

既知遺伝子変異陽性の先天性内分泌疾患の臨床像解析

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 荒木 俊介 産業医科大学医学部小児科 助教

研究要旨

新規責任遺伝子の探索を行う本研究において、その第一段階は症例毎に既知責任遺伝子の変異を検索することである。変異同定で診断が確定する場合、エクソーム解析には進まないが、詳細な臨床像解析を通じて既知遺伝性疾患の新規臨床知見が得られる場合がある。以下、本研究の一部として行った4研究を概説する。

A. 研究目的

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報告する。

B. 研究方法

（1）*PAX8* 異常症の研究

先天性甲状腺機能低下症患者コホートに対し、甲状腺の発生分化に重要な役割を果たす転写因子 *PAX8* の変異スクリーニングを行った。同定された新規変異の分子機能を発現実験で解析した。すなわち、野生型 *PAX8* 発現ベクターを鋳型に変異導入を行い、野生型および変異型 *PAX8* 分子のたんぱく質発現能、細胞内局在、標的 DNA 結合能、標的遺伝子発現活性化能を汎用培養細胞である HeLa 細胞で評価した。

（2）*DUOX2* 異常症の研究

妊娠中に母がヨードを大量摂取（耐容量の10倍以上）していた出生児。先天性甲状腺機能低下症に対する新生児マススクリーニングは陰性判定であったが、2か月時に遷延黄疸、体重増加不良などを契機に遅発発症型の先天性甲状腺機能低下症と診断された。この時点で甲状腺腫があり、

甲状腺腫性先天性甲状腺機能低下症の責任遺伝子のひとつである *DUOX2* を解析した。

（3）*NR5A1* 異常症の研究

性分化疾患患者コホート 34 名に対し、性腺の発生分化で重要な役割を果たす転写因子 *NR5A1* の変異スクリーニングを行った。同定された新規変異の分子機能を発現実験で解析した。すなわち、野生型 *NR5A1* 発現ベクターを鋳型に変異導入を行い、野生型および変異型 *NR5A1* 分子のたんぱく質発現能、細胞内局在、標的遺伝子発現活性化能を汎用培養細胞である HEK293 細胞で評価した。

（4）*LHX4* 異常症の研究

先天性下垂体機能低下症患者コホート 91 名に対し、器官形成期の下垂体に発現する転写因子群 9 種（*LHX4* を含む）の変異検索を行った。同定された新規 *LHX4* 変異の分子機能を発現実験で解析した。すなわち、野生型 *LHX4* 発現ベクターを作製、それを鋳型に変異導入を行い、野生型および変異型 *LHX4* 分子のたんぱく質発現能、細胞内局在、標的遺伝子発現活性化能を汎用培養細胞である COS7 細胞で評価した。

C. 研究結果/D. 考察

（1）PAX8 異常症の研究

遺伝子解析の結果、4 家系 8 名の新規 PAX8 変異を有する患者を同定した（家系 1 p.L16P, 家系 2 p.F20S, 家系 3 D46Sfs*24, 家系 4 p.R133Q）。家系 1-3 は親子例であり、家系 4 のみ *de novo* 変異の孤発例であった。

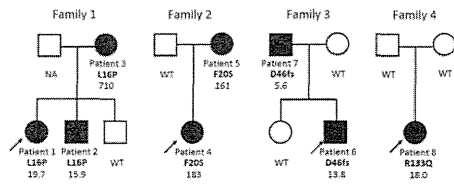


図 1 変異陽性患者の家系図 4 家系 8 名の新規 PAX8 変異陽性患者が認められた。変異陽性者はいずれも血清 TSH 値が高く（図中、各記号の下に血清 TSH 値 (mU/L) を示す：基準値 0.5-5.0）、甲状腺機能低下であった。

HeLa 細胞を用いた分子機能解析では、4 種の変異をそれぞれ単独で発現した場合、いずれも残存転写活性はほぼ 0 であり、機能低下型であることが確認された（図 2）。ウェスタンブロットによるたんぱく質発現量の検討では、D46fs を除く変異体のたんぱく質発現量が正常型と同等であったのに対し、D46fs はたんぱく質発現が認められなかった。なお、このたんぱく質発現量の低下は、プロテアソーム阻害剤の MG132 を添加し細胞培養を行うことで回復した。このため、D46fs は異常な立体構造をとり、その結果ユビキチン-プロテアソーム系を介して破壊されたと推測された。残る L16P、F20S、R133Q の検討では、これらはいずれも核内移行は正常であるものの、PAX8 の標的 DNA 配列に対する結合能の低下がゲルシフト実験で示され、標的 DNA 結合障害であることが明らかとなった。なお、これらの 3 変異体は、甲状腺形成に重要な役割を果たすもうひとつの転写因子 TTF-1 と共発現させることにより、転写活性が部分的に（60-75%）回復することが示された（図 2）。下流遺伝子の活性化において、PAX8 と TTF-1 は、プロモーター領域で複合体を形成することが知られており、TTF-1 による転写活性の部

