

先天性甲状腺機能低下症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

研究要旨

最も高頻度の先天性内分泌疾患である先天性甲状腺機能低下症の新規責任遺伝子を同定するため、エクソーム解析に加えて bodymap データから独自にリストアップした甲状腺に特異的に発現する遺伝子群、ラット甲状腺原基での高発現が先行研究で示されている遺伝子群を標的遺伝子解析法で解析し、新規候補遺伝子 T を同定した。

A. 研究目的

先天性甲状腺機能低下症は最も高頻度の先天性内分泌疾患であるが、その機序の大半は不明である。本研究は、先天性甲状腺機能低下症の発症に関わる新規責任遺伝子の同定を目的に行った。

B. 研究方法

（1）試料

本研究のために全国の小児内分泌科医から提供された、先天性甲状腺機能低下症患者の末梢血 453 検体を開始試料とした。このうち 25 検体はエクソーム解析に、428 検体は標的遺伝子解析にそれぞれ供した。

（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）解析対象遺伝子

① エクソーム解析

SureSelect All Exon Kit v5（Agilent）で選択的濃縮可能な全遺伝子を解析対象とした。

② 標的遺伝子解析

我々は本研究の平成 23 年度の課題として bodymap プロジェクトのデータから正常 15 器官（甲状腺を含む）の RNA 発現データベースを作

成した。このデータベースから、甲状腺に特異的に発現する遺伝子をリストアップした。標的遺伝子解析では、既知の先天性甲状腺機能低下症責任遺伝子に、bodymap データにもとづきリストアップされた甲状腺に特異的に発現する遺伝子群、および、先行研究で示されたラット甲状腺原基に高発現する遺伝子群（Fagman H et al., Dev Biol 2011;359:163-175）を加え、計 120 遺伝子を選択した。Agilent 社のウェブページ SureDesign（<https://earray.chem.agilent.com/suredesign/>）を利用し、これら遺伝子のエクソン領域を選択的に濃縮するための相補的 RNA 群（SureSelect カスタムキット）をデザインした。

（3）遺伝子解析

末梢血白血球細胞から抽出したゲノム DNA 2 μ g を Covaris で断片化し、SureSelect All Exon Kit v5 もしくはカスタムキットを用いて解析対象遺伝子を選択的に濃縮した。塩基配列決定はエクソーム解析は HiSeq（Illumina）で、標的遺伝子解析は MiSeq（Illumina）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（Novoalign、SAMtools、GATK、ANNOVAR など）による標準パイプラインで解析し、バリエント（多型、変異）の一覧リストを出力した。

C. 研究結果

エクソーム解析では、患者 1 名あたり 200-250 種のバリエーションが同定されたが、このうち複数患者で共有され、他疾患のエクソーム解析データではバリエーションが認められない遺伝子は同定されなかった。しかし、Fagman らがラット甲状腺原基で高発現する遺伝子として報告した T 遺伝子のフレームシフト変異が 1 名で同定された。

標的遺伝子解析では、約 20% の患者において既知責任遺伝子に変異が同定された。候補遺伝子解析では、複数の遺伝子で変異の可能性の考えられるバリエーションが同定されたが、その大半はバリエーションを有する患者が 1 名のみであり、これらは疾患発症との関連性は不明確と判断した。エクソーム解析のデータもあわせ、2 名以上でバリエーションを同定した遺伝子は、前述 T 遺伝子を含む 3 遺伝子であった。T 遺伝子において、標的遺伝子解析で新たに同定された変異もフレームシフト変異であった。残り 2 遺伝子に同定されたバリエーションはいずれもミスセンスバリエーションであり、機能異常をきたすか否かについては慎重な判断が必要と考えられた。

患者表現型解析では T 遺伝子にバリエーションを有する 2 名の患者はいずれも異所性甲状腺であった。

D. 考察

エクソーム解析は、解析の網羅性が強みであるが、解析費用の高さゆえに多数検体の解析には制約がある。本分担研究ではエクソーム解析と、組織発現データ・先行研究のデータを基礎とした標的遺伝子解析を組み合わせることにより、時間的・経済的に効率的な次世代シーケンシング解析を行った。

上記解析の結果、遺伝性先天性甲状腺機能低下症の新規候補遺伝子を 3 種同定した。このうちのひとつ T 遺伝子は、Fagman らの研究によりラット甲状腺原基で高発現することが示されており、患者表現型（異所性甲状腺）と照らし合わせても矛盾ない所見と考えられる*。

*註 哺乳類の甲状腺は発生過程でまず咽頭舌部に甲状腺原基が生じる。その後、尾側へ移動しながら機能的分化と細胞増殖を起し、最終的に成熟した甲状腺を形成する。このため、甲状腺発生初期の甲状腺（すなわち甲状腺原基）で役割を持つ遺伝子の異常は異所性甲状腺をきたすと予想される。

これまで、異所性甲状腺における遺伝子異常の報告は皆無であり、T 遺伝子の変異の関与が証明できれば、現時点でその病態の大部分が不明である異所性甲状腺の分子レベルでの発症機序解明につながる重要な所見となると考えられる。今後、分子機能解析などを通じて、変異と疾患の関連性を検証する予定である。

E. 結論

エクソーム解析と標的遺伝子解析を組み合わせる独自の手法で先天性甲状腺機能低下症患者由来 DNA 検体を解析し、新規候補遺伝子 3 種を同定した。先天性甲状腺機能低下症においても、次世代シーケンシングは有力な新規責任遺伝子探索手法であると考えられる。

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

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

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

副腎機能低下症患者に対するエクソーム解析で同定した新規候補遺伝子（S 遺伝子）の分子機能解析と患者表現型解析を行った。5 種の変異型 S 遺伝子は全て HEK293 細胞に著明な細胞増殖抑制効果を発揮し、病原性変異であることを確認した。変異陽性患者は成長障害、造血異常など特徴的な副腎外合併症があり、新規の症候群と考えられた。

A. 研究目的

先天性副腎機能低下症のうち主要病型である副腎過形成症の大部分は、*CYP21A2* など既知責任遺伝子の変異で説明されるが、副腎低形成症（アジソン病；厚生労働省の特定疾患治療研究事業対象）の病因に関する知見は不十分である。本研究は、先天性副腎機能低下症（主に副腎低形成症）の新規責任遺伝子同定を目的に行われた。

