え、さらに機能解析を進める。

5. 変異陽性症例の臨床像・自然歴をより明確にし、フォローアップ上の注意を喚起することが可能となった。患者毎に個別化された最適医療の

提供に貢献すると考える。

6. McCune-Albright 症候群において、より変異アレル頻度の低い末梢血 DNA 検体からの遺伝子診断が可能となった。この方法は、臨床診断に苦慮する際の確定診断の一助となると思われる。

7. C 遺伝子が副腎皮質の発生や層構造維持に重要な役割を示す可能性が示唆され、「C 遺伝子」は先天性副腎低形成の新規責任遺伝子と考えられる。さらに機能解析を進める。

8. 研究班のウェブサイトおよび大学のプレスリリースにより、研究成果を日本国民に幅広く発信することができた。

9. サイエンススクール、一般市民を対象とした公開市民講座および、患者会での講演により研究成果を日本国民に幅広く発信することができた。またサイエンススクールは次世代の研究者養成の端緒（知的資産への間接的な社会的波及効果）となる。

## E. 結論

平成 24 年度は、1. 先天性内分泌疾患ゲノム DNA 検体収集、2. ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた高速・包括的な先天性内分泌疾患遺伝子解析系「Endocrinome システム」の運用、3. 全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析による先天性内分泌疾患 5 種の新規責任遺伝子の探索、4. 新規の先天性副腎低形成症・責任遺伝子（A 遺伝子）の検証解析、5. 既知遺伝子変異陽性の先天性内分泌疾患の臨床像解析、6. ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の新規診断法の開発、7. マウス各種内分泌組織の特異的マーカーによる発現マップの作成と先天性副腎低形成症の新規候補遺伝子（C 遺伝子）の発現パターンの解析、について大きな成果が得られた。また、ウェブサイト・プレスリリースおよびサイエンススクール・公開市民講座・患者会での講演を通じて研究成果を社会へ向けて発信することができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Narumi S, Araki S, Hasegawa T et al. Functional characterization of four novel *PAX8* mutations causing congenital hypothyroidism: new evidence for haploinsufficiency as a disease mechanism. *Eur J Endocrinol.* 2012;167:625-632.

Takagi M, Ishii T, Narumi S, Hasegawa T et al. Gradual loss of ACTH due to a novel mutation in *LHX4*: comprehensive mutation screening in Japanese patients with congenital hypopituitarism. *PLoS One.* 2012;7:e46008.

Kasahara T, Narumi S, Hasegawa T et al. Delayed onset congenital hypothyroidism in a patient with *DUOX2* mutations and maternal iodine excess. *Am J Med Genet A.* 2013;161A:214-217.

Suwanai AS, Ishii T, Narumi S, Hasegawa T et al. A report of two novel *NR5A1* mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013;78:957-965.

Narumi S, Matsuo K, Ishii T, Tanahashi Y, Hasegawa T. Quantitative and Sensitive Detection of *GNAS* Mutations Causing McCune-Albright Syndrome with Next Generation Sequencing. *PLoS One.* 2013;8:e60525.

Yoshizawa-Ogasawara A, Narumi S, Hasegawa T et al., Congenital hypothyroidism caused by a novel mutation of the dual oxidase 2 (*DUOX2*) gene. *J Pediatric Endocrinol Metab.* 2013;26:45-52.



鳴海 覚志, 長谷川 奉延. 次世代シーケンシングによる先天性内分泌疾患の分子基盤の解明. 医学のあゆみ, 2013;245(5);427-432.

## 2. 学会発表

鳴海 覚志, 石井 智弘, 長谷川 奉延 ら「次世代シーケンシングによる先天性内分泌疾患の包括的遺伝子解析」日本小児内分泌学会学術集会（大阪）, 2012年9月27日

鳴海 覚志, 石井 智弘, 長谷川 奉延 ら「次世代シーケンシングによる体細胞GNAS変異の定量的検出」日本小児内分泌学会学術集会（大阪）, 2012年9月29日

鳴海 覚志, 石井 智弘, 長谷川 奉延 ら「次世代シーケンシングによる体細胞GNAS変異の定量的検出」日本人類遺伝学会学術集会（東京）, 2012年10月25日

