

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21665

研究課題名(和文) 偽性副甲状腺機能低下症1bにおけるインプリンティング異常発症機序の解明

研究課題名(英文) Molecular genetic analyses of the mechanism of pseudohypoparathyroidisms type 1b

研究代表者

中村 明枝 (Nakamura, Akie)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90724708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は偽性副甲状腺機能低下症の症例を集積し、分子遺伝学的要因を同定した。更に、GNAS A/B領域の軽度低メチル化を呈する兄妹例において、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析によりXLASとA/B領域の間に1100bpのレトロトランスポゾン由来の挿入配列を確認した。ドロップレットデジタルPCRを用いた遺伝子発現解析によりNESP55発現低下傾向を認め、今後、更に詳細な遺伝子解析を確認するため、RNA-Seq解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：We clarify the molecular basis of PHP cases. Furthermore, we identified a family case of PHP1b with mild hypomethylation of GNAS A/B. We performed whole genome sequence analysis with next generation sequencer and found out

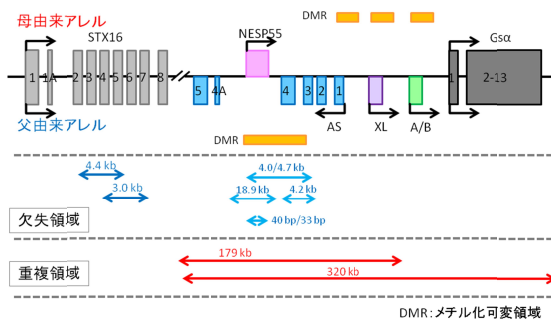
研究分野：小児内分泌

キーワード：インプリンティング疾患 偽性副甲状腺機能低下症

1. 研究開始当初の背景

偽性副甲状腺機能低下症(以下 PHP)は副甲状腺ホルモン(以下 PTH)標的組織における PTH 抵抗性に特徴付けられる疾患で、組織特異的インプリンティングが起きる組織(腎近位尿管、甲状腺、下垂体、性腺)での Gs タンパクの発現異常により引き起こされる。これらの組織では母由来アレルの Gs タンパクのみが発現しており、母由来アレルの GNAS 遺伝子の機能喪失型変異により発症する PHP1a と、GNAS A/B の低メチル化により発症する PHP1b に分類される。PHP1b の大半は GNAS 領域全体のメチル化が父アレルのメチル化パターンとなる Sporadic PHP1b である。PHP1b の一部には、GNAS 領域より約 220 kb 上流に存在する STX16 遺伝子の微小欠失により GNAS A/B 単独の低メチル化をきたす家族性 PHP1b が報告されている。染色体構造異常による PHP として、NESP55 や AS の欠失症例でも GNAS A/B の低メチル化を来し、同領域内に GNAS 領域のメチル化を制御するシス因子が存在すると考えられていた。

図1. GNAS領域のインプリンティング制御機構と既報の染色体構造異常



2. 研究の目的

(1) STX16 遺伝子内のシス因子による GNAS A/B のメチル化制御機構の解明
STX16 遺伝子内のシス因子による GNAS A/B メチル化制御機構の解明: 先行研究で同定された GNAS 領域の染色体再構成を有する家族例、STX16 欠失症例において、STX16 遺伝子内に存在するシス因子による GNAS A/B のメチル化制御機構を明らかにする。