B. 研究方法

平成 24 年度までに候補遺伝子 S 遺伝子のヘテロ接合性変異を 6 家系 7 名（変異は 5 種類）で同定していた。本研究では、これら 5 種の変異型遺伝子 S の病原性の検証、および変異陽性患者の臨床的特徴を解析するために行われた。

（1）発現実験

患者表現型（副腎低形成）から、S 遺伝子はたんぱく質発現により細胞増殖が抑制される遺伝子と予想された。このような遺伝子の発現実験は一過性発現では困難であり（遺伝子導入された細胞が増殖しないため）、また、単純に安定発現株を作製しても、S 遺伝子発現レベルの低いクローンが選択される（遺伝子発現が高いクローンは、その細胞増殖抑制作用により増殖できないため）可能性を考慮し、誘導発現が可

能な安定発現株を樹立する方針とした。

pBQ812 (System Biosciences) ベクターに、赤色蛍光たんぱく質 (RFP) タグ付加 S 遺伝子 cDNA を挿入した。piggybac システムを用いて、このプラスミドをゲノムに組み込んだ HEK293 細胞を樹立し、これがインデューサーの cumate の添加により濃度依存的に S 遺伝子を発現することを確認した。5 種の変異型はそれぞれ site directed mutagenesis 法で作製し、同様に安定発現株を樹立した。

野生型および変異型 S 遺伝子産物のたんぱく質発現レベルはウェスタンブロットで、細胞内局在は蛍光顕微鏡観察で、それぞれ評価した。S 遺伝子発現による細胞増殖への影響は、タイムラプス顕微鏡によるコンフルエンスの経時的変化をもとに評価した。細胞周期への影響は、フローサイトメトリー法で評価した。

（2）臨床像解析

S 遺伝子変異陽性患者の診療担当医と連携し、性別、年齢、家族構成・家族歴、周産期情報（在胎週数、出生体重、妊娠経過中の異常所見の有無など）、副腎不全の発症、診断（生化学的副腎機能、副腎画像所見など）、治療の経過、副腎外合併症（成長障害、知能障害、外性器異常、その他の臓器特異的な異常）につき情報を収集した。

(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。

C. 研究結果

培地への cumate 添加により RFP タグつき S 遺伝子(野生型もしくは変異型)を誘導発現する HEK293 細胞を樹立し、解析に用いた。ウェスタンブロットでは、変異型 S 遺伝子 5 種に由来するたんぱく質発現量は野生型のたんぱく質発現量に対し有意差を認めなかった(図 1、上)。RFP に対する蛍光観察を利用した細胞内局在の検討では、変異型 S 遺伝子 5 種は野生型 S 遺伝子と同様に、細胞内に顆粒状に存在した(図 1、下)。各種細胞内器官マーカー(小胞体、ゴルジ体、リソゾーム、エンドソーム、エクソソームなど)と S 遺伝子の共局在を検討したが、いずれとも共局在せず、S 遺伝子が局在する細胞内小器官は特定できなかった。

誘導性安定発現株を約 10%のコンフルエンスで 96 ウェルプレートに培養し、S 遺伝子を誘導した。7 日間連続、3 時間毎にコンフルエンスを計測し、細胞増殖に対する S 遺伝子発現の影響を評価した。野生型 S 遺伝子を誘導すると、誘導しなかった対照細胞に対しごくわずかな細胞増殖抑制効果が認められた。一方、変異型 S 遺伝子 5 種いずれも、誘導により著明な細胞増殖抑制効果を発現した(図 2)。

フローサイトメトリー法を用いた、細胞周期への S 遺伝子(野生型、変異型)誘導の影響の検討では、有意な影響は確認されなかった。

(2) 臨床像解析

6 家系 7 名の S 遺伝子変異陽性副腎皮質機能低下症患者の臨床情報を収集比較したところ、これら 7 名は極めて酷似した共通の臨床像をとることが判明した。7 例全例が出生前からの成

長障害を指摘されており、胎児仮死徴候出現を契機に緊急帝王切開で出生していた。出生後成長も全例で不良であるほか、精神発達遅滞も全例で認められた。XY 核型を有する個体 4 例はいずれも矮小陰茎、尿道下裂、停留精巣など外性器形態の異常があり、うち 1 例は完全女性型外性器のため女兒として養育されていた。この他、乳児期の造血異常が全例で認められた。

D. 考察

本研究では、エクソーム解析を中核として遺伝子解析研究を通じて抽出された先天性副腎機能低下症の新規責任遺伝子候補 S 遺伝子が、真の責任遺伝子であることを証明するため、S 遺伝子の分子機能の解析および変異陽性患者の臨床像解析を行った。

分子機能解析では、S 遺伝子が細胞増殖抑制作用を有すること、患者で同定された変異型の S 遺伝子は、内因性の細胞増殖抑制作用が過剰であることを示した。これらのデータは、患者で同定された 5 種の変異は機能亢進型変異であることを示唆するが、患者がいずれもヘテロ接合性変異で発症することと矛盾しないと考えられる。

また、臨床像解析では 6 家系 7 名の変異陽性患者は、副腎機能低下症以外の特徴的な臨床所見(著明な成長障害、精神運動発達遅滞、XY 個体における性分化疾患、造血異常など)が共通しており、この点も、S 遺伝子が責任遺伝子であることを示唆する所見と考えられた。上記の臨床症状の組み合わせはこれまで報告がなく、S 遺伝子異常症は新規の症候群と考えられた。

E. 結論

エクソーム解析を通じて同定された先天性副腎機能低下症の新規候補遺伝子の機能解析

を発現実験系で行い、変異の病原性を確認した。変異陽性者の臨床像解析では、共通の臨床像が明らかになった。この臨床像はこれまで記載のある副腎低形成症候群に合致せず、新規の症候群と考えられた。