鳴海 覚志, 石井 智弘, 長谷川 奉延 ら「次世代シーケンシングによる先天性甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析」日本甲状腺学会学術集会（福岡）, 2012年11月30日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## II. 分担研究報告書

## 先天性内分泌疾患ゲノム DNA 検体集積

研究分担者 石井 智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室 助教  
研究分担者 荒木 俊介 産業医科大学医学部小児科 助教  
研究分担者 安達 昌功 神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科 部長  
研究分担者 長谷川 行洋 東京都立小児総合医療センター内分泌代謝科 部長

### 研究要旨

先天性内分泌疾患は稀少疾患である。先天性内分泌疾患の分子遺伝学的基盤の解明に多数のゲノム DNA 検体を収集することは必要条件である。我々は、日本小児内分泌学会の承認のもと全国規模での検体収集を試み、総数 950 以上の先天性内分泌疾患ゲノム DNA 検体を確保した。

### A. 研究目的

先天性内分泌疾患は下垂体、甲状腺、性腺など内分泌器官の先天異常の総称である。先天性内分泌疾患患者に由来するゲノム DNA 検体を全国規模で収集する。

研究参加への同意は書面を用いて全ての患者（もしくは患者の親権者）から得た。本研究は、慶應義塾大学医学部倫理委員会で承認されている（承認期間：平成 23 年 11 月 28 日～平成 28 年 3 月 31 日）。

### B. 研究方法

#### （1）書面による研究協力の依頼

2011 年 12 月初旬に、日本小児内分泌学会（理事長 横谷 進）の承認のもと、全国の日本小児内分泌学会評議員宛に『「全ゲノムエクソン配列解析法による先天性内分泌疾患の分子基盤の解明研究」 参加のお願い』の書面を郵送した。

研究協力施設と研究班との役割分担について、図 1 に示す。

#### （2）E-mail による研究協力の依頼

多数の先天性内分泌疾患患者を継続診療中と考えられる全国 20 施設の部門責任医師に対し、2011 年 12 月中旬に E-mail での研究参加依頼を行った。

【倫理面への配慮】検体収集は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠して行わ

### C. 研究結果

平成 23 年度の検体送付は 7 検体であったが、本年度はおよそ 450 検体であった。

### D. 考察

先天性内分泌疾患は下垂体、甲状腺、性腺など内分泌器官の先天異常の総称である。このうち、マススクリーニングで軽症例も含めて診断される先天性甲状腺機能低下症の有病率が 1/4,000 と最も高いが、他疾患の有病率は 1/10,000 未満であり、いずれも稀少疾患である。本研究は、先天性内分泌疾患に関わる未知責任遺伝子の同定を通じて疾病成立機序解明を目指すものであり、この目的の達成には多数の患者由来ゲノム DNA 検体の収集が必要条件である。

本研究開始時点において、慶應義塾大学小児科では 500 名以上の先天性内分泌疾患患者のゲノム

DNA 検体を保有していた。昨年度に引き続き、本年度も全国規模で積極的な検体収集を継続した結果、1 年間でおよそ 450 検体を収集可能であった。総検体数およそ 950 検体は世界的に見ても屈指の小児内分泌疾患ゲノム DNA 数である。

### E. 結論

小児内分泌疾患総数およそ 950 検体のゲノム DNA を確保した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

