

令和元年5月15日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09998

研究課題名(和文) 生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症の分子基盤の解明と新規責任遺伝子の同定

研究課題名(英文) molecular basis and a new genetic cause of primary adrenal insufficiency

研究代表者

天野 直子 (Amano, Naoko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：70348689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：(1)「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」の63例中54例で遺伝子変異を同定した(STAR 19例、NROB1 20例、SAMD9 8例、AAAS 3例、NNT 2例、MC2R 1例、CDK N1C 1例)。各単一遺伝子疾患の臨床的特徴について検討した成果を学術雑誌に受理された。
(2)先天性副腎低形成症3例で遺伝子A内に微細欠失を同定した。遺伝子A安定発現株を用いたin vitro機能解析で、欠失型は、野生型よりもカテニン産生能が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」の分子基盤および各単一遺伝子疾患の臨床的特徴を明らかとした。さらに先天性副腎低形成症の新規責任遺伝子を発見し、その分子機構がWnt-カテニンシグナル系の低下であることを明らかにする。最終的にはヒトの副腎発生分化におけるWnt-カテニンシグナル系の意義を解明することが目標である。

研究成果の概要(英文)：We enrolled 63 Japanese children (59 families) with biochemically uncharacterized PAI, and sequenced 12 PAI-associated genes. We calculated the proportion of mutation-carrying patients according to demographic characteristics. We identified genetic defects in 50 (85%) families: STAR in 19, NROB1 in 18, SAMD9 in seven, AAAS in two, NNT in two, MC2R in one and CDKN1C in one. This work was published in the peer-reviewed academic journal 'European journal of endocrinology.'

We identified submicroscopic deletions in the gene A in three patients with adrenal hypoplasia. The in vitro study using the HEK293 cells having stable expression of gene A revealed that β -catenin producing-capacity would decrease in the identified gene A-deleted cells.

研究分野：小児内分泌

キーワード：副腎機能低下症

1. 研究開始当初の背景

(1) 「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」とは

原発性副腎皮質機能低下症の中で、生化学的に特徴的な所見を呈さない「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」はその病因により、先天性リポイド副腎過形成症(責任遺伝子:CYP11A1, STAR)、先天性副腎低形成症(責任遺伝子:NR0B1, NR5A1)、家族性グルココルチコイド欠損症(責任遺伝子:MC2R, MRAP, NNT, TXNRD2)に大別される。その他、副腎低形成を伴う症候群として、triple A 症候群(責任遺伝子:AAAS)、IMAGe 症候群(責任遺伝子:CDKN1C)、MCM4 異常症(責任遺伝子:MCM4)、MIRAGE 症候群(責任遺伝子:SAMD9)などが報告されている。

「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」54 例を対象に遺伝子解析を行った。解析遺伝子は最近報告されたものを含む全ての責任遺伝子(AAAS, CYP11A1, CDKN1C, NR0B1, MC2R, MCM4, MRAP, NNT, NR5A1, STAR, TXNRD2)を網羅している。全 54 例中 37 例で遺伝子変異を同定した(STAR 16 例、NR0B1 16 例、NNT 2 例、AAAS 2 例)。遺伝子解析対象症例は性別、発症年齢、成長データ、内分泌学的所見、画像所見、合併症の有無、予後などの詳細な臨床データを連結しており、責任遺伝子 変異 表現型解析が可能である。

(2) Wnt- カテニン系と副腎皮質の発生・分化

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。

われわれの研究室は変異陰性例を対象にオリゴアレイ CGH (Agilent 1M)を行った。2 例で同一遺伝子(遺伝子 A)内に翻訳領域を含む 50kb、80kb の微細欠失を同定し、FISH (50kb と 80kb 欠失例)で確定した。両親も FISH を行い、同定した欠失は 1 家系で新規発生であることを確認した。もう 1 家系で母に同欠失の体細胞モザイクを認めた。1 症例については切断点も同定した。マウス副腎皮質由来 Y1 細胞の遺伝子 A の発現を確認した。ヒト成人副腎 cDNA でも遺伝子 A の発現を確認した。さらに、成獣および新生仔マウス副腎を用いて in situ hybridization を行い、副腎皮質被膜下での遺伝子 A 発現を確認した。先行研究で遺伝子 A が Wnt- カテニン系に關与する分子であると報告されている。平成 27 年度に科研費「研究活動スタート支援」を受けて、遺伝子 A の一過性強制発現系(HEK293 細胞、CMV プロモーターによる遺伝子 A 過剰発現下)における Wnt- カテニン機能解析系を確立した。変異体(該当領域欠失)と野生型のカテニン産生能の比較をしたところ、遺伝子 A 過剰発現下では、野生型・変異体ともにカテニン産生が抑制された。一過性強制発現系では、遺伝子 A 過剰発現(飽和状態)となるため、遺伝子 A 発現のカテニン産生に対する調節能を正確に評価できないと判断した。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は以下の 2 点である。(1)【「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」の分子基盤の解明】:「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」における各単一遺伝子疾患の臨床的な特徴および遺伝子型 - 表現型関連を明らかにする。(2)【遺伝子 A が先天性副腎低形成症の責任遺伝子であることを明らかにする】:本研究期間中に、切断点未確定例の切断点同定、新たな症例の探索、薬剤誘導性安定発現下の in vitro 機能解析系の確立を行う。

