

compound heterozygotes for p.[G418fsX482]+[skipping of exon 20] also presented with PIOD (a female with a 68% perchlorate discharge at 4.5 years, and her younger brother with 60% at 4 years). In another report (12), two siblings in an Italian family were compound heterozygotes for p.[R376W]+[R842X]. Their discharge rates after perchlorate administration were 28% in the older boy at 4 years of age and 12% in his younger brother at 4 years of age (reference value, 0%). In this study, no perchlorate discharge test could be performed; however, the patients harboring a compound heterozygous mutation for p.[L479SfsX3]+[G488R] or a homozygous mutation for p.[G488R] would be unlikely to represent TIOD.

Maruo et al. (20) reported that transient CH was diagnosed in eight Japanese patients with biallelic mutations in the *DUOX2* gene. Four patients had transient, but not permanent CH, caused by a compound heterozygous mutation for p.[L479SfsX3]+[K628RfsX11] that completely inactivated *DUOX2*. This suggested that the need for thyroid hormone decreased after the neonatal period, and the activity of *DUOX1*-dependent oxidases in thyrocytes became sufficient for adequate thyroid hormone synthesis.

Our study involved two Japanese patients in whom CH was diagnosed during a neonatal screening. These patients had either a compound heterozygous or a homozygous p.G488R mutation but had no mutations in the other candidate genes that would be expected to lead to CH. These patients required thyroid hormone replacement therapy, which was initiated during the neonatal period. After the thyroid function improved, L-T₄ replacement therapy was discontinued in both patient 1 (at 8 years of age) and patient 2 (at 12 years of age). The father of patient 1 and the mother of patient 2 were heterozygous for this missense mutation but exhibited no obvious thyroid dysfunction. Indeed, the absence of functional characterization of the G488R mutation associated with CH could not explain the *DUOX2* phenotype. Nonetheless, their clinical, biochemical, and genetic data strongly indicate that a novel G488R mutation of the *DUOX2* gene caused their dyshormonogenesis. From these observations, we therefore hypothesize that the biallelic mutation of the *DUOX2* gene in these cases causes a mild decrease in thyroid function. It is still unclear why these cases were mild, whereas other cases involving biallelic mutations of the *DUOX2* gene cause permanent hypothyroidism. We propose the following as

possible explanations for this discrepancy: First, Japan is considered to be an iodine-sufficient area because of the ingestion of large quantities of iodine-rich seaweed (30). Iodide plays an important role in the control of H₂O₂ production, regulating *DUOX* activity in a dual fashion, where it is stimulatory at low concentrations and inhibitory at high concentrations (31–33). In the absence of iodide, the H₂O₂ produced by *DUOX2* decreases the activity of both TPO and *DUOX* (34). Second, the *DUOX1* enzyme is able to generate extracellular H₂O₂ in thyroid cells, suggesting that *DUOX1* could partially compensate for the loss of *DUOX2* (35). Third, Hului et al. (36) have recently reported a case in which a patient heterozygous for p.[C189R] within *DUOXA2* lacks one allele of *DUOX2*, *DUOXA2*, and *DUOXA1* but has two functioning *DUOX1* alleles and presents with mild and transient CH. This suggests that *DUOX1* could play a role in H₂O₂ production. Therefore, it is conceivable that, with sufficient iodine intake, the H₂O₂ provided by *DUOXs* might be sufficient to maintain thyroid function after the neonatal period in some Japanese patients. Furthermore, the phenotype might depend not only on *DUOX2* alone but also on other factors that are involved in the generation of H₂O₂ by *DUOX2*.

In conclusion, we describe two patients with CH that have a novel p.G488R mutation in the *DUOX2* gene. The compound heterozygous or homozygous p.G488R mutation resulted in CH that presented during the neonatal period as low T₄ and high TSH levels, resulting in elevated TG. L-T₄ replacement was initiated during the neonatal period and was discontinued in both patients, who are currently euthyroid.

Acknowledgments: We would like to thank Dr. Shohei Harada (Tokyo, Japan) and Dr. Akira Hishinuma (Tochigi, Japan) for their helpful suggestions about the preparation of our manuscript. This work was supported in part by the Health Science Research Grant for Research on Applying Health Technology [Jitsuyoka (Nanbyo)-Ippan-014] from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (SN, TH).