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

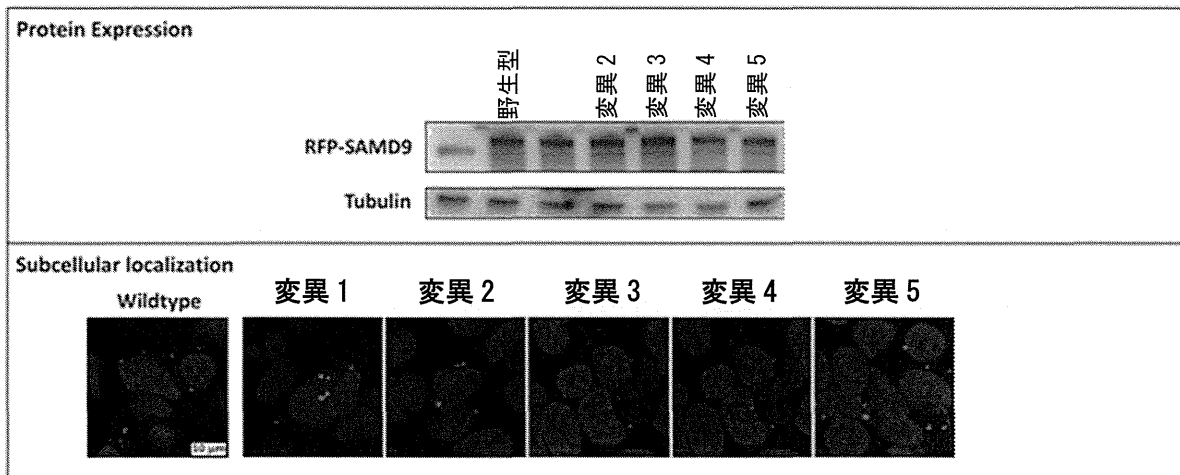


図1 野生型および変異型Sのたんぱく質発現と細胞内局在。いずれの変異も野生型と有意な差異を認めなかった。

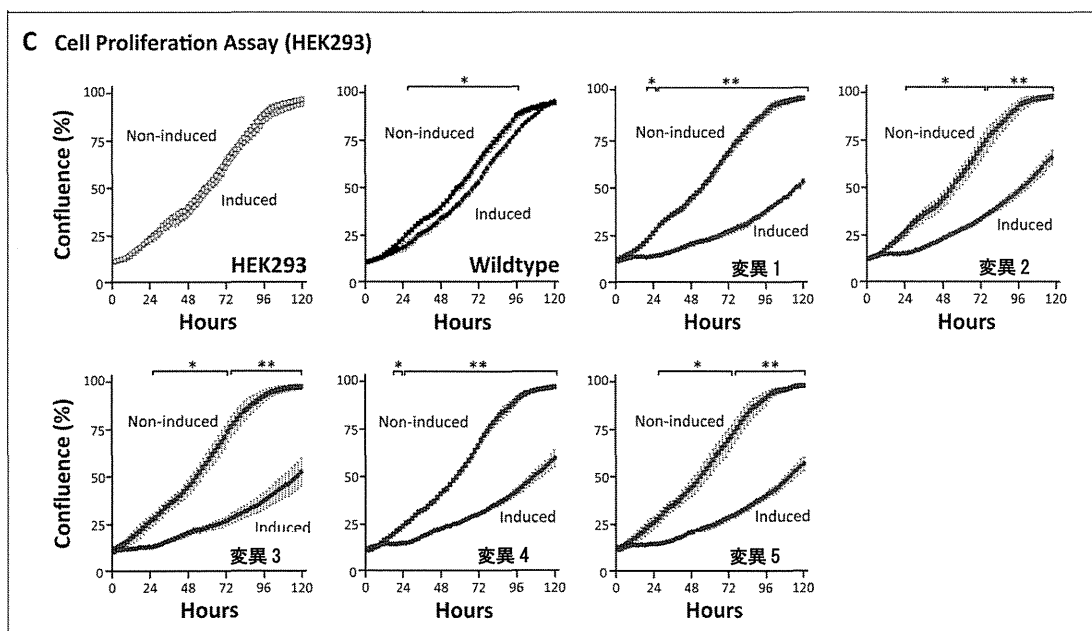


図2 細胞増殖アッセイ。野生型ではS遺伝子を誘導した細胞（図中 Induced）は誘導していない細胞（図中 Non-induced）と比較してごくわずかな細胞増殖速度の低下が観察された。変異型S遺伝子を誘導すると、非誘導時と比較して著明な細胞増殖抑制が認められた。

ヒト 27 器官の RNA 発現データベースの作成

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 専任講師

研究要旨

先天性内分泌疾患の新規責任遺伝子を同定する上で、内分泌器官特異的に発現する遺伝子のカタログは効率的な研究遂行上有用と考えられる。我々はすでに 15 器官の RNA 発現データベースを作成したが、今回、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。

A. 研究目的

内分泌器官（甲状腺、副腎、精巣、卵巣）を含むヒト正常器官の RNA 発現データベースの作成。

B. 研究方法

（1）データ取得・解析

RNA-シーケンシングのデータは、The Human Protein Atlas プロジェクトが行った健全なヒト 27 器官（脂肪、副腎、虫垂、膀胱、骨髄、大脳皮質、結腸、十二指腸、食道、胆嚢、心筋、腎、肝、肺、リンパ節、卵巣、睪嚢、胎盤、前立腺、唾液腺、皮膚、小腸、脾臓、胃、精巣、甲状腺、子宮）の RNA-シーケンシング解析のものを利用した（下線は古典的内分泌臓器を示す）。

本分担研究では、下記ウェブサイトからそれぞれ 27 器官分の FPKM 値*のデータをダウンロードした。

The Human Protein Atlas

<http://www.proteinatlas.org/>

*Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments 次世代シーケンシングリード数にもとづき、RNA 産物長を補正した RNA 発現量の指標

ダウンロードしたファイル（全データが単一のファイルに格納されている）を Linux コマンドで器官別に分け、縦軸：遺伝子名、横軸：器官名 として Excel 2010 に展開できるファイル形式に加工した。各器官の FPKM 値の raw data は、細胞の特性に影響を受けるため器官間の比較が困難である。このため、ヒストグラムの形状を共通にする Quantile 補正を行った。

（2）器官別発現データベースの作成と検証

上記解析で得られた器官別、遺伝子別の Quantile 補正済み FPKM 値を Excel 2010 のシートに展開した。発現量の器官特異性の指標として以下の通り Selectivity index を定義した。

$$\text{器官 O での遺伝子 G の Selectivity Index} = \frac{(\text{O での G の FPKM 値}) \text{ の平均}}{(\text{O を除く 26 器官での G の FPKM 値}) \text{ の平均}}$$

本データベースの有効性を評価するため、27 器官に特異的に発現すると予想される遺伝子の Selectivity index を確認した。

C. 研究結果

本解析により、27 器官につき 20,296 遺伝子の RNA 発現量 (FPKM 値) が含まれるデータベース

を作成した（図1）。本データベースは Excel 2010 で容易に扱うことができ、数値にもとづくフィルタリングや統計操作（平均値や中央値の演算処理など）を実行できることを確認した。

今回作成した The Human Protein Atlas からのデータにもとづくデータベースと、前回平成 23 年度に作成した Bodymap 2.0 からのデータにもとづくデータベースを比較したところ、両者の間に良好な相関関係が認められた（図2）。

次に、各器官で特異的発現を見せる既知遺伝子（甲状腺での TSH 受容体、肝での C reactive protein など）の Selectivity Index を参照し、各器官の解析の妥当性を検証した。その結果、27 器官では、特異的発現の知られる既知遺伝子がおおむね高い Selectivity Index を示すことが確認できた。また、前回平成 23 年度の検討では、Bodymap 2.0 に副腎が含まれていたものの、Selectivity Index の解析では ACTH 受容体、21 水酸化酵素など副腎に特異的に発現するはずの遺伝子が軒並み低値であり、妥当性を確認できなかったが、今回の The Human Protein Atlas からのデータでは、ACTH 受容体 Selectivity index 114.5（全遺伝子中 8 位）、21 水酸化酵素 Selectivity index 101.1（全遺伝子中 11 位）と期待された通りのデータが得られた。

D. 考察

本分担研究では The Human Protein Atlas の RNA-シーケンシングのデータを利用し、甲状腺、精巣、卵巣に加え、副腎を含むヒト 27 器官の RNA 発現量のデータベースを作成した。27 器官はそれぞれ特異的遺伝子が高い Selectivity index を示しており、ウェット実験、ドライ解析とも有効に行われていると考えられた。

エクソーム解析では約 2 万種の遺伝子を解析するため、偽陽性の制御、すなわち変異が発見された遺伝子が、真の疾患責任遺伝子か否かを見極めることが肝要である。これまで同定されてきた先天性内分泌疾患の責任遺伝子は、当該内分泌器官に特異的に発現する遺伝子が大半である。このた

め、今回作成した甲状腺、精巣、卵巣、副腎の発現データベースは、それぞれの器官の候補遺伝子の病因としての確からしさを判断する上で重要なリソースとなる。一方、下垂体、副甲状腺など他の内分泌器官の RNA 発現データベースは独自にデータを得る必要があり、今後の課題である。

E. 結論

公共で利用可能な RNA-シーケンスのデータを利用し、甲状腺、精巣、卵巣、副腎を含むヒト 27 器官の RNA 発現量のデータベースを作成した。このデータベースは、先天性内分泌疾患の新規責任遺伝子を同定する上での補助手段として有用と考えられる。

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

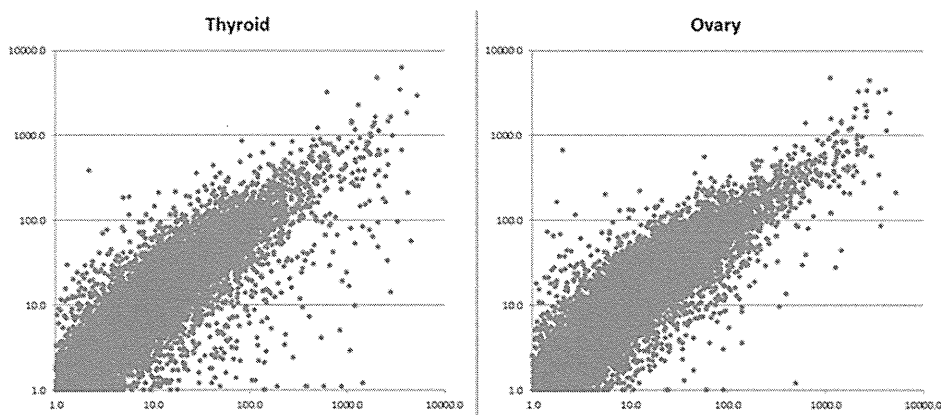
該当なし

図1 Protein Atlas のデータにもとづく器官別 RNA 発現量データベース

Gene	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC
ENSG00000174697	LEP	265	0.9	4.3	0.1	0	0	0.2	0.1	0.2	1	0.7	0.1	0	0	0.3	0	2.4	5.3	0	1.1	0	0.1	0.3	0	0	0	0
ENSG00000166819	PLIN1	917	11.6	3	1.2	0.9	1.8	1.9	0.4	1.3	5.4	5	0.4	27.7	0.1	2	1.4	5.9	0.2	0.8	18.4	0.8	0.8	0.5	0.4	2.9	1.4	0.5
ENSG00000176194	CIDEA	230	4.2	0.2	0	0	1.3	0.6	0.2	5.6	1.2	2.4	0	0.7	0	0.4	0	0.9	0	0	6	5.6	0.2	0	0.1	0	0.3	0.1

図中のデータは脂肪 (adipose tissue) の Selectivity Index の順にソートしてある。なお、最も Selectivity Index が高い遺伝子はレプチン (LEP) であった。

図2 Bodymap 2.0 にもとづく FPKM 値と ProteinAtlas にもとづく FPKM 値の相関



(左パネル) 甲状腺における比較 (R²=0.41) (右) 卵巣における比較 (R²=0.52)

横軸 : Bodymap 2.0 にもとづく FPKM 値 (対数表示) 縦軸 : ProteinAtlas にもとづく FPKM 値 (対数表示)

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）

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の患者 QOL の向上である。この目標達成のために社会への研究成果の還元・発信は必須である。本年度は中学校 3 年生を対象としたサイエンススクールを 1 回開催した。

A. 研究目的

本研究の目的は、研究班の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である。

B. 研究方法

昨年度に引き続き、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）を行う。

C. 研究結果

2013 年 11 月 28 日に、神奈川県内で中学校 3 年生を対象としたサイエンススクールをおこなった。参加者はおよそ 150 名であった。

D. 考察

厚生労働省大臣官房厚生科学課による「厚生労働科学研究費補助金公募要項」（難治・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）に、「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、国民との双方向性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。サイエンススクール（特別授業）はこの活動の一例として記載されている。すなわち、上記研究成果は国民との双方向性コミュニケーション活動に見合うものである。さらに、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となりうる。このことは間接

的な知的資産の社会的波及効果をもたらす。

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性コミュニケーションすることにより、研究成果が広く社会に発信・還元された。

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

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

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Ishii T</u>	Transcriptome analysis of adrenocortical cells in health and disease.	Alfredo Ulloa-Aguirre A, Conn MP	Cellular endocrinology in health and disease. 1st ed.	Academic Press	Waltham, MA	2014	169-192
<u>安達昌功</u>	Part 1 ホルモンの作用と病態: 成長ホルモンと身長増加	有阪治	ビギナーのための小児内分泌診療ガイド	中山書店	東京	2014	8-11
<u>安達昌功</u>	Part 2 さまざまな症状や検査異常への対応と診断・治療: 低身長	有阪治	ビギナーのための小児内分泌診療ガイド	中山書店	東京	2014	80-85
<u>佐藤武志、安達昌功</u>	耐性誘導療法によりアルグルコシダーゼαに対するアナフィラキシーを克服した小児型ポンペ病の1例	埜中征哉	ポンペ病症例集 - 早期診断・早期治療のために	メディカルトリビューン	東京	2014	31-35

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
Amano N, Mukai T, Ito Y, <u>Narumi S</u> , Tanaka T, Yokoya S, Ogata T, <u>Hasegawa T</u>	Identification and Functional Characterization of Two Novel <i>NPR2</i> Mutations in Japanese Patients with Short Stature.	J Clin Endocrinol Metab	94 (4)	E713-E718	2014
Takagi M, <u>Narumi S</u> , Asakura Y, Muroya K, <u>Hasegawa Y</u> , <u>Hasegawa T</u>	A novel mutation in <i>SOX2</i> causes hypogonadotropic hypogonadism with mild ocular malformation.	Horm Res Paediatr	81 (2)	133-138	2014
Sato T, Muroya K, Hanakawa J, Asakura Y, <u>Adachi M</u> , Aida N, Tomiyasu M, Tajima G, <u>Hasegawa T</u>	A neonatal patient with classic MSUD: the usefulness of ¹ HMRS on early diagnosis.	Pediatr Int	56	112-115	2014
Takagi M, <u>Ishii T</u> , Torii C, Kosaki K, <u>Hasegawa T</u>	A novel mutation in <i>SOX3</i> polyalanine tract: A case of kabuki syndrome with combined pituitary hormone deficiency harboring double mutations in <i>MLL2</i> and <i>SOX3</i> .	Pituitary		in press	2013
Takagi M, Sasaki G, Mitsui T, Honda M, Tanaka Y, <u>Hasegawa T</u>	A 2.0 Mb microdeletion in proximal chromosome 14q12, involving regulatory elements of <i>FOXP1</i> , with the coding region of <i>FOXP1</i> 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, <u>Hasegawa T</u>	A recurrent mutation in the 5'-UTR of <i>IFTM5</i> causes osteogenesis imperfecta type V.	Am J Med Genet A	161 A(8)	1980-1982	2013
Matsumoto T, Miyakoshi K, Saisho Y, <u>Ishii T</u> , 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

<u>Adachi M</u>	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, <u>Adachi M</u> , Takahashi E, Shiroyanagi Y, Yamazaki Y, Tanaka Y, <u>Hasegawa T</u>	Association between Graves' disease and renal coloboma syndrome: a case report.	Clin Pediatr Endocrinol	22	45-51	2013
Soneda A, <u>Adachi M</u> , Muroya K, Asakura Y, Takagi M, <u>Hasegawa T</u> , 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
<u>Adachi M</u> , 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
<u>Adachi M</u> , 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, <u>Hasegawa T</u> , <u>Hasegawa Y</u>	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, <u>Hasegawa Y</u> , 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, <u>Hasegawa Y</u>	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、 <u>安達昌功</u>	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、 <u>安達昌功</u>	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、 <u>安達昌功</u> 、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、 <u>安達昌功</u> 、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

IV. 研究成果の刊行物・別冊

Identification and Functional Characterization of Two Novel *NPR2* Mutations in Japanese Patients With Short Stature

Naoko Amano, Tokuo Mukai, Yoshiya Ito, Satoshi Narumi, Toshiaki Tanaka, Susumu Yokoya, Tsutomu Ogata, and Tomonobu Hasegawa

Department of Pediatrics (N.A., S.N., T.H.), Keio University School of Medicine, Tokyo 160–8582, Japan; Department of Pediatrics (T.M.), Asahikawa-Kosei General Hospital, Asahikawa 078–8211, Japan; Department of Basic Sciences (Y.I.), The Japanese Red Cross Hokkaido College of Nursing, Kitami 090–0011, Japan; Tanaka Growth Clinic (T.T.), Tokyo 158–0097, Japan; Department of Medical Subspecialties (S.Y.), National Center for Child Health and Development, Tokyo 157–0074, Japan; Department of Pediatrics (T.O.), Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431–3125, Japan; and Japan Growth Genome Consortium (T.M., Y.I., T.T., S.Y., T.O., T.H.)

Context: C-type natriuretic peptide-natriuretic peptide receptor B (NPR-B) signaling is critical for endochondral ossification, which is responsible for longitudinal growth in limbs and vertebrae. Biallelic *NPR2* mutations cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux, which is bone dysplasia characterized by severe short stature and short limbs. A monoallelic *NPR2* mutation has been suggested to mildly impair long bone growth.

Objective: The goal of this study was to identify and characterize *NPR2* mutations among Japanese patients with short stature.

Subjects and Methods: We enrolled 101 unrelated Japanese patients with short stature. *NPR2* and *NPPC* were sequenced, and the identified variants were characterized in vitro.