3. 研究の方法

(1) 【「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」の分子基盤の解明】

単一遺伝子疾患の変異陽性率の算出、臨床的特徴の抽出と遺伝子型 - 表現型関連解析
変異陽性例の臨床症状（成長、外陰部所見、塩喪失の有無など）、検査所見（内分泌学的所見、画像所見）などの臨床データを用いて、各単一遺伝子疾患の臨床的な特徴および遺伝子型 - 表現型関連の解析をする。

(2) 【遺伝子 A が先天性副腎低形成症の責任遺伝子であることを明らかにする】

切断点未確定 1 例の切断点同定

切断想定領域周囲に密にプローブを設定したカスタムアレイにより切断候補領域をさらに狭め、再度 PCR 直接シーケンス法による切断点同定を試みる。カスタムアレイで候補領域を狭めても切断点同定が不可能な場合には、カスタムアレイにより同定された候補領域の情報に加え、全ゲノムシーケンス解析を用いて、切断点同定を試みる。

カスタムアレイによる遺伝子 A 微細欠失症例の検索

既知責任遺伝子変異陰性例を対象に、遺伝子 A のカスタムアレイを行い、新たな遺伝子 A 微細欠失例を検索する。

遺伝子 A 薬剤誘導性安定発現下での *in vitro* 機能解析系の確立

i) 遺伝子 A cDNA を薬剤誘導性安定発現ベクター（具体的には Cumate 誘導性 PiggyBac トランスポゾン発現ベクター）に制限酵素処理で挿入し、遺伝子 A 薬剤誘導性安定発現ベクターを作成する。同様にして、該当領域を欠失した遺伝子 A 薬剤誘導性安定発現ベクターも作成する。

ii) 遺伝子 A 薬剤誘導性安定発現ベクターを HEK293 細胞に導入し、ピューロマイシン選択により、遺伝子 A 薬剤誘導性安定発現細胞株を樹立する。

iii) 遺伝子 A 薬剤誘導型安定発現株にルシフェラーゼ発現ベクター（TCF/LEF レポーター）を導入する。誘導薬剤（Cumate）とヒト Wnt3a とヒト RSP01 を培養液中に添加後に ONE-GLO reagent を添加し、蛍光強度を定量する。誘導薬剤の添加量と添加時間などの条件検討により、Wnt3a と RSP01 添加量増加に伴い、カテニン産生量が増加する遺伝子 A 発現誘導薬剤添加量と添加時間（すなわち遺伝子 A 発現過剰でないことを意味する）を決定する。

4. 研究成果

(1) 新たな症例を追加し、「生化学診断が困難な原発性副腎皮質機能低下症」の対象症例は 63 例に増えた。全 63 例中 54 例で遺伝子変異を同定した（STAR 19 例、NROB1 20 例、SAMD9 8 例、AAAS 3 例、NNT 2 例、MC2R 1 例、CDKN1C 1 例）（図 1、表 1）。対象症例の臨床データを用いて各単一遺伝子疾患の臨床的特徴および遺伝子型 - 表現型関連について検討した。学術論文を投稿し、受理された（European Journal of Endocrinology 2017 177 187-194）。

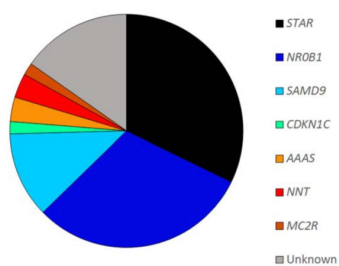


図 1 .

表 1

	Legal sex (n)	Karyotype (n)	External genitalia (n)	Replacement therapy and nonendocrine features (n)	Genetic defects (n)
59 probands	Male (35)		Normal (30)	GC+MC (22)	<i>NROB1</i> (18) <i>NNT</i> (1) Unknown (1)
				GC alone (5)	<i>STAR</i> (2) <i>MC2R</i> (1) Unknown (2)
				Nonendocrine features (3)	<i>AAAS</i> (1) Unknown (2)
	Female (24)		Underdeveloped (5)	GC+MC (1)	<i>STAR</i> (1)
				Nonendocrine features (4)	<i>SAMD9</i> (4)
46,XY (5)			GC+MC (10)	<i>STAR</i> (9) Unknown (1)	
			GC alone (5)	<i>STAR</i> (3) <i>AAAS</i> (1) <i>NNT</i> (1)	
			Nonendocrine features (4)	<i>SAMD9</i> (2) <i>CDKN1C</i> (1) Unknown (1)	
				GC+MC (4)	<i>STAR</i> (4)
				Nonendocrine features (1)	<i>SAMD9</i> (1)

GC, glucocorticoid; MC, mineralocorticoid.