分的救済は、DNA 結合能が低下した PAX8 変異をプロモーターにとどめることにより生じたと推測された。

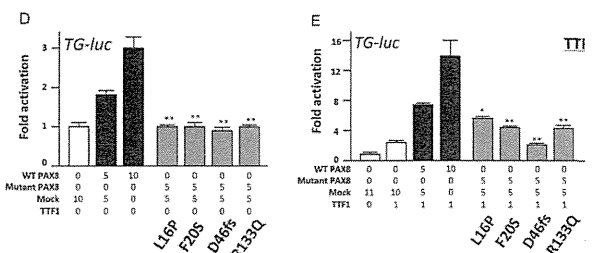


図 2 変異体の転写活性化能の評価 HeLa 細胞にルシフェラーゼレポーター（ヒト TG 遺伝子のプロモータ配列を有する）とエフェクター（PAX8 発現ベクター±TTF-1 発現ベクター）を一過性発現し、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。（左）TTF-1 を共発現しない条件下での実験結果。4 つの変異体の転写活性はいずれも空ベクターと同程度であった。（右）TF-1 を共発現した条件下での実験結果。たんぱく質発現のない D46fs はこの条件下においても活性を認めなかった。一方、標的 DNA 結合障害である残り 3 変異（L16P, F20S, R133Q）は、部分活性が認められた。

本研究において同定された D46fs 変異は、世界で初めて、たんぱく質発現が欠如することを *in vitro* で証明された無活性型 PAX8 変異である。D46fs 変異は常染色体優性の甲状腺機能低下症を起こしえたことから、PAX8 変異による甲状腺機能低下症の発症にはハプロ不全で十分であり、優性阻害効果は必ずしも必要でないことが本研究を通じて初めて明らかにされた。

（2）DUOX2 異常症の研究

遺伝子解析の結果、発端者は DUOX2 の両アレルに機能低下型バリエーションを有することが明らかとなった（p.[E327X]+[H678R]）。p.E327X は新規変異であり、7 つの膜貫通ドメイン全てを喪失することから残存活性のない null 変異と考えられた。p.H678R は既報の機能性多型であった（Narumi *et al.* *J Clin Endocrinol Metab* 2011）。

家族解析の結果、p.E327X は母に、p.H678R は父にそれぞれ由来することが明らかとなった。また、甲状腺機能低下症の既往のない妹は、p.E327X のヘテロ接合体であった（図 3）。

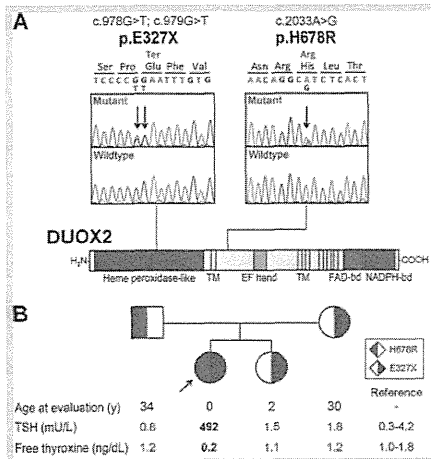


図3 患者および家族の *DUOX2* 解析の結果 患者は複合ヘテロ接合、その他の家族（甲状腺機能正常）はヘテロ接合であった。

本症例のように、ヨード過剰と *DUOX2* 変異が同一個体に生じた例は過去に一例報告があるのみである (Vigone MC *et al.*, *Human Mutat* 2005)。興味深いことに、この症例も本症例と同様に、新生児マススクリーニングの結果は偽陰性であった。ヨード過剰は、先天性甲状腺機能低下症を惹起する確立された病因であるが、逆説的ではあるが、もうひとつ病因である *DUOX2* 変異との共存により、新生児期の甲状腺機能はむしろ正常に維持されたと推測される。

DUOX2 変異が先天性甲状腺機能低下症の最も高頻度の遺伝的病因であること、国際的にみて海藻類（ヨードを多量に含有する）の摂取量が多い本邦ではヨード過剰も稀ではないこと、を考慮すると、*DUOX2* 変異とヨード過剰の共存は、マススクリーニング偽陰性の重要な原因となっている可能性があり、今後さらなる研究が必要と考えられた。

(3) *NR5A1* 異常症の研究

遺伝子解析の結果、2家系6名の新規 *NR5A1* 変異を有する患者を同定した（家系1 p.D257Tfs*39, 家系2 p.V424del）。家系1の発端者は重度尿道下裂、矮小陰茎があり女兒として養育されていた。家系2の発端者は尿道下裂、矮小陰茎を認めた。家系1において変異は発端者、母、祖母に認めら

れた。家系2では、発端者、姉（XX核型であることを確認済み）、母に認められた。興味深いことに、両家系とも発端者の母に精神症状（不安障害、抑うつ）を有していた（図4）。

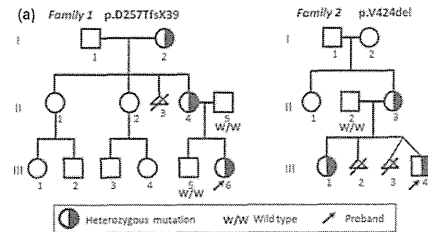


図4 変異陽性患者の家系図 2家系6名の新規 *NR5A1* 変異陽性患者が認められた。性分化疾患を有した2名の発端者を除くと、残り4名の変異陽性者はいずれも女性であった。このうち、両家系とも、発端者の母に精神症状（不安障害、抑うつ）がみられた。