Conflict of interest statement

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

Received March 20, 2012; accepted October 5, 2012

References

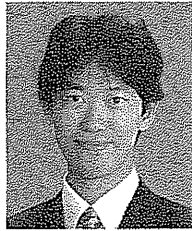
1. Knobel M, Medeiros-Neto G. An outline of inherited disorders of the thyroid hormone generating system. *Thyroid* 2003;13:771–801.
2. Harada S. Incidence and etiology of permanent congenital hypothyroidism (cretinism). *Horm Rinsho* 2007;55:537–43.

3. De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms. *Endocr Rev* 2004;25:722–46.
4. Corbetta C, Weber G, Cortinovis F, Calebiro D, Passoni A, et al. A 7-year experience with low blood TSH cutoff levels for neonatal screening reveals an unsuspected frequency of congenital hypothyroidism (CH). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;71:739–45.
5. Park SM, Chatterjee VK. Genetics of congenital hypothyroidism. *J Med Genet* 2005;42:379–89.
6. Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, Vigone MC, Chiumello G, et al. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (*DUOX2*) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:605–10.
7. Moreno JC, Klootwijk W, Toor H, Pinto G, D'Alessandro M, et al. Mutations in the iodotyrosine deiodinase gene and hypothyroidism. *N Engl J Med* 2008;358:1811–8.
8. Bikker H, Vulsma T, Baas F, de Vijlder JJ. Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Mutat* 1995;6:9–16.
9. De Vijlder JJ. Primary congenital hypothyroidism: defects in iodine pathways. *Eur J Endocrinol* 2003;149:247–56.
10. Ris-Stalpers C, Bikker H. Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations. *Mol Cell Endocrinol* 2010;322:38–43.
11. Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (*THOX2*) and congenital hypothyroidism. *N Engl J Med* 2002;347:95–102.
12. Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, Passoni A, Di Candia S, et al. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the *DUOX2* gene in two siblings. *Hum Mutat* 2005;26:395.
13. Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, Gruñeiro-Papendieck L, Chiesa A, et al. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A>C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clin Chem* 2006;52:182–91.
14. Pfarr N, Korsch E, Kaspers S, Herbst A, Stach A, et al. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (*THOX2*) gene. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:810–5.
15. Suzuki H, Higuchi T, Sawa K, Ohtaki S, Horiuchi Y. Endemic coast goiter in Hokkaido, Japan. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1965;50:161–4.
16. Katamine S, Mamiya Y, Sekimoto K, Hoshino N, Totsuka K, et al. Iodine content of various meals currently consumed by urban Japanese. *J Nutr Sci Vitaminol* 1986;32:487–95.
17. American Academy of Pediatrics, Rose SR, Section on Endocrinology and Committee on Genetics, American Thyroid Association, Brown RS, et al. Update of newborn screening and therapy for congenital hypothyroidism. *Pediatrics* 2006;117:2290–303.
18. Mahony BS, Callen PW, Filly RA. The distal femoral epiphyseal ossification center in the assessment of third-trimester menstrual age: sonographic identification and measurement. *Radiology* 1985;155:201–4.
19. Ueda D. Normal volume of the thyroid gland in children. *J Clin Ultrasound* 1990;18:455–62.
20. Maruo Y, Takahashi H, Soeda I, Nishikura N, Matsui K, et al. Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4261–7.
21. Ohye H, Fukata S, Hishinuma A, Kudo T, Nishihara E, et al. A novel homozygous missense mutation of the dual oxidase 2 (*DUOX2*) gene in an adult patient with large goiter. *Thyroid* 2008;18:561–6.
22. Grasberger H, De Deken X, Miot F, Pohlenz J, Refetoff S. Missense mutations of dual oxidase 2 (*DUOX2*) implicated in congenital hypothyroidism have impaired trafficking in cells reconstituted with *DUOX2* maturation factor. *Mol Endocrinol* 2007;21:1408–21.
23. Tonacchera M, De Marco G, Agretti P, Montanelli L, Di Cosmo C, et al. Identification and functional studies of two new dual-oxidase 2 (*DUOX2*) mutations in a child with congenital hypothyroidism and a eutopic normal-size thyroid gland. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:4309–14.
24. Hoste C, Rigutto S, Van Vliet G, Miot F, De Deken X. Compound heterozygosity for a novel hemizygous missense mutation and a partial deletion affecting the catalytic core of the H_2O_2 -generating enzyme *DUOX2* associated with transient congenital hypothyroidism. *Hum Mutat* 2010;31:E1304–18.
25. Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Neol-Hudson MS, Deme D, et al. Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. *J Biol Chem* 1999;274:37265–9.
26. De Deken X, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 2000;275:23227–33.
27. Caillaud B, Dupuy C, Lacroix L, Nocera M, Talbot M, et al. Expression of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (*ThoX*, *LNOX*, *Duox*) genes and proteins in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3351–8.
28. Corvilain B, Van Sande J, Laurent E, Dumont JE. The H_2O_2 -generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog. *Endocrinology* 1991;128:779–85.
29. Chiesa A, Rivolta CM, Targovnik HM, Gruñeiro-Papendieck L. Clinical, biochemical, and molecular findings in Argentinean patients with goitrous congenital hypothyroidism. *Endocrine* 2010;38:377–85.
30. Tajiri J, Higashi K, Morita M, Umeda T, Sato T. Studies of hypothyroidism in patients with high iodine intake. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:412–7.
31. Corvilain B, Collyn L, Van Sande J, Dumont JE. Stimulation by iodide of H_2O_2 generation in thyroid slices from several species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;278:E692–9.
32. Cardoso LC, Martin DC, Figueiredo MD, Rosenthal D, Vaisman M, et al. Ca^{2+} /nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent H_2O_2 generation is inhibited by iodide in human thyroids. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4339–43.
33. Morand S, Chaaoui M, Kaniewski J, Dème D, Ohayon R, et al. Effect of iodide on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and *Duox2* protein expression in isolated porcine thyroid follicles. *Endocrinology* 2003;144:1241–8.
34. Fortunato RS, Lima de Souza EC, Ameziane-el Hassani R, Boufraqech M, Weyemi U, et al. Functional consequences of dual oxidase-thyroperoxidase interaction at the plasma membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:5403–11.