該当なし

#### 2. 学会発表

該当なし

### H. 知的財産の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

該当なし

#### 2. 実用新案登録

該当なし

#### 3. その他

該当なし

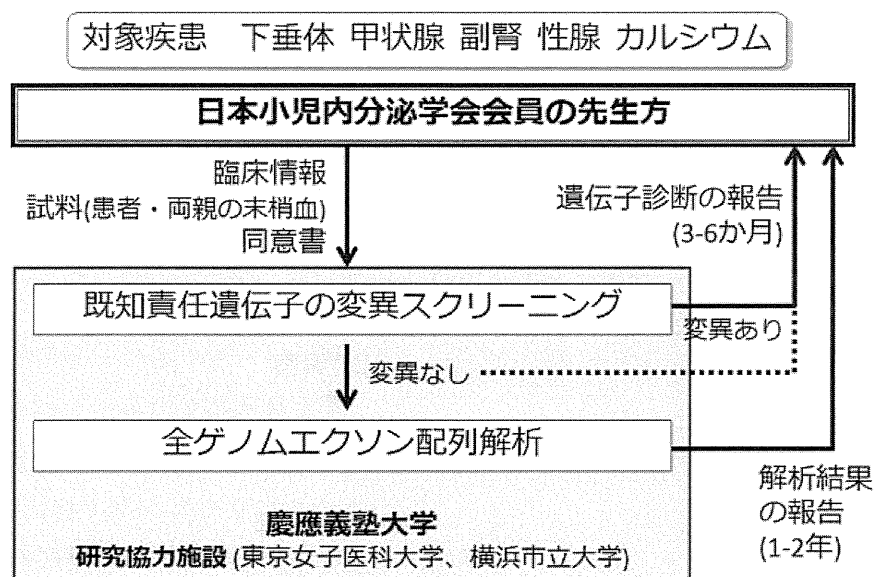


図 1 研究協力施設と研究班との役割分担

## ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた高速・包括的な 先天性内分泌疾患遺伝子解析系「Endocrinome システム」の運用

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教  
研究代表者 長谷川 奉延 慶應義塾大学医学部小児科学教室 教授

### 研究要旨

先天性内分泌疾患・関連遺伝子を超高速解析可能な「Endocrinome システム」を用いて患者 311 例を解析し、78 名 (25%) で変異を同定した。先天性甲状腺機能低下症 96 例における従来法との比較では、変異陽性率は同等であった。本システムを用いることにより、解析精度を犠牲にすることなく既知責任遺伝子の高速解析が可能である。

### A. 研究目的

先天性内分泌疾患・周辺疾患に関わる 120 遺伝子を高速解析する「Endocrinome システム」を運用し、その特性を明らかにすること。

### B. 研究方法

#### (1) 試料

##### ① 前方視的な運用

本研究のために全国の小児内分泌科医から提供された、先天性内分泌疾患患者の末梢血 311 検体を開始試料とした。疾患内訳は、先天性複合型下垂体機能低下症 23 例、中枢性性腺機能低下症 33 例、先天性甲状腺機能低下症 109 例、先天性カルシウム代謝異常 24 例、先天性副腎機能低下症 5 例、性分化疾患 64 例、糖代謝異常 7 例、骨形成不全症 46 例。

##### ② 後方視的な精度検証

過去に既に従来法（Sanger 法）で解析されている 96 検体を Endocrinome システムで再解析し、変異検出精度を評価した。なお、従来法では表現型により 5 遺伝子（甲状腺腫を伴わない患者）もしくは 12 遺伝子（甲状腺腫を伴う患者）を解析されており、Endocrinome システムでは全例で 12 遺

伝子を解析した。

【倫理面への配慮】本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠して行われた。遺伝子解析研究への参加に関する書面での同意を全ての患者（もしくは患者の親権者）から取得した。

#### (2) 解析対象遺伝子

解析対象とする先天性内分泌疾患および周辺疾患として、先天性下垂体機能低下症、先天性甲状腺機能低下症、先天性副腎機能低下症、性分化疾患、先天性糖代謝異常症、先天性カルシウム代謝異常症、骨形成不全症を選択した（最新バージョン (v2.3) の対象遺伝子のリストを表 1 に示す）。

#### (3) 遺伝子解析

Agilent 社のウェブページ eArray (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) を利用して表 1 に示す遺伝子のエクソン領域を選択的に捕捉するための相補的 RNA 群（SureSelect XT カスタムキット）をデザインした。

末梢血白血球細胞から抽出したゲノム DNA 2 μg を Covaris で断片化し、上記カスタムキット

を用いて解析対象 120 遺伝子（表 1）のエクソンに由来する DNA を選択的に濃縮した。濃縮した DNA からライブラリ（次世代シーケンサーで解析可能な状態の DNA プール）を構築する過程で 24 種の識別配列のうち 1 つを付加した。塩基配列決定は MiSeq (Illumina) で行った。識別配列を利用して 24 検体を同時に 150 塩基ペアエンドモードで解析した。得られた配列データは二次・三次解析プログラム群（BWA、SAMtools、GATK、ANNOVAR など）による標準パイプラインで解析し、バリエーション（多型、変異）の一覧リストを出力した。標的エクソンの 95%以上で 30×以上のカバレッジ（塩基あたり配列決定回数）が得られた場合を解析完了とした。患者の疾患との関連が疑われるバリエーションが検出された場合、Sanger 法でその存在を確認した。

