

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461380

研究課題名(和文) IGSF1異常による新たなX連鎖性中枢性甲状腺機能低下症の概念の確立と病態解明

研究課題名(英文) The mechanism of congenital central hypothyroidism caused by IGSF1 deficiency

研究代表者

田島 敏広 (Tajima, Toshihiro)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50333597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IGSF1異常症により、中枢性甲状腺機能低下症が発症することを日本で初めて明らかにした。またIGSF1異常は重症であり、乳幼児期早期の成長障害、精神運動発達の遅れを示すことがある。そのため、新生児マススクリーニングのよりTSH、FT4を同時に測定し、早期発見が重要であることを提唱する。そしてIGSF1はサイトロロブの増殖分化に關与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Congenital central hypothyroidism (C-CH) is a rare disease in which thyroid hormone deficiency is caused by insufficient thyrotropin (TSH) stimulation of a normally located thyroid gland. So far, it has been known that genetic causes of isolated C-CH are autosomal recessive TSH deficiency and autosomal recessive TRH receptor-inactivating mutations. Recently, the deficiency of immunoglobulin superfamily member 1 (IGSF1) has been demonstrated to cause C-CH. IGSF 1 encodes a plasma membrane immunoglobulin superfamily 1glycoprotein that is highly expressed in pituitary, but its physiological role in human is still unknown. IGSF1 deficiency causes TSH deficiency, leading to hypothyroidism. In addition macroorchidism and delayed puberty are characteristic features. Moreover some patients with IGSF1 deficiency show mild developmental delay and attention deficit disorder. IGSF1 is considered to be a new factor controlling growth and puberty in children.

研究分野：小児内分泌

キーワード：甲状腺 マススクリーニング IGSF1 下垂体

### 1. 研究開始当初の背景

中枢性先天性甲状腺機能低下症(CCH)の原因は不明なことが多く、その頻度も不明であった。しかし我々は IGSF1 が X 連鎖性の CCH の原因である可能性を示唆した。しかし IGSF1 の機能は不明であり、また本邦での IGSF1 異常の病態は全く未知の領域であった。

### 2. 研究の目的

- a. X 連鎖性 CCH の原因である IGSF1 遺伝子の解析を行い、遺伝子変異、病態との関連を明確にし、新たな疾患概念を確立
- b. IGSF1 の視床下部-下垂体-甲状腺系における役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- a. 男性 TSH+PRL 欠損患者の PCR-ダイレクトシーケンスにより IGSF1 遺伝子解析。対象患者は TSH 欠損、TSH+PRL 欠損を伴う患者とする。DNA を抽出し、塩基配列を決定する。
- b. *In vitro* 解析  
< IGSF1 の PRL 産生に対する効果の検討 >  
(1) GH3 細胞に PRL プロモーター-ルシフェラーゼベクターをトランスフェクトし、アクチビン刺激による活性化を検討する。同時に PRL 抗体を用いて、Western blot によりその蛋白量の変化も検討する。  
(2) アクチビンによる PRL の発現低下には、アクチビン受容体の下流に存在し、シグナル伝達を引き起こす Smad を介する。そのなかでも始めに Smad2 がリン酸化される。そこで、リン酸化 Smad2 に対する抗体を用いた Western blot により、アクチビンによる Smad2 のリン酸化を確認する。Smad を介した系をさらに確認するため、Dominant negative Smad2 または Smad7 を強制発現させ、PRL プロモーター活性の変化を検討する。  
上記の系に一過性に野生型 IGSF1 変異 IGSF1 を発現させ、PRL プロモーターの活性化、PRL

の蛋白量の変化、Smad2 蛋白のリン酸化の変化を検討し、Igsf1 の作用を検討する。

### (3) IGSF1 と POU1F1 との相互作用の有無の検討

IGSF1 異常症の患者では、TSH PRL の欠損に加え、GH の欠損を伴う場合がある。POU1F1 は下垂体前葉のサイトロローブ、ソマトローブ、ラクトロローブに発現し、TSH、GH、PRL の発現、細胞の増殖に必須の因子であり、この POU1F1 異常により、TSH、GH、PRL 欠損がおこることが知られている。

GH3 細胞に POU1F1 プロモーター-ルシフェラーゼベクターをトランスフェクトし、アクチビン刺激による活性化の変化を検討する。

上記の系に Igsf1 を発現させてその変化を検討し、IGSF1 と POU1F1 の相互作用の有無を検討する。

### < TGF β 2/glycan シグナル伝達における IGSF1 の効果についての検討 >

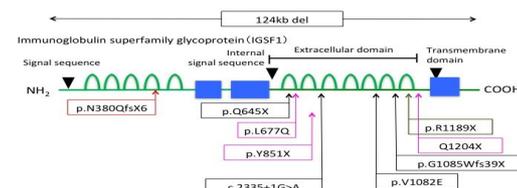
TGF β の betaglycan を介したシグナルは Smad2, 3 を活性化したのち、細胞膜より離れ、common mediator Smad である Smad4 と複合体をつくり、核内に移行する。

そこで、Smad 結合エレメントを持つルシフェラーゼベクター-pGL4.48 [luc2P/SBE/Hygro] (Promega 社)を用いて、TGF β による活性化に IGSF1 が作用を示すか検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) IGSF 遺伝子異常

計 15 名の患者を解析し、新たに 4 名に IGSF1 の欠失、スプライシング変異、終止コドンの変異を同定した。変異はすべて C 末に存在することが明らかになった。(図 1)



また遺伝子異常とその重症度には相関がないこと、遺伝子変異のホットスポットは存在しないことを明らかにした。

#### (2) IGSF1 異常症の臨床像

本邦ではCCH発見のために一部の地域でTSH, FT4の同時スクリーニングがおこなわれている。先天性甲状腺機能低下症の血清FT4による重症度分類については重症がFT4で0.4-0.7 ng/dl、中等症が0.7-1.5 ng/dlと定義されている。

表1にFT4のレベルをまとめた。

	新生児マススクリーニング		初診時
	FT4 (ng/dl)	TSH ( $\mu$ U/ml)	FT4 (ng/dl)
1	0.07	5.6	0.13
2	0.14	5.9	0.50
3	0.2	8.3	0.44
4	0.4	4.6	0.72
5	0.6	25.3	0.54
6	0.68	1.2	0.57
7	0.69	4.04	0.62
8	0.76	1.7	0.96
9	0.79	2.7	0.52

新生児マススクリーニングでみつかる症例についてはFT4が0.7ng/dl未満の症例が7例中5例であり、重症であることが明らかになった。表2に臨床症状、内分泌所見をまとめた。

#### 臨床症状

- MSで発見
- 乳児期甲状腺機能低下症
- 成長障害
- 軽度精神発達遅延
- 思春期遅発
- 精巣の腫大、生殖能力正常
- 肥満・代謝異常

#### 内分泌所見

- TSH, FT4 低値
- TRH 刺激 TSH 低反応
- または過剰遷延反応
- PRL 分泌低下
- GH 分泌低下
- LH の遅発上昇

中核症状はTSH、FT4低値であるが、これらの症状を様々な組み合わせで発症することがあきらかになり、臨床症状の多様性がある。また、軽度の精神発達遅滞を示すことがあり、早期からの介入が必要である。

#### (3) In vitroでの検討

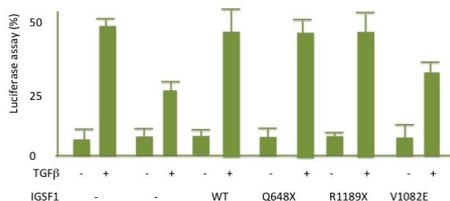
IGSF1のPRL産生に対する効果の検討  
GH3細胞にPRLプロモーター-ルシフェラーゼベクターをトランスフェクとし、アクチビン刺激による活性化を検討したところ、既報の報告のように活性化された。IGSF1を共発現させ、TGF $\beta$ 、インヒピンにより、プロモーター活性を検討したが、変化は認められなかった。