35. Rigutto S, Hoste C, Grasberger H, Milenkovic M, Communi D, et al. Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2. *J Biol Chem* 2009;284:6725–34.
36. Huler I, Hermanns P, Nestoris C, Heger S, Refetoff S, et al. A single copy of the recently identified dual oxidase maturation factor (*DUOXA*) 1 gene produces only mild transient hypothyroidism in a patient with a novel biallelic *DUOXA2* mutation and monoallelic *DUOXA1* deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96: E841–5.

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

Unveiling the genetic landscape of congenital endocrine disorders by next generation sequencing



鳴海覚志(写真) 長谷川奉延
Satoshi NARUMI and Tomonobu HASEGAWA
慶應義塾大学医学部小児科

◎先天性下垂体機能低下症、先天性甲状腺機能低下症などの内分泌器官の先天異常は、先天性内分泌疾患と総称される。先天性内分泌疾患の一部は単一遺伝子異常を病因とするが、その分子基盤の全貌は十分に理解されていない。著者らはベンチトップ型次世代シーケンサーを用いて先天性内分泌疾患の既知責任遺伝子約120種を超高速度解析する“Endocrinome システム”を開発・運用し“先天性内分泌疾患患者のうち既知責任遺伝子の変異が検出されるのはどの程度か?”という問いへの答えを得つつある。一方、Endocrinome システムを用いてもなお変異を同定できない症例に対し、全2万遺伝子を対象としたエクソーム解析を積極的に適用し、新規責任遺伝子の同定に挑んでいる。本稿では、次世代シーケンサーという新しいツールを用いて先天性内分泌疾患の分子基盤解明をめざす著者らの取組みを紹介したい。



先天性内分泌疾患、単一遺伝子異常、エクソーム解析

先天性内分泌疾患の遺伝学

先天性内分泌疾患とは、各種内分泌器官に先天性に生じた形態的異常あるいは機能的異常によりホルモン欠乏をきたす病態の総称である。内分泌器官には視床下部-下垂体系、甲状腺、副甲状腺、副腎、性腺、膵内分泌細胞などが含まれるため、先天性内分泌疾患は異質性の高い疾患単位といえる。

