

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19538

研究課題名(和文)新規遺伝子解析技術を用いた性成熟疾患の病因の解明

研究課題名(英文) Systematic mutation screening and genome-wide copy number analysis of patients with delayed puberty and precocious puberty.

研究代表者

鈴木 江莉奈 (Suzuki, Erina)

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・(非)研究員

研究者番号：60726785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、思春期遅発症/性腺機能低下症218検体、思春期早発症48検体を対象として、次世代シーケンサーによる包括的遺伝子解析とアレイ comparative genomic hybridization(アレイCGH)によるゲノム構造異常解析を行った。主な研究成果として、難聴と虹彩色素脱出を伴うKallmann症候群患者1名における機能喪失型SOX10変異の同定、卵巣機能不全患者2名におけるX染色体複雑構造異常の同定、思春期早発症患者1名における世界初の機能亢進型PROKR2変異の同定、が挙げられる。

研究成果の概要(英文)：We conducted next generation sequencing-based comprehensive screening of nucleotide-level mutations and array comparative genomic hybridization-based screening of genomic rearrangements for 218 samples obtained from patients with delayed puberty and 48 samples obtained from patients with precocious puberty,. As a result, we found (i) a novel inactivating SOX10 mutation in a patient with Kallmann syndrome accompanied by deafness and iris hypopigmentation; (ii) complex X chromosome rearrangements in two patients with ovarian dysfunction, and (iii) the first activating PROKR2 mutation in a patient with precocious puberty.

研究分野：分子生物学

キーワード：次世代シーケンサー アレイCGH 変異 染色体異常

1. 研究開始当初の背景

性成熟疾患には、思春期遅発症と思春期早発症が含まれる。これらの疾患の原因として、視床下部・下垂体・性腺のホルモン産生に關与するさまざまな遺伝子の異常が同定されている。

一方で従来のサンガー法による遺伝子解析では、多数の検体を対象とした全既知原因遺伝子の変異スクリーニングは不可能であった。また、ヘテロのゲノム微細構造異常は検出困難であり、多数の性成熟疾患患者を対象とする全ゲノムコピー数解析は行われていない。

近年、次世代シーケンサーおよびアレイ comparative genomic hybridization (アレイ CGH) が開発され、多数の検体を用いた遺伝子スクリーニングや、従来法で同定困難であったヘテロゲノム微細構造異常の検出が可能となった。

2. 研究の目的

最新の技術を用いた思春期遅発症・思春期早発症患者の遺伝子解析により、性成熟疾患における既知遺伝子変異の寄与を明確とし、新規原因責任遺伝子を探索することである。

3. 研究の方法

既責任遺伝子を含む遺伝子疾患パネルを作成し、思春期遅発症・思春期早発症患者を対象に、次世代シーケンサーによる遺伝子変異スクリーニングを行った。既知原因遺伝子に変異が同定された場合は、家族解析、*in silico*解析、*in vitro*機能解析などによって表現型と遺伝子型との検討、遺伝子機能の解明を行った。

既知原因遺伝子に変異が同定されなかった症例に関しては、エクソーム解析を行い、新規原因遺伝子の探索を行った。

対象症例の中で特異な合併症を有する症例

に関しては、アレイCGHによるゲノム欠失・重複の評価を行った。

4. 研究成果

思春期遅発症/性腺機能低下症 218検体、思春期早発症 48検体を対象として、既知責任遺伝子を含む約90遺伝子の次世代シーケンサー解析を行った。その結果、80症例（約30%）に疾患原因と考えられる異常を既知責任遺伝子に同定した。更に、既知責任遺伝子の異常を否定された中枢性性腺機能低下症患者8家系15名を対象としてエクソーム解析を行い、新規責任遺伝子を探索した。また、アレイCGHによるゲノム欠失・重複の評価を行い、既知責任遺伝子に異常のない3症例で疾患原因と考えられるゲノムコピー数異常を同定した。以下に挙げる3症例に関しては、論文化を行った。

難聴と虹彩色素脱出を伴う Kallmann 症候群より、Waardenburg 症候群既知責任遺伝子として知られる *SOX1* に機能喪失変異(p.L145P)を同定した。この症例に関して家族解析を行い、*de novo* 変異であることを確認した。また、MITF プロモーター・ルシフェラーゼ融合遺伝子をレポーターとしたルシフェラーゼアッセイにより、p.L145P 変異が機能喪失型変異であることを確認した。以上は *SOX10* 機能喪失型変異が Waardenburg 症候群のみならず、難聴と虹彩色素脱出を伴う Kallmann 症候群を招きうることを示すものであり、*SOX10* 機能喪失型変異と内分泌疾患との関連性に関する新たな知見である。

非症候性卵巣機能不全女性患者とターナー症候群を呈する卵巣機能不全女性患者において X 染色体複雑構造異常を同定した。前者は、既報のクロモソプシスによる染色体破砕所見に一致した。後者は、X 短腕末端領域転座と同腕

染色体形成という独立した2現象の連続が関与していた。

以上により、生殖細胞系列におけるゲノム再構成の発症に、クロモスリプシス及び同腕染色体が関与することを明らかにした。

思春期早発症患者においてその機能低下により中枢性思春期早発症を引き越す*PROKR2*に世界初となる機能亢進型変異を同定した。この症例に関しては、家族解析を行い、症例の母親に同一の変異を認めた。細胞内カルシウム濃度測定をエンドポイントとした発現実験を行い、この変異が機能亢進型変異であることを示した。以上の研究を通じて、ヒト内分泌疾患の原因となる新たなGタンパク質共役型受容体の機能亢進メカニズムを示すことができた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計7件)

Suzuki E, Izumi Y, Chiba Y, Horikawa R, Matsubara Y, Tanaka M, Ogata T, Fukami M, Naiki Y. Loss-of-Function SOX10 mutation in a patient with Kallmann syndrome, hearing loss, and iris hypopigmentation. *Hormone Research in Paediatrics* 2015;84(3):212-6. DOI:10.1159/000436965. Epub 2015 Jul 29. 査読あり

Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nagasaki K, Horikawa R, Nagai T, Tsuchiya T, Suzuki E, Miyado M, Hata K, Nakabayashi K, Hayashi K, Matsubara Y, Baba T, Morohashi K, Igarashi A, Ogata T, Takada S, Fukami M. Testicular dysgenesis/regression without campomelic dysplasia in patients carrying missense mutations and upstream deletion of SOX9. *Molecular Genetics and Genomic Medicine* 2015 Jul 14;3(6):550-7. DOI: 10.1002/mgg3.165.

eCollection 2015 Nov. 査読あり

Shima H, Yatsuga S, Nakamura A, Sano S, Sasaki T, Katsumata N, Suzuki E, Hata K, Nakabayashi K, Momozawa Y, Kubo M, Okamura K, Kure S, Matsubara Y, Ogata T, Narumi S, Fukami M. NR0B1 frameshift mutation in a boy with idiopathic central precocious puberty. *Sexual Development*. 2016;10(4):205-209. Epub 2016 Sep 21. 査読あり

Nagai K, Shima H, Kamimura M, Kanno J, Suzuki E, Ishiguro A, Narumi S, Kure S, Fujiwara I, Fukami M. Xp22.31 microdeletion due to microhomology-mediated break-induced replication in a boy with contiguous gene deletion syndrome. *Cytogenetic and Genome Research* 2017;151(1):1-4. DOI:10.1159/000458469. Epub 2017 Mar 3. 査読あり

Suzuki E, Shima H, Toki M, Hanew K, Matsubara K, Kurahashi H, Narumi S, Ogata T, Kamimaki T, Fukami M. Complex X-chromosomal rearrangements in two women with ovarian dysfunction: Implications for chromothripsis/chromoanaphase-dependent and -independent origins of complex genomic alterations. *Cytogenetic and Genome Research* 2016 in press DOI: 10.1159/000455026. 査読あり

Fukami M, Shima H, Suzuki E, Ogata T, Matsubara K, Kamimaki T. Catastrophic cellular events leading to complex chromosomal rearrangements in the germline. *Clinical Genetics* 2017 May;91(5):653-660. DOI: 10.1111/cge.12928. Epub 2017 Feb 22. 査読あり

Fukami M, Suzuki E, Izumi Y, Torii T, Narumi S, Igarashi M, Miyado M, Katsumi M, Fujisawa Y, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Matsubara Y, Yamauchi J, Ogata T. Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein-coupled receptor PROKR2 promotes early puberty. Journal of Cellular and Molecular Medicine 2017 Mar 24. DOI: 10.1111/jcmm.13146. [Epub ahead of print] 査読あり

[学会発表] (計3件)

鈴木 江莉奈、泉 陽子、千葉 悠太、堀川 玲子、松原 洋一、緒方勤、内木 康弘、深見 真紀。難聴を合併する Kallmann 症候群と Waardenburg 症候群患者における SOX10 変異の同定。第 49 回小児内分泌学会 2015 年 10 月 08 日—2015 年 10 月 10 日 船堀

鈴木 江莉奈 泉 陽子 鳥居 知宏 五十嵐 麻希 宮戸 真美 勝見 桃理 山内 淳司 藤澤 泰子 緒方 勤 深見 真紀。内分泌疾患の原因となる新たな G タンパク共役型受容体機能亢進メカニズムの解明。第 50 回日本小児内分泌学会学術集会 2016 年 11 月 16 日、東京

鈴木 江莉奈 島 彦仁 土岐 真智子 羽 二生 邦彦 松原 圭子 倉橋 浩樹 鳴海 覚志 緒方 勤 上牧 務 深見 真紀。卵巣機能不全患者 2 例における複雑 X 染色体再構成の同定。第 39 回日本小児遺伝学会。2016 年 12 月 9 日—10 日 東京。

[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]

ホームページ等

ホームページ情報: 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

<http://nrichd.ncc-hd.go.jp/endocrinology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 江莉奈 (SUZUKI Erina)

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: 60726785

