

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 9 月 26 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860715

研究課題名(和文)カルシウム感知受容体に關与する分子遺傳学的異常について

研究課題名(英文)Molecular genetic analysis of CASR gene

## 研究代表者

中村 明枝(Nakamura, Akie)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・研究員

研究者番号：90724708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はカルシウム代謝異常(高カルシウム血症、低カルシウム血症、高カルシウム尿症)を呈する24症例を集積し、次世代シーケンサーを用いたカルシウム代謝に關与する遺伝子解析を施行した。低カルシウム血症を呈する家族例1例、孤発例1例に新規のCASR遺伝子変異を同定した。更に、新規のCLDN16遺伝子、FAM111A遺伝子、GATA3遺伝子変異を同定した。また、複雑な染色体構造異常を呈するPHP1b家族例も同定した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the molecular basis of calcium homeostasis, we performed mutation analysis for the genes associated with calcium homeostasis using next-generation sequencing. We identified novel CASR mutations in one familial case and one sporadic case with hypocalcemia. Furthermore, we found out novel pathogenic mutations in FAM111A, CLDN16 and GATA3. We also found out that complex genomic rearrangement within the GNAS region are associated with familial pseudohypoparathyroidism type 1b.

研究分野：小児内分泌

キーワード：カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

G 蛋白共役受容体(GPCR)シグナル伝達の調節機構はまだ不明な点も多い。我々は、先行研究として GPCR であるカルシウム感受受容体 (CASR) の変異受容体と受容体に対するアロステリックモデュレーターの効果について *in vitro* で検討し、細胞内局在の変化が GPCR 調節機構に関与していることを見いだした。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、このような先行研究を進展させ、以下の点を解明する。

アロステリックモデュレーターによる CASR 変異受容体の機能選択的活性化

AP2S1 異常、GNA11 異常に対するアロステリックモデュレーターの効果の検討

CASR 遺伝子異常、GNA11 遺伝子異常、AP2S1 遺伝子異常における phenotype-genotype correlation の解明

本研究の成果は、GPCR シグナル伝達の調節機構の解明と GPCR を標的とした新たな治療薬の開発、CASR が関与する疾患の病態の理解に貢献すると期待される。

## 3. 研究の方法

(1) カルシウム代謝異常(高カルシウム血症、低カルシウム血症、尿中カルシウム排泄異常)を呈する症例を集積して、カルシウム代謝に関与する遺伝子をターゲットとしたターゲットリシークエンス解析を施行した。同定された変異の確認や家族内の変異の有無についてはサンガー法を施行した。

(2) 今回、症例の集積の中で、染色体構造異常が疑われる偽性副甲状腺機能低下症の家族症例を認めため、疾患責任領域であるGNAS 領域をターゲットとしたカスタムアレイ CGH を作成し、同領域のコピー数異常を判定した。GNAS 領域にはインプリンティング遺伝子が存在し、同領域のコピー数異常はメチル化異常を招くことが考えられ、パイロシークエンス法、MS-MLPA 法を用いたメチル化解析も施行した。更に複雑な染色体構造異常が予想されたため、発端者の検体を用いて全ゲノムシークエンス解析を行う事により切断点の配列を決定することで、同領域の重複を来す染色体構造異常を決定した。

## 4. 研究成果

(1) 今回、カルシウム代謝異常を呈する 24 症例の解析を行ったところ、低カルシウム血症を来す症例において、CASR 遺伝子の新規の機能亢進型変異を 2 症例(家系例 1 例、孤発例 1 例)において認めた。

家族例は兄弟と父親が低カルシウム血症と相対的高カルシウム尿症を呈しており、兄弟

症例において、Gln27Glu の新規ミスセンス変異をヘテロ接合性に同定した。同変異は、CASR 遺伝子の機能獲得型変異の hot spot として知られている細胞外領域の VFT domain の loop2 に存在していた。もう一例は、大脳基底核の石灰化と軽度の低カルシウム血症を呈する症例で、エクソン 7 に新規のミスセンス変異 (Val833Phe) をヘテロ接合性に同定した。同変異は、やはり、機能獲得型変異の hot spot である細胞膜貫通領域のヘリックス 7 に存在しており、病態に関与していると考えられたが、phenotype が正常であった母親にも同変異を同定したため、更なる検討が必要と考えられる。