HEK293細胞を用いた分子機能解析では、2種の変異型 *NR5A1* はいずれも *CYP11A1* プロモーター、*CYP19A1* プロモーターに対する転写活性が著明に低下しており、機能低下型変異であることが確認された。なお、野生型 *NR5A1* との共発現実験では、優性阻害効果を認めなかった（図5）。

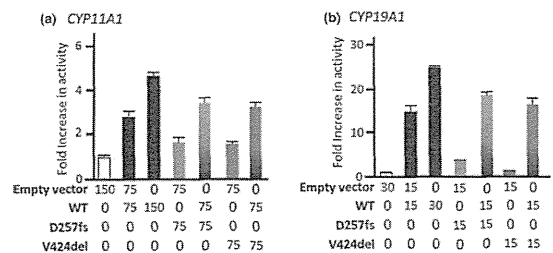


図5 変異体の転写活性化能の評価 HEK293細胞にルシフェラーゼレポーター（ヒト *CYP11A1* および *CYP19A1* のプロモーター配列をそれぞれ有する）とエフェクター（*NR5A1* 発現ベクター）を過剰発現し、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。2種の変異体の転写活性はいずれも野生型に比べ低下しており、優性阻害効果は認めなかった。

一般に、*NR5A1* 変異はXY個体においては性分化疾患を惹起する一方、XX個体に対する影響は、軽度の卵巣機能不全を除くと臨床症状は軽微と考えられてきた。本研究は、*NR5A1* 変異を有する個体における精神症状の存在を初めて記載したものである。視床下部特異的な *Nr5a1* ノックアウトマウスでは不安行動が増加することが知られ

ているが、本研究を通じて、ヒトにおいても同様の精神症状が惹起される可能性が示唆された。

（４）LHX4 異常症の研究

遺伝子解析の結果、1名において *POU1F1* 既報変異を同定した。また、2名において *LHX4* 新規変異を同定した（家系 1 c.294-1G>A, 家系 2 p.V75I）。

家系 1 の発端者（16 歳女兒）は、低身長を主訴に受診し、当初成長ホルモン単独欠損症として経過を観察されていたが、経過中 14 歳から低血糖負荷に対するコルチゾール反応不良を認めた。臨床的な副腎不全はないものの ACTH 分泌不全が存在することが示唆された。発端者と同様の変異が、低身長 (-2.9 SD) の父、および正常身長の同胞（姉 0.2 SD、兄-1.3 SD）からも検出された（図 6）。

家系 2 の発端者は 3 か月時に矮小陰茎、停留精巣を契機に医療機関を受診し、その後 11 か月時より重度の成長障害を認め汎下垂体機能低下症の診断にいたった。発端者と同様の変異が、身長正常範囲低値 (-1.8 SD) の父にも認められた（図 6）。



図 6 変異陽性患者の家系図 新規 *LHX4* 変異を認めた 2 家系の家系図を示す。両家系とも、変異は父に由来しており、家系 1 では同胞 2 名にも変異が認められた。発端者を除くと、2 家系 4 名の家族解析を通じて同定された変異キャリアはいずれも下垂体機能低下症を示す内分泌学的所見はなく、表現型の幅広さが示唆された。

COS7 細胞を用いた分子機能解析では、2 種の変異型 *LHX4* はいずれも *POU1F1* プロモーター、 α GSU プロモーターに対する転写活性が低下しており、機能低下型変異であることが確認された。なお、野生型 *LHX4* との共発現実験では、優性阻害効果を認めなかった。

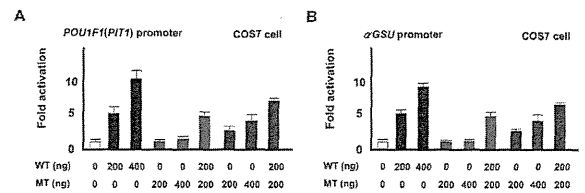


図 7 変異体の転写活性化能の評価 COS7 細胞にルシフェラーゼレポーター（ヒト *POU1F1Y* および α GSU のプロモーター配列をそれぞれ有する）とエフェクター（*LHX4* 発現ベクター）を一過性発現し、細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。2 つの変異体の転写活性はいずれも野生型に比べ低下しており、優性阻害効果は認めなかった。

本研究を通じて同定された *LHX4* 変異の 2 家系とも、変異保有者の臨床症状は重度の下垂体機能低下症から正常まで幅が広がった。このような表現度のゆらぎは、転写因子異常のヘテロ接合性変異ではしばしば認められる現象であり、*LHX4* においても同様の現象が起こりうることを確認された。臨床的な観点からは、家系 1 の発端者で認められた進行性の ACTH 分泌不全が重要である。同様の現象は *PROPI* 変異による下垂体機能低下症において報告があるが、*LHX4* 変異における報告は世界初であった。ACTH 分泌不全による二次性副腎不全は、未診断の場合死亡原因ともなりうる。このため、初期評価で ACTH 分泌能正常であった *LHX4* 変異保有者においても、後の ACTH 分泌能低下を予期した定期的評価が重要であると考えられる。また、*PROPI*、*LHX4* のように一部の遺伝子異常による下垂体機能低下症では臨床像の経年変化が予測できるため、変異スクリーニングを行い遺伝子診断を適切に行っておくことが、患者診療を改善しうることを示唆する知見ともいえるだろう。

E. 結論

本研究計画を通じて同定された既知責任遺伝子の変異による先天性内分泌疾患患者の臨床像を解析し、得られた新知見を報告した。これらの知見は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ものであ

る。このような知見の積み重ねが、遺伝子診断を単なる「患者のラベルづけ」とせず、患者毎に個別化された最適医療の提供に貢献するものと考ええる。

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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

Kawahara 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.

