

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09630

研究課題名(和文) 甲状腺形成異常におけるメチローム解析

研究課題名(英文) Methylome Analysis of Thyroid Dysgenesis

研究代表者

鳴海 覚志 (Narumi, Satoshi)

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・室長

研究者番号：40365317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺形成異常(TD)患者末梢血DNAと対照DNAを用いて、平均メチル化率の異なるゲノム領域を探索した。PBAT法による解析(TD 7検体、対照 3検体)では、甲状腺特異的転写因子PAX8のCpGアイランドを含む約300箇所の候補領域を同定した。しかし解析スケールを増加したビーズアレイ法による解析(TD 10検体、対照 16検体)では、候補領域の異常は再現できなかった。ビーズアレイ法のデータのみでクラスタリング解析、甲状腺特異的転写因子に絞った解析を行ったが、いずれにおいても有意差は検出できなかった。以上から「TD発症にDNAメチル化異常が関与する」とした本研究の作業仮説は否定的であった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we screened genomic region showing differential methylation levels using DNA samples derived from patients with thyroid dysgenesis (TD) or age-matched control individuals. Analysis with the PBAT method (TD N=7; control N=3) revealed about 300 genomic regions, including the CpG island of the thyroid-specific transcription factor PAX8, were identified as the candidate regions. However, replication analysis with the BeadArray method failed to reproduce the abnormalities identified in the initial screening. We also re-analyzed the difference with the dataset obtained by the BeadArray method, but no significant difference was detected in the clustering analysis and analysis focusing on thyroid-specific transcription factors. The above data did not support our working hypothesis that "DNA methylation abnormality is involved in the onset of TD".

研究分野：小児内分泌学

キーワード：小児内内分泌学 甲状腺形成異常 遺伝学 エピジェネティクス メチローム

1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症 (Congenital hypothyroidism; CH) は約 3,000 出生に 1 名にみられる最も高頻度の先天性内分泌疾患である。甲状腺ホルモンは正常な成長・発達に不可欠であり、無治療の CH では不可逆的な成長障害・知能障害が認められる。重症 CH の約 80% は、甲状腺器官形成過程の異常、すなわち甲状腺形成異常 (thyroid dysgenesis; TD) であり、臨床的には甲状腺無形成、甲状腺低形成、異所性甲状腺を含む。その臨床的重要性にもかかわらず、TD の病因は大部分不明である。器官全体の形成異常という劇的なフェノタイプには何らかの分子レベルの異常が想定され、事実、TD の一部は PAX8 など甲状腺形成に関わる転写因子の遺伝子変異を病因とする。しかし、我々による本邦 TD 患者 51 例における甲状腺転写因子群の網羅的遺伝子解析研究では、既知責任遺伝子により説明される TD 例はわずか 4% であった。フランスの観察研究では TD の 98% は孤発例であり、単一遺伝子異常は主因でないことを支持する。また一児が TD に罹患した一卵性双生児対 13 組のうち、二児とも TD であったのは 1 対のみであることも、単一遺伝子異常が主因ではないことを支持する。このような背景のもと、遺伝性を示さないが大きな発生物学的インパクトをもたらす分子レベル異常として DNA メチル化異常に着目し、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は「甲状腺形成異常発症に DNA メチル化異常が関与する」という作業仮説の検証である。

3. 方法

試料収集・解析対象の選択

本研究では、放射線学的に診断された TD 患者、すなわち超音波もしくは甲状腺シンチグラフィで異所性甲状腺、甲状腺無形成と診断された患者を解析対象とした。既知 CH 責任遺伝子に変異を有する者、家族歴のある者、甲状腺外合併症のある者、染色体異常のある者は除外した。

対照群として、研究目的での遺伝学的解析に関しインフォームドコンセントを取得した健常小児に由来するゲノム DNA 検体 (主に遺伝性疾患の家族解析の際に採取された末梢血由来 DNA) を用いた。

PBAT 法によるメチローム解析

TD 患者 7 検体
コントロール 3 検体

ビーズアレイ法によるメチローム解析

TD 患者 10 検体
コントロール 16 検体

DNA の調整、バイサルファイト処理

開始試料として TD 患者白血球由来ゲノム DNA 100 ng (もしくは 500 ng) を用いて EZ DNA Methylation-Gold Kit (ZYMO Research) でバイサルファイト処理を行った。

PBAT 法によるメチローム解析

バイサルファイト処理後 DNA 100 ng に上流側アダプター配列を組み込んだビオチン化ランダムプライマーをハイブリダイズし、Klenow fragment (3' → 5', exo-) で第一鎖を合成した。ストレプトアビジンビーズを用いて第一鎖を回収し、下流側アダプター配列を組み込んだランダムプライマーを用いて第二鎖を合成した。最後に、アタッチメントサイト配列を含む上流側プライマー・下流側プライマーで PCR 増幅を行い、NGS 解析が可能なライブラリを構築した [以上 Post-bisulfite adaptor-tagging (PBAT) 法] 本研究では DMR に重点をおいたハイスループット解析を行うため、SureSelect-Methyl-Seq Kit (アジレント) を用いてメチル化領域に由来するライブラリを濃縮し、HiSeq2500 (イルミナ) で解析した。