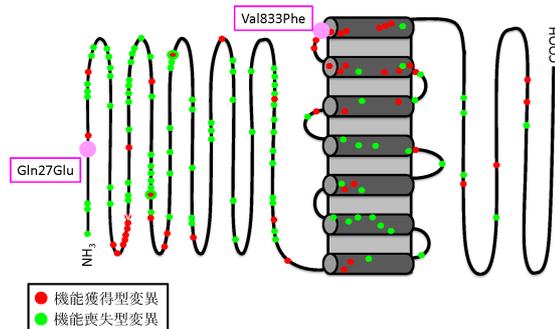


図1. 新規の同定されたCASR遺伝子変異

今回の検討では、その他、CASR 遺伝子やそれに関与する遺伝子(AP2S1 遺伝子、GNA11 遺伝子)では変異を同定することができず、更なる機能解析やアロステリックモデュレーターの機能について検討することは出来なかった。

(2) 集積した症例での CASR 遺伝子以外のカルシウム代謝に関わる遺伝子変異解析の結果、FAM111A 遺伝子、CLDN16 遺伝子、GATA3 遺伝子の新規変異と GATA3 遺伝子に既報の変異を同定した。

FAM111A 遺伝子は HRD 症候群の責任遺伝子であり、低カルシウム血症の他に、低身長や骨変形、発達遅滞を合併するが、変異が同定された症例では明らかな成長障害や発達遅滞は認めなかった。また、同定された変異は既報の FAM111A 遺伝子の hot spot とは異なるヘテロ接合性のミスセンス変異(Asp483Val)であった。現在まで、FAM111A 遺伝子の機能については不明な点が多く、その病的意義についての判断は難しいが、今後、更なる検討を行いたいと考えている。

尿中カルシウム排泄高値を認めた親子例で、CLDN16 遺伝子の新規ミスセンス変異(Arg185His)をヘテロ接合性に認めた。同変異はホモ接合性に変異を有するところ軽し尿症と腎石灰化を伴う家族性低マグネシウム血症の責任遺伝子であるが、ヘテロ接合性のキャリアで血尿や腎結石、高カルシウム

尿症を呈するという報告がされており、本症例においても、高カルシウム尿症との関与が示唆された。

イスタンブール人の HDR 症候群の三徴が揃った症例では、Arg276Gln という新規のミスセンス変異を同定した。同変異は、GATA3 の Zinc-Finger Domain に存在しており、過去の機能解析で転写活性が低下していることが証明されていた変異であった。

また、既報変異であったが、難聴と低カルシウム血症を来す孤発例において、Arg367X 変異を同定した。本変異は、前施設でのサンガー法では見逃された変異であった。

(3) 家族性偽性副甲状腺機能低下症(以下、PHP)症例において、今までに報告のない GNAS 領域の複雑な染色体構造異常を同定した。本症例の発端者とその母、母方叔父が臨床的に PHP1b と診断されていた。

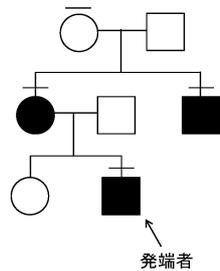


図2. 偽性副甲状腺機能低下症の家系図

MS-MLPA 法、PHP の疾患責任領域である GNAS 領域に対するカスタムアレイを行った結果、2 コピーと 3 コピーのコピー数増加をみとめるおおよそ 96 kb の領域を認めた。同領域には GNAS 遺伝子や STX16 遺伝子は含まれていなかった。

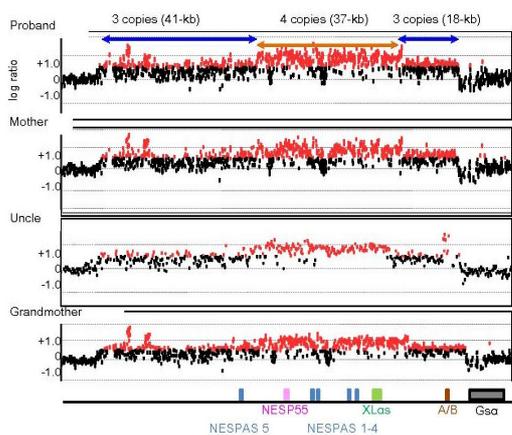


図3. GNAS領域のコピー数異常

メチル化解析の結果、罹患者（発端者、母、母方叔父）では、A/B の低メチル化をコピー数異常を有するが非罹患者であった母方祖母では、A/B のメチル化は正常であることを確認した。

構造異常を決定するため、発端者の白血球由来 DNA を用いた全ゲノムシーケンス解析を

施行した。アレイ CGH より推定される Break point 付近にマッピングされた異常な Read のみを集積して、local アセンブリを行う事により発端者の Breakpoint の配列を決定することができた。

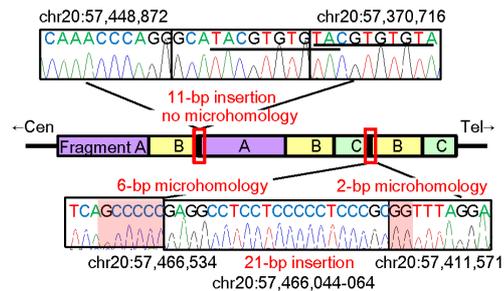


図4. Breakpointにおける配列

コピー数異常を認めた他の家族では、サンガー法で Breakpoint 付近に発端者と同様の配列を有する事を確認した。

PHP1b では、GNAS 領域に存在する A/B-DMR(メチル化可変領域)の低メチル化により、組織特異的インプリンティングが起こる組織(腎近位尿管、甲状腺、性腺)で母由来の GNAS 発現が障害されるため PTH 不応症を来す。A/B-DMR の低メチル化を起こすメカニズムとして、GNAS 領域の欠失症例はいくつか報告がされているが、配列も同定された GNAS 領域の重複症例は本症例が初めてとなる。

母由来アレルの A/B-DMR のメチル化維持に重要なシス因子として STX16、NESP55-DMR があげられるが、本症例では、構造異常に伴う切断点が NESP55-DMR に存在することにより A/B-DMR のメチル化を維持できなくなっている、あるいは、シス因子である STX16 が A/B-DMR と重複により距離的に離れ、立体構造の変化が A/B-DMR のメチル化に障害を来している可能性が考えらる。

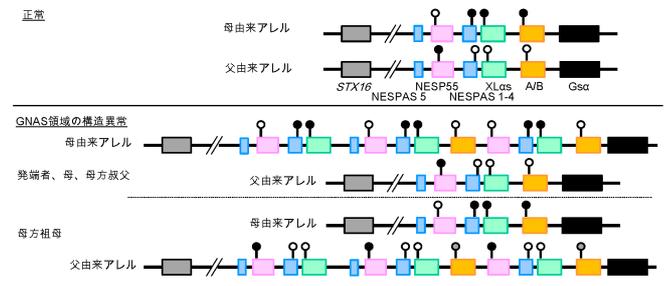


図5. GNAS領域の染色体増異常

## 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 1 件)

(1) Nakamura A, Hamagudhi E, Horikawa R, Nishimura Y, Matsubara K, Sano S, Nagasaki K, Matsubara Y, Umezawa A, Tajima T, Ogata T,

Kagami M, Okamura K, Fukami M. Complex Genomic Rearrangement within the GNAS Region Associated with Familial Pseudohypoparathyroidism Type 1b  
J Clin Endocrinol Metab. (投稿中)

なし

(3)連携研究者  
なし

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) CLDN16 遺伝子のミスセンス変異をヘテロ接合性に有する高カルシウム尿症、腎石灰化症例 (第 49 回 日本小児内分泌学会、2015 年 10 月 8 日～10 月 10 日、タワーホール船堀)

(2) 家族性偽性副甲状腺機能低下症 1b を招く新たなゲノム再構成の同定と成立機序の解明 (第 49 回、日本小児内分泌学会、2015 年 10 月 8 日～10 月 10 日、タワーホール船堀)

(3) 家族性偽性副甲状腺機能低下症 1b を招く新たなゲノム再構成の同定と成立機序の解明 (第 60 回日本人類遺伝学会、2015 年 10 月 14 日～10 月 17 日、京王プラザホテル)

〔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

氏名：中村 明枝

氏名のローマ字表記：Nakamura Akie

機関名：国立研究開発法人国立成育医療  
研究センター

所属部局名：分子内分泌研究部

職名：研究員

研究者番号：907274708

### (2) 研究分担者