図2. 先行研究にて家族性PHP症例で同定された染色体再構成

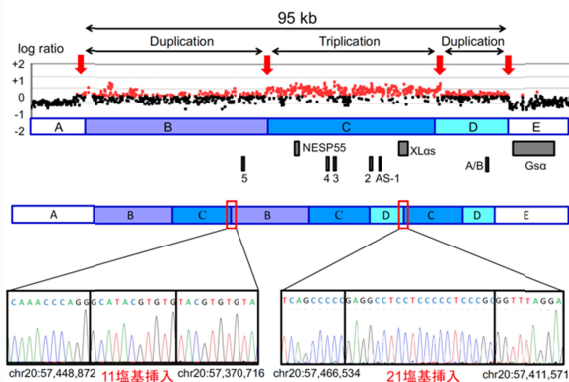
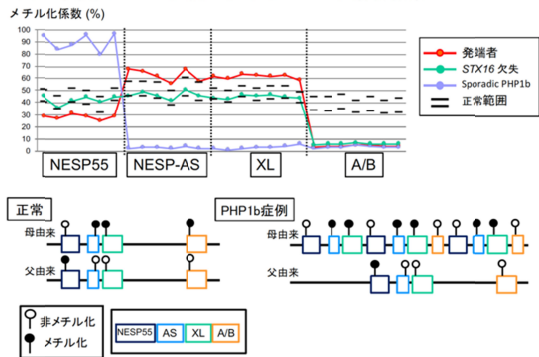


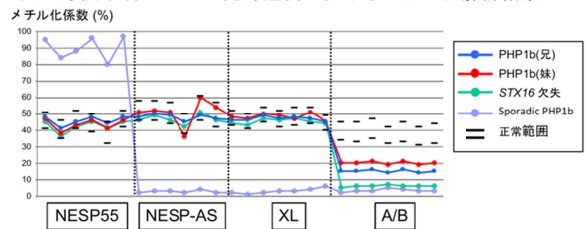
図3. 家族性PHP1b症例におけるメチル化解析結果



(2)原因不明の PHP 症例の発症メカニズムの解明

先行研究で同定された STX16 遺伝子や GNAS 領域のコピー数異常を認めない GNAS A/B 単独の低メチル化を来す PHP1b 兄妹例に対して、全ゲノムシーケンス解析を施行し、GNAS 領域でのシス因子の塩基置換や微小欠失・重複などの有無を明らかにする。

図4. 原因不明のPHP1b兄妹症例におけるメチル化解析結果



(3) Sporadic PHP1b におけるインプリンティング異常の発症機序

次世代シーケンス解析によるエクソーム解析にてメチル化修飾関連遺伝子の変異解析を行う。これにより、Sporadic PHP1b 症例に共通した遺伝子変異の有無を明確にし、エピ変異発症機序の解明につなげる。また、Sporadic PHP1b 症例における網羅的メチル化解析のためメチローム解析を行い、MLMD の有無も解明する。

3. 研究の方法

(1)PHP の分子遺伝学的解析

本研究期間内に新たに集積する PHP 症例を対象として、分子遺伝学的解析を行う。具体的には、GNAS 遺伝子変異解析を行い、変異が同定されなければ、MLPA を用いた GNAS 領域のコピー数解析とパイロシーケンス法、MS-MLPA による GNAS 領域のメチル化解析を施行して、PHP1b の有無を決定する。Sporadic PHP1b 症例に対しては、UPD(20)pat の有無を確認するため、両親の検体を用いて GNAS 領域を含む 20 番染色体のマイクロサテライト解析にて片親性ダイソミーの有無を確認する。また、いずれの異常も同定されない場合、PRKAR1 遺伝子変異解析、PDE4D 遺伝子解析も施行し変異の有無を確認する。今までに報告のない新規の染色体構造異常あるいは、GNAS 領域の非典型的なメチル化異常

を認めるが MLPA ではコピー数異常を確認できない症例に対して、GNAS 領域のカスタムアレイ CGH を用いて、更に詳細なコピー数解析を施行する。

今までに報告のない染色体構造異常症例あるいはアレイ CGH で染色体構造異常が同定されない PHP1b 症例では、次世代シーケンサーによる全ゲノムシーケンス解析あるいは FISH 解析を施行して、染色体構造異常の同定、コーディング領域以外の GNAS A/B メチル化制御機構に関与が考えられる候補領域の塩基置換や微小欠失・重複の有無などについて検討を行う。

