

201331014A

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25年度総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 奉延

平成26年5月

# 平成 25 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	専任講師
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 検体集積	7
	石井 智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室 専任講師	
	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先天性内分泌疾患遺伝子解析系	
	「Endocrinome システム」：サイログロブリン異常値を伴った先天性甲状腺機能低下症	12
	荒木 俊介 産業医科大学医学部小児科 助教	
	鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教	
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の責任遺伝子探索	14
	古川 徹 東京女子医科大学統合医科学研究所 教授	
4.	先天性甲状腺機能低下症の新規責任遺伝子の探索	16
	鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教	
5.	先天性副腎機能低下症の新規責任遺伝子同定：新規副腎低形成症候群の発見	18
	鳴海 覚志 慶應義塾大学医学部小児科学教室 特任助教	
6.	ヒト 27 器官の RNA 発現データベースの作成	22
	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 専任講師	
7.	社会へ向けての研究成果の発信（サイエンススクールでの講演）	25
	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	27
IV.	研究成果の刊行物・別冊	31

# 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 検体集積、2. 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遺伝子解析系「Endocrinome システム」：サイログロブリン異常値を伴った先天性甲状腺機能低下症、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の責任遺伝子探索、4. 先天性甲状腺機能低下症の新規責任遺伝子の探索、5. 先天性副腎機能低下症の新規責任遺伝子同定：新規副腎低形成症候群の発見、6. ヒト 27 器官の RNA 発現データベースの作成、について大きな成果が得られた。また、サイエンススクールでの講演を通じて研究成果を社会へ向けて発信・還元した。

### 研究分担者

石井 智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室・専任講師  
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  
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

伝子解析系「Endocrinome システム」：サイログロブリン異常値を伴った先天性甲状腺機能低下症、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の責任遺伝子探索、先天性甲状腺機能低下症の新規責任遺伝子の探索、先天性副腎機能低下症の新規責任遺伝子同定：新規副腎低形成症候群の発見、ヒト 27 器官の RNA 発現データベースの作成、を行う。さらに研究成果を社会に向けて発信・還元する。

### 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。

本年度（3 年計画の 3 年目）は、先天性内分泌疾患ゲノム DNA 検体集積、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遺

### 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. 新生児マス・スクリーニング陽性となり、精査を行われた症例のうち、血液検査でサイログロブリンが異常高値を呈した症例を、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遺伝子解析系「Endocrinome システム」で解析した。

3. 発症機序不明の先天性内分泌疾患家系 22 例に対し、次世代型シーケンサーを用いて全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析を行った。

4. 先天性甲状腺機能低下症 453 検体のうち、

25 検体は全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析を、428 検体は標的遺伝子解析を行った。

5. 副腎機能低下症に対する全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析で同定した新規候補遺伝子の病原性の検証（発現実験など）、および臨床像の解析を行った。

6. The Human Protein Atlas の RNA シーケンシングのデータにもとづき、新たに副腎を含む 27 器官の RNA 発現データベースを作成した。

7. 中学校 3 年生を対象としたサイエンススクールでの講演を通じて、研究成果を社会へ向けて発信・還元した。

（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. 先天性内分泌疾患のゲノム DNA およそ 280 検体を収集した。

2. 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遺伝子解析系「Endocrinome システム」：サイログロブリン異常値を伴った先天性甲状腺機能低下症 4 例中 3 例において、DUOX2 複合ヘテロ接合性変異を同定した。

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の責任遺伝子探索 優性遺伝形式で 248 個、劣性遺伝形式では 18 個の候補遺伝子を見出した。

4. 先天性甲状腺機能低下症の新規責任遺伝子の探索 エクソーム解析および標的遺伝子解析により、2 名に T 遺伝子のフレームシフト変異を同定した。

5. 先天性副腎機能低下症の新規責任遺伝子同定：新規副腎低形成症候群の発見 候補遺伝子 S は、野生型においてごく弱い細胞増殖抑制作用を、変異型において著明な細胞増殖抑制作用を認めた。

6. 27 器官につき、20,296 遺伝子の RNA 発現量が含まれるデータベースを作成した。

7. 中学校 3 年生を対象としてサイエンススクールを 1 回行った。

### D. 考察

1. 先天性内分泌疾患総ゲノム DNA 検体およそ 1,230 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. 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遺伝子解析系「Endocrinome システム」を用いることにより、既知責任遺伝子の同定が可能である。

3. 同定した候補遺伝子について、今後検証解析を通じて、真の責任遺伝子を同定する。

4. T 遺伝子は先天性甲状腺機能低下症の新規責任遺伝子と考え、さらに機能解析を進める。

5. S 遺伝子変異は機能獲得型変異である。

6. 今回作成した発現データベースは、それぞれの器官形成にかかわる候補遺伝子の病因の確からしさを判断する上で重要なリソースとなる。

7. サイエンススクール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 25 年度は、1. 先天性内分泌疾患ゲノム DNA 検体集積、2. 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遺伝子解析系「Endocrinome システム」：サイログロブリン異常値を伴った先天性甲状腺機能低下症、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の責任遺伝子探索、4. 先天性甲状腺機能低下症の新規責任遺伝子の探索、5. 先天性副腎機能低下症の新規責任遺伝子同定：新規副腎低形成症候群の発見、6. ヒト 27 器官の RNA 発現データベースの作成、において大きな成果が得られた。さらにサイエンススクールを通じて研