先天性内分泌疾患のすくなくとも一部は、単一遺伝子異常を病因とする Mendel 遺伝形質である。疾患に占める単一遺伝子異常の寄与は一様ではなく、器官により大きく異なる。たとえば、先天性副腎機能低下症の80%以上は糖質コルチコイド合成に不可欠な21水酸化酵素の欠損症(CYP21A2変異)である。一方、先天性下垂体機能低下症では10種以上の責任遺伝子が報告されているが、変異が検出される患者の割合は積算でも5%未満と考えられる。このように器官ごとに単一遺伝子異常の寄与の程度には差異が認められるが、その一方で責任遺伝子には共通のパターン

があり、病因論的に重要である。具体的には以下の3グループに大別可能である(図1、表1)。

グループ1：内分泌器官の形成(=発生・分化)にかかわる転写因子の異常。

グループ2：内分泌器官でのホルモン合成にかかわる分子(酵素、トランスポーターなど)の異常。

グループ3：内分泌器官の機能調節を行う上位ホルモンとその受容機構の異常。

この分類に基づくと、臨床像(たとえば内分泌器官の画像所見)から責任遺伝子の機能をある程度予測することができる。

先天性内分泌疾患の既知責任遺伝子の包括的解析

著者らの研究室では2005年以来、先天性甲状腺機能低下症、先天性下垂体機能低下症、副腎低形成症、性分化疾患など、さまざまな先天性内分泌疾患の遺伝子解析をPCR-直接シーケンス法(以下、Sanger法)で行ってきた。多数の患者からな

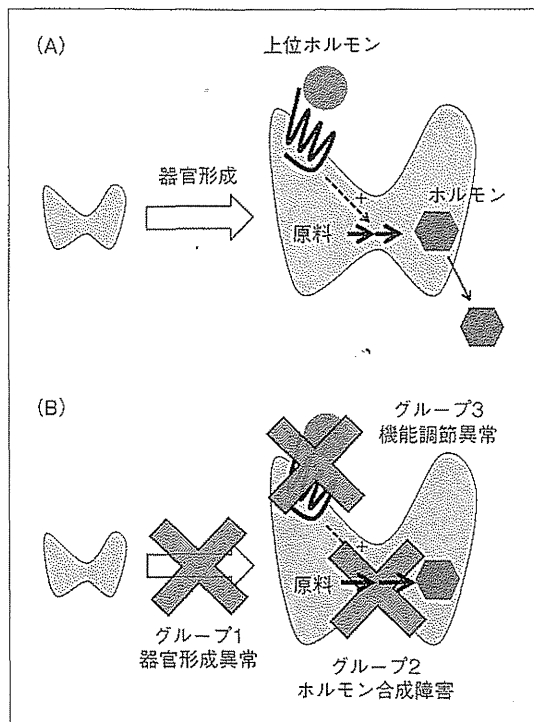


図1 先天性内分泌疾患の病因分類

A: 正常なホルモン分泌機構(例として甲状腺を模したもの)。正常な器官形成過程を経て成熟した内分泌器官は、典型的には器官のホルモン合成能を制御する上位ホルモンの支配下にホルモンを合成し、循環血液中へと放出する。

B: 先天性内分泌疾患の3つの病因グループ。本稿では便宜的に、器官形成過程の異常をグループ1、成熟した内分泌器官内でのホルモン合成障害をグループ2、機能調節機構の異常をグループ3とした。通常、グループ1と3の異常をもつ内分泌器官は低形成となり、グループ2では過形成となる。

るコホートを解析した結果、単一遺伝子異常の寄与の程度は従来の認識よりも高いことが明らかになった。たとえば、先天性甲状腺機能低下症患者における単一遺伝子異常保有者の割合は、従来5~10%と見積もられていたが¹⁾、日本人患者コホートに対する包括的解析では20%以上に単一遺伝子異常を同定できた²⁻⁴⁾。ただし、これまでの遺伝疫学的研究の多くは、Sanger法の時間的・経済的制約から相対的に変異が高頻度な遺伝子、臨床像から予測可能な遺伝子など一部の責任遺伝子のみが解析されてきた。そのため、得られるデータは疾患の遺伝的背景の全貌には遠く、各遺伝子の変異頻度の推定値や臨床像スペクトラムへの選択バイアスの影響は排除しきれなかった。

このような限界を打破すべく、著者らは2012年2月から次世代シーケンサーを用いて先天性内分泌疾患のほぼすべての既知責任遺伝子を超高速解析する“Endocrinomeシステム”を開発・運用している(「サイドメモ1」参照)。以下、このシステムについて概説する。

