

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893259

研究課題名(和文) 副腎低形成症における新規原因遺伝子の同定とその分子機能の解明

研究課題名(英文) Identification and functional characterization of a novel causative gene for adrenal hypoplasia

研究代表者

天野 直子 (AMANO, NAOKO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：70348689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：原因不明の原発性副腎機能低下症の小児を対象に、既に報告のある責任遺伝子を解析した。遺伝子解析により変異を同定されなかった症例を対象にアレイCGHを行い、2症例で同一遺伝子(遺伝子A)内に微細欠失を同定した。PCR直接シーケンス法により1例において切断点を同定し、欠失サイズは73.5kbであった。もう1例は同様の方法で切断点が同定できず、カスタムアレイを行った結果、欠失サイズは58.5-61.0kbであった。患者由来のリンパ芽球を用いた解析により、2症例で産生されるメッセンジャーRNAは同一エクソンを欠失することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We enrolled Japanese pediatric patients having primary adrenal insufficiency without diagnostic findings of urine or serum steroid metabolites indicating enzymatic defects, such as 21-hydroxylase deficiency. We sequenced 12 genes associated with primary adrenal insufficiency. We performed array comparative genomic hybridization analyses in the mutation-negative patients. In two of these patients, we detected submicroscopic deletions of the same gene (Gene A). By PCR based sequencing, we identified the breakpoint in one patient, who had 73.5kb deletion in Gene A. However, we could not identify the breakpoint in the other patient. Additionally, we performed custom array CGH (fine-tiling array CGH), and presumed that the deletion size was between 58.5-61.0kb. We revealed that the mRNAs extracted from lymphoblastoid cell lines of the two patients lacked the same exon of Gene A.

研究分野：小児内分泌

キーワード：小児内分泌 発生分化 副腎

1. 研究開始当初の背景

(1) 副腎低形成症とは、副腎が形態的に小さくかつ原発性副腎機能低下症を呈する疾患の総称である。副腎低形成症は、副腎皮質の発生・分化異常、ACTH 不応 (家族性グルココルチコイド欠損症)、副腎低形成を伴う症候群 (triple A 症候群、IMAGe 症候群など) に臨床的に大別される。

(2) 副腎皮質の発生・分化異常による副腎低形成症の原因遺伝子として、1990 年代に *NROB1* (DAX-1) と *NR5A1* (SF-1) が報告された。家族性グルココルチコイド欠損症の原因遺伝子として、1990 年代に *MC2R*、2005 年に *MRAP* が報告された。2012 年以降、次世代シーケンサー (Whole exome sequencing) など新たな解析技術により、さらに複数の原因遺伝子が報告された。家族性グルココルチコイド欠損症の原因遺伝子として、ミトコンドリア内膜における酸化還元調節に関与する *NNT*、*GPX1*、*TXNRD2* が報告された。2012 年に副腎低形成を伴う症候群の原因遺伝子として、*CDKN1C* (IMAGe 症候群) や *MCM4* (MCM4 異常症) が報告された。このように解析技術の進歩により、かつて原因不明とされていた副腎低形成症の原因が明らかとなりつつある。

(3) Wnt- カテニン系は副腎皮質の発生・分化については以下の知見が明らかとなっている。カテニンは成獣マウスの副腎皮質被膜下に発現している。カテニンノックアウトマウスは、胎生致死である。SF-1 プロモーターを用いたコンディショナルノックアウトマウスでは完全副腎無形成もしくは副腎皮質 (永久層) 欠損である。しかし、ヒトの副腎皮質の発生分化における Wnt- カテニン系の役割については不明である。

(4) 遺伝子 A は Wnt- カテニン系に関与し、カテニン産生に抑制的に働く分子と報告されている。ヒトの副腎皮質の発生分化において遺伝子 A の関与を含めた Wnt- カテニン系の役割は全く不明である。さらに、先天性

副腎低形成症において遺伝子 A の変異例、欠失例の報告はない。

われわれは、既存の酵素欠損症を除外した原発性副腎機能低下症を対象に、既知責任遺伝子の包括的解析を行った。既知責任遺伝子変異陰性 20 症例を対象にアレイ CGH (Agilent 1M) を行った。2 症例で同一遺伝子 (遺伝子 A) 内に翻訳領域を含む約 50kb、約 80kb の微細欠失を同定し、FISH 法で欠失を確定した。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、遺伝子 A が副腎低形成症の原因遺伝子の 1 つであり、Wnt-catenin シグナルがヒト副腎皮質の発生分化における役割を証明することである。

上記の目標のために、本研究期間では以下の目的で研究を行った。

- (1) 新たな遺伝子 A 変異例を検索する。
- (2) 2 症例で同定された欠失の切断点を明らかにする。
- (3) 欠失を有するアレルから産生される mRNA の配列を同定する。
- (4) 一過性強制発現系による機能解析系を確立する。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子 A に微細欠失陰性の既知責任遺伝子陰性の原発性副腎機能低下症例を対象とした変異解析

既にアレイ CGH で遺伝子 A に微細欠失のないことを確認した原因不明副腎機能低下症 18 例、およびさらに収集する原因不明の副腎機能低下症を対象に PCR 直接シーケンス法で遺伝子 A の解析を行った。