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.

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

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

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

研究要旨

新規責任遺伝子の探索を行う本研究において、その第一段階は症例毎に既知責任遺伝子の変異を検索することである。変異同定で診断が確定する場合、エクソーム解析には進まないが、詳細な臨床像解析を通じて既知遺伝性疾患の新規臨床知見が得られる場合がある。以下、本研究の一部として行った 4 研究を概説する。

A. 研究目的

McCune-Albright 症候群は、体細胞モザイク性 *GNAS* 変異を病因とし、皮膚病変、骨病変、内分泌病変を呈する稀少難病である。従来法の遺伝子診断率は 50%前後であり、精度が不十分と認識されていた。本研究では、*GNAS* 変異を末梢血サンプルから高感度に検出する、新規遺伝子診断法の確立とその診断精度の評価を目的に行われた。

B. 研究方法

(1) PCR 増幅・ペプチド核酸法

McCune-Albright 症候群と関連する *GNAS* 変異はエクソン 8 および 9 に生じる。このゲノム領域を増幅可能な PCR プライマーを設計した。この際、のちに PCR 産物を次世代シーケンサーで解析するため、それぞれの PCR プライマーの 5'側にアダプター配列を組み込んだ。

また、PCR 増幅反応に添加することにより、特定変異の存在比率を増加することができるペプチド核酸プローブを、既報の配列にならひ合成した (Bianco P et al. J Bone Mineral Res. 2000)。

(2) 試験用鋳型 DNA

次世代シーケンシング (NGS) を用いた遺伝子変異検出法の感度および定量性を評価するため、試験用鋳型 DNA (プラスミド) を作製した。すな

わち、上記のプライマーで PCR を行い得られた産物を TA クローニング法でサブクローニングし、野生型 DNA の鋳型とした。また、site-directed mutagenesis 法で R201H 変異を導入し、変異型 DNA の鋳型とした。変異型 DNA を順次野生型 DNA で希釈し、下記の希釈系列を作成した：変異型 DNA の割合 10%、1%、0.3%、0.1%、0.03%、0.01%。

(3) NGS 解析

上記の第一 PCR 産物 (アダプタ配列付加済み) を精製し、全量の 1/20 を用いて第二 PCR を行った。この際の PCR プライマーには、Illumina 社の NGS 解析を可能とする P5 配列、P7 配列を付加したほか、24 種のインデックス識別配列のうち 1 つを付加した。塩基配列決定は MiSeq (Illumina) で行った (図 1)。識別配列を利用して 24 検体を同時に 50 塩基以上をペアエンドモードで解析した。解析にあたり、塩基配列決定の精度を向上するため、PhiX コントロールを 50%混入して解析した。得られた配列データは Bowtie でアライメントし、SAMtools で各塩基のコールおよびカウントを行った。

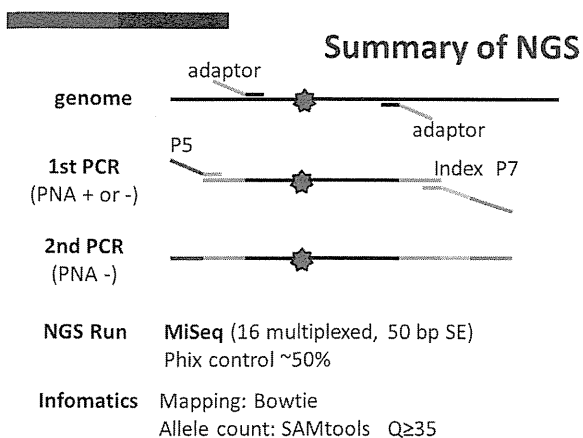


図1 NGSによるGNAS解析：サンプル調整のまとめ まず、ゲノム DNA 配列に対し、アダプター配列を付加したプライマーで第一 PCR を行う。得られたフラグメントに対して、イルミナ次世代シーケンシング解析が必要とされる P7 配列、P5 配列、および認識配列を付加したプライマーを用いて第二 PCR を行った。得られた PCR 産物を MiSeq で解析した。

患者解析にあたっては、必ず同一ランで健常コントロール由来の PCR 産物を同時に解析した。健常者における変異アレルカウント（バックグラウンドの誤差）の平均+2.5 SD を越える変異アレルカウントが患者で観察された場合を変異陽性とした。

(4) McCune-Albright 症候群患者コホート

McCune-Albright 症候群の古典的三徴（皮膚病変、骨病変、内分泌病変）のうち二徴以上を有する患者 16 名を解析対象とした。それぞれ PNA 法、PNA を用いない NGS（NGS 単独法）、PNA を併用する NGS（PNA-NGS 法）でそれぞれ解析し、変異陽性率を比較した。

C. 研究結果

まず、健常者 DNA を鋳型とした PCR 産物を NGS 単独法で解析し、我々の解析法で極めて低い誤差率（0.01%未満）で各塩基の配列を決定可能であることを確認した。

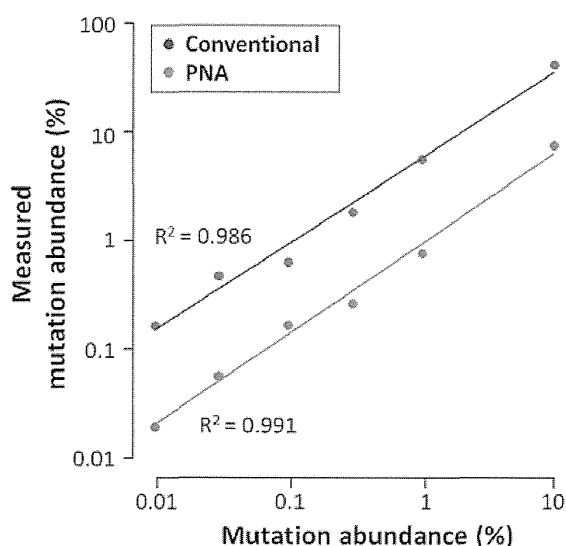


図2 試験用 DNA の変異割合（横軸）と NGS による実測値 NGS でのアレルカウントにもとづく変異割合の測定値は、実際の変異割合と良好に相関しており、アレルカウントの信頼性が高いことが示唆された。図中、赤色の点は PNA を併用しない NGS 単独法のデータ、青色の点は PNA を併用する PNA-NGS 法のデータを示す。

次に、希釈系列の試験用 DNA を使い、従来法である PNA 法、NGS 単独法、PNA-NGS 法それぞれの解析を行った（図 2）。その結果、PNA 法では変異割合 1%まで、NGS 単独法では変異割合 0.03%まで、PNA-NGS 法では変異割合 0.01%まで変異が検出可能であることが明らかとなった。試験用 DNA の変異割合と NGS 単独法のアレルカウントにもとづく変異割合測定値は直線関係にあり、NGS による変異割合の評価は妥当と考えられた。

最後に、16 の MAS 患者由来末梢血 DNA 検体を用いて PNA 法、NGS 単独法、PNA-NGS 法のそれぞれで遺伝子診断を行い、変異陽性率を比較した。PNA 法、NGS 単独法、PNA-NGS 法の変異陽性率はそれぞれ 56%、63%、75%であり、PNA-NGS 法の変異検出感度が最も優れていた。

D. 考察

NGS では、大量の DNA を並列解析することができる。本研究では 1 サンプルあたり約 20 万リ

ードの PCR 産物が解析されたが、これは従来法にあてはめると 20 万回のサブクローニング解析を行ったことと同義である。NGS では、膨大な塩基決定能力、すなわち量的な能力の高さに目を奪われがちであるが、並列解析という質的特性に着目することにより、本研究では独自性の高い解析を行うことができたと考える。

本研究により開発された PNA-NGS 法は、従来法である PNA 法と比較して 100 倍の変異検出感度を持つ。このことから、PNA-NGS 法の応用により、変異アリル頻度の低いことが想定される MAS 部分症症例における遺伝子診断が実用化できる可能性がある。

E. 結論

従来法である PNA 法と比較して 100 倍の変異検出感度を持つ PNA-NGS 法により、より変異アリ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る。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

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

先天性内分泌疾患の新規候補遺伝子を検証するためには、発現パターンの解析が必要である。本研究では、候補遺伝子の発現評価の対照となるべく、マウスの各種内分泌組織に特異的なマーカーで発現マップを作成した。また、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 *Shh* 発現陽性の被膜下の前駆細胞と合致し、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た。

A. 研究目的

エクソーム解析で先天性内分泌疾患の新規責任遺伝子を同定するためには、候補遺伝子の発現及び機能評価が必須である。すなわち、罹患細胞自身ないし罹患細胞に機能的に関連する細胞で発現していること、罹患細胞ないし組織の機能上重要な役割を担っていることが必要条件となる。本研究では、候補遺伝子の発現評価の対照となるべく、マウスの各種内分泌組織に特異的なマーカーで発現マップを作成し、先天性副腎低形成症の新規候補遺伝子 C の胎生期のマウス副腎皮質での発現パターンを解析した。

B. 研究方法

（1）マウス組織

C57Bl/6J マウスの胎生 12.5 日（E12.5）、14.5 日（E14.5）、17.5 日（E17.5）、新生仔、生後 8 週齢の下垂体、甲状腺、副甲状腺、副腎、性腺を対象とした。

（2）*In situ* ハイブリダイゼーション

下垂体、甲状腺、副甲状腺、副腎、性腺に特異

的に発現することが明らかになっている 11 遺伝子（*Nr5a1*, *Star*, *Nr0b1*, *Shh*, *Gli1*, *Sox9*, *Pax8*, *Nkx2-1*, *Gcm2*, *Hesx1*, *Pou1f1*）の発現パターンを確認した。また、副腎における C 遺伝子の発現パターンを解析した。具体的には、各遺伝子の cDNA を GEMT-Easy vector（Promega）でサブクローニングし、センスとアンチセンスの RNA プローブを作成した。プローブのラベルは digoxigenin、発色は NRT-BCIP（Sigma）で行った。

C. 研究結果

マウス各胎生齢ないし週齢、各組織での *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を以下の表と図 1-4 で示す。