データは、連携研究者の伊藤らが開発した独自のパイプラインで解析し、専用ブラウザで視覚化を行った。

ビーズアレイ法によるメチローム解析

バイサルファイト処理後 DNA 500 ng を Infinium Methylation EPIC BeadChip Kit (イルミナ) のマイクロアレイにハイブリダイズし、iScan アレイスキャナーで信号強度を定量した。出力されたデータは、GenomeStudio Data Analysis ソフトウェアを用いて解析を行った。

4. 結果と考察

PBAT 法によるメチローム解析

PBAT 法を用いて、次世代シーケンシングでメチル化解析を行った検体 (TD 患者 7 検体、コントロール 3 検体) につき、メチル化率の差異が値で 0.1 以上、t 検定での P 値が 0.05 未満の条件で候補領域を探索したところ、ゲノム全体で約 300 箇所領域を同定した。この領域内には、甲状腺形成に役割をはたす転写因子 PAX8 の遺伝子内の CpG アイランドが含まれており、特に重要な候補領域と推測された (図 1)。

ビーズアレイ法によるメチローム解析

次に、PBAT 法によるメチローム解析で検

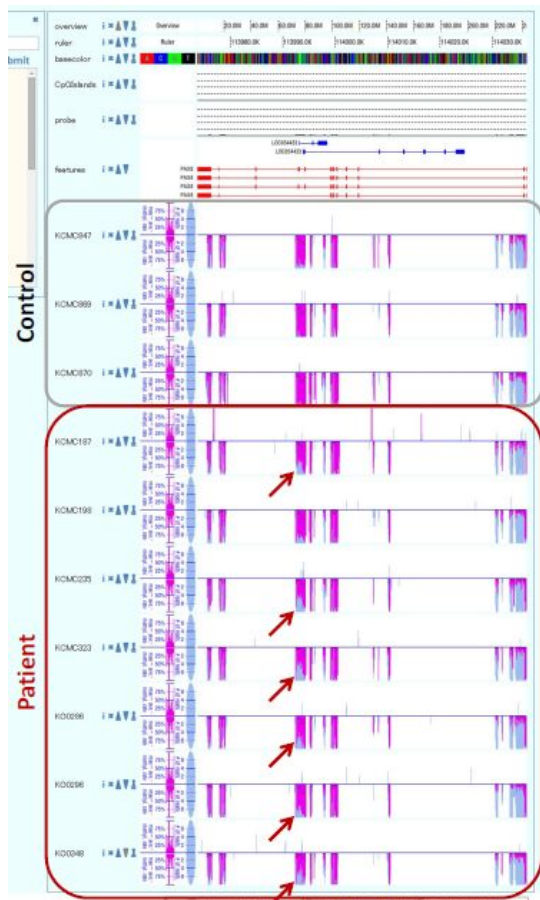


図1 PAX8 遺伝子内の CpG アイランドにおけるメチル化率を示す。メチル化率に差異を認めた部位を矢印で示す。

出された候補領域の検証を目的に、原理の異なるメチローム解析としてビーズアレイ法による解析を、サンプルサイズを大きくした上で行った (TD 患者 10 検体、コントロール 16 検体)。クオリティコントロールを通過した TD 9 検体とコントロール 15 検体の比較では、PBAT 法による解析で得られた約 300 箇所の候補領域の全てにおいて、値 0.1 以上、P 値 0.05 未満の基準を満たす領域はなかった。PAX8 遺伝子内の候補領域については、ビーズアレイ法による解析だけでなく、バイサルファイト処理 DNA に対する PCR-直接シーケンシングによる解析も試みたが、この追加解析においても、有意な差異は検出できず、PBAT 法あるいは NGS 解析に特有の偽陽性と判断せざるをえなかった。

ビーズアレイ法による解析は PBAT 法による解析に比べサンプルサイズが大きいため、それ単独での TD 群とコントロール群の差異に関する検討も行った。ゲノム全体のメチル化データを使ったクラスタリング解析(図2)では、TD 群に特有なパターンを見出すことはできなかった。また、甲状腺形成に関わることが知られる 3 種の転写因子 (PAX8、NKX2-1、FOXE1) に絞った解析においても、TD 群において有意にメチル化率が異なるプ