(2) さらに1例に新たな遺伝子A微細欠失を同定した。最終的に遺伝子A内に微細欠失を有する先天性副腎低形成症は3例となった。3例中2例において欠失特異的PCRを行い、欠失領域(切断点)を確定した。確定した2例の欠失領域は75kbと8kbであった。確定不可能であった残りの1例において次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンス解析を行った。解析により想定された領域についてPCR直接シーケンスを行い、60kb欠失と4kb挿入を確定した。

遺伝子A薬剤誘導型安定発現株(HEK293細胞)を用いて、ルシフェラーゼ発現ベクター(TCF/LEFレポーター)の導入、誘導薬剤(Cumate)とヒトWnt3aとヒトRSP01添加後のカテニン産生能を検討したが、樹立後培養期間が長くなるにつれて、リークの影響が大きくなること、誘導薬剤に対する反応性にばらつきがでることなどがあり解析が困難であった。そこで、遺伝子A(野生型・欠失型)安定発現ベクター(PiggyBacトランスポゾン発現ベクターに遺伝子AcDNAを挿入)を作成し、遺伝子A安定発現株を樹立した。樹立後4週間以内の細胞株のみを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果、リガンド(Wnt3a, RSP01)添加下で欠失型遺伝子A安定発現株は野生型遺伝子A安定発現株と比較し、カテニン産生能が50%以下に低下した(図2)。

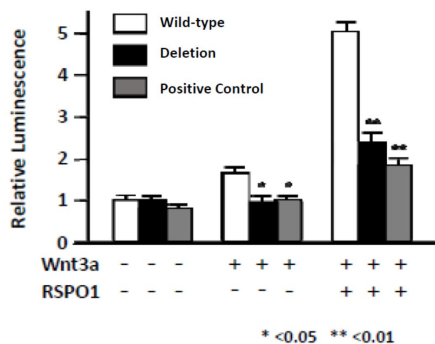


図 2

以上より、遺伝子Aが副腎低形成症をきたす新規責任遺伝子であり、その分子機構はWnt-カテニン系のシグナル伝達の低下であると考えた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1)Hatabu N, Amano N, Mori J, Hasegawa Y, Matsuura H, Sumitomo N, Nishizawa K, Suzuki M, Katakura S, Kanamoto N, Kamimaki T, Ishii T, Hasegawa T. Pubertal Development and Pregnancy Outcomes in 46,XX Patients with Nonclassic Lipoid Congenital Adrenal Hyperplasia. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 104(5) 1866-1870 doi: 10.1210/jc.2018-01752. [査読有り]

(2)Amano N, Narumi S, Hayashi M, Takagi M, Imai K, Nakamura T, Hachiya R, Sasaki G, Homma K, Ishii T, Hasegawa T. Genetic defects in pediatric-onset adrenal insufficiency in Japan. European journal of endocrinology 2017 177(2) 187-194. doi: 10.1530/EJE-17-0027. [査読有り]

〔学会発表〕(計3件)

(1) 天野直子「副腎疾患の最近の話題~21 水酸化酵素欠損症を中心に~」 臨床内分泌 Update 2018年11月

(2)天野直子, 鳴海覚志, 長谷川奉延「本邦における STAR 遺伝子変異 p.Q258*と p.R272C の創始者効果の検証」日本小児内分泌学会学術集会 2018年

(3) 天野直子, 鳴海覚志, 鳴海覚志, 林美恵, 林美恵, 高木優樹, 蜂屋瑠見, 蜂屋瑠見, 佐々木悟郎, 佐々木悟郎, 本間桂子, 石井智弘, 長谷川奉延「小児期発症原発性副腎皮質機能低下症 63 例における遺伝子異常:STAR 変異例の遺伝子型と臨床的特徴」日本小児内分泌学会学術集会 2017年

〔図書〕(計3件)

(1)天野直子, 長谷川奉延 医歯薬出版株式会社「移行期医療 成人に達する/達した患者への医療 Vol.8 小児内分泌疾患」医学のあゆみ 266(4) 304 309 2018年

(2) 天野直子 東京医学社「小児内分泌アドバンス 副腎 21 水酸化酵素欠損症」小児内科 49(2) 242 245 2017年

(3)天野直子 診断と治療社「先天代謝異常,内分泌疾患 先天性副腎過形成症(21 水酸化酵素欠損症)」小児科診療 80 90 93 2017年

〔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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。