### C. 研究結果

2012 年 4 月から 2013 年 4 月までに計 311 名を Endocrinome システムで解析した。標的領域の平均カバレッジは 100×～500×程度であり、90%以上の検体は 1 回で解析完了した。対象 311 名中 78 名で変異を検出した（変異陽性率 25%）。Endocrinome システムの偽陽性（変異検出判定が Sanger 法での検証で覆された例）は 2 検体（1%）であった。これらは反復配列の周囲で認められたことから、アライメント（得られた配列を標準ゲノム配列へ参照する解析過程）の不正確さが原因と考えられた。

過去に既に従来法で解析されている先天性甲状腺機能低下症 96 検体を Endocrinome システムで解析し、解析精度を評価した。変異陽性例はいずれも 22 例（23%）であり検出率は同等であった。また、従来法では未解析であった常染色体劣性先天性甲状腺機能低下症を起こす遺伝子（例：DUOX2、TG など）のヘテロ変異が Endocrinome システムにより新たに 10 例で検出された。

### D. 考察

本研究を通じて、Endocrinome システムにより、既知責任遺伝子の大部分を網羅する包括的遺伝子解析を、多数検体に対して行えることを実証できた。先天性甲状腺機能低下症検体における従来法との比較実験では、変異検出精度は Golden standard とされる Sanger 法と遜色なかった。また、表現型ベースの Sanger 解析では未解析であった遺伝子において、Endocrinome システムでヘテロ接合性変異を検出することができた。これらの病的意義については今後の検討課題である。

### E. 結論

Endocrinome システムにより、既知責任遺伝子の大部分を網羅する包括的遺伝子解析を、多数検体に対して行うことができることが実証された。先天性甲状腺機能低下症検体における従来法との比較実験では、変異検出精度は Golden standard とされる Sanger 法と遜色なかった。また、表現型ベースの Sanger 解析では未解析であった遺伝子において、Endocrinome システムでヘテロ接合性変異を検出することができた。これらの病的意義については今後の検討課題である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Yoshizawa-Ogasawara A, Narumi S, Hasegawa T *et al.*, Congenital hypothyroidism caused by a novel mutation of the dual oxidase 2 (DUOX2) gene. *J Pediatric Endocrinol Metab.* 2013;26;45-52.

#### 2. 学会発表

鳴海 覚志, 石井 智弘, 長谷川 奉延 ら「次世代シーケンシングによる先天性内分泌疾患の包括的遺伝子解析」日本小児内分泌学会学術集会（大阪）, 2012 年 9 月 27 日

鳴海 覚志, 石井 智弘, 長谷川 奉延 ら「次世代シーケンシングによる先天性甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析」日本甲状腺学会学術集会（福岡）, 2012年11月30日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

**表 1 Endocrinome システム(v 2.3)の解析対象遺伝子**

**先天性下垂体機能低下症** : *CHD7, FGFR1, FSHB, GH1, GHR, GHRH, GHRHR, GHSR, GLI2, GNRH1, GNRHR, HESX1, IGF1, IGF1R, KAL1, KISS1, KISS1R, LHB, LHX4, NELF, OTX2, PAX6, POU1F1, PROK2, PROKR2, PROP1, SIX3, SIX6, SOX2, STAT5B, TAC3, TACR3, TBX19*

**先天性甲状腺機能低下症** : *DUOX2, DUOX2A, GLIS3, IGSF1, IYD, NKX2-5, PAX8, SLC26A4, SLC5A5, TG, THRA, THRB, TPO, TRH, TRHR, TSHB, TSHR*

**先天性副腎機能低下症** : *AAAS, CYB5A, CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, GPX1, HSD17B3, HSD3B2, MC2R, MRAP, NNT, NROB1, POR, STAR*

**性分化疾患** : *AKR1C2, AKR1C4, AR, BNC2, CBX2, DHH, FGF8, LHCGR, MAMLD1, MAP3K1, MCM4, NR5A1, RBM28, RSPO1, SOX9, SRD5A2, SRY, TSPYL1, WDR11, WNT4, WT1, ZFPM2*