表. マウス各内分泌組織の特異的マーカー遺伝子とその発現時期

組織	遺伝子	E12.5	E14.5	E17.5 新生仔	8週
副腎 性腺	<i>Nr5a1</i>	○	○	○	○
	<i>Star</i>		○	○	○
	<i>Nr0b1</i>		○		
	<i>Shh</i>		○		
	<i>Gli1</i>		○		
	<i>Sox9</i>		○		
甲状腺	<i>Pax8</i>		○		○
	<i>Nkx2-1</i>		○		○
副甲状腺	<i>Gcm2</i>		○		○
下垂体	<i>Hesx1</i>	○			×
	<i>Pou1f1</i>			○	○

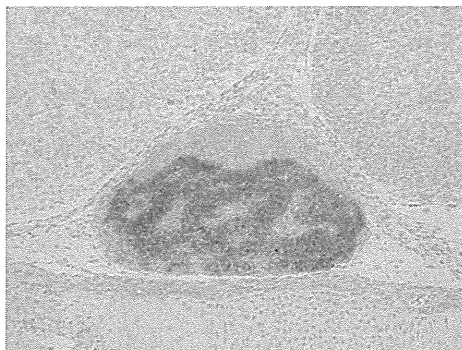


図 1. 下垂体における *Pou1f1* (*Pit1*) (E17.5)

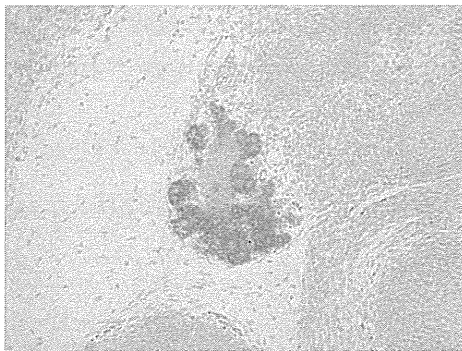


図 2. 甲状腺における *Pax8* (E14.5)

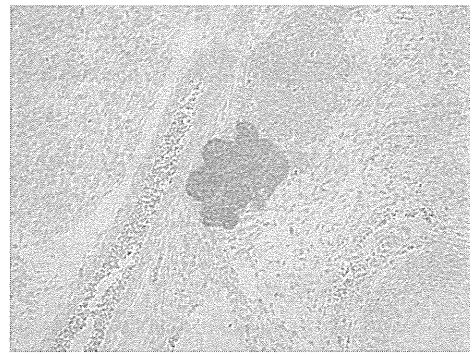


図 3. 副甲状腺における *Gcm2* (E14.5)

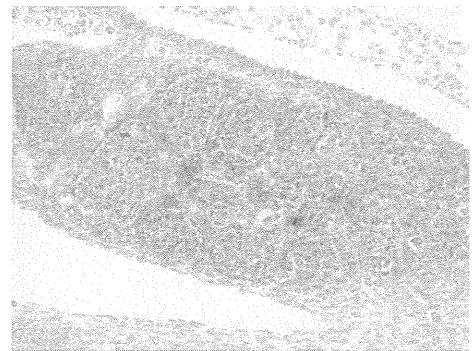
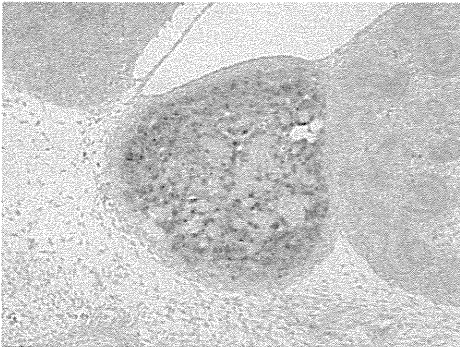


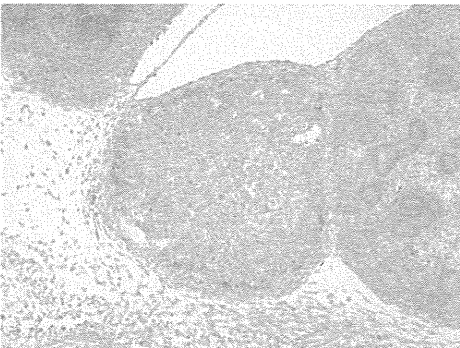
図 4. 精巣における *Nr5a1* (*Sf1*) (E12.5)

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の胎生期のマウス副腎皮質での発現パターンは *Nr51a* 陽性細胞の外側部と一致し、*Shh* 陽性細胞とほぼ同一であった。

Nr5a1



Shh



C遺伝子

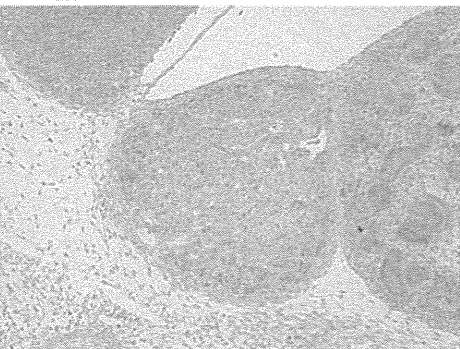


図 5. 副腎における Nr5a1、Shh、遺伝子 C の発現 (E14.5)

D. 考察

マウスの下垂体、甲状腺、副甲状腺、副腎、性腺における 11 遺伝子の発現パターンは過去の報告にそれぞれ一致していた⁽¹⁻⁵⁾。少なくとも、検証した胎生齢と週齢、および細胞においては、発現マップの有用性を確認できた。

先天性副腎低形成症の新規候補遺伝子 C のマウスのホモログの発現パターンは、Shh 陽性細胞の分布と一致していた。Shh 陽性細胞は副腎の発生

や層構造維持に重要で、被膜下の前駆細胞と考えられている⁽¹⁾。実際に、副腎特異的な Shh ノックアウトマウスでは、副腎低形成が確認されている⁽⁶⁻⁸⁾。発現時期と発現細胞を考慮すると、C 遺伝子がヒト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る。

E. 結論

先天性内分泌疾患の新規候補遺伝子を同定するために有用な各内分泌組織の発現マップを作成した。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は被膜下の前駆細胞と合致し、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た。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

adrenocortical hypoplasia. *Genesis*, 47, 628–637.