1. Endocrinomeシステムの概要

本システムの最新バージョンでは先天性下垂体

機能低下症、先天性甲状腺機能低下症、先天性副甲状腺機能低下症、先天性副腎機能低下症、性分化疾患などの既知責任遺伝子約120種が解析可能である。上記疾患の既知責任遺伝子の大半が網羅

サイドメモ1

臨床遺伝子診断への次世代シーケンサーの参入

Sanger法の数万倍以上の解析力をもつ次世代シーケンサーが2000年代の半ばに市販され、2009年に特定遺伝子のエクソン領域を選択的に濃縮するキットがAgilent Technologiesなどから発売されると、遺伝子解析研究の障壁のひとつであった時間的・経済的制約の解消は時間の問題となった。しかし、2009年時点で普及していた次世代機はランニングコストの高い大型機であり、エクソーム解析など少数症例に対する探索的研究には威力を発揮したが、“既知責任遺伝子の変異検索”といった中規模の診断研究には応用しにくかった。2011年に入るとIon PGM(Life Technologies)、MiSeq(Illumina)といった、低ランニングコストのベンチトップ機が市場投入され、既知責任遺伝子の変異検索に次世代シーケンサーを適用できる環境が整った。

表 1 先天性内分泌疾患の病因分類と責任遺伝子

| | 下垂体 | 甲状腺 | 副甲状腺 | 副腎 | 精巣 |
|--------------------|--|--|-----------------------------|---|---|
| グループ 1 器官形成異常 | <i>POU1F1</i> <i>PROPI</i> <i>LHX4</i> | <i>PAX8</i> <i>NKX2-1</i> <i>FOXE1</i> | <i>GCM2</i> <i>GATA3</i> | <i>NR0B1</i> <i>CDKNIC</i> | <i>NR5A1</i> <i>SRY</i> <i>WT1</i> |
| グループ 2 ホルモン合成障害 | <i>GH</i> <i>TSHB</i> <i>LHB</i> | <i>TG</i> <i>TPO</i> <i>DUOX2</i> | <i>PTH</i> | <i>CYP21A2</i> <i>CYP17A1</i> <i>STAR</i> | <i>HSD3B2</i> <i>HSD17B3</i> <i>CYP17A1</i> |
| グループ 3 機能調節異常 | <i>GHRHR</i> <i>TRHR</i> <i>KISS1R</i> | <i>TSHR</i> | <i>CASR</i> | <i>MC2R</i> | <i>LHCGR</i> |

されている。末梢血白血球細胞から抽出したゲノム DNA 2 μ g を開始試料とし、Covaris による DNA 断片化の後 SureSelect XT カスタムキット (Agilent) を用いて、上記 120 遺伝子のエクソンに由来する DNA を選択的に濃縮する。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 つを付加する。塩基配列決定は MiSeq (Illumina) で行う。識別配列を利用して 12 検体あるいは 24 検体を同時に 150 塩基ペアエンドモードで解析している。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する。標的エクソンの 95% 以上で 30 \times 以上のカバレッジ (塩基当り配列決定回数) が得られた場合を解析完了とする。実験開始からこの段階までを計 5 日間で行うことができる。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ている。

2. Endocrinome システムの運用実績

2012 年 2 月～2013 年 1 月に計 215 名の先天性内分泌疾患患者の遺伝子解析を Endocrinome システムで行った。このうち 20 名以上を解析した疾患は、先天性甲状腺機能低下症 84 名、性分化疾患 47 名、中枢性性腺機能低下症 28 名の 3 疾患であった。標的領域の平均カバレッジは 100 \times ～500 \times 程度であり、90% 以上の検体は 1 回で解析完了した。対象 215 名中 55 名で変異を検出した (変異陽性率 27%)。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。

解析件数の多い先天性甲状腺機能低下症の変異陽性率を 2012 年 1 月まで (Sanger 法) と 2012 年 2 月以降 (Endocrinome システム) で比較すると、19 (440 検体) \rightarrow 29 (84 検体) と有意な増加を認めた ($p=0.02$, Fishser 検定)。

3. Endocrinome システムの評価

先天性内分泌疾患患者の遺伝子診断において、Endocrinome システムは Sanger 法による従来型遺伝子解析と比較して以下の特徴があると考えられた。

① 変異陽性率の改善……Sanger 法では全症例で全責任遺伝子を検索することは不可能であったが、Endocrinome システムはこれを可能とした。網羅性の向上は変異陽性率 (診断率) の増加に寄与すると想定されたが、すくなくとも先天性甲状腺機能低下症においては想定を支持する成績が確認された。

