

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：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860871

研究課題名(和文)複合型下垂体機能低下症における新規原因遺伝子の同定

研究課題名(英文)trio whole exome sequencing in patients with combined pituitary hormone deficiency

研究代表者

伊達木 澄人(DATEKI, Sumito)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：70462801

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)：複合型下垂体機能低下症3例において、トリオエクソーム解析、ならびに網羅的ゲノムコピー数解析を行った。結果、3症例全体で、de novoヘテロ変異は計5変異、常染色体劣性遺伝形式をとるホモ変異は、計13変異同定された。3症例に共通の遺伝子の変異はなかった。これらの候補遺伝子のヒト下垂体での発現はなく、病原性は不明であった。array CGHの結果、症例1においてHTR1Fを含む3p11.2領域の微小ヘテロ欠失を同定した。これは表現型正常である父にも同定されたため、病的意義は低いと考えられた。

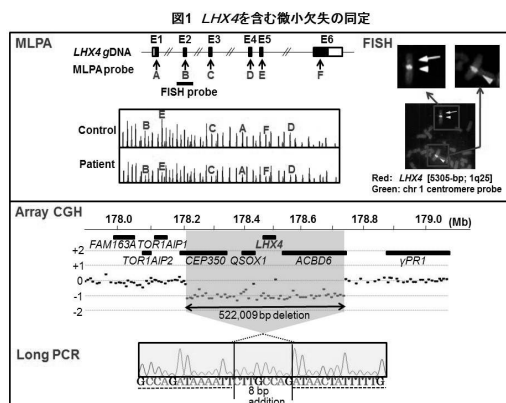
研究成果の概要(英文)：We performed Trio-whole exome sequencing in three Japanese patients with combined pituitary hormone deficiency (Patient 1: a 12-year-old girl; patient 2: a 15-year-old boy; patient 3: an 1-year-old boy) for finding de novo and/or recessive type mutations in the patients. We found four de novo mutations (CDK13, MYOD1, SPATA13, XYLT) in patient 1 and one de novo mutation (TUBGCP3) in patient 2. In addition, we found three recessive homozygous mutations (TSPAN2, YEATS2, SYNM) in patient 2, and nine homozygous mutations (PKN2, MAGI1, ROBO1, KHDC1L, CCDC91, HNF1A, CYP1A2, TTLL12, RP1-32110.10) in patient 3. No compound heterozygous mutations have not been identified in all the patients. These candidate genes have not been expressed in human pituitary cDNA. Array CGH analysis identified a heterozygous microdeletion in 3p11.2 involving HTR1F in patient 1. This microdeletion was identified in phenotypically normal father. Thus, The deletion could not be pathogenic.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：小児内分泌学 下垂体

1. 研究開始当初の背景

複合型下垂体機能低下症は、2 つ以上の下垂体前葉ホルモンが障害された状態と定義される。近年、ヒトにおいて、下垂体発生、分化に関わる一部の転写因子の異常により、CPHD が生じることが報告されてきた。われわれは、本邦約 80 例の CPHD 患者において、既知の原因遺伝子 (*POU1F1*, *PROP1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *SOX3*) の網羅的遺伝子変異・コピー数解析を行い、1 例に *LHX4* を含むヘテロ微小欠失を同定した (文献 1) (図 1)。これらの結果は、CPHD において、既知の転写因子異常症の頻度が非常に稀であること、さらにその発症には、その他の遺伝的もしくは環境因子が関与することを示唆している。



無・小眼球症の原因遺伝子である *OTX2* は、下垂体機能低下症の原因遺伝子として、われわれが世界に先駆けて報告した遺伝子である (文献 2, 3)。

OTX2 を含む 14q22-23 の微小欠失例の一部には、眼奇形のほかに下垂体機能異常をきたす例が存在すること (文献 4, 5) さらに、下垂体発生に重要な転写因子である *HESX1* のプロモーター部位には *OTX2* 認識配列が存在していることから (文献 6) *OTX2* の下垂体発生、分化、機能に対する関与が示唆されてきた。2009 年度以降、われわれは、全国より集積された無・小眼球症、下垂体機能低下症患者、約 100 名に対し、*OTX2* 変異・欠失解析を行った。その結果、異なる 5 名の患者において 4 種の新規ヘテロ接合性変異 (p.S135fsX136、p.K74fsX103、p.A72fsX86、p.G188X) を、さらに、1 男児例に *OTX2* 遺伝子を含む 2.86 Mb のヘテロ接合性欠失を同定した。これら計 6 例の *OTX2* 変異・欠失陽性患者における詳細な臨床的、分子遺伝学的解析の結果から以下のことを明らかにし、その研究成果を報告した (文献 2)。(1) *OTX2* ヘテロ異常症では、複合型下垂体機能低下症から GH 単独分泌不全症、正常まで多様な下垂体表現型を示す。(2) 下垂体低形成、異所性後葉などの下垂体構造異常を一部に伴う。(3) *OTX2* 変異・欠失陽性例は何かしらの眼の異常を示しており、眼に異常がない下垂体機能低下症にお