**先天性カルシウム代謝異常** : *CASR, DHCR7, GATA3, GCM2, GNAS1, PDE4D, PRKAR1A, PTH, TBCE*

**先天性糖代謝異常** : *ABCC8, BLK, GCK, GLUD1, HNF1A, HNF1B, HNF4A, INS, KCNJ11, KLF11, NEUROD1, PAX4*

**骨形成不全症** : *BMP1, COL1A1, COL1A2, CRTAP, FGFR2, FKBP10, LEPRE1, LRP5, NPR2, PPIB, SERPINF1, SERPINH1, SP7*

## 全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析による 先天性内分泌疾患 5 種の新規責任遺伝子の探索

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教  
研究分担者 古川 徹 東京女子医科大学統合医科学研究所 教授

### 研究要旨

これまで分子レベルでの発症機序が大部分不明であった先天性内分泌疾患 5 種（先天性下垂体機能低下症、先天性甲状腺機能低下症、先天性カルシウム代謝異常、先天性副腎低形成、性分化疾患）の患者計 58 例に対してエクソーム解析を行い、計 199 種の候補遺伝子を同定した。今後、検証解析を通じて、真の責任遺伝子を絞り込んでゆく。

### A. 研究目的

既知責任遺伝子に変異を認めない先天性内分泌疾患患者における、未知責任遺伝子の変異の探索を行うこと。

### B. 研究方法

#### (1) 対象

Endocrinome システム（ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた先天性内分泌疾患既知責任遺伝子の包括解析系）で、既知責任遺伝子変異が検出されなかった先天性内分泌疾患患者 58 名を対象とした。なお、両親の協力が得られた家系では、トリオ解析（発端者と両親の同時解析）を行った。

疾患内訳（括弧内はトリオ解析例数）は、先天性複合型下垂体機能低下症 15 例（含む 8 トリオ）、先天性甲状腺機能低下症 20 例（含む 6 トリオ）、先天性カルシウム代謝異常 7 例（含む 7 トリオ）、先天性副腎機能低下症 9 例（含む 4 トリオ）、性分化疾患 7 例（含む 3 トリオ）。

【倫理面への配慮】本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に準拠して行われ

た。遺伝子解析研究への参加に関する書面での同意を全ての患者（もしくは患者の親権者）から取得した。

#### (2) エクソーム解析

エクソーム解析は、拠点研究班「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム解析拠点の構築」（研究代表：松本直通）との共同研究として行った。

末梢血白血球細胞から抽出したゲノム DNA 3  $\mu$ g を Covaris で断片化し、SureSelect All Exon v4（Agilent）を用いて全遺伝子のエクソン領域を選択的に濃縮した。塩基配列決定は HiSeq (Illumina) を用いて、100 塩基ペアエンドモードで行った。得られた配列データは二次・三次解析プログラム群（BWA、SAMtools、Picard、GATK、ANNOVAR など）による標準パイプラインで解析し、バリエーション（多型、変異）の一覧リストを出力した。

本研究では、以下のクライテリアを満たすものを変異（機能異常を伴うレアバリエーション）と定義した。

- ・アリル頻度が 0.002 未満
- ・たんぱく質機能への影響が強いと予想される



（ナンセンスバリエント、フレームシフトバリエント、スプライスサイトバリエント、もしくは下記基準\*を満たすミスセンスバリエント）

\*PolyPhen-2 スコア 0.5 以上かつ SIFT スコア 0.05 未満

トリオ解析では、発端者と両親の保有する変異を比較し、発端者における各変異の親由来（父由来、母由来、*de novo*）を検討した。

想定される遺伝形式にもとづき、下記の基準から各疾患の新規責任遺伝子の候補を定めた。

（AD）優性遺伝モデル

- ① 孤発例における *de novo* 変異
- ② 患者 3 症例以上でヘテロ接合性変異が共有され、かつ、非患者群でヘテロ接合性変異を認めない遺伝子。トリオ解析で親からの遺伝が複数例で確認される場合は除外。