究成果を社会に向けて発信・還元することができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, Ogata T, Hasegawa T. Identification and Functional Characterization of Two Novel *NPR2* Mutations in Japanese Patients with Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab* 94(4):E713-E718, 2014

Takagi M, Narumi S, Asakura Y, Muroya K, Hasegawa Y, Hasaegawa T. A novel mutation in *SOX2* causes hypogonadotropic hypogonadism with mild ocular malformation. *Horm Res Paediatr* 81(2):133-138, 2014

Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Asakura Y, Adachi M, Aida N, Tomiyasu M, Tajima G, Hasegawa T. A neonatal patient with classic MSUD: the usefulness of <sup>1</sup>HMRs on early diagnosis. *Pediatr Int* 56:112-115, 2014

Takagi M, Ishii T, Torii C, Kosaki K, Hasegawa T. A novel mutation in *SOX3* polyalanine tract: A case of kabuki syndrome with combined pituitary hormone deficiency harboring double mutations in *MLL2* and *SOX3*. *Pituitary* (in press)

Takagi M, Sasaki G, Mitsui T, Honda M, Tanaka Y, Hasegawa T. A 2.0 Mb microdeletion in proximal chromosome 14q12, involving regulatory elements of *FOXG1*, with the coding region of *FOXG1* being unaffected, results in severe developmental delay, microcephaly, and hypoplasia of the corpus callosum. *Eur J Med Genet* 56(9):526-528, 2013

Takagi M, Sato S, Hara K, Tani C, Miyazaki O, Nishimura G, Hasegawa T. A recurrent mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* causes osteogenesis imperfecta type V. *Am J Med Genet A* 161A(8):1980-1982, 2013

Matsumoto T, Miyakoshi K, Saisho Y, Ishii T, Ikenoue S, Kasuga Y, Kadohira I, Sato S, Momotani N, Minegishi K, Yoshimura Y. Antenatal management of recurrent fetal goitrous hyperthyroidism associated with fetal cardiac failure in a pregnant woman with persistent high levels of thyroid-stimulating hormone receptor antibody after ablative therapy. *Endocr J* 60:1281-1287, 2013

Adachi M. Assessment of user-friendliness of the Norditropin FlexPro for pediatric patients treated with recombinant human growth hormone: results of an open-label user survey. *J Pediatr Endocrinol Metab* 26:1105-1110, 2013

Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Asakura Y, Adachi M, Takahashi E, Shiroyanagi Y, Yamazaki Y, Tanaka Y, Hasegawa T. Association between Graves' disease and renal coloboma syndrome: a case report. *Clin Pediatr Endocrinol* 22:45-51, 2013

Soneda A, Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Takagi M, Hasegawa T, Inoue H, Itakura M. Novel compound heterozygous mutations of the growth hormone-releasing hormone receptor gene in a case of isolated growth hormone deficiency. *Growth Hormone and IGF Research* 23:89-97, 2013

Adachi M, Asakura Y, Muroya K, Goto H, Kigasawa H. Abnormal adipose tissue distribution with unfavorable metabolic profile in five children following hematopoietic stem cell transplantation: A new etiology for acquired partial lipodystrophy. *Clin*

Pediatr Endocrinol 22:53-64, 2013

Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Tajima T. Classic Bartter syndrome complicated with profound growth hormone deficiency: a case report. Journal of Medical Case Reports 7:283, 2013

Nishina-Uchida N, Fukuzawa R, Numakura C, Suwanai AS, Hasegawa T, Hasegawa Y. Characteristic Testicular Histology Is Useful for the Identification of NR5A1 Gene Mutations in Prepubertal 46,XY Patients. Horm Res Paediatr. 20:119- 128,2013

Enkai S, Koinuma S, Ito R, Igaki J, Hasegawa Y, Murayama K, Ohtake A. Case of an infant with hepatic cirrhosis caused by mitochondrial respiratory chain disorder. Pediatr Int 55(4):e103-6, 2013

Ariyasu D, Yoshida H, Yamada M, Hasegawa Y. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis contribute to the pathogenesis of dominantly inherited isolated GH deficiency due to GH1 gene splice-site mutations. Endocrinology 154(9):3228-39, 2013

曾根田明子、安達昌功. GHRH 受容体異常症. ホルモンと臨床 60:497-500, 2014

湊川真理、室谷浩二、花川純子、大戸佑二、朝倉由美、安達昌功. 生後7ヶ月に嘔吐と意識障害で発症したグルタル酸血症2型の一例. 特殊ミルク情報 49:21-26, 2013