IGSF1のPOU1F1プロモーター活性の効果

GH3細胞にPOU1F1プロモーター-ルシフェラーゼベクターをトランスフェクとし、TGF $\beta$ 刺激による活性化を検討した、POU1F1の活性化が低下した。IGSF1の共発現により、その活性化の抑制が解除される傾向にあったが、有意差は認められなかった。

.COS 細胞に pGL4.48 をトランスフェクトし、TGFβ で刺激、ルシフェラーゼ活性を測定してところ、明らかに上昇を認めた。この系に IGSF1 を発現させ、IGSF1 の TGFβ に対する作用への影響を検討したが、IGSF1 でその刺激は抑制されることを見いだした。またいくつかの変異体の検討では、その活性化の抑制が解除されることを見いだした。(図2)

The effect of TGFβ-Smad signal by IGSF1



IGSF1 は TGFβ のシグナルを介して、サイロトローブ、ラクトローブの増殖に関与していることが明らかにされた。今後 IGSF1 の生理機能の解明にさらなる研究が必要である。

#### 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10件)

Shima H, Tanaka T, Kamimaki T, Dateki S, Muroya K, Horikawa R, Kanno J, Adachi M, Naiki Y, Tanaka H, Mabe H, Yagasaki H, Kure S, Matsubara Y, Tajima T, Kashimada K, Ishii T, Asakura Y, Fujiwara I, Soneda S, Nagasaki K, Hamajima T, Kanzaki S, Jinno T, Ogata T, Fukami M; Japanese SHOX study group. Systematic molecular analyses of SHOX in Japanese patients with idiopathic short stature and Leri-Weill dyschondrosteosis. J Hum Genet. 査読有 2016 Mar 17. [Epub ahead of print]

DOI: 10.1038/jhg.2016.18.

Tajima T, Fukushi M. Neonatal mass

screening for 21-hydroxylase deficiency. Clin Pediatr Endocrinol. 査読有 2016 ;25(1):1-8.

DOI: 10.1297/cpe.25.1.

Morikawa S, Komatsu N, Sakata S, Nakamura-Utsunomiya A, Okada S, Tajima T. Two Japanese patients with the renal form of pseudohypoaldosteronism type 1 caused by mutations of NR3C2. Clin Pediatr Endocrinol. 査読有 2015;24:135-8.

DOI: 10.1297/cpe.24.135.

Mass Screening Committee; Japanese

Society for Pediatric Endocrinology; Japanese Society for Mass Screening, Nagasaki K, Minamitani K, Anzo M, Adachi M, Ishii T, Onigata K, Kusuda S, Harada S, Horikawa R, Minagawa M, Mizuno H, Yamakami Y, Fukushi M,

Tajima T. Guidelines for Mass Screening of Congenital Hypothyroidism (2014 revision). Clin Pediatr Endocrinol. 査読有 2015;24:107-33.

DOI: 10.1297/cpe.24.107. E

Tajima T, Nakamura A, Morikawa S, Ishizu K. Neonatal screening and a new cause of congenital central hypothyroidism. Ann Pediatr Endocrinol Metab. 査読有 2014 ;19:117-21.

DOI: 10.6065/apem.2014.19.3.117.

Morikawa S, Moriya K, Ishizu K, Tajima T. Two heterozygous mutations of the AMH gene in a Japanese patient with persistent Müllerian duct syndrome. J Pediatr Endocrinol Metab. 査読有 2014;27(11-12):1223-6. DOI:

10.1515/jpem-2014-0111.