る変異陽性例は稀である。(4) *OTX2* 異常症では haploinsufficiency がその発症メカニズムである。(5) *OTX2* ヘテロ異常症の眼症状ならびに下垂体症状には、遺伝子型 - 表現型の関連性がない。(6) CPHD における *OTX2* 異常症の頻度は稀であり、依然、原因不明の CPHD 患者が多く存在している。

参考文献

1. Dateki S, et al. 2010 Mutation and Gene Copy Number Analyses of Six Pituitary Transcription Factor Genes in 71 Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency: Identification of a Single Patient with *LHX4* Deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4043-4047.
2. Dateki S, et al. 2010 Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 95:756-764
3. Dateki S, et al. 2008 *OTX2* Mutation in a Patient with Anophthalmia, Short Stature, and Partial GH Deficiency: Functional Studies Using the *IRBP*, *HESX1*, and *POU1F1* Promoters. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3697-3702
4. Elliott J, et al. 1993 A case of deletion 14(q22.1-->q22.3) associated with anophthalmia and pituitary abnormalities. *J Med Genet* 30:251-252
5. Nolen LD, et al. 2006 Deletion at 14q22-23 indicates a contiguous gene syndrome comprising anophthalmia, pituitary hypoplasia, and ear anomalies. *Am J Med Genet A* 140:1711-1718
6. Dateki S, et al. 2010 Mutation and Gene Copy Number Analyses of Six Pituitary Transcription Factor Genes in 71 Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency: Identification of a Single Patient with *LHX4* Deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4043-4047.

2. 研究の目的

われわれは、複合型下垂体機能低下症 (CPHD) 患者、約 80 名において、既知の原因遺伝子 (*POU1F1*, *PROP1*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *SOX3*, *OTX2*) の網羅的遺伝子変異・コピー数解析を行い、CPHD における既知遺伝子異常症の頻度が本邦において非常にまれであることを明らかにした (文献 1, 2)。この結果は、CPHD の原因となる未知の遺伝子異常症の存在を示唆している。本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析、array CGH 解析により、CPHD における新規原因遺伝子を同定すること、さらにその変異による下

垂体機能異常症発症機序を *in vitro* および *in vivo* 機能解析により解明することである。これにより、CPHD の発症機序、ならびに下垂体発生・分化の分子基盤を解明することに貢献する。

3. 研究の方法

(1) 既知の原因遺伝子に異常を認めない CPHD 2 症例、ならびにその両親を対象に、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析、arrayCGH 解析を行う。CPHD の原因となりうる *denovo* もしくは compound hetero の遺伝子変異、コピー数異常を同定する。

(2) 新規候補遺伝子の機能、発現パターンを検討し、当該遺伝子が、下垂体の発生・分化、機能に関与するか検討する。

(3) 原因不明の CPHD 症例約 80 名を対象に、新規候補遺伝子の変異解析を行う。他の CPHD 症例に同遺伝子異常が発見された場合は、候補遺伝子の異常が CPHD の原因となることを強く示唆する。

(4) 変異による下垂体機能異常症発症機序を *in vitro* および *in vivo* 機能解析により解明する

初年度

(1) 検体集積：われわれはすでに長崎大学病院小児科、国立成育医療研究センターを中心とする複数の医療機関で継続的に下垂体機能低下症患者の集積を行い、これまでに約 80 例の下垂体機能低下症例を集積した(文献 1)。さらに下垂体症状のない両親の検体を同意を得たうえで集積を初めている。

(2) 臨床評価：診断は各施設において、臨床像、ホルモン学的検査(下垂体前葉ホルモン分泌試験含む)、画像検査を行い決定した。症例は全国に散在しているため、各臨床医と連携をはかり情報集積の支援を要請する。

(3) エクソーム解析：末梢白血球から通常の方法でゲノム DNA を採取し、次世代シーケンサー (SOLiD 5500, Life Technologies) を用いて、全遺伝子のエクソン領域の配列を決定する。

まず最初に、解析対象症例は、両親の検体を利用可能な下記に示す 2 症例とする。これは *de novo* や compound hetero の変異を検出し、疾患責任遺伝子変異を絞ることを容易にするためである。ただ、これでは浸透度の低い遺伝子異常症を見逃す恐れがあるため、順次、その他の CPHD 患者症例を検査対象とし、共通の遺伝子上の変異を探索する。

症例 1：12 歳女兒、汎下垂体機能低下症、下垂体低形成、異所性後葉

症例 2：15 歳男児、複合型下垂体機能低下症 (GH, TSH, PRL, LH, FSH 欠損) 下垂体低形成、視神経低形成。

(4) PCR-直接シーケンシング法による変異の

確認：PCR-直接シーケンシング法を用いて、エクソーム解析で同定された遺伝子変異の有無を確認する。プライマー配列、PCR 条件はその都度最適化する。患者においてヘテロの変異が同定された場合には、制限酵素による切断あるいは TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) にサブクローニングして 2 アリルの塩基配列を決定することにより変異を確認する。これまで報告されていない変異が同定された場合は、正常対象者 100 例における当該変異の有無を検討し、その変異が多型か否か、表現型に関与するか検討する。

(5) array CGH 解析：エクソーム解析では解析できないコピー数の異常を array CGH 解析にて行う。検査は、エクソーム解析と同様に、両親の検体を利用可能な 2 症例を優先させる。

次年度以降

(1) 新規候補遺伝子の機能・発現パターン解析

新規候補遺伝子が CPHD の原因遺伝子となりうるか、その機能や発現パターンを *in silico* に検討する。情報が得られない場合は、ヒトもしくはマウス cDNA ライブラリーを用いて PCR にて発現パターンの解析を行う。

(2) 新規候補遺伝子の標的遺伝子の *in silico* 同定

候補遺伝子が転写因子であった場合、同遺伝子の認識配列を有するプロモーターを含む遺伝子をバイオインフォマティクスの手法を用いて同定する。

(3) 新規候補遺伝子の *in vitro* 機能解析

新規候補遺伝子の種類、特徴にもよるが、*in vitro* の実験にて、候補遺伝子が、下垂体の発生分化に関わること、さらには変異タンパクが下垂体機能異常に関与することを証明する方法を模索する。下垂体もしくは視床下部に発現する転写因子である場合は、下垂体発生・分化に関わる既知遺伝子に対する DNA 結合能、転写活性化能を、ゲルシフトアッセイ、ルシフェラーゼアッセイ等で検討する。

(4) ノックアウトマウスの作製と解析

ノックアウトマウスの表現型解析

下垂体の形態異常の有無、障害ホルモンパターンを検討する。

ノックアウトマウスにおける候補標的遺伝子発現解析

下垂体発生・分化に関わる遺伝子の発現量を Real time PCR の手技を用いて行う。

(5) エクソーム解析、array CGH 解析の継続

2 症例以外の原因不明 CPHD 症例においても、網羅的変異解析を順次行っていく。

以上の実験が全て順調に経過するとは限らないが、順調に進むものを重点的に解析し、当該研究期間の目的達成を目指す。

4. 研究成果

(1) 検体集積：両親の検体及使用可能な 3 症例（症例 1：12 歳女児、症例 2：15 歳男児、症例 3：1 歳男児）において、以下の解析をおこなった。

(2) エクソーム解析：3 症例とその両親において、末梢白血球から通常の方法でゲノム DNA を採取し、次世代シーケンサー (SOLiD 5500, Life Technologies) を用いて、全遺伝子の 100% 領域の配列を決定した。

De novo 候補変異数は 3 症例ともに平均で約 30 万だったが、その後、missense, nonsense, frameshift, splice 変異を抽出し、データベースを用いて候補変異を抽出、最終的には直接シーケンス法で確認したところ、de novo 変異コール数は家系 1 が 4 遺伝子の 4 変異 (CDK13, MYOD1, SPATA13, XYLT), 家系 2 が 1 遺伝子 1 変異 (TUBGCP3) を同定した。常染色体劣性遺伝形式をとるホモ変異は、家系 1 では 1 遺伝子 1 変異 (SMARCA2), 家系 2 では 3 遺伝子 3 変異 (TSPAN2, YEATS2, SYNM), 家系 3 ではいとこ婚であることを反映してか、9 遺伝子 9 変異を認めた (PKN2, MAGI1, ROBO1, KHDC1L, CCDC91, HNF1A, CYP1A2, TTLL12, RP1-32110.10)。複合ヘテロ変異 3 症例ともに同定されなかった。これらの候補遺伝子のヒト下垂体での発現は明らかではなかった。

(3) ゲノムコピー数解析：エクソーム解析では解析できないコピー数の異常検出するため、array CGH、SNP array 解析を行った。上記症例 1 では HTR1F を含む 3p11.2 領域の微小ヘテロ欠失を同定した。これは表現型正常である父にも同定されたため、病的意義は低いと考えられた。

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)

1. 渡辺聡・中枢神経奇形を合併した先天性複合型下垂体機能低下症の 3 例～トリオ・エクソーム解析による新規原因遺伝子同定への試み・第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日・アクトシティ浜松 (静岡県浜松市中区)。(高得点演題口演)

〔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〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊達木 澄人 (DATEKI Sumito)
長崎大学・病院 (医学系)・助教
研究者番号：70462801

(2) 研究協力者

渡辺 聡 (WATANABE Satoshi)