佐藤武志、室谷浩二、花川純子、朝倉由美、安達昌功、近藤脩. 訪問看護師による経静脈的ビタミンD 補充でくる病の顕著な改善を得た進行性家族性胆汁鬱滞症1型 (Byler病) の1例. 小児科臨床 66:2263-2267, 2013

河野香、安達昌功、朝倉由美、室谷浩二、鹿間芳

明、赤城邦彦、田中祐吉、福田冬季子、杉江秀夫. 非進行性肝型と考えられる糖原病 IV 型の1例. 日本小児科学雑誌 117(12):1883-1887, 2013

## 2. 学会発表

三井俊賢、鳴海覚志、長崎啓祐、井ノ口美香子、佐々木悟郎、中澤美絵、岩崎泰正、長谷川奉延. 原発性副甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析. 第23回臨床内分泌代謝 Update 2014年1月24日-25日 (名古屋)

石津桂、森川俊太郎、鳴海覚志、長谷川奉延、田島敏広. 新生児マス・スクリーニング検査でみつかった TPO 異常症の2例. 第23回臨床内分泌代謝 Update 2014年1月24日-25日 (名古屋)

高木優樹、鳴海覚志、室谷浩二、朝倉由美、長谷川行洋、安達昌功、長谷川奉延. 中枢性性腺機能低下症の網膜剥離を合併した、SOX2 異常症の一例. 第23回臨床内分泌代謝 Update 2014年1月24日-25日 (名古屋)

後藤元秀、荒木俊介、山本幸代ら. 「サイログロブリン著明高値、甲状腺腫大を契機に診断した DUOX2 異常症の2例」 日本小児科学会福岡地方会 2013年12月14日 (福岡)

高木優樹、藤田秀樹、小崎里華、内木康博、鳴海覚志、三宅紀子、鶴崎美徳、才津浩智、中島光子、松本直通、西村玄、長谷川奉延. SERPINH1 遺伝子変異による骨形成不全症の本邦初発例. 第31回小児代謝性骨疾患研究会 2013年12月7日 (東京)

新堀哲也、青木洋子、番匠俊博、岡本伸彦、水野誠司、黒澤健司、緒方勤、高田史男、長谷川奉延、舟山亮、長嶋剛史、中山啓子、井上晋一、渡邊裕介、小椋利彦、松原洋一. エクソームシーケンスによる Noonan 症候群新規原因遺伝子 RIT1 の同



定. 日本人類遺伝学会第 58 回大会 2013 年 11 月  
20 日-23 日（仙台）

山科なおみ、白井晴己、阿部清美、鳴海覚志、上  
牧務、長谷川奉延. NKX2-1 遺伝子異常による遅発  
発症先天性甲状腺機能低下症の 1 例. 第 47 回日本  
小児内分泌学会学術集会 2013 年 10 月 10 日-12  
日（東京）

田邊裕子、黒柳裕一、高屋淳二、金子一成、長谷  
川奉延、鳴海覚志、林美恵、本間桂子. 新規 SF-1  
遺伝子変異を認めた 46,XY 性分化疾患の 1 男児例  
第 47 回日本小児内分泌学会学術集会 2013 年 10  
月 10 日-12 日（東京）

河口亜津彩、本庄紗帆、母坪智行、星野恵美子、  
黒岩由紀、布施茂登、森俊彦、横田美紀、阿部清  
美、鳴海覚志、長谷川奉延. 橋本病母体より出生  
し、新生児マススクリーニングは正常判定であつ  
た DUOX2 異常症の 1 例 第 47 回日本小児内分泌  
学会学術集会 2013 年 10 月 10 日-12 日（東京）

上村美季、鳴海覚志、梅木郁美、箱田明子、菅野  
潤子、長谷川奉延、藤原幾磨. 新生児マススクリ  
ーニングで発見されなかった先天性甲状腺機能  
低下症の 3 例. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集  
会 2013 年 10 月 10 日-12 日（東京）

林美恵、石井智弘、鳴海覚志、天野直子、本間桂  
子、長谷川奉延. 出生時に逡巡なく法律上の性を  
女性と決定された 46,XY 性分化疾患の分子遺伝  
学のおよび臨床的検討. 第 47 回日本小児内分泌  
学会学術集会 2013 年 10 月 10 日-12 日（東京）

濱田淳平、平井洋生、勢井友香、竹本幸司、岡澤  
朋子、三井俊賢、鳴海覚志、長谷川奉延、石井榮  
一. CHD7 遺伝子に変異を認めた Kallmann 症候群  
女児例. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会  
2013 年 10 月 10 日-12 日（東京）

朝倉由美、花川純子、大戸佑二、室谷浩二、安達  
昌功、鳴海覚志、佐藤武志、高木優樹、長谷川奉  
延. 特異な下垂体形成異常・朝顔症候群を伴う複  
合型下垂体機能低下症における PROKR2 ヘテロ  
接合性変異. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集  
会 2013 年 10 月 10 日-12 日（東京）