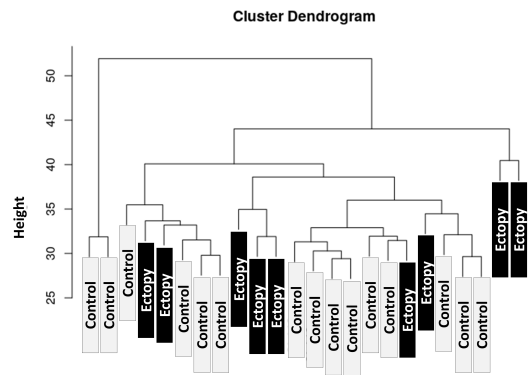


図2 ビーズアレイ法によるメチローム解析データのクラスタリング解析。黒は TD 群、灰色はコントロール群を示す。

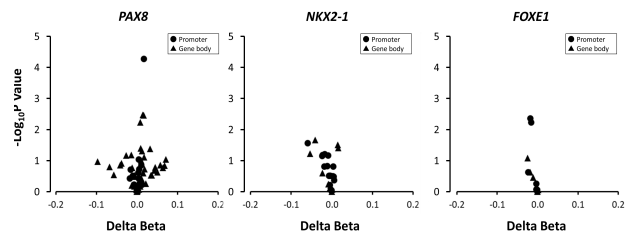


図3 3種の甲状腺特異的転写因子 (PAX8、NKX2-1、FOXE1) のプロモーター (○) もしくは遺伝子内 (△) のメチル化率の差異を示すボルケーノプロット

ローブは発見できなかった(図3)。以上から、ゲノム全体でみた場合においても、既知の甲状腺特異的転写因子に限定した場合においても、疾患に特異的なメチル化異常パターンは観察されなかった。

本研究の限界として以下の2点が挙げられる。まず、本研究は過去に例のない規模の患者サンプル数の研究であるが、それでも計 16 名分の患者サンプルしか有効に解析できていない。仮にメチル化異常が TD 発症の 10-20% 程度のみに関わるマイナーな発症要因であった場合には、群間比較によるメチル化率の差異の検出は原理的に不可能である。第二に、末梢血細胞のメチル化状態と発生過程の甲状腺細胞のメチル化状態が必ずしも一致しない可能性がある。この場合、本研究で採用した末梢血細胞を用いた解析では病態探索が成立しない。しかし、摘出甲状腺組織と末梢血細胞とのメチル化状態の比較した Abu-Khudir R らによる研究 (*J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99:E1120-1129)では甲状腺組織と末梢血細胞のメチル化の違いは軽微と結論づけられており、真のメチル化率の差異が組織差によりマスクされた可能性は低いと考える。

本研究全体を通じての結論としては、TDの発症の主要なメカニズムとして、DNAメチル化異常が関わる可能性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2件)

1. Narumi S, Fox LA, Fukudome K, Sakaguchi Z, Sugisawa C, Abe K, Kameyama K, Hasegawa T. Mild thyroid peroxidase deficiency caused by TPO mutations with residual activity: Correlation between clinical phenotypes and enzymatic activity. *Endocr J.* 2017;64: 1087-1097.
2. Sugisawa C, Higuchi S, Takagi M, Hasegawa Y, Taniyama M, Abe K, Hasegawa T, Narumi S. Homozygous DUOXA2 mutation (p.Tyr138*) in a girl with congenital hypothyroidism and her apparently unaffected brother: Case report and review of the literature. *Endocr J.* 2017;64:807-812

〔学会発表〕(計5件)

1. Satoshi Narumi, Kiyomi Abe, Larry Fox, Miki Kamimura, Junko Kanno, Ikuma Fujiwara, Keisuke Fukudome, Zenichi Sakaguchi, Maki Fukami, Tomonobu Hasegawa. Mild Thyroid Peroxidase Defect: A Case Series. Biannual Meeting of Asia Pacific Paediatric Endocrine Society. 2016年10月、東京
2. 鳴海 覚志、堀 尚明、玉井 伸哉、佐藤 清二、長谷川 奉延 JAG1 レアバリエーション (p.Thr569Met) を同定した非症候性先天性甲状腺機能低下症の一例. 日本小児遺伝学会. 2016年11月、東京
3. 鳴海 覚志、阿部 清美、Larry A. Fox、福留 啓祐、坂口 善市、深見 真紀、長谷川 奉延. 部分型 TPO 異常症: 新生児マススクリーニングが陰性であった TPO 異常症の 2 例. 日本内分泌学会 2017 年 4 月、京都
4. 鳴海 覚志. 先天性甲状腺機能低下症の成因: 遺伝、環境、相互作用. 日本内分泌学会、2017年4月、京都
5. 鳴海 覚志. 先天性甲状腺機能低下症の分子基盤解明. 日本甲状腺学会、2017年11月、別府

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鳴海覚志(Satoshi Narumi)国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・室長

研究者番号: 40365317

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

伊藤隆司(Takashi Ito)九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 90201326

(4)研究協力者

なし