Results: In two subjects, we identified two novel heterozygous *NPR2* mutations (R110C and Q417E) causing a loss of C-type natriuretic peptide-dependent cGMP generation capacities and having dominant-negative effects. R110C was defective in trafficking from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. In contrast, Q417E showed clear cell surface expression.

Conclusions: We identified heterozygous *NPR2* mutations in 2% of Japanese patients with short stature. Our in vitro findings indicate that *NPR2* mutations have a dominant negative effect, and their dominant-negative mechanisms vary corresponding to the molecular pathogenesis of the mutations. (*J Clin Endocrinol Metab* 99: E713–E718, 2014)

C-type natriuretic peptide (CNP)-natriuretic peptide receptor B (NPR-B) signaling plays a critical role in endochondral ossification, which is responsible for longitudinal growth in limbs and vertebrae (1–3). *NPR2* encodes NPR-B, which transduces CNP signals. Knockout mice for *Nppc* (encoding CNP) or *Npr2* are severely dwarfed (4, 5). Biallelic loss-of-function *NPR2* mutations cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux (AMDM),

which is characterized by severe short stature and short limbs (6–9). In contrast, gain-of-function *NPR2* mutations were identified in patients with tall stature and macrodactyly (10, 11). These studies showed that CNP-NPR-B signaling is essential in skeletal development in humans.

In the first report of biallelic *NPR2* mutations causing AMDM, height SD scores (SDSs) of the probands' parents who were heterozygous carriers were lower than the mean

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2014 by the Endocrine Society

Received September 17, 2013. Accepted January 16, 2014.

First Published Online January 28, 2014

Abbreviations: AMDM, acromesomelic dysplasia, type Maroteaux; CNP, C-type natriuretic peptide; Endo H, endoglycosidase H; ER, endoplasmic reticulum; HA, hemagglutinin; ISS, idiopathic short stature; NPR-B, natriuretic peptide receptor B; PNGase F, peptide-N-glycosidase F; SDS SD score; WT, wild type.

height SDS of population-matched standards (7). In a large pedigree including an AMDM proband, who carried a homozygous mutation (p.I364fs), the mean height SDS of the heterozygous carriers was -1.8 ± 1.1 , whereas that of the noncarriers was -0.4 ± 0.8 (12). Based on these two studies, it is presumed that heterozygous *NPR2* mutations can mildly impair long bone growth. Recently heterozygous *NPR2* mutations were detected in a Brazilian cohort with idiopathic short stature (ISS) (13).

In this study, we conducted genetic analyses of these two genes in 101 Japanese patients with short stature of unknown etiology and performed functional analyses to elucidate the precise molecular mechanisms of the identified mutations.

Subjects and Methods

Details of subjects and methods are described in the Supplemental Data, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>.

Subjects

We enrolled 101 unrelated Japanese patients with short stature who were recruited by the Japan Growth Genome Consortium, a research network of Japanese pediatric endocrinologists (14).

Sequencing

NPPC and *NPR2* were sequenced. Variations were filtered with reference to the dbSNP database and the 1000 Genomes

Project database. Detected mutations were analyzed in 100 Japanese control individuals and the family members of mutation-carrying patients.

Functional characterization of mutant NPR-B

The hemagglutinin (HA)-tagged wild-type (WT) human NPR-B construct (HA-WT-NPR-B) has been described previously (8). All variants and myc-tagged WT NPR-B construct were generated. CNP-dependent cGMP response of transiently transfected COS7 cells were measured by a competitive enzyme immunoassay. Total protein expression of HA-NPR-B was determined by Western blotting. Deglycosylation experiments were performed, and the effect of brefeldin A was evaluated. The subcellular localization of HA-NPR-B was observed under a confocal microscope using immunofluorescence experiments. Co-immunoprecipitation experiments were performed after cotransfection of myc-WT-NPR-B and each HA-NPR-B construct.

Results

Characteristics of the subjects

The characteristics of the 101 subjects are shown in Supplemental Table 1.

Sequencing

We identified three novel *NPR2* variations (c.328C>T, p.R110C; c.559G>A, p.V187I; and c.1249C>G, p.Q417E) in three subjects and no novel *NPPC* sequence variation (Figure 1A). These three *NPR2* variations were absent in the 100 con-