花川純子、室谷浩二、林美恵、深見真紀、大戸佑  
二、朝倉由美、白柳慶之、山崎雄一郎、長谷川奉  
延、安達昌功. 高度尿道下裂患者 39 例における臨  
床および分子遺伝学的検討. 第 47 回日本小児内  
分泌学会学術集会 2013 年 10 月 10 日-12 日（東  
京）

三井俊賢、鳴海覚志、長崎啓祐、井ノ口美香子、  
佐々木悟郎、中澤美絵、岩崎泰正、長谷川奉延.  
原発性副甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析  
とそれにより同定し得た本邦初の GCM2 異常症.  
第 47 回日本小児内分泌学会学術集会 2013 年 10  
月 10 日-12 日（東京）

鳴海覚志、阿部清美、室谷浩二、朝倉由美、安達  
昌功、長谷川奉延. 従来法 vs 次世代法：先天性甲  
状腺機能低下症における遺伝子診断アプローチ  
の精度比較. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集  
会 2013 年 10 月 10 日-12 日（東京）

天野直子、林美恵、鳴海覚志、山田思郎、今井一  
秀、玉田泉、佐々木敦子、室谷浩二、木津りか、  
望月弘、谷口祐子、松浦宏樹、鈴木敦詞、小野敦  
史、高野洋子、石井智弘、本間桂子、長谷川奉延.  
臨床症状および生化学的評価で原因特定が困難  
な原発性副腎機能低下症における包括的遺伝子  
解析. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会 2013  
年 10 月 10 日-12 日（東京）

阿部清美、鳴海覚志、天野直子、石井智弘、室谷  
浩二、朝倉由美、安達昌功、長崎啓祐、阿部貴行、  
長谷川奉延. 遺伝性甲状腺ホルモン合成障害を初

診時に予測できる：ROC 解析によるカットオフ値  
の提唱. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会  
2013 年 10 月 10 日－12 日（東京）

該当なし  
3. その他  
該当なし

鈴木美華子、村野弥生、五十嵐鮎子、森真理、松  
永展明、池野充、久田研、東海林宏道、清水敏明、  
本間桂子、長谷川奉延. 修正 2 か月時に著名な高  
カルシウム血症を呈した超低出生体重児の 1 例.  
第 603 回日本小児科学会東京都地方会講和会  
2013 年 9 月 14 日（東京）

鳴海覚志、長谷川奉延. 次世代シーケンシングで  
内分泌を切り拓く. 第 31 回内分泌代謝学サマー  
セミナー 2013 年 7 月 11 日（由布）

藤井小弥太、久保暢大、仁藤美子、田中雅人、楡  
井惇、星名潤、斎藤なか、吉田宏、伊藤末志、長  
崎啓祐、三井俊賢、長谷川奉延. GCM2 遺伝子変  
異を同定した特発性副甲状腺機能低下症の 1 例.  
第 213 回日本小児科学会新潟地方会 2013 年 5 月  
11 日（新潟）

三井俊賢、湯野暁子、臼井健、中村明枝、田島敏  
広、長谷川奉延. 偽性副甲状腺機能低下症 I 型の  
包括的分子遺伝学的解析. 第 86 回日本内分泌学  
会学術集会 2013 年 4 月 25 日－27 日（仙台）

高木優樹、藤田秀樹、小崎里華、内木康博、鳴海  
覚志、三宅紀子、鶴崎美穂、才津浩智、中島光子、  
松本直道、西村玄、長谷川奉延. SERPINH1 遺伝子  
変異による骨形成不全症の本邦初発例. 第 36 回  
日本小児遺伝学会学術集会 2013 年 4 月 18 日（広  
島）

#### 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

## II. 研究分担報告書

## 先天性内分泌疾患のゲノム DNA 検体収集

研究分担者 石井 智弘 慶應義塾大学医学部小児科学教室 専任講師  
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

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数多くの患者 DNA 検体を収集することは必須である。我々は本年度に先天性内分泌疾患ゲノム DNA およそ 280 検体を収集した。

### 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ことを目的とした。

### B. 研究方法

平成 25 年 10 月 10 日～12 日に東京で行われた第 47 回日本小児内分泌学会学術集会において、「従来法 vs 次世代法：先天性甲状腺機能低下症における遺伝子診断アプローチの制度比較」を発表し、その際に広く研究協力を依頼した。

（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れた。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）。

### C. 研究結果

平成 23 年度の検体送付は 7 検体、平成 24 年度はおおよそ 450 検体、本年度はおおよそ 280 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り、先天性甲状腺機能低下症以外の各疾患の有病率は 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 検体の収集が必須である。

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。平成 23 年度、24 年度に引き続き、本年度も全国規模で積極的に検体集積を継続した結果、1 年間でおおよそ 280 検体を集積した。総検体数はおおよそ 1,230 検体となり、この数は世界的屈指の先天性内分泌疾患ゲノム DNA 数といえる。

### E. 結論

本年度先天性内分泌疾患おおよそ 280 検体のゲノム DNA を収集した。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, Ogata T, Hasegawa T. Identification and Functional Characterization of Two Novel *NPR2*