② 診断に要するマンパワーの低減……従来、著者らの研究室では内分泌器官ごとに担当者を決め、逐次 Sanger 法で解析する体制であった。Endocrinome システムではサンプル調整からバイオインフォマティクス解析までの次世代シーケンシング解析を専任者 1 名 (著者) が行い、器官担当者は変異陽性検体の Sanger 法による確認解析のみを行う体制とした。その結果、各担当者の遺伝子解析にかかる労力は大幅に減少した。臨床遺伝子診断を従来よりも少ないマンパワーで維持できるようになり、各担当者は発現実験などの病態解析により重点をおけるようになった (「サイドメ

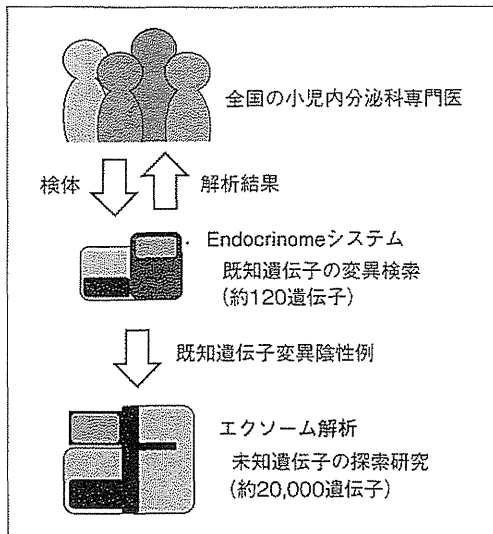


図 2 未知責任遺伝子の探索：研究の概要

著者らは全国の小児内分泌科専門医から臨床検体・臨床情報を収集し、Endocrinome システムによる遺伝子解析を行っている。解析結果はおおむね3カ月程度で主治医へフィードバックされる。既知遺伝子変異陰性例のうち、家族歴あり、重症例、両親検体が利用可能、など研究的価値が高い症例についてはエクソーム解析による未知責任遺伝子の探索を行っている。

モ 2」参照)。

③ コストは？……検体当りの解析コスト比較(従来法 vs. Endocrinome システム)は、前者のコストが対象疾患ごとに異なることから容易ではない。消耗品費ベースで考えると、従来法での50アンプリコン分(エクソン10個からなる遺伝子なら5遺伝子分)のコストと Endocrinome システムのコストはほぼ同等であった。シーケンサー本体の導入・維持費用は次世代シーケンサーのほうが高額であり、減価償却の観点からは後者は不利である。一方、商業ベースでの運用を想定すると、解析に要するマンパワー(人件費)は後者のほうが低

く、多数検体を解析する場合は後者にメリットがあると考えられる。また、従来型シーケンサーのデータ出力量がここ10年近く頭打ちであるのに対し、現在普及している次世代シーケンサーの出力量は改善の余地を残しており、塩基当り解析コストは今後さらに下がることが予想される。遺伝子解析における従来型シーケンサーの役割が今後縮小していくことは間違いないであろう。

● 先天性内分泌疾患の未知責任遺伝子の探索

家族性の先天性内分泌疾患であるにもかかわらず、Endocrinome システムで既知責任遺伝子に変異が見出せない家系が散見される。また、孤発例であっても子の世代で新生した変異(*de novo* 変異)が未知の責任遺伝子に起こり、発症するような場合も十分に想定される。著者らは先天性内分泌疾患の未知責任遺伝子を探索すべく、エクソーム解析を中心とした研究に取り組んでいる(図2)。想定される遺伝形式に合わせ、複数の解析戦略を組み合わせて研究を進めている(図3)。以下、著者らの取組みの実例を紹介する。

1. 常染色体優性の大家族

5世代罹患者20名以上の常染色体優性遺伝を呈する先天性内分泌疾患家系の解析を行っている。本家系は short tandem repeat マーカーを用いた連鎖解析により LOD スコア 4 以上の候補領域を 4Mb まで絞り込んでいるが、この領域には既知責