（AR）劣性遺伝モデル

ホモ接合もしくは複合ヘテロ接合（疑いも含む）の変異が 1 名以上で存在する遺伝子

（XL）X 連鎖遺伝モデル

男性患者において、ヘミ接合性変異が 1 名以上で存在する遺伝子

## C. 研究結果

（1）先天性下垂体機能低下症

患者 15 名（うちトリオ解析 8 名）のエクソーム解析を行った。AD モデルでの候補遺伝子は 69 種

（*de novo* 変異の遺伝子 48 種、3 症例以上で変異が共有される遺伝子 21 種）、AR モデルでの候補遺伝子は 34 種、XL モデルでの候補遺伝子は 7 種であった。

（2）先天性甲状腺機能低下症

患者 20 名（うちトリオ解析 6 名）のエクソーム解析を行った。AD モデルでの候補遺伝子は 13 種

（*de novo* 変異の遺伝子 10 種、3 症例以上で変異が共有される遺伝子 3 種）、AR モデルでの候補遺伝子は 33 種、XL モデルでの候補遺伝子は 3 種であった。

現在、エクソーム解析対象ではない患者コホート約 300 名において、これら候補遺伝子の変異を検索中である。

（3）先天性カルシウム代謝異常

患者 7 名（うちトリオ解析 7 名）のエクソーム解析を行った。AD モデルでの候補遺伝子は 30 種（*de novo* 変異の遺伝子 29 種、3 症例以上で変異が共有される遺伝子 1 種）、AR モデルでの候補遺伝子は 4 種、XL モデルでの候補遺伝子は 2 種であった。

（4）先天性副腎機能低下症

患者 9 名（うちトリオ解析 4 名）のエクソーム解析を行った。うち 1 例は、研究途中でカリフォルニア大学ロサンゼルス校のグループが報告した *CDKN1C* 変異を持つことが判明したため、以下の解析対象から除外した。

AD モデルでの候補遺伝子を 1 種同定した（A 遺伝子）。この遺伝子の変異は患者 4 名で共有されており、またトリオ解析を行った 1 名では *de novo* 変異であった。これらのエクソーム解析の結果は、Sanger 法による解析でも確認された。

AR モデルでの候補遺伝子は 2 種、XL モデルでの候補遺伝子は 0 種であった。

（5）性分化疾患

患者 7 名（うちトリオ解析 3 名）のエクソーム解析を行った。AD モデルでの候補遺伝子は 18 種（*de novo* 変異の遺伝子 13 種、3 症例以上で変異が共有される遺伝子 5 種）、AR モデルでの候補遺伝子は 5 種、XL モデルでの候補遺伝子は 1 種であった。

#### D. 考察

計 199 種の候補遺伝子について検証解析（患者コホート解析および発現実験）を通じて、真の責任遺伝子を絞り込む予定である。

なお、最も新規責任遺伝子である可能性が高いと考えられる、先天性副腎低形成患者における A 遺伝子の検証解析については、本報告書内に記載した。

#### E. 結論

既知責任遺伝子に変異を認めない先天性内分泌疾患 5 種に対し、トリオ解析を含むエクソーム解析を行い、5 疾患で計 199 種の候補遺伝子の同定に成功した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## 新規の先天性副腎低形成症・責任遺伝子（A 遺伝子）の検証解析

研究分担者 鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教  
研究分担者 石井 智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室 助教

### 研究要旨

先天性副腎低形成の候補責任遺伝子「A 遺伝子」の変異を検証用患者コホートで検索し、合算で 6 名の変異陽性例を同定した。患者はいずれもヘテロ接合であり、その両親には変異を認めなかった。リアルタイム RT-PCR 解析では、副腎を含む複数の組織で A 遺伝子は高発現であった。発現実験では、A たんぱく質は細胞内で顆粒状に局在した。

### A. 研究目的

エクソーム解析を通じて同定された新規の先天性副腎低形成・責任遺伝子候補である A 遺伝子が、真の病因であるかを検証する。

レーザー顕微鏡で評価した。同時に、先行研究で A たんぱく質との相互作用が報告されている B 分子に蛍光緑色たんぱく質タグを付与したコンストラクトを共発現し、細胞内での共局在の有無を評価した。

### B. 研究方法

#### （1）患者コホート解析

エクソーム解析を行っていない、先天性副腎低形成患者 20 名を対象に、Sanger 法、もしくは次世代シーケンシング法を用いて A 遺伝子の変異検索を行った。変異が同定された症例では患者の両親を解析し、変異の由来（父由来、母由来もしくは *de novo* 変異）を確認した。

#### （2）分子機能解析

##### ① 空間的発現パターン解析

リアルタイム RT-PCR 解析を用いて、健常ヒト組織における A 遺伝子の発現量を評価した。

##### ② 細胞内局在解析

A 遺伝子の発現ベクターは共同研究者から供与を受けた。A 遺伝子の N 末端側に RFP タグを付加したベクターを作製した。このコンストラクトを HEK293 細胞にリポフェクション法で一過性過剰発現し、A たんぱく質の細胞内局在を共焦点レ

### C. 研究結果

#### （1）患者コホート解析

エクソーム解析の対象とは独立の患者コホート 20 名を対象に、A 遺伝子を解析し、新たに 3 名で変異を同定した。うち 1 例は、同胞罹患例であり、同胞の一方はエクソーム解析で既に変異が同定されていた。以上、エクソーム解析での同定例も含めて 6 家系 7 名の A 遺伝子変異症例を同定した。

これらの変異はいずれもヘテロ接合性であり、両親解析の結果全 6 家系で両親での変異の不在を確認できた。このため、大半は発端者において変異が *de novo* に生じたと考えられた。例外的に、同胞罹患例では、両親（末梢血で変異を認めない）のいずれかが変異を性腺モザイクとして有しており、同胞 2 名に変異が伝達されたと推測された。

## （２）分子機能解析

### ① 空間的発現パターン解析

健常ヒト由来 RNA に対するリアルタイム RT-PCR 解析では、遺伝子 A の発現は多組織に確認された。特に副腎、脾臓、卵巣、胸腺において高発現であった。

### ② 細胞内局在解析

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察では、RFP タグつき野生型 A 遺伝子は、細胞内において顆粒状に存在することが明らかとなった（図 1）。また、共発現実験では、A たんぱく質は先行研究で相互作用が示唆されている B たんぱく質と、共局在することが確認された（図 1）。

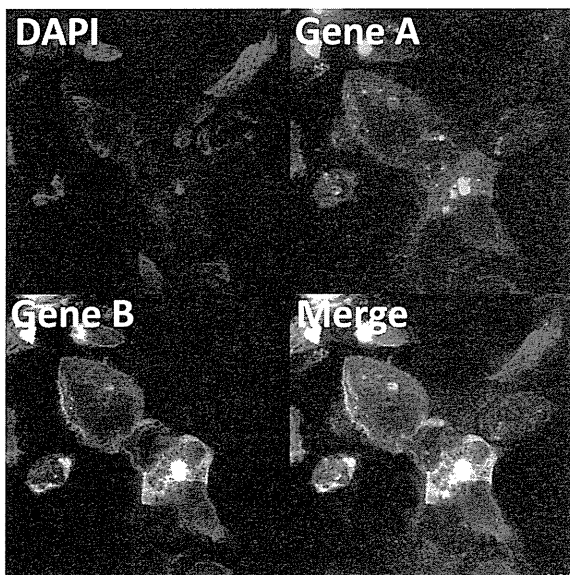


図 1 A たんぱく質の細胞内局在 赤色蛍光たんぱく質タグつきたんぱく質 A は細胞内で顆粒状の分布を示した(右上)。また、A たんぱく質と相互作用する分子として報告のある B たんぱく質(緑色蛍光たんぱく質タグつき、左下)と共局在していた(右下)。細胞：HEK293 細胞、共焦点レーザー顕微鏡による観察（倍率 630×）。

## D. 考察

複数の同一表現型の症例で、遺伝子 A の変異が同定されていること、そのいずれもが *de novo* 変異あるいは性腺モザイク変異によるヘテロ接合性変異であること、の 2 点から少なくとも臨床遺伝学的には遺伝子 A が先天性副腎低形成の新規

責任遺伝子である可能性は極めて高いと考えられる。

## E. 結論

臨床遺伝学的には、遺伝子 A は先天性副腎低形成の新規責任遺伝子である可能性が極めて高い。責任遺伝子であることを確定するには、A 遺伝子の機能を明らかにし、変異によりこの機能が障害されることを示す必要がある。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし