

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07325

研究課題名（和文）家族性発症する甲状腺腫の遺伝学的要因の解析

研究課題名（英文）Analysis of Genetic Factors in Multi-nodular Goiter

研究代表者

小飼 貴彦（Takahiko, Kogai）

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：40711693

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）：多結節性甲状腺腫（MNG）は、人口の1-4%にみられ、その発症には遺伝学的要因も関与することがわかってきた。われわれは、甲状腺腫瘍発症に関連するとされるがん関連遺伝子や、甲状腺腫の原因となる、甲状腺ホルモン合成に関係する遺伝子の変異を、126人の血液検体を用いて網羅的に検索し、多結節性甲状腺腫の遺伝学的要因の解明を試みた。その結果、サイログロブリン遺伝子のミスセンス変異が約75%の症例で認められた。また、KEAP1変異の症例で、遺伝性腫瘍と同様の2ヒット説に従う腫瘍形成機序が示唆されたほか、先天性甲状腺機能低下症の新規遺伝的多型の関与が示唆される例も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人でしばしば認められる多結節性甲状腺腫の遺伝学的背景として、サイログロブリン遺伝子のミスセンスバリエーションの頻度が高いことが確認された。また、悪性腫瘍のリスク因子として重要な遺伝性腫瘍症候群の原因遺伝子が、約10%程度の症例に関与していることが明らかとなった。サイログロブリン遺伝子のバリエーション自体も悪性腫瘍との関連が報告されており、多結節性甲状腺腫の遺伝診療で、今後重要な情報となる悪性腫瘍合併リスクを推測するうえで、甲状腺腫関連遺伝子の網羅的検査が有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Multinodular goiter (MNG) is observed in 1-4 % of the population, and genetic factors, in addition to environmental and endogenous endocrine factors, has been considered to contribute to its onset. We aimed to elucidate the genetic factors of MNG, and thus comprehensively searched for germline mutations in oncogenes related to thyroid nodule, as well as genes involved in thyroid hormone synthesis, using blood samples from 129 individuals. The results indicated that missense mutation(s) in thyroglobulin gene was found in ~75% of the cases. The tumor formation mechanism following the two-hit hypothesis, like hereditary tumors, was suggested in cases with germline mutation of KEAP1. Furthermore, the association of a novel microsatellite polymorphism in congenital hypothyroidism was also demonstrated in adult MNG.

研究分野：臨床検査

キーワード：サイログロブリン遺伝子 多結節性甲状腺腫 KEAP1

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多結節性甲状腺腫 (MNG) は、人口の 1~4% にみられ、環境要因、内分泌的要因、遺伝学的要因などが関与する多因子疾患と考えられている。近年、遺伝学的要因として *DICER1* が原因遺伝子として同定(1)され、甲状腺ホルモン合成障害 (TDH) も、表現型として MNG をともなうことがわかってきた(2)。MNG を発症した成人を解析したわれわれの予備研究では、サイログロブリン遺伝子 (*TG*) のモノアレリックバリエントの頻度が高いことが明らかとなっていた。

### 2. 研究の目的

*TG* ヘテロバリエントは MNG の原因となるのか。また、甲状腺ホルモン合成関連遺伝子が結節 (腫瘍) 形成のドライバー遺伝子となり得るのか。さらに、*RET*, *DICER1*, *PTEN* など、遺伝性腫瘍症候群の原因として知られる遺伝子の関与はどの程度か。成人 MNG における既知の生殖細胞系列および体細胞のゲノム解析から明らかにする。

### 3. 研究の方法

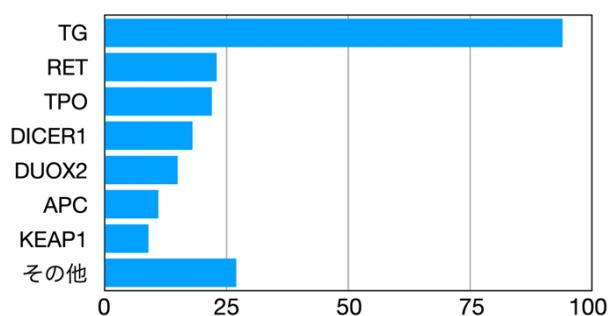
遺伝学的要因が疑われる成人の MNG コホートに遺伝子パネル検査を行い、関連遺伝子 (24 種、ヒトゲノム上の 583 領域) の生殖細胞系列バリエントの頻度を解析した。解析された症例のうち、甲状腺切除術に至ったものについては、さらに手術検体を利用して関連遺伝子の体細胞バリエントについて解析した。なお、解析に利用されたコホートは隈病院で診療を受けた 126 症例で、年齢の中央値は 40.5 歳、生物学的女性が 76% を占めた。血液細胞から抽出された DNA は、獨協医科大学研究連携・支援センターの Ion Torrent® System (Thermo Fisher Scientific) によるライブラリー作成およびシーケンス解析に供された。バリエントコール後のアノテーション付加には Ion Reporter® (Thermo Fisher Scientific) が、精度保証のためのフィルター (サンガー法による確認検査の結果を含む) には Excel® および Power Query™ (Microsoft) が利用された。

### 4. 研究成果

#### (1) 成人 MNG コホートにおける甲状腺腫関連遺伝子バリエントの頻度

126 名の成人 MNG (若年発症あるいは家族歴があり、遺伝性が疑われる症例) の生殖細胞系列バリエントを検索したところ、リファレンスに一致しないバリエントは、のべ 1419 検出された。

そのうち、データの質が確保され、人口における頻度が 5% 未満、かつ同義バリエントでないものは、のべ 352 であり、すべての症例が、何らかの希少バリエントを有していた。このうち特徴的なのが *TG* で、126 症例中 94 症例で *TG* のヘテロ接合性ミスセンスバリエントが検出された。上記条件を満たす *TG* バリエントのアレル頻度は、MNG コホートで 43%、一方、健常日本人コホートによる



図：本研究のコホートで検出されたバリエント数

Human Genetic Variant Database (HGVD, <https://www.hgvd.genome.med.kyoto-u.ac.jp>) では 16% で、HGVD を対照とすると、*TG* バリエント保有者の MNG 発症のオッズ比は有意に高く 4.4% (95% CI 3.3-5.8) であった。なお、ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) によると、コールされた 352 バリエントのうち、106 (30.1%) は良性バリエントで発症への関与は低く、病的バリエントとして登録されているものは 15 (4.3%) のみであった。とくに、半数近い 165 のバリエントについては、ClinVar への登録がなく、分子生物学的に病的であることが予想されるフレームシフト変異やナンセンス変異の 15 バリエントを除く、150 のミスセンスバリエントについては、その病的意義についての解析が今後の課題となった。

#### (2) 成人 MNG コホートにおける *TG* バリエントの特徴

*TG* バリエントが検出された 94 症例のうち、モノアレリックは 77 例、バイアレリックは 17 例であった。また、上記フィルター後のバリエントはすべてミスセンスバリエントで、サイログロ

ブリン分子内に広く分布したが、その頻度は、甲状腺ホルモン合成に直接関わるチロシン残基が複数存在する N-terminal domain (NTD) には少なく、コンフォメーションへの関与が示唆される領域 (Arm, Flap) に比較的多い (52%) ことが示された。

### (3) 既知の MNG 関連遺伝子の病的変異の頻度

既知の MNG 原因遺伝子の一つである *DICER1* については、126 人中 18 人でバリエントが検出され、そのうちフレームシフト変異が 5 症例、ナンセンス変異が 4 症例、病的意義不明のミスセンス変異が 9 例であった。成人の MNG のうち少なくとも 7% 以上は、*DICER1* の病的バリエントによるものと推定される。また、*PTEN* の病的バリエントも 3 症例で指摘された一方、23 例で検出された *RET* バリエント、11 例で認められた *APC* バリエントはすべてミスセンスで、ほぼ良性バリエントとして ClinVar に登録されているものであった。以上より、成人の MNG で遺伝性が疑われる症例のうち 10%前後は、多発腫瘍症候群の原因として広く知られている遺伝子のうちの 2 種 (*DICER1*, *PTEN*) の関与によることが示された。

### (4) *KEAP1* の病的バリエントの体細胞バリエントへの関与

*KEAP1* も MNG 発症への関与が指摘されている (3) が、その詳細な機序は不明である。本研究のコホートでは、9 症例で *KEAP1* 生殖細胞系列病的バリエント (すべてヘテロ接合性) を検出した。そのうちの 4 症例で甲状腺切除術が行われたため、手術検体 (FFPE) を利用して、甲状腺腫関連遺伝子の体細胞バリエントの検索を行った。その結果、2 例の *KEAP1* バリエントで、バリエントアレル頻度 (VAF) が 80% を超えており、体細胞レベルでのヘテロ接合性喪失 (LOH) が示唆された。一方、*KEAP1* のヘテロ接合性バリエントの見られた組織で、MNG の原因となる *DICER1* および *PTEN* の機能喪失バリエントが検出された。これらの結果は、*KEAP1* バリエントによる MNG 発症における 2 ヒット機序の関与を強く示唆するものである。

### (5) 新規マイクロサテライト・バリエントの甲状腺機能低下症への関与

幼少時にクレチン症と診断され甲状腺ホルモン補充療法を受けていたにもかかわらず、成人後にホルモン補充が不要になる TDH の症例があり、しばしば *DUOX2* など TDH 関連遺伝子の病的バリエントが検出されるが、一方、TDH 関連遺伝子に異常を認められない例も多くある。最近、慶応大学の鳴海らは、15q26.1 に位置するマイクロサテライトの多型が、先天性甲状腺機能低下症の一亜型 (CHNG3) の原因であることを見出し、とくに家族歴の認められる症例の 42% を占めることを報告した (4)。代表者らは、彼らと共同研究を行い、本研究のコホートで、MNG や TDH の関連遺伝子に明らかな病的バリエントを認めなかった 40 例について、当該マイクロサテライトの解析を行った。その結果、4 例で繰り返し数の減少を認め、同多型が成人の MNG の発症にも関与することが示された (4)。

### <引用文献>

1. 小飼貴彦. 多結節性甲状腺腫 (1) DICER1 症候群. 深田修司, 小飼貴彦他 編集, 遺伝性甲状腺疾患のすべて: 日本医事新報社; 2021. pp. 288-97.
2. 小飼貴彦, 深田修司, 菱沼昭. 先天性甲状腺ホルモン合成障害・ヨード有機化障害. 内分泌症候群. 別冊・日本臨床 領域別症候群シリーズ No. 1: 日本臨床社; 2018. pp. 372-376.
3. Nishihara E, Hishinuma A, Kogai T, Takada N, Hirokawa M, Fukata S, et al. A Novel Germline Mutation of *KEAP1* (R483H) Associated with a Non-Toxic Multinodular Goiter. *Front Endocrinol.* 2016;7:131.
4. Narumi S, Nagasaki K, Kiriya M, Uehara E, Akiba K, Tanase-Nakao K, et al. Functional variants in a TTTG microsatellite on 15q26.1 cause familial nonautoimmune thyroid abnormalities. *Nat Genet.* 2024;56(5):869-76.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jojima Teruo, Sakurai Shintaro, Wakamatsu Sho, Iijima Toshie, Saito Masahiro, Tomaru Takuya, Kogai Takahiko, Usui Isao, Aso Yoshimasa	4. 巻 331
2. 論文標題 Empagliflozin increases plasma levels of campesterol, a marker of cholesterol absorption, in patients with type 2 diabetes: Association with a slight increase in high-density lipoprotein cholesterol	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 243 ~ 248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijcard.2021.01.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iijima Toshie, Jojima Teruo, Hosonuma Soichiro, Ohhira Eriko, Tomaru Takuya, Kogai Takahiko, Usui Isao, Aso Yoshimasa	4. 巻 68
2. 論文標題 Symptomatic hypocalcemia after treatment for hyperthyroidism in a woman with chromosome 22q11.2 deletion syndrome complicated by Graves' disease: longitudinal changes in the number of subsets of CD4 and CD8 lymphocytes after thyroidectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1187 ~ 1195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ20-0717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jojima Teruo, Shinzawa Toshimitsu, Ohira Eriko, Sakurai Shintaro, Tomaru Takuya, Iijima Toshie, Kogai Takahiko, Usui Isao, Aso Yoshimasa	4. 巻 69
2. 論文標題 Switching from the tablet to the powder formulation of levothyroxine corrects severe hypothyroidism in a patient with lactose intolerance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 941 ~ 945
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ21-0656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narumi Satoshi, Nagasaki Keisuke, Kiriya Mitsuo, Uehara Erika, Akiba Kazuhisa, Tanase-Nakao Kanako, Shimura Kazuhiro, Abe Kiyomi, Sugisawa Chiho, Ishii Tomohiro, Miyako Kenichi, Hasegawa Yukihiko, Maruo Yoshihiro, Muroya Koji, Watanabe Natsuko, Nishihara Eijun, Ito Yuka, Kogai Takahiko, et al.	4. 巻 56
2. 論文標題 Functional variants in a TTTG microsatellite on 15q26.1 cause familial nonautoimmune thyroid abnormalities	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 869 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-024-01735-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小飼貴彦	4. 巻 49
2. 論文標題 検査領域別に見たアプローチ：遺伝子検査	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Technology	6. 最初と最後の頁 938-943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 小飼貴彦	4. 巻 38
2. 論文標題 甲状腺疾患の遺伝子診断	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vita	6. 最初と最後の頁 37-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小飼貴彦
2. 発表標題 多結節性甲状腺腫の遺伝学的背景
3. 学会等名 日本臨床化学会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 深田修司, 菱沼昭, 小飼貴彦, 大江秀美, 鳴海覚志編	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 408
3. 書名 遺伝性甲状腺疾患のすべて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	菱沼 昭  (Hishinuma Akira)		
研究協力者	西原 永潤  (Nishihara Eijun)		
研究協力者	深田 修司  (Fukata Shuji)		
研究協力者	伊藤 裕佳  (Ito Yuka)		
研究協力者	作本 順子  (Sakumoto Junko)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	生田目 貴  (Namatame Takashi)		
研究協力者	中尾 美佐子  (Nakao Misako)		
研究協力者	春山 康夫  (Haruyama Yasuo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関