(2)GNAS 領域のインプリンティング制御機構の解明

先行研究で染色体構造異常を同定した家族性 PHP1b 症例でのメチル化解析の結果、GNAS A/B の低メチル化を認め、その他の GNAS 領域の DMR (NESP55-DMR、AS-DMR、XLAS-DMR) では、親由来のメチル化状態を保持したままコピー数が増加した結果を反映したメチル化状態であった。よって、本症例のメチル化障害は STX16 遺伝子内に存在するシス因子の作用不全により生じていると推測している。GNAS A/B 単独の低メチル化をきたす PHP1b 兄妹症例を同定したが、MLPA やマイクロアレイによるコピー数異常は同定されていなかった。しかし、本症例は兄弟例であり、GNAS A/B 単独の低メチル化を来している事より STX16 遺伝子に関係する遺伝的要因が関与する可能性が高いと考え、全ゲノムシーケンス解析で発症機序の同定を目指す。

4. 研究成果

(1)新規 PHP 症例の分子遺伝学的解析

分子遺伝学的解析を行われていない PHP 症例 18 例を集積して解析を行った結果、4 例に GNAS コーディング領域にミスセンス変異あるいはスプライシング変異を同定した。GNAS 遺伝子変異が不明であった症例に対して MS-MLPA あるいはパイロシーケンス解析によるメチル解析を行った所、6 例に GNAS 領域全体のメチル化異常 (NESP55 の高メチル化、NESP-AS、XLAS、A/B の低メチル化) を、3 例に GNAS A/B 単独の低メチル化を確認した。GNAS 領域全体のメチル化異常を同定した症例で、GNAS 領域のコピー数異常は確認できず、Sporadic PHP あるいは 20 番染色体の父性片親性ダイソミーのいずれかが考えられた。GNAS A/B 単独の低メチル化症例では全例において、コピー数異常により既知の STX16 欠失が確認された。GNAS 遺伝子で変異が同定されず、GNAS 領域のコピー数異常も確認できなかった原因不明例は 6 例みられたが、1 例は次世代シーケンス解析により、PRKAR1A 遺伝子にミスセンス変異を確認した。

(2)GNAS A/B 領域単独の低メチル化を来す兄妹例の全ゲノムシーケンス解析

先行研究にて GNAS A/B 単独の軽度低メチル化を呈する兄妹例において全ゲノムシーケンス解析を行った結果、GNAS 領域の XLAS と A/B の間の領域に明らかな Read depth の低下がみられたため、同領域において、何らかの配列が挿入された可能性を予想し、マッピング異常があった Read だけを集積して、de novo アセンブリを行った結果、全長およそ 1100bp の SINE/Alu 由来のレトロトランスポゾン挿入が疑われたが、最終的な配列決定はサンガー法で行うことができた。

図5. 原因不明のPHP1b兄妹症例における全ゲノムシーケンス解析



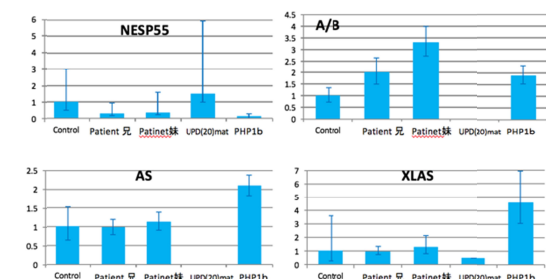
図6. 原因不明のPHP1b兄妹症例における挿入配列の部位



(3)GNAS A/B 単独軽度低メチル化症例における遺伝子発現解析

GNAS 領域の遺伝子発現を確認するため、患者 2 名のリンパ球あるいは皮膚線維芽細胞由来の mRNA を用いて、GNAS 領域の遺伝子発現解析を qPCR、デジタルドロップレットを用いて行った。血液、皮膚ともに GNAS A/B は有意に正常コントロールに比べて発現量の増加を確認した。一方、NESP-AS や XLAS は正常コントロールと比較し明らかな発現量の変化は見られなかったが、NESP55 の発現量は減少傾向を認めた。

図7. 原因不明のPHP1b兄妹症例における遺伝子発現解析



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 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者
中村 明枝 (NAKAMURA AKIE)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：90724708

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし