

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：84305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461392

研究課題名(和文) 偽性副甲状腺機能低下症をモデルとしたエピゲノム病の病態基盤解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of epigenetic disorders including pseudohypoparathyroidism

研究代表者

白井 健 (Usui, Takeshi)

独立行政法人国立病院機構(京都医療センター臨床研究センター)・内分泌代謝高血圧研究部・客員室長

研究者番号：20271512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：偽性副甲状腺機能低下症の分子基盤の解明のため本邦の偽性副甲状腺機能低下症患者13名についてGNAS遺伝子の塩基配列の解析に加えGNAS領域におけるメチル化状態とゲノムコピー数についてMS-MLPA法を用いて解析を行った。家族性の症例においてはSTX16領域の約3Kbの欠失を認めA/B領域の脱メチル化を同定した。これに対して孤発性の症例においてはコピー数異常を含めてgeneticな異常は認めず、DMR領域の広範なメチル化異常を認めた。しかしこれらのgenetic, epigeneticな異常には病型によるオーバーラップも認められた。MS-MLPA法は本症の分子診断に有用である。

研究成果の概要(英文)：To clarify the usefulness of methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA), we evaluated genetic and epigenetic changes of the GNAS locus in Japanese PHP-1b patients. We studied 13 subjects with PHP-1b (three families with eight affected members and one unaffected member and four sporadic cases). The methylation status of GNAS differentially methylated regions (DMRs) was evaluated using MS-MLPA. The main outcome measure was the presence of deletion mutations in the GNAS locus and STX16, which were assessed using MLPA. In all familial PHP-1b cases, a 3kb deletion of STX16 and demethylation of the A/B domain were identified. In contrast, no deletion was detected throughout the entire GNAS locus region in the sporadic cases. Broad methylation abnormalities were observed in the GNAS DMRs.

研究分野：内分泌学

キーワード：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(PHP)はその臨床的特徴によってPHPIa型とPHPIb型に分類される。PHPIbは更にその遺伝性の有無によって常染色体優性PHPIb型と孤発性PHPIb型に分類される。これらの臨床的特徴を形成する分子基盤が近年徐々に明らかにされてきたがその全容はまだ不明な部分も残されている。更に本症の遺伝性の有無は臨床遺伝医療において重要な問題である。

2. 研究の目的

PHPは希な疾患であり本邦での患者数は430(330-520)名程度と推定されている。本邦におけるPHP患者を集積してそのジェノタイプ、エピジェノタイプを解析し、それぞれの臨床病型と比較することでPHPの臨床病型-ジェノタイプ-エピジェノタイプを明らかにしてPHPのよりよい診断、遺伝診療に結びつける。

3. 研究の方法

(1) 本邦におけるPHP症例を集積してPCR-ダイレクトシーケンス法にてGNAS遺伝子全エクソン領域の塩基配列を検討した。

(2) またGNAS遺伝子群およびSTX16の各エクソンにアニールするプローブを用いて通常のMLPA(multiplex ligation-dependent probe amplification)を行いGNAS complex領域のゲノムコピー数解析を行った。

(3) 更にメチル化可変領域(DMR)部位のメチル化特異的制限酵素HhaIの認識部位を含んだ領域に対してMS(Methylation-specific)-MLPAを行った。PCR産物をABI310 Genetic Analyzerで泳動しGene Mapperソフトウェアを用いてPCR産物の定量解析を行った。

(4) 更に詳細なメチル化異常の検出のためにはバイサルファイト置換methylation-specific PCR (MS-PCR)法を用いて個々の症例におけるメチル化異常のパターンを解析した。

(5) またメチル化のパターンより染色体のダイソミーが疑われる症例についてはGNAS遺伝子近傍のマイクロサテライト解析を追加した。

4. 研究成果

(1) オルブライト徴候を有し臨床的にPHPIa/PPHPと診断された12例の解析では7例においてGNAS遺伝子の塩基の変異置換を認めた。しかし5例についてはGNAS遺伝子の塩基配列に変異を認めなかった。

(2) 対照的にオルブライト徴候を呈さずに臨床的にPHPIbと診断された27例において

はGNAS遺伝子の塩基配列の異常が同定されたケースは0であった。

(3) MS-MLPA法では健常人のGNAS遺伝子A/B領域を含む全てのDMR領域におけるアリル特異的メチル化が確認された。

(4) 全てのPHPIb患者においてGNAS遺伝子A/B領域の母性アリル脱メチル化が示された。

(5) 常染色体優性(AD)-PHPIb患者では、MLPA法でSTX16エクソン5および6の片アリル欠失が示された。Long-PCR法およびダイレクトシーケンス法の解析でSTX16遺伝子のイントロン3とイントロン6に存在するダイレクトリピート部位の相同組換えにより約3kbの欠失が生じていることが明らかになった。