1) Kim AC, et al. (2009). In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocrine Reviews*, 30, 241–263.

2) Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss P. (1990). Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development*, 110, 643–651.

3) Pabst O, Herbrand H, Takuma N, Arnold HH. (2000). NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesodermally derived structures depends on sonic hedgehog in mouse embryos. *Development genes and evolution*, 210, 47–50.

4) Patel SR, Gordon J, Mahub F, Blackburn CC, Manley NR. (2006). Bmp4 and Noggin expression during early thymus and parathyroid organogenesis. *Gene Expression Patterns*, 6, 794–799.

5) Olson LE, Dasen JS, Ju BG, Tollkuhn J, Rosenfeld MG. (2003). Paired-like repression/activation in pituitary development. *Endocrine Reviews*, 58, 249–261.

6) King P, Paul A, Laufer E. (2009). Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 21185–21190.

7) Huang CCJ, Miyagawa , Matsumaru D, Parker KL, Yao HHC. (2010). Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology*, 151, 1119–1128.

8) Ching S, Vilain E. (2009). Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to

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)

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

本研究の最終目標のひとつは、先天性内分泌疾患患者の QOL 改善であるが、これを達成する上で「研究成果の社会への還元」は必要不可欠である。このため、2012 年 7 月に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積極利用した。

A. 研究目的

研究班の研究成果をアカデミアのみにとどめず、日本国民に幅広く発信すること。

ウェブサイトの内容は以下の通り

・研究代表者からのあいさつ

・研究概要の解説

次世代シーケンシング

全ゲノムエクソン配列解析

Endocrinome プロジェクト

McCune-Albright 症候群プロジェクト

B. 研究方法

(1) 研究班ウェブサイト

大学病院医療情報ネットワーク研究センター (UMIN) のサービスを利用し、ウェブサイトを開設した (図 1)。

URL <http://plaza.umin.ac.jp/nge/>

・研究者紹介

・業績一覧

・リンク

無料公開されているアクセス解析サイト Google analytics に研究班のウェブサイトを登録した。日別のアクセス数、アクセス元 (国、都道府県など)、検索エンジンを経由した場合の検索ワードの情報を得た。

なお、このアクセス解析では、アクセス者の特定につながる個人情報 (性別、年齢、職業、利用しているプロバイダ) は収集されていない。

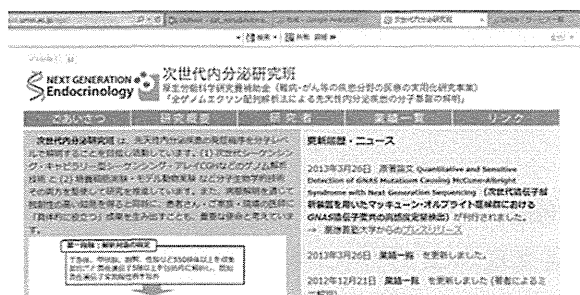


図1 研究班ウェブサイトのトップページ トップページで研究班の目的と研究の概要に関する説明、更新履歴などのニュースを読むことができる。研究概要のタブをクリックすると、「次世代シーケンシング」「全ゲノムエクソン配列解析」といった詳細情報が閲覧できる。

(2) プレスリリース

新規性が高いと考えられる研究成果については、その論文発表の際に、慶應義塾大学を通じてプレスリリースを行った。

C. 研究結果

(1) 研究班ウェブサイト

研究班ウェブサイトは2012年7月20日に開設された。以後、2013年5月2日までの286日間に694回（平均2.4回/日）のアクセスがあった。アクセスは青森県、高知県、鹿児島県を除く44都道府県から確認されたほか（表1に上位10の都道府県を示す）、米国、英国、ドイツなどからのアクセスも確認された。

表1 都道府県別アクセス回数

東京都	264
福岡県	75
大阪府	36
愛知県	28
神奈川県	27
埼玉県	19
宮城県	14
静岡県	14
長崎県	14
千葉県	10

検索キーワードの分析では、「エクソーム解析」「エクソーム」が90%以上を占めたが、少数ながら「McCune-Albright 症候群」「5 候還元酵素欠損症」といった、先天性内分泌疾患の病名による検索も見られた。

(2) プレスリリース

分担研究「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」（詳細は別掲）について、論文発表を行った2013年3月26日に慶應義塾大学からプレスリ

