

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19630

研究課題名(和文) 偽性副甲状腺機能低下症1Bにおけるメチル化異常の遺伝的背景は？

研究課題名(英文) Genomic background of pseudohypoparathyroidism 1B

研究代表者

高谷 里依子 (takatani, rieko)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20772370

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：1)広範囲のメチル化異常を示した孤発性PHP1B患者27例について遺伝学的解析を施行した。2)20番染色体のマイクロサテライト解析にて、27例中2例に20番染色体長腕の父性片親性ダイソミー(patUPD20q)を認めた。3)patUPD20q 認めなかった25例のうち23例についてSTX16-GNAS locusでのターゲットゲノムシーケンス解析を施行した。新規変異、微小な父性片親性ダイソミー、微小な欠失はいずれも検出できなかった。4)1例についてはSNP-CGHアレイを施行した。コピー数の異常やloss of heterozygosityは認めなかった。

研究成果の概要(英文)：1)I did genomic study of 27 pseudohypoparathyroidism 1B (PHP1B) patients with broad methylation changes at GNAS locus. 2) I found 2 patients had paternal uniparental disomy at long arm of 20 chromosome out of 27 sporadic PHP1B patients. 3) Regarding 23 patients, I did whole genome sequence at STX-GNAS locus. I did not see new findings. 4) Regarding 1 patient, I did SNP-CGH array study. I did not see loss of heterozygosity.

研究分野：小児科

キーワード：偽性副甲状腺機能低下症1B インプリンティング異常症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

(1) 研究開始当初の背景

偽性副甲状腺機能低下症 1 B (Pseudohypoparathyroidism type 1B; PHP1B) における、副甲状腺ホルモン (PTH) への抵抗性は、腎臓近位尿細管で *Gs* expression が欠如または低下することに起因する (Mantovani et al. JCEM 2011 など)。PHP1B 症例の genomic DNA では、染色体 20 番の長腕に位置する *GNAS* locus のメチル化可変領域の広範囲のメチル化異常または一部のメチル化異常をきたし疾患の原因とされている。PHP1B 症例は、ほとんどが孤発だが、一部で家族発症を示す。家族例の場合、常染色体優性遺伝の形式をとり、*STX16* または *GNAS* において母由来の欠失を認め、メチル化異常の原因として報告されている (Richard et al. JCEM 2012, Elliott et al. JCEM 2014 など)。また、孤発例の一部では、*GNAS* が位置する 20 番染色体長腕の父性片親性ダイソミーを有し、メチル化異常の原因となっているが知られている (Dixi et al. JCEM 2013)。しかし、大部分の症例ではメチル化異常の遺伝学的背景は未だ不明である。

(2) 研究の目的

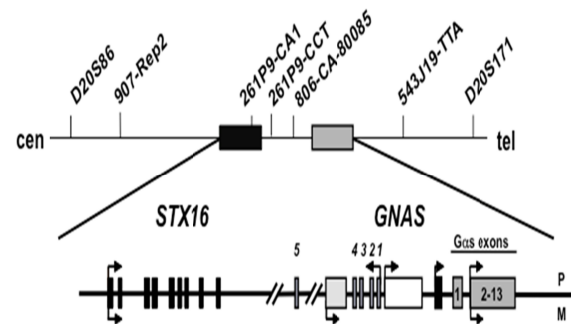
上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究ではメチル化異常の遺伝学的背景についての、分子遺伝学的研究を完成し、今後の診断方法や遺伝カウンセリングに展開することを目的とした。また、遺伝学的背景を明らかにすることで、未だに解明されていない、メチル化成立のメカニズムについて解明の手がかりになることが期待される。

(3) 研究の方法

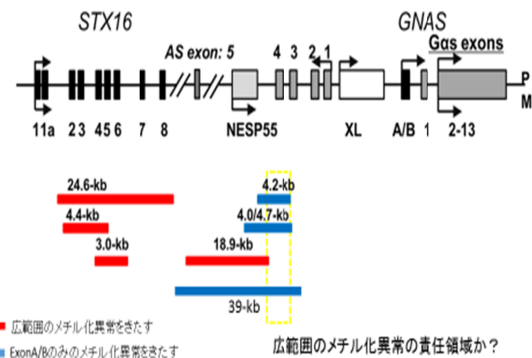
臨床的に PHP1B と診断された症例を収集し、末梢血白血球から genomic DNA を抽出した。MS-MLPA 法にて *GNAS* locus のメチル化状態を解析した。*GNAS* locus において広範囲のメチル化異常を呈している症例を本研究