(2) 微細欠失を同定した 2 症例の切断点同定
同定した微細欠失の切断点を PCR 直接シーケンス法で同定を試みた。

(3) 微細欠失により産生される mRNA の配列同定

患者リンパ球を芽球化した、その細胞から

mRNA を抽出した。抽出した mRNA から cDNA を作成し、遺伝子 A の PCR およびシーケンスを行った。

(4) 一過性強制発現系による機能解析系を確立

遺伝子 A の cDNA は購入し、EGFP および HA タグ融合タンパク質を発現するベクターを作成した。作成した遺伝子 A の発現ベクターを用いて、ルシフェラーゼアッセイによる Wnt- catenin シグナルの定量を行った。

Day0 に培養細胞 (HEK293) を 96 ウェルプレートに撒き、Day1 に遺伝子 A 発現ベクターとルシフェラーゼ発現ベクター (TCF/LEF レポーター) を Lipofectamine2000 で培養細胞に導入した。導入後 24~48 時間 (Day2-3) に、ヒト Wnt3a とヒト RSP01 を培養液中に添加した。添加後 12~24 時間 (Day3-4) に ONE-GLO reagent を添加し、蛍光強度をルミノメーターで定量した。各発現ベクター量、発現ベクター導入から Wnt3a、RSP01 添加までの時間および添加量、蛍光強度測定までの時間について条件検討を行った。

4 . 研究成果

(1) 遺伝子 A に微細欠失陰性の原因不明副腎機能低下症例を対象とした変異解析

遺伝子 A 変異陽性例は存在しなかった。

(2) 微細欠失を同定した 2 症例の切断点同定 1 例において切断点を同定した。欠失領域は約 73.5kb であった。もう 1 例は、切断点同定が困難のため、欠失想定領域のカスタムアレイを作成し、アレイ CGH を行った。結果、欠失領域は 58.5-61.0kb まで欠失領域を絞り込めた。

(3) 微細欠失により産生される mRNA の配列同定

微細欠失を有する 2 症例ともに同じエクソンを欠失する mRNA を同定した。尚、対照においては同じエクソン欠失を検出しなかった。

(4) 一過性強制発現系による機能解析系を確立する。

野生型遺伝子 A 発現ベクターを HEK293 細胞に一過性強制発現させた場合、空ベクター導入と比較し、カテニン産生は著しく低下した。

発現ベクターの量を減らし、ヒト Wnt3a とヒト RSP01 添加量を増やしても、野生型遺伝子 A による Wnt- カテニン系の抑制効果を減じることが不可能であった。その分子機能から、変異体 (特定のエクソン欠失を有する分子 A) は、野生型と比較し、Wnt- カテニン系に対する抑制効果が強いことを予想されるため、この一過性強制発現下での解析では検討が困難と判断した。今後、薬剤誘導型安定発現株を用いた解析を行う方針とした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

(1) Ishii T, Matsuo N, Sato S, Ogata T, Tamai S, Anzo M, Kamimaki T, Sasaki G, Inokuchi M, Hori N, Amano N, Narumi S, Shibata H, Hasegawa T.

Human Chorionic Gonadotropin Stimulation Test in Prepubertal Children with Micropenis Can Accurately Predict Leydig Cell Function in Pubertal or Postpubertal Adolescents. *Horm Res Paediatr.* 2015 Sep 10. (Epub ahead of print) 査読あり

(2) Takagi M, Nagasaki K, Fujiwara I, Ishii T, Amano N, Asakura Y, Muroya K, Hasegawa Y, Adachi M, Hasegawa T. Heterozygous defects in PAX6 gene and congenital hypopituitarism. *Eur J Endocrinol.* 2015;172(1): 37-45. 査読あり

(3) Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, Ogata T, Hasegawa T. Identification and Functional Characterization

of Two Novel *NPR2* Mutations in Japanese Patients with Short Stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(4): E713-718 査読あり

(4) Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, Ogata T. IMAGE syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014;80 (5): 706-13. 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

(1)天野直子

Adrenal conference2016

Boston MA. (米国)

口演発表 2016年3月31日

‘MIRAGE SYNDROME: A NEW ADRENAL HYPOPLASIA SYNDROME CAUSED BY HETEROZYGOUS *SAMD9* MUTATIONS’

(2)天野直子

第49回小児内分泌学会学術集会

タワーホール船堀(東京・江戸川区)

口演発表 2015年10月8日 最優秀演題賞

「MIRAGE 症候群: 副腎低形成を伴う新規症候群の疾患概念の確立と責任遺伝子の同定」

(3)天野直子

第88回日本内分泌学会学術総会

ホテルニューオータニ東京(東京・千代田区)

口演発表 2015年4月24日

「生化学的評価で原因特定が困難な原発性副腎機能低下症における包括的遺伝子解析」

〔図書〕(計1件)

(1)天野直子 小児内科 47巻増刊 2015年 Page427-430 【小児疾患診療のための病態生理2 改訂版第5版】内分泌疾患 原発性アルドステロン症

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

天野 直子 (AMANO, Naoko)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号: 70348689