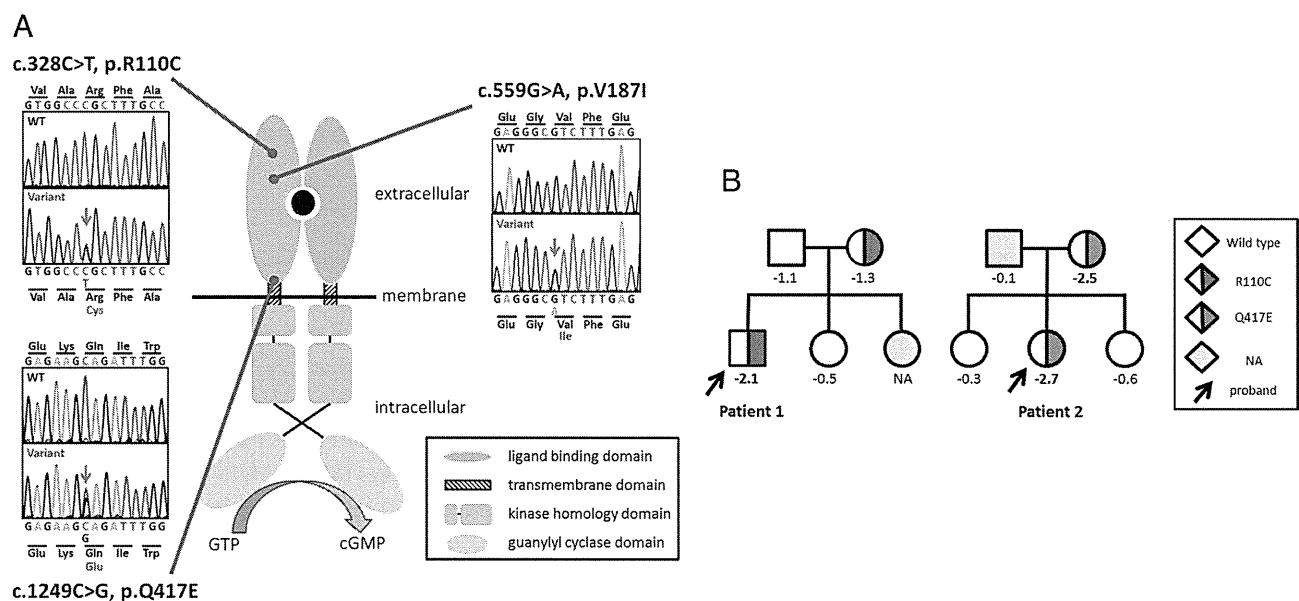


Figure 1. Identification of three *NPR2* sequence variations. A, A schematic diagram of NPR-B protein, which acts as a dimer and has an extracellular ligand binding domain, a transmembrane domain, a kinase homology domain, and a guanylyl cyclase domain. The blue closed circle is CNP. Three sequence variations are visualized by chromatograms. The three heterozygous substitution of cysteine in place of Arg110, isoleucine in place of Val187, and glutamic acid in place of Gln417 are indicated by arrows. The three sequence variations are located in the ligand binding domain. B, Pedigrees of patient 1 and patient 2 are shown. The values under the symbols show height SDS. NA, not available.

tol individuals. The three *NPR2* variants were located in the extracellular domain.

Functional characterization of NPR-B variants

To examine the pathogenicity of the three variations, we evaluated the CNP-dependent, cGMP-producing capacities. R110C showed a negligible cGMP response, and Q417E showed a markedly low response (Figure 2A). V187I had a comparable response with WT, indicating that the variant is functionally neutral.

We characterized HA-WT-NPR-B using Western blotting. HA-WT-NPR-B (total cell lysate, untreated) showed two bands (Figure 2B). Peptide-N-glycosidase F (PNGase F) treatment showed a single digested product band of smaller molecular size (Figure 2C), indicating that the two bands were derived from N-linked glycosylated protein. The lower band was sensitive to endoglycosidase H (Endo H), which digests the sites of N-glycosylation occurring in the endoplasmic reticulum (ER), whereas the upper band was digested by O-glycosidase, which digests the sites of O-glycosylation occurring in the Golgi apparatus. These results indicate that the lower band corresponded to N-glycosylated NPR-B produced in the ER, whereas the upper band corresponded to the mature NPR-B with N- and O-glycosylation produced in the Golgi apparatus. Treatment with brefeldin A, which inhibits protein transportation from the ER to the Golgi apparatus, resulted in the same immunoreactive pattern as that of O-glycosidase (Figure 2D). This result also indicates that the upper band was derived from the fully glycosylated NPR-B in the Golgi apparatus.

To clarify the mechanisms underlying the two loss-of-function mutants, we conducted a series of expression experiments *in vitro*. We performed Western blotting of the mutant HA-NPR-B. R110C showed only the lower band, whereas Q417E appeared as two bands (Figure 2E), indicating that R110C did not exist in the O-glycosylated form. We analyzed the subcellular localization of HA-NPR-B with an HA epitope in the extracellular domain. Under the nonpermeabilized condition, WT and Q417E displayed cell surface expression, whereas R110C did not (Figure 2F). Under the permeabilized condition, R110C was colocalized with an ER marker (Figure 2F).

We assessed possible dominant-negative effects of the two mutants. Coexpression of each mutant and WT led to a significant loss in the CNP-dependent cGMP response compared with that of the empty vector and WT, indicating a dominant-negative effect (Figure 2G).

To elucidate mechanisms causing the dominant-negative effects, we conducted further expression experiments. We performed Western blotting using cells coexpressing HA-WT-NPR-B and HA-R110C-NPR-B (Figure 2I). A

decrease in the upper band (fully glycosylated receptor) and parallel an increase in the lower bands (N-glycosylated, not O-glycosylated) were observed in cells coexpressing the R110C mutant. To evaluate the interaction between WT and each mutant, we performed coimmunoprecipitation (Figure 2H). After precipitation of total cell lysates with an anti-HA antibody, immunoblotting of the precipitates with an antimyc antibody showed that both HA-R110C-NPRB and HA-Q417E-NPRB interacted with the myc-WT-NPR-B.

Family analyses and clinical phenotypes

The mutations (R110C and Q417E) were transmitted from their mothers (Figure 1B). Patient 1 showed normal serum IGF-I and normal GH responses by stimulation tests of arginine, L-DOPA, and growth hormone releasing hormone. After introduction of recombinant human GH treatment (50 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{d}$) for 2 years, the patient's height velocity slightly improved. However, the patient's adult height SDS was -2.8 (Supplemental Figure 1). Height SDS of the patient's mother was -1.3 . Patient 2 also showed normal serum IGF-I level, and the patient's adult height SDS was -2.6 . The patient's mother had short stature (height SDS, -2.5) (Supplemental Table 2).

Discussion

In the present study, we identified three *NPR2* variants (R110C, V187I, and Q417E) in a Japanese short stature cohort. The Arg110 residue is highly conserved among vertebrate species, whereas Val187 and Gln417 are conserved among terrestrial animals but not in fish (Supplemental Figure 2). Functional studies showed that R110C and Q417E lost the CNP-dependent cGMP generation capacities and had dominant-negative effects in different manners *in vitro*.