サイドメモ 2

次世代シーケンシングは 遺伝子診断に何をもたらすか

次世代シーケンシングを利用した遺伝子解析では数百個規模の遺伝子を同時解析可能であり、共通のワークフローで複数の病態の診断が可能である。次世代シーケンシングではサンプル調整およびバイオインフォマティクスの習熟が必須であるが、一度これに習熟すれば複数の病態を共通の技術で解析可能であることを意味する。従来、遺伝子診断はおもに研究室レベルで疾患ごと、責任遺伝子ごとに行われており、試薬組成や機器設定条件といった解析ノウハウが研究室を超えて共有されることは珍しかった。臨床遺伝子診断への次世代シーケンシングの導入により、このような閉鎖的状況が打破される可能性がある。

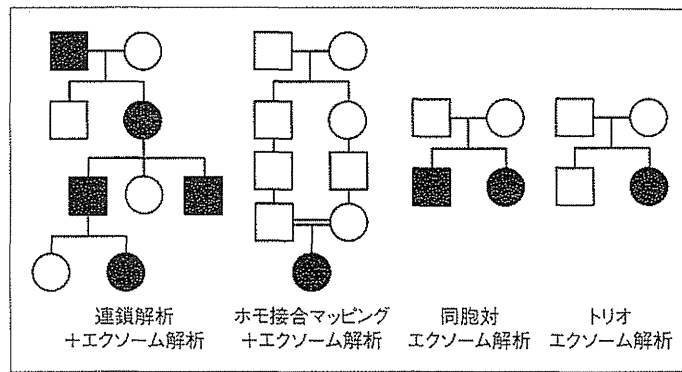


図 3 想定される遺伝形式に応じた解析戦略

左から、常染色体優性の大家系、近親婚家系、(親が非罹患の)罹患同胞対、孤発例の代表的な家系図を示す。どの場合においてもエクソーム解析は強力な解析ツールとなるが、遺伝歴濃厚な場合は連鎖解析、ホモ接合マッピングなどの物理的方法を組み合わせることにより効率的な研究推進が可能である。また、孤発例であってもトリオ解析を用いることにより責任遺伝子を絞り込める場合がある(本文参照)。

任遺伝子に含まれない。この領域には約20の遺伝子がコードされており、このなかに新規責任遺伝子が存在する可能性が高いと考えている。候補ゲノム領域をイントロン、遺伝子間領域も含めて濃縮するカスタム SureSelect を作製し、この領域の詳細な解析を行ったが、エクソン内部には変異と考えられるバリエーションが同定されなかった。イントロンの変異、調節領域の変異などを想定し、解析継続中である。

2. 近親婚の罹患同胞対

はとこ同士(近交係数 1/64 の近親婚)の父母から出生した合併奇形を伴う先天性甲状腺機能低下症の同胞例を解析中である。本罹患同胞対に対するホモ接合マッピング(SNP アレイ解析)により約 8Mb の autozygous segment を同定した。この領域には先天性甲状腺機能低下症の既知責任遺伝子が存在し、Sanger 法でホモ接合性のスプライスサイト変異を確認した。

当初、①合併奇形の存在、②重症度の高さから、その責任遺伝子の変異を想定できなかった。②に関しては当該変異がわが国ではきわめてまれなホモの無機能型変異であったためと考えられる。①に関しては変異同定済みの責任遺伝子による症状としては説明がつかないため、autozygous segment に存在する他遺伝子に未同定の変異が存在する可能性が考えられる。現在、エクソーム解析

により候補領域に存在するホモ接合性バリエーションを探索中である。なお、本家系の解析は Endocrinome システム導入以前であったが、かりに Endocrinome システムで解析していたとするならば遅滞なく先天性甲状腺機能低下症にかかわる変異を同定できていたと考えられる。

3. 非近親婚の罹患同胞対

従来、非近親婚の罹患同胞対に対する解析(たとえば SNP アレイ)でその責任遺伝子を同定することはきわめて困難であったが、エクソーム解析の導入によりこれが可能となった⁵⁾。非罹患の両親から罹患同胞対が生じる機序として、①常染色体劣性変異、②常染色体優性変異であるが親が未発症(不完全浸透・性腺モザイクなど)、③(兄弟例の場合)X連鎖変異、などといった可能性が考えられる。このうち、①についてはエクソーム解析を行い“同胞間で共有される変異が同一遺伝子内に2アリル(ホモ接合あるいは複合ヘテロ接合)あるような遺伝子”という条件でフィルタリングすることにより責任遺伝子同定に至る可能性がある。X連鎖の場合は共有されるヘミ接合性変異として同定可能である⁶⁾。