Nakamura A, Bak B, Silander TL, Lam J, Hotsubo T, Yorifuji T, Ishizu K, Bernard DJ, Tajima T. Three novel IGSF1 mutations in four Japanese patients with X-linked congenital central hypothyroidism. J Clin Endocrinol Metab. 査読有  
2013;98:E1682-91. DOI:  
10.1210/jc.2013-1224.

Tajima T, Nakamura A, Ishizu K. A novel mutation of IGSF1 in a Japanese patient of congenital central hypothyroidism without macroorchidism. Endocr J. 査読有  
2013;60:245-9.

Tajima T, Ishizu K, Nakamura A. Molecular and Clinical Findings in Patients with LHX4 and OTX2 Mutations. Clin Pediatr Endocrinol. 査読有  
2013 ;22:15-23.  
DOI: 10.1292/cpe.22.15.

Nihei H, Tada H, Naruse Y, Izawa M, Kato M, Okuno H, Nakamura A, Ishizu K, Hamajima T, Tajima T. Polyarthritis caused by methimazole in two Japanese patients with graves' disease. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 査読有  
2013;5:270-2.

DOI: 10.4274/Jcrpe.1055.

[学会発表](計8件)

田島 敏広 中枢性甲状腺機能低下症とIGSF1異常症 第59回日本甲状腺学会学術集会国際分子甲状腺学シンポジウム(招待講演)2016年11月3日、虎ノ門ヒルズフォーラム(東京都、港区)  
田島 敏広 遺伝性 GHD/CPHD の進歩(招待講演)第49回日本小児内分泌学会学術総会、2015年10月8日、タワーホール船堀(東京都、江戸川区)

田島 敏広 複合型下垂体機能低下症の成因 第42回日本神経内分泌学会(招待講演)2015年9月19日 仙台市戦災復興会館(宮城県、仙台市)  
田島 敏広 IGSF1 異常による中枢性甲状腺機能低下症の2例 第41回日本マスキング学会学術総会 2014年8月22日 広島大学広仁会館(広島県、広島市)

Tajima T, Nakamura A, Morikawa S. Molecular basis of IGSF1 deficiency in Japan. (招待講演) Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research joint meeting 2014年5月4日 (Vancouver, Canada)

田島 敏広 先天性副腎機能異常の新展開(招待講演)第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日 福岡国際会議場(福岡県、福岡市)  
森川 俊太郎、中村 明枝、石津 桂、母坪 智行、田島 敏広 IGSF1 遺伝子異常による先天性中枢性甲状腺機能低下症の病態解明 第47回日本小児内分泌学会学術総会 2013年10月3日 浅草ビューホテル(東京、台東区)

Morikawa S, Nakamura A, Bak B, Silander TL, Lam J, Hostubo T, Yorifuji T, Ishizu K, Bernard DJ, Tajima T Molecular basis of IGSF1 mutations in Japanese patients with X-linked congenital central hypothyroidism. The 9<sup>th</sup> joint Meeting ESPE, LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE. 2013年9月20日 (Milano, Italy)

[図書](計3件)

田島 敏広 他 日本小児医事出版社 私の処方2015、2015年、865

-870

田島 敏広 他 中山書店、ピギナーの  
ための小児内分泌診療ガイド、2014  
年、86-97

田島 敏広 他 総合医学社、ワンラン  
ク上の小児の臨床検査、総合医学社、2  
013年、109-115

〔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

先天性甲状腺機能低下症マススクリーニン  
グ診断治療ガイドライン

[http://jspe.umin.jo/medical/files/.CH\\_g  
uide](http://jspe.umin.jo/medical/files/.CH_guide)

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田島 敏広 (TAJIMA toshihiro)

北海道大学・医学研究科・講師

研究者番号：50333597

(2)研究分担者

棚橋 裕典 (TANAHASHI yusuke)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50374228

(3)連携研究者

守屋 公彦 (MORIYA kimihiko)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：20374233