Mutations in Japanese Patients with Short Stature. J Clin Endocrinol Metab 94(4) :E713-E718, 2014

Takagi M, Narumi S, Asakura Y, Muroya K, Hasegawa Y, Hasegawa T. A novel mutation in *SOX2* causes hypogonadotropic hypogonadism with mild ocular malformation. Horm Res Paediatr 81(2):133- 138, 2014

Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Asakura Y, Adachi M, Aida N, Tomiyasu M, Tajima G, Hasegawa T. A neonatal patient with classic MSUD: the usefulness of <sup>1</sup>HMRs on early diagnosis. Pediatr Int 56:112-115, 2014

Takagi M, Ishii T, Torii C, Kosaki K, Hasegawa T. A novel mutation in *SOX3* polyalanine tract: A case of kabuki syndrome with combined pituitary hormone deficiency harboring double mutations in *MLL2* and *SOX3*. Pituitary (in press)

Takagi M, Sasaki G, Mitsui T, Honda M, Tanaka Y, Hasegawa T. A 2.0 Mb microdeletion in proximal chromosome 14q12, involving regulatory elements of *FOXG1*, with the coding region of *FOXG1* being unaffected, results in severe developmental delay, microcephaly, and hypoplasia of the corpus callosum. Eur J Med Genet 56(9):526- 528, 2013

Takagi M, Sato S, Hara K, Tani C, Miyazaki O, Nishimura G, Hasegawa T. A recurrent mutation in the 5'-UTR of *IFITM5* causes osteogenesis imperfecta type V. Am J Med Genet A 161A(8):1980-1982, 2013

Matsumoto T, Miyakoshi K, Saisho Y, Ishii T, Ikenoue S, Kasuga Y, Kadohira I, Sato S, Momotani N, Minegishi K, Yoshimura Y. Antenatal management of recurrent fetal goitrous hyperthyroidism associated

with fetal cardiac failure in a pregnant woman with persistent high levels of thyroid-stimulating hormone receptor antibody after ablative therapy. Endocr J 60:1281-1287, 2013

Adachi M. Assessment of user-friendliness of the Norditropin FlexPro for pediatric patients treated with recombinant human growth hormone: results of an open-label user survey. J Pediatr Endocrinol Metab 26:1105-1110, 2013

Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Asakura Y, Adachi M, Takahashi E, Shiroyanagi Y, Yamazaki Y, Tanaka Y, Hasegawa T. Association between Graves' disease and renal coloboma syndrome: a case report. Clin Pediatr Endocrinol 22:45-51, 2013

Soneda A, Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Takagi M, Hasegawa T, Inoue H, Itakura M. Novel compound heterozygous mutations of the growth hormone-releasing hormone receptor gene in a case of isolated growth hormone deficiency. Growth Hormone and IGF Research 23:89-97, 2013

Adachi M, Asakura Y, Muroya K, Goto H, Kigasawa H. Abnormal adipose tissue distribution with unfavorable metabolic profile in five children following hematopoietic stem cell transplantation: A new etiology for acquired partial lipodystrophy. Clin Pediatr Endocrinol 22:53-64, 2013

Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Tajima T. Classic Bartter syndrome complicated with profound growth hormone deficiency: a case report. Journal of Medical Case Reports 7:283, 2013

Nishina-Uchida N, Fukuzawa R, Numakura C, Suwanai AS, Hasegawa T, Hasegawa Y. Characteristic Testicular Histology Is Useful for the Identification of

NR5A1 Gene Mutations in Prepubertal 46,XY Patients. Horm Res Paediatr. 20:119-128,2013

Enkai S, Koinuma S, Ito R, Igaki J, Hasegawa Y, Murayama K, Ohtake A. Case of an infant with hepatic cirrhosis caused by mitochondrial respiratory chain disorder. Pediatr Int 55(4):e103-6, 2013

Ariyasu D, Yoshida H, Yamada M, Hasegawa Y. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis contribute to the pathogenesis of dominantly inherited isolated GH deficiency due to GH1 gene splice-site mutations. Endocrinology 154(9):3228-39, 2013

曾根田明子、安達昌功. GHRH 受容体異常症. ホルモンと臨床 60:497-500, 2014

湊川真理、室谷浩二、花川純子、大戸佑二、朝倉由美、安達昌功. 生後7ヶ月に嘔吐と意識障害で発症したグルタル酸血症2型の一例. 特殊ミルク情報 49:21-26, 2013

佐藤武志、室谷浩二、花川純子、朝倉由美、安達昌功、近藤脩. 訪問看護師による経静脈的ビタミンD補充でくる病の顕著な改善を得た進行性家族性胆汁鬱滞症1型（Byler病）の1例. 小児科臨床 66:2263-2267, 2013

河野香、安達昌功、朝倉由美、室谷浩二、鹿間芳明、赤城邦彦、田中祐吉、福田冬季子、杉江秀夫. 非進行性肝型と考えられる糖原病IV型の1例. 日本小児科学雑誌 117(12):1883-1887, 2013

## 2. 学会発表

三井俊賢、鳴海覚志、長崎啓祐、井ノ口美香子、佐々木悟郎、中澤美絵、岩崎泰正、長谷川奉延. 原発性副甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析. 第23回臨床内分泌代謝 Update 2014年1月24日-25日（名古屋）

石津桂、森川俊太郎、鳴海覚志、長谷川奉延、田島敏広. 新生児マス・スクリーニング検査でみつけたTPO異常症の2例. 第23回臨床内分泌代謝 Update 2014年1月24日-25日（名古屋）

高木優樹、鳴海覚志、室谷浩二、朝倉由美、長谷川行洋、安達昌功、長谷川奉延. 中枢性性腺機能低下症の網膜剥離を合併した、SOX2異常症の一例. 第23回臨床内分泌代謝 Update 2014年1月24日-25日（名古屋）

後藤元秀、荒木俊介、山本幸代ら. 「サイログロブリン著明高値、甲状腺腫大を契機に診断したDUOX2異常症の2例」 日本小児科学会福岡地方会 2013年12月14日（福岡）

高木優樹、藤田秀樹、小崎里華、内木康博、鳴海覚志、三宅紀子、鶴崎美徳、才津浩智、中島光子、松本直通、西村玄、長谷川奉延. SERPINH1遺伝子変異による骨形成不全症の本邦初発例. 第31回小児代謝性骨疾患研究会 2013年12月7日（東京）

新堀哲也、青木洋子、番匠俊博、岡本伸彦、水野誠司、黒澤健司、緒方勤、高田史男、長谷川奉延、舟山亮、長嶋剛史、中山啓子、井上晋一、渡邊裕介、小椋利彦、松原洋一. エクソームシーケンズによるNoonan症候群新規原因遺伝子RIT1の同定. 日本人類遺伝学会第58回大会 2013年11月20日-23日（仙台）

山科なおみ、白井晴己、阿部清美、鳴海覚志、上牧務、長谷川奉延. NKX2-1遺伝子異常による遅発発症先天性甲状腺機能低下症の1例. 第47回日本小児内分泌学会学術集会 2013年10月10日-12日（東京）

田邊裕子、黒柳裕一、高屋淳二、金子一成、長谷川奉延、鳴海覚志、林美恵、本間桂子. 新規 SF-1

遺伝子変異を認めた 46,XY 性分化疾患の 1 男児例  
第 47 回日本小児内分泌学会学術集会 2013 年 10  
月 10 日－12 日（東京）

河口亜津彩、本庄紗帆、母坪智行、星野恵美子、  
黒岩由紀、布施茂登、森俊彦、横田美紀、阿部清  
美、鳴海覚志、長谷川奉延。橋本病母体より出生  
し、新生児マススクリーニングは正常判定であつ  
た DUOX2 異常症の 1 例 第 47 回日本小児内分泌  
学会学術集会 2013 年 10 月 10 日－12 日（東京）

上村美季、鳴海覚志、梅木郁美、箱田明子、菅野  
潤子、長谷川奉延、藤原幾磨。新生児マススクリ  
ーニングで発見されなかつた先天性甲状腺機能  
低下症の 3 例。第 47 回日本小児内分泌学会学術集  
会 2013 年 10 月 10 日－12 日（東京）

林美恵、石井智弘、鳴海覚志、天野直子、本間桂  
子、長谷川奉延。出生時に逡巡なく法律上の性を  
女性と決定された 46,XY 性分化疾患の分子遺伝  
学のおよび臨床的検討。第 47 回日本小児内分泌  
学会学術集会 2013 年 10 月 10 日－12 日（東京）

濱田淳平、平井洋生、勢井友香、竹本幸司、岡澤  
朋子、三井俊賢、鳴海覚志、長谷川奉延、石井榮  
一。CHD7 遺伝子に変異を認めた Kallmann 症候群  
女児例。第 47 回日本小児内分泌学会学術集会  
2013 年 10 月 10 日－12 日（東京）

朝倉由美、花川純子、大戸佑二、室谷浩二、安達  
昌功、鳴海覚志、佐藤武志、高木優樹、長谷川奉  
延。特異な下垂体形成異常・朝顔症候群を伴う複  
合型下垂体機能低下症における PROKR2 ヘテロ  
接合性変異。第 47 回日本小児内分泌学会学術集  
会 2013 年 10 月 10 日－12 日（東京）

花川純子、室谷浩二、林美恵、深見真紀、大戸佑  
二、朝倉由美、白柳慶之、山崎雄一郎、長谷川奉  
延、安達昌功。高度尿道下裂患者 39 例における臨

床および分子遺伝学的検討。第 47 回日本小児内  
分泌学会学術集会 2013 年 10 月 10 日－12 日（東  
京）

三井俊賢、鳴海覚志、長崎啓祐、井ノ口美香子、  
佐々木悟郎、中澤美絵、岩崎泰正、長谷川奉延。  
原発性副甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析  
とそれにより同定し得た本邦初の GCM2 異常症。  
第 47 回日本小児内分泌学会学術集会 2013 年 10  
月 10 日－12 日（東京）

鳴海覚志、阿部清美、室谷浩二、朝倉由美、安達  
昌功、長谷川奉延。従来法 vs 次世代法：先天性甲  
状腺機能低下症における遺伝子診断アプローチ  
の精度比較。第 47 回日本小児内分泌学会学術集  
会 2013 年 10 月 10 日－12 日（東京）

天野直子、林美恵、鳴海覚志、山田思郎、今井一  
秀、玉田泉、佐々木敦子、室谷浩二、木津りか、  
望月弘、谷口祐子、松浦宏樹、鈴木敦詞、小野敦  
史、高野洋子、石井智弘、本間桂子、長谷川奉延。  
臨床症状および生化学的評価で原因特定が困難  
な原発性副腎機能低下症における包括的遺伝子  
解析。第 47 回日本小児内分泌学会学術集会 2013  
年 10 月 10 日－12 日（東京）

阿部清美、鳴海覚志、天野直子、石井智弘、室谷  
浩二、朝倉由美、安達昌功、長崎啓祐、阿部貴行、  
長谷川奉延。遺伝性甲状腺ホルモン合成障害を初  
診時に予測できる：ROC 解析によるカットオフ値  
の提唱。第 47 回日本小児内分泌学会学術集会  
2013 年 10 月 10 日－12 日（東京）

鈴木美華子、村野弥生、五十嵐鮎子、森真理、松  
永展明、池野充、久田研、東海林宏道、清水敏明、  
本間桂子、長谷川奉延。修正 2 か月時に著名な高  
カルシウム血症を呈した超低出生体重児の 1 例。  
第 603 回日本小児科学会東京都地方会講和会  
2013 年 9 月 14 日（東京）

鳴海覚志、長谷川奉延. 次世代シーケンシングで  
内分泌を切り拓く. 第31回内分泌代謝学サマー  
セミナー 2013年7月11日（由布）

藤井小弥太、久保暢大、仁藤美子、田中雅人、楡  
井惇、星名潤、齋藤なか、吉田宏、伊藤末志、長  
崎啓祐、三井俊賢、長谷川奉延. GCM2 遺伝子変  
異を同定した特発性副甲状腺機能低下症の1例.  
第213回日本小児科学会新潟地方会 2013年5月  
11日（新潟）

三井俊賢、湯野暁子、臼井健、中村明枝、田島敏  
広、長谷川奉延. 偽性副甲状腺機能低下症I型の  
包括的分子遺伝学的解析. 第86回日本内分泌学  
会学術集会 2013年4月25日-27日（仙台）

高木優樹、藤田秀樹、小崎里華、内木康博、鳴海  
覚志、三宅紀子、鶴崎美穂、才津浩智、中島光子、  
松本直道、西村玄、長谷川奉延. SERPINH1 遺伝子  
変異による骨形成不全症の本邦初発例. 第36回  
日本小児遺伝学会学術集会 2013年4月18日（広  
島）

#### 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



## 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遺伝子解析系「Endocrinome システム」：サイログロブリン異常値を伴った先天性甲状腺機能低下症

研究分担者 荒木 俊介 産業医科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

### 研究要旨

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遺伝子解析系「Endocrinome システム」を用いて、血清サイログロブリン異常高値を伴った先天性甲状腺機能低下症 4 症例に対して、先天性甲状腺機能低下症(CH)の既知責任遺伝子の解析を行い、3 例で遺伝子変異を同定した。「Endocrinome システム」の解析に要した時間は 5 日間であった。サイログロブリン異常値は遺伝子変異による CH を発見する契機になる可能性が示唆された。

### A. 研究目的

本研究の一環として、平成 24 年度から運用を開始した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遺伝子解析系「Endocrinome システム」の有効性を確認する。同時に、新生児期の血清サイログロブリン(Tg)異常高値が、単一遺伝子異常による先天性甲状腺機能低下症(CH)の危険因子となるかを明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

新生児マス・スクリーニング陽性となり、精査を行われた症例のうち、血液検査で Tg が異常高値(>1000 ng/mL)を呈した 4 症例。

患児の白血球から DNA を抽出、断片化後に解析遺伝子(DUOX2, DUOXA2, GLIS3, IGSF1, IYD, PAX8, SECISBP2, SLC6A4, SLC5A5, TG, THRA, THRB, TPO, TRH, TRHR, TSHR)の翻訳領域を SureSelect Taret Enrichment System で濃縮し、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遺伝子解析系「Endocrinome システム」で解析した。

(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すべての患者（もしくは患者の親権者）から所得した。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）。

### C. 研究結果

症例 1：在胎 39 週 0 日、3498g で出生。新生児マス・スクリーニングで TSH 高値のため日齢 19 に受診。初診時 TSH 30.38 $\mu$ IU/mL、FT4 1.68ng/dL。CH の家族歴なし。ヨード過剰なし。現在 2 歳になるが、L-T4 製剤 10 $\mu$ g/日の少量で甲状腺機能は正常範囲で推移している。