の対象とした。

片親性ダイソミーを検出するために染色体 20 番のマイクロサテライト解析を行った。



申請者が報告した PHP1B 患者における新規母由来の欠失 (Takatani et al. JBMR 2016.) と過去に報告されている欠失 (Bastepe et al. Nat Genet 2005, Chillyambhi et al. JCEM 2010) から、*GNAS* locus に位置する AS4 と AS3 を含む領域が広範囲のメチル化異常の責任領域であることを推測し、この領域の塩基配列を確認する。具体的には PCR ダイレクトシーケンス法を施行した。



上記のマイクロサテライト解析では、マーカー間に存在する微小な欠失や父性片親性ダイソミーについては検出不能である。それまでの手法では検出できなかった微小な父性片親性ダイソミーや欠失を同定するために SNP-CGH アレイ解析を施行した。

②～④の方法で、メチル化異常の遺伝的背景を同定できない症例が存在することが予

想された。したがって、同定できなかった症例については、新たな構造異常の発見が期待し、発端者と両親について *STX16-GNAS* locus で全ゲノムシーケンスを施行した。

(4) 研究成果

GNAS locus のメチル化解析

臨床的に PHP が疑われる 14 症例の末梢白血球から genomic DNA を抽出した。*GNAS* locus の MLPA および MS-MLPA を施行した。5 例に *GNAS* locus のメチル化異常を認めた。そのうち 1 例は *STX16* において母由来の既知の欠失を認めた。

残る 4 例については MS-MLPA 法にて *GNAS* locus における広範囲のメチル化異常を認めるものの、MLPA 法にてコピー数の異常は認めなかった。

これらの 4 例とこれまでに解析していた同様の結果 (MS-MLPA 法にて *GNAS* locus における広範囲のメチル化異常を認めるものの、MLPA 法にてコピー数の異常は認めない) を示す 23 例を加えた合計 27 症例を本研究の対象とした。

染色体 20 番のマイクロサテライト解析 27 例中 24 例にて染色体 20 番のマイクロサテライト解析を施行した。

全てのマーカーで homozygous を示した 2 症例については、親の解析結果も合わせて 20 番染色体長腕の父性片親ダイソミーを有していると証明した。

AS 4 と AS 3 を含む領域にシーケンス 27 例中 22 例について *GNAS* locus の広範囲のメチル化異常の原因と推測している領域に PCR ダイレクトシーケンスを施行した。

施行した検体いずれも、新規の変異や欠失を認めなかった。

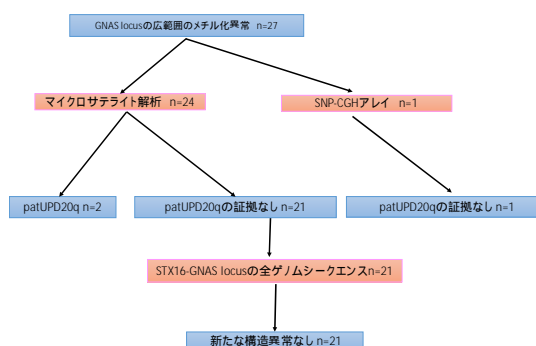
SNP-CGH アレイ解析

上記方法でメチル化異常が証明できなかった症例のうち 1 例で SNP-CGH アレイを施行した。しかしながら、片親性ダイソミー、欠失いずれも検出できなかった。

STX16-GNAS locus で全ゲノムシーケンス

～④の方法で遺伝学的背景を同定できなかった 21 例について *STX16-GNAS* locus で全ゲノムシーケンスを施行した。しかしながら微小な父性片親性ダイソミーや欠失を同定できなかった。また、新たな構造異常を検出することもできなかった。

今回の研究のまとめ



以上の結果より、今回の研究では孤発性偽性副甲状腺機能低下症 1 B の新たな遺伝学的異常を検出することはできなかった。

孤発性偽性副甲状腺機能低下症 1 B の遺伝学的責任領域は *STX16-GNAS* locus 以外にある、もしくは、孤発性偽性副甲状腺機能低下症 1 B の多くはメチル化異常を呈するが、DNA の配列や構造に異常を示さない、と考察した。

(5) 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

〔学会発表〕(計1件)

高谷 里依子、Harald Juppner. 弧発性偽性副甲状腺機能低下症 1B(sporPHP1B)におけるメチル化パターンと臨床指標の相関性. 日本小児内分泌学会. 2016年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 計0件

(6) 研究組織

研究代表者

高谷 里依子 (TAKATANI Rieko)

千葉大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 20772370