リースを行った（図2）。

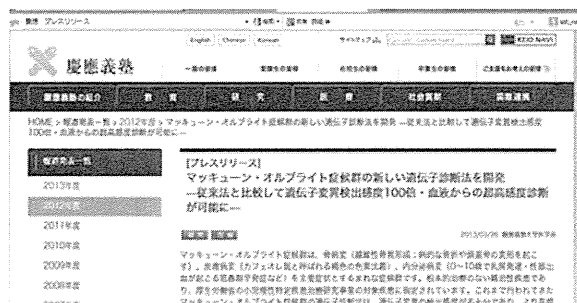


図2 「ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いた McCune-Albright 症候群の新規診断法の開発」に関する慶應義塾大学のプレスリリース

プレスリリースは「日経プレスリリース」に掲載され、複数のニュースサイトへと転載された。

D. 考察

厚生労働省大臣官房厚生科学課による平成23年度「厚生労働科学研究費補助金公募要項」（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）には、「特に、1件当たり年間3千万円以上の公的研究費（競争的資金又はプロジェクト研究資金）の配分を受ける研究者等においては、国民との双方向コミュニケーション活動に積極的に取り組む」と記載されている。インターネット上での研究成果の継続的な発信はこの活動の一つの例として記載されている。研究班ウェブサイトはこの活動に合致する。

E. 結論

研究班ウェブサイトへのアクセスは全国から確認された。検索ワードの上位は次世代シーケンシング関連で占められたが、少数ながら疾患名で検索を行い、ウェブサイトを開覧したユーザが確認された。ウェブサイトの開設により、研究概要・成果を幅広い国民に伝達しうる体制が整備されたと考える。

分担研究「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」のプレスリリースを行い、マスメディアを通じた情報発信を行った。

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

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）

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

本研究の最終目標のひとつは、先天性内分泌疾患患者の QOL 改善であるが、これを達成する上で「研究成果の社会への還元」は必要不可欠である。このため、本年度は中学 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 回おこなった。

A. 研究目的

研究班の研究成果を国民との科学・技術対話として双方向コミュニケーションする。

(2) 公開市民講座

参加者は 100 名以上であった。

(3) 患者会講演

参加者は以下の通りであった。

2012 年 8 月 5 日 30 名以上

2012 年 10 月 21 日 10 名

B. 研究方法

(1) サイエンススクール

中学校 3 年生を対象としたサイエンススクール（特別授業）を 2012 年 11 月 22 日に神奈川県で、また 2013 年 2 月 25 日に東京都で行った。

(2) 公開市民講座

一般市民を対象とした公開市民講座を 2012 年 3 月 10 日に山梨県で行った。

(3) 患者会講演

小児内分泌疾患の一つである骨形成不全症患者会（ネットワーク OI）を対象とした講演を 2012 年 8 月 5 日に東京都で行った。また成長ホルモン分泌不全性低身長患者会（ポプラの会）を対象とした講演を 2012 年 10 月 21 日に東京都で行った。

D. 考察

厚生労働省大臣官房厚生科学課による平成 23 年度「厚生労働科学研究費補助金公募要項」（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）には、「特に、1 件当たり年間 3 千万円以上の公的研究費（競争的資金又はプロジェクト研究資金）の配分を受ける研究者等においては、国民との双方向コミュニケーション活動に積極的に取り組む」と記載されている。中学校での特別授業、地域の市民公開講座での研究成果の講演は、いずれもこの活動の一つの例として記載されており、上記の成果はこの活動に合致する。

C. 研究結果

(1) サイエンススクール

参加者は以下の通りであった。

2012 年 11 月 22 日 160 名

2013 年 2 月 25 日 254 名

E. 結論

研究班の研究成果を国民との科学・技術対話として双方向コミュニケーションすることにより研究成果が社会に還元された。また、中学校 3 年

生を対象とし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。

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

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Narumi S, Araki S, Hasegawa T et al.</u>	Functional characterization of four novel <i>PAX8</i> mutations causing congenital hypothyroidism: new evidence for haploinsufficiency as a disease mechanism.	Eur J Endocrinol	167	625-632	2012
Takagi M, <u>Ishii T, Narumi S, Hasegawa T et al.</u>	Gradual loss of ACTH due to a novel mutation in <i>LHX4</i> : comprehensive mutation screening in Japanese patients with congenital hypopituitarism.	PLoS One	7	e46008	2012
Kasahara T, <u>Narumi S, Hasegawa T et al.</u>	Delayed onset congenital hypothyroidism in a patient with <i>DUOX2</i> mutations and maternal iodine excess.	Am J Med Genet A	161A	214-217	2013
Suwanai AS, <u>Ishii T, Narumi S, Hasegawa T et al.</u>	A report of two novel <i>NR5A1</i> mutation families: possible clinical phenotype of psychiatric symptoms of anxiety and/or depression.	Clin Endocrinol (Oxf)	78	957-965	2013
<u>Narumi S, Matsuo K, Ishii T, Tanahashi Y, Hasegawa T.</u>	Quantitative and Sensitive Detection of <i>GNAS</i> Mutations Causing McCune-Albright Syndrome with Next Generation Sequencing.	PLoS One	8	e60525	2013
Yoshizawa-Ogasawara A, <u>Narumi S, Hasegawa T et al.</u>	Congenital hypothyroidism caused by a novel mutation of the dual oxidase 2 (<i>DUOX2</i>) gene.	J Pediatric Endocrinol Metab	26	45-52	2013
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	245 (5)	427-432	2013

IV. 研究成果の刊行物・別冊