症例 2：在胎 37 週 1 日、2284g で出生。新生児マス・スクリーニングで TSH 高値のため日齢 10 に受診。初診時 TSH 19.4 $\mu$ IU/mL、FT4 1.50ng/dL。CH の家族歴なし。ヨード過剰無し。現在 6 歳になるが無投薬で甲状腺機能は正常範囲で推移している。

症例 3: 新生児マス・スクリーニングで TSH 高値のため日齢 14 に受診。初診時 TSH 324.1 $\mu$ IU/mL、FT4 0.24ng/dL。CH の家族歴なし。3 歳時に病型診断で一過性甲状腺機能低下症と診断。現在 17

歳になるが甲状腺機能は正常範囲で推移している。

症例 4：在胎 40 週 2 日、3716g で出生。新生児マス・スクリーニングで TSH 高値のため日齢 26 に受診。初診時 TSH 284.4μIU/mL、FT4 0.76ng/dL。CH の家族歴なし。現在 3 か月になるが L-T4 製剤 20μg/日の投与中。

以下に 4 症例の新生児期サイログロブリン(Tg)および遺伝子解析結果を示す。なお、遺伝子解析に要した時間は 5 日間であった。

#### 新生児期 Tg および遺伝子解析結果

	Tg(ng/ml)	遺伝子変異
症例 1	2830	DUOX2 (p.G488R/ p.H678R)
症例 2	2570	DUOX2 (p.G488R/ p.G488R)
症例 3	1010	検出無し
症例 4	3015	DUOX2 (p.H678R/ p.E810K)

症例 3 についてはエクソーム解析を追加したが、変異は認めなかった。

#### D. 考察

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遺伝子解析系「Endocrinome システム」により、5 日間で遺伝子解析可能であった。現時点で、5 日間で計 24 検体の解析可能である。

合成障害による CH では代償的に増加した TSH が甲状腺細胞を刺激するため高 Tg 血症を呈する。合成障害による CH のうちどの程度が単一遺伝子異常を有するかは不明であるが今回の結果からは高 Tg 血症は単一遺伝子異常を有する可能性があり、既知遺伝子変異に異常が無い場合でも、エクソーム解析による新規遺伝子を探索するよい対象となると考えられた。また、症例 2 は一過性甲状腺機能低下症であり、症例 1 も内服治療が中止可能な症例と考えられる。既報のように DUOX2 異常症では一過性の甲状腺機能低下を呈することが再認識された。

#### E. 結論

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遺伝子解析系「Endocrinome システム」は遺伝子解析ツールとして有用である。

新生児期に Tg が 1000ng/ml 以上の高値を認めた 4 症例のうち 3 例で遺伝子異常を検出した。Tg 高値は単一遺伝子変異による CH を発見する契機になる可能性が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当なし

##### 2. 学会発表

後藤元秀、荒木俊介、山本幸代ら、「サイログロブリン著明高値、甲状腺腫大を契機に診断した DUOX2 異常症の 2 例」日本小児科学会福岡地方会 2013 年 12 月 14 日（福岡）

#### 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

## 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の責任遺伝子探索

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

先天性内分泌疾患の 22 家系において全エクソン配列（エクソーム）解析を行い、計 266 個の候補遺伝子を同定した。今後、検証解析を通じて、真の責任遺伝子を同定する。

### A. 研究目的

先天性内分泌疾患は、下垂体、甲状腺、副甲状腺、性腺、膵臓、性腺などの内分泌器官の先天異常の総称である。そのほとんどが遺伝子異常に基づくと考えられるが責任遺伝子については多くが不明のままである。本研究の目的は、全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析により原因不明の先天性内分泌疾患の責任遺伝子を特定することである。

### B. 研究方法

患児血液より DNA を抽出しライブラリーを作製してゲノムの標的領域あるいは全エクソン部分を抽出し次世代型シーケンサーで塩基配列を解析する。リファレンス配列と比較し、一塩基置換、微小挿入欠失を見出して原因遺伝子を確定する。

（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すべての患者（もしくは患者の親権者）から所得した。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）。

### C. 研究結果

先天性内分泌疾患家系サンプル 22 例に対し、次世代型シーケンサー SOLiD system (Life

Technologies)を使用して全ゲノムエクソン配列（エクソーム）解析を行った。プロトコールの改良、テクニカル面の改善により平均出力 6.8G 塩基、平均カバレッジ 75、読取り深度 10 倍以上が平均 91%のデータを得た。両親と患児のトリオ解析では de novo の非同義性、レアバリエントを平均で 45 個見出した。優性遺伝形式では候補遺伝子を 248 個、劣性遺伝形式では候補遺伝子を 18 個見出した。

### D. 考察

エクソーム解析のデータクオリティの向上、解析パイプラインの改善により、より精度の高い候補遺伝子を同定可能であった。今後、検証解析（Validation および機能解析）を通じて、真の責任遺伝子を同定する。

### E. 結論

エクソーム解析により先天性内分泌疾患における疾患関連候補遺伝子を同定した。

### 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