著者らはこれまで複数の先天性内分泌疾患の罹患同胞対に対して、このアプローチで解析している。著者らの二次・三次解析アルゴリズムでは、1エクソームに含まれる低頻度(アリル頻度 0.2%

未満)かつ機能異常と推測されるバリエーションの個数は200~250程度である。これらのうち、2つ以上のバリエーションが同一遺伝子内に同定される遺伝子の数は0~5程度であり、この時点で候補遺伝子はかなり絞り込まれる。同胞間でバリエーションが一致する遺伝子数はかなり少なく、著者らの経験では0~2である。

このように、罹患同胞対に対するエクソーム解析は非常に効率のよい新規責任遺伝子探索法に思われるが、実際には解析中の家系では有力な候補遺伝子の同定に至っていない。解析が困難である要因のひとつとして、エクソーム解析のβエラー(偽陰性)の確率の高さが考えられる。一般的に第1エクソンなどGC含有率の高いゲノム領域は核酸ハイブリダイゼーションによる選択的濃縮が困難であり、エクソーム解析においてカバレッジが不十分となりやすい。優性モデルの場合1つの変異のみを検出すればよいのに対し、劣性モデルでは2つの変異の双方が検出される必要があり、βエラーの影響をより受けやすいと考えられる。

4. 孤発例に対する解析

“遺伝子変異をもつ孤発例”の成立機序として、①常染色体劣性変異、②常染色体優性変異であるが親が未発症(不完全浸透・性腺モザイクなど)、③(男児例の場合)X連鎖変異、④常染色体優性変異が患児で新生(*de novo*変異)、といった可能性が考えられる。①~③については上述した同胞対と同様であるが、④が利用できる点が決定的に異なる。一世代で生じる*de novo*変異は1エクソーム内で0~2個程度であることが報告されている⁷⁾。かりに、ある孤発例が未知責任遺伝子の*de novo*変異を有するならば、患者とその両親のエクソームを比較し“発端者にのみに存在するバリエーション”の条件でフィルタリングすることにより同定可能である。

著者らはこれまで、複数の先天性内分泌疾患の孤発例に対して5~10トリオのエクソーム解析を行っている。その結果、ある先天性内分泌疾患2

例において機能未知遺伝子Aの*de novo*変異を同定した。遺伝子Aの変異は類似の表現型を示す他患者のエクソームにも含まれており、有力な新規責任遺伝子候補と考えられる。現在、患者コホート解析と分子機能解析を並行して進行中である。

次世代内分泌学に向けて

医学・医療の歴史のなかで、疾病の制圧にはつねに正確な病因診断が先立ってきた。感染症学を例にとれば、起因病原体の分離・観察により病因診断が成立し、起因病原体ごとの抗生物質治療が開発・最適化されてきた。感染症学においては顕微鏡が細胞レベルの観察を可能とするが、Mendel遺伝病学においてはシーケンサーが“分子レベルの顕微鏡”として威力を発揮する。これまで20年以上にわたりキャピラリー型の第一世代シーケンサーが豊かな知見をもたらしてきた。そして現在においては、広大なゲノムのランドスケープ全体を見渡すことができる次世代シーケンシングが医学研究のさまざまな局面で利用できる時代となった。今後も次世代シーケンシングが医学・医療の幅広い分野を大幅にバージョンアップしていくことに疑いの余地はない。著者らも内分泌学の分野で、次世代シーケンシングにより得られる“果実”を患者・家族、そして臨床現場で活躍する諸先生方に還元できるよう、努力を続けていきたいと考えている。

文献

- 1) Krude, H. et al.: *Horm. Res.*, **53**(Suppl.1): 12-18, 2000.
- 2) Narumi, S. et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **94**: 1317-1323, 2009.
- 3) Narumi, S. et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **95**: 1981-1985, 2010.
- 4) Narumi, S. et al.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **96**: E1340-E1345, 2011.
- 5) Ng, S. B. et al.: *Nat. Genet.*, **42**: 30-35, 2010.
- 6) Shoubridge, C. et al.: *Nat. Genet.*, **42**: 486-488, 2010.
- 7) Veltman, J. A. and Brunner, H. G.: *Nat. Rev. Genet.*, **13**: 565-575, 2012.

* * *