We identified heterozygous *NPR2* mutations in 2% (95% confidence interval 0%–7%) of Japanese patients with short stature. Assuming that the prevalence of AMDM is 1 in 2 000 000 by comparing the number of patients with AMDM with that with achondroplasia in the Little People of America, regardless of ethnicities, the frequency of heterozygous *NPR2* mutation carriers is calculated to be approximately 1 in 700 (12). Hypothesizing that the effect of a heterozygous *NPR2* mutation on height SDS is -1.8 according to the previous report, 2.6 in 100 subjects with short stature, which is defined as height SDS less than -2.0 , are expected to be heterozygous for the *NPR2* mutation. This estimation is consistent with our observation. Recently *NPR2* mutations were identified in 6% of the Brazilian cohort with ISS (13). Further studies

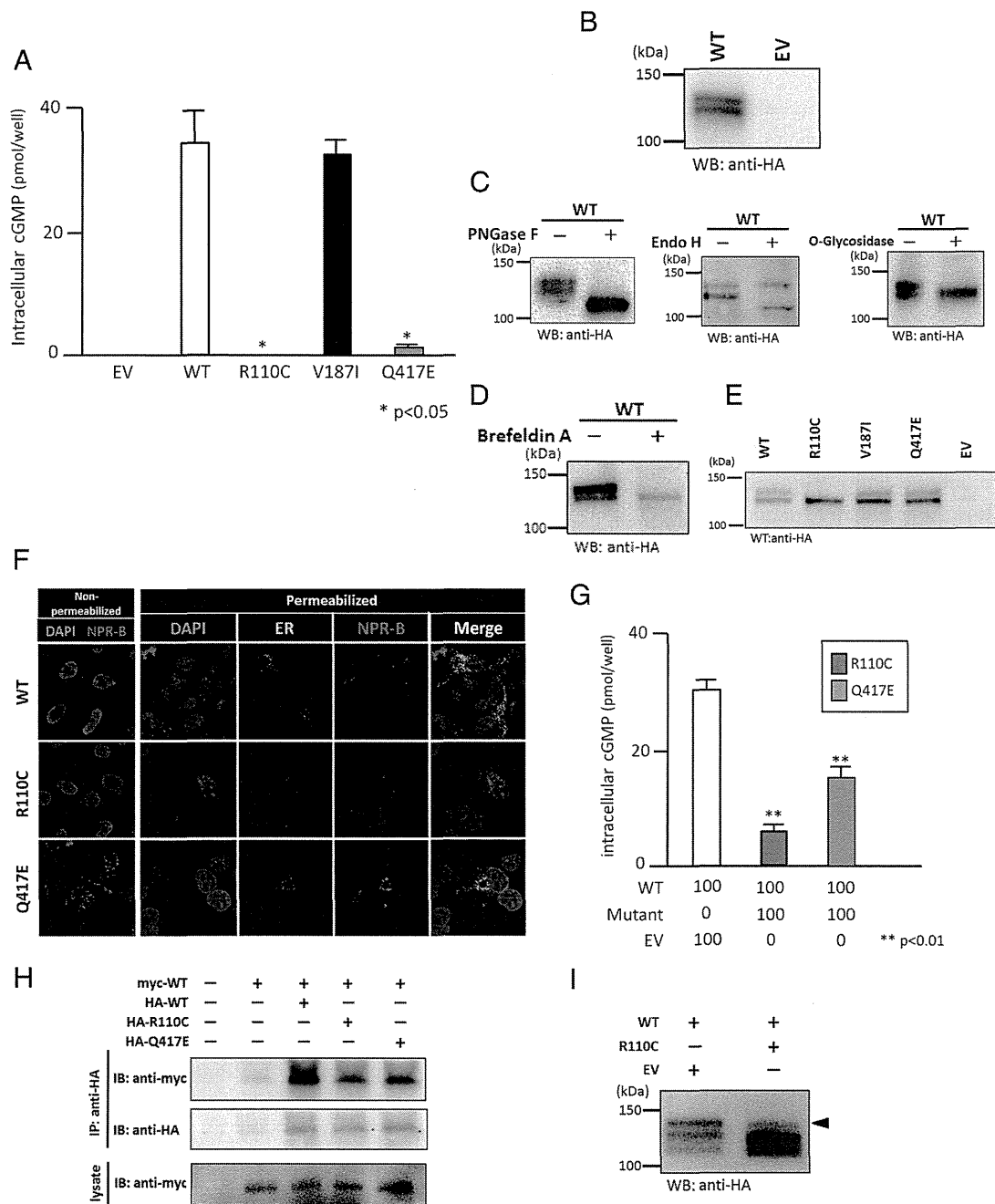


Figure 2. Functional characterization of the three NPR-B variants. A, CNP-stimulated cGMP accumulation in COS7 cells transiently transfected with empty vector (EV), wild-type (WT), and the three NPR-B variants (R110C, V187I, and Q417E) were evaluated. Data are presented as the mean \pm SEM of triplicate samples and are representative of three independent experiments. B, Western blotting analysis of COS7 cells expressing HA-WT-NPR-B revealed two bands. C, Western blotting analysis of HA-WT-NPR-B, which was deglycosylated with PNGase F, Endo H, or O-glycosidase/neuraminidase is shown. Both bands were sensitive to PNGase F (left panel). The lower band was digested by Endo H (middle panel), whereas the upper band was sensitive to O-glycosidase/neuraminidase (right panel). D, Western blotting analysis of HA-WT-NPR-B under treatment with brefeldin A is shown. Only the lower band was detected. E, Western blotting analysis of HA-NPR-B (WT, R110C, and Q417E) shows that WT and Q417E revealed two bands, whereas R110C did as a single band. Migrations of molecular mass markers (in kilodaltons) are shown on the left of each panel in B–E. F, Subcellular localization analyses of HA-NPR-B proteins in COS7 cells under the nonpermeabilized or permeabilized condition are shown. WT (red) and Q417E (red) showed clear plasma membrane expression in nonpermeabilized cells, whereas R110C (red) colocalized with an ER (green) marker in permeabilized cells. G, CNP-stimulated cGMP accumulation in cells transfected with WT/R110C or WT/Q417E NPR-B is shown. H, Coimmunoprecipitation analysis of WT and the mutants is shown. Lysates from cells expressing myc-WT-NPR-B and HA-NPR-B (WT or mutants) were precipitated (IP) with an anti-HA antibody. The myc-WT-NPR-B alone and myc-WT-NPR-B being coexpressed with HA-NPR-B were used as negative and positive controls, respectively. Samples were assessed by Western blotting using anti-myc (top panel) and anti-HA antibodies (middle panel). As a control, the amount of myc-HA-NPR-B was verified in total cell lysates (bottom panel). The bands corresponding to HA-NPR-B (R110C and Q417E) were present in immunoprecipitates from cells coexpressing myc- and HA-WT-NPR-B (top panel). I, Western blotting analysis in cells coexpressing WT and R110C showed that the upper band (arrowhead) decreased and the lower bands increased.