(6) 一方sporadic-PHPIb患者では、STX16およびGNAS complexにMLPA法で検出できるような欠失は認められず、DMR領域の複数のメチル化異常(NESP55領域の過メチル化、AS、XL、A/B領域の脱メチル化)が確認された。

(7) sporadic-PHPIbにおいて、両アリルのメチル化パターンが一致したためマイクロサテライト解析を行ったが、uniparental disomyは否定的だった。

(8) 上記のメチル化異常についてMS-PCR法にて確認を行ったがMS-MLPA法とMS-PCR法の解析結果は完全に一致した。

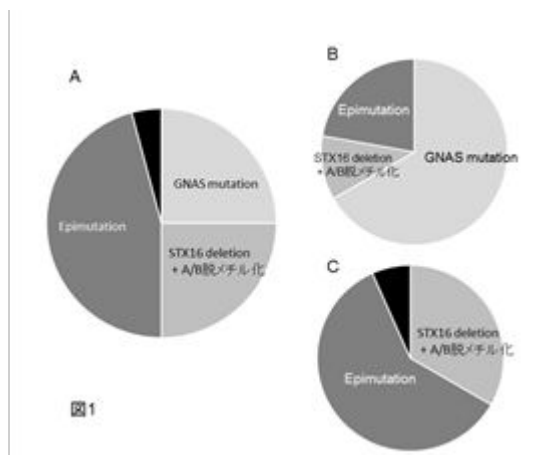
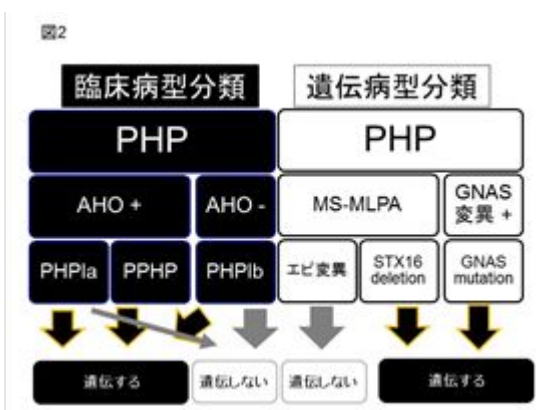


図1にこれらの解析のまとめを示す。Aは本研究で解析した全症例についてその分子遺伝学的に分類するとGNASの塩基配列の変異(GNAS mutation)がほぼ1/4、STXの3Kbの欠失とそれに伴うA/B領域の脱メチル化(STX16 deletion+A/B脱メチル化)が1/4で約半数がDMRの広範な脱メチル化(Epimutation)であった。オルブライト徴候を呈する臨床的にPHPIa/PPHPと診断された症例に限ってみるとBのようになり約2/3の症例ではGNAS遺伝子の塩基配列の変異が検出されるが残り

1/3 の症例では STX の 3kb の欠失とそれに伴う A/B 領域の脱メチル化を呈する例、DMR の広範な脱メチル化を呈する例が混在していることが明らかになった。また一方オルブライト徴候を呈さない PHP1b 症例に限っての解析では C の如く STX16 deletion+A/B 脱メチル化群と DMR の広範な脱メチル化群でほぼ全例を占めた。

PHPIb における epigenetic、genetic 異常についてこれまでの報告では、AD-PHP1b の大部分で STX16 の 3kb の欠失、1 家系で一部重複する 4.4kb の欠失が報告され、他の 4 家系で NESP 領域の欠失が報告されている。これらの欠失が母系遺伝した場合に、GNAS 遺伝子エクソン A/B の母性アリルのメチル化消失によりエクソン A/B の両アリル脱メチル化を生じる。今回解析した AD-PHP1b のほぼ全例で STX16 の 3kb の欠失とエクソン A/B の両アリル脱メチル化を認めた。sporadic-PHP1b ではエクソン A/B の両アリル脱メチル化を示したが、STX16、NESP 領域の欠失は認められなかった。また、エクソン A/B 以外の NESP55、XL、AS のメチル化異常を示した。sporadic-PHP1b ではメチル化異常を生じる原因や疾患遺伝性の有無は明らかになっていない。AD-PHP1b、sporadic-PHP1b とともに我々の解析結果はこれまで最も多く報告されたメチル化異常のパターンに一致していた。MS-MLPA 法はバイサルファイト法に比較して手技が簡便で必要検体量も少なく、欠失を同時に解析できる点で優れている。

これらの解析によって得られた知見に基づいて本症を再分類すれば PHP 患者に対してより質の高い遺伝医療が提供できる (図 2)。



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 12 件)

Uraki S, Ariyasu H, Doi A, Furuta H, Nishi M, Usui T, Yamaue H & Akamizu T. Hypersecretion of ACTH and PRL from

pituitary adenoma in MEN1, adequately managed by medical therapy. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep 2017 2017.

Sakane N, Sato J, Tsushita K, Tsujii S, Kotani K, Tominaga M, Kawazu S, Sato Y, Usui T, Kamae I, Yoshida T, Kiyohara Y, Sato S, Tsuzaki K, Nirengi S, Takahashi K, Kuzuya H & Group JR. Determinants of Glycated Hemoglobin in Subjects With Impaired Glucose Tolerance: Subanalysis of the Japan Diabetes Prevention Program. J Clin Med Res 2017 9 360-365.

Saitoh K, Yonemoto T, Usui T, Takekoshi K, Suzuki M, Nakashima Y, Yoshimura K, Kosugi R, Ogawa T & Inoue T. Novel germline variant of TMEM127 gene in a patient with familial pheochromocytoma. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep 2017 2017.

Yamamoto K, Namba N, Kubota T, Usui T, Takahashi K, Kitaoka T, Fujiwara M, Hori Y, Kogaki S, Oue T, Morii E & Ozono K. Pheochromocytoma complicated by cyanotic congenital heart disease: a case report. Clin Pediatr Endocrinol 2016 25 59-65.

Sakane N, Sato J, Tsushita K, Tsujii S, Kotani K, Tominaga M, Kawazu S, Sato Y, Usui T, Kamae I, Yoshida T, Kiyohara Y, Sato S, Tsuzaki K, Takahashi K & Kuzuya H. Effects of lifestyle intervention on weight and metabolic parameters in patients with impaired glucose tolerance related to beta-3 adrenergic receptor gene polymorphism Trp64Arg(C/T): Results from the Japan Diabetes Prevention Program. J Diabetes Investig 2016 7 338-342.

Imashuku S, Muramatsu H, Sugihara T, Okuno Y, Wang X, Yoshida K, Kato A, Kato K, Tatsumi Y, Hattori A, Kita S, Oe K, Sueyoshi A, Usui T, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Ogawa S, Kojima S & Kanno H. PIEZO1 gene mutation in a Japanese family with hereditary high phosphatidylcholine hemolytic anemia and hemochromatosis-induced diabetes mellitus. Int J Hematol 2016 104 125-129.

Yamashita Y, Iguchi M, Nakatani R, Usui T, Takagi D, Hamatani Y, Unoki T, Ishii M, Ogawa H, Masunaga N, Abe M & Akao M. Thyroid Storm with Heart Failure Treated with a Short-acting Beta-adrenoreceptor Blocker, Landiolol Hydrochloride. Intern Med 2015 54 1633-1637.

Ueda Y, Tagami T, Tamanaha T, Kakita M, Tanase-Nakao K, Nanba K, Usui T, Naruse M & Shimatsu A. A family of RTHbeta with p.R316C mutation presenting occasional syndrome of inappropriate secretion of TSH. Endocr J 2015 62 251-260.

Okawa T, Yoshida M, Usui T, Kudou T, Iwasaki Y, Fukuoka K, Takahashi N, Uehara Y & Oiso Y. A novel loss-of-function mutation of GATA3 (p.R299Q) in a Japanese family with Hypoparathyroidism, Deafness, and Renal Dysplasia (HDR) syndrome. BMC Endocr Disord 2015 15 66.

Nanba K, Tsuiki M, Umakoshi H, Nanba A, Hirokawa Y, Usui T, Tagami T, Shimatsu A, Suzuki T, Tanabe A & Naruse M. Shortened saline infusion test for subtype prediction in primary aldosteronism. Endocrine 2015 50 802-806.

Hiramatsu R, Ubara Y, Tajima T, Usui T, Namba K, Takeuchi Y, Sawa N, Hasegawa E & Takaichi K. Tumoral calcinosis in a patient with hypoparathyroidism, sensorineural deafness, and renal dysplasia syndrome undergoing hemodialysis. Clin Case Rep 2015 3 73-75.

〔学会発表〕(計 3 件)

臼井 健 21 水酸化酵素欠損症の出生前診断、出生前治療の現状と問題点 第 89 回日本内分泌学会学術集会 京都 2016.4.23

臼井 健 偽性副甲状腺機能低下症の分子機構とエピゲノム シンポジウム 第 88 回日本内分泌学会学術総会 東京 2015.4.25

Yuno A, Usui T et al. Molecular characterization of genetic and epigenetic alterations in Japanese patients with pseudohypoparathyroidism.

ICE/ENDO2014 Chicago, USA 2014.4.23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

臼井健 (USUI. Takeshi)

独立行政法人国立病院機構京都医療センター臨床研究センター、客員室長

研究者番号: 20271512

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()