

機関番号：82612

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791025

研究課題名 (和文) 先天性下垂体機能低下症における OTX2 遺伝子解析ならびに機能解析

研究課題名 (英文) Molecular and functional analyses of OTX2 in patients with congenital pituitary hormone deficiency

研究代表者

伊達木 澄人 (DATEKI SUMITO)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・共同研究員

研究者番号：70462801

研究成果の概要 (和文)：われわれは、無・小眼球症の責任遺伝子である *OTX2* が、下垂体の発生・分化に関与し、下垂体機能低下症の原因遺伝子のひとつであることを世界に先駆けて報告した。本研究では、*OTX2* 変異陽性患者の詳細な臨床的、分子遺伝学的検討により、*OTX2* 異常症の下垂体機能を含めた臨床像、*OTX2* 変異による下垂体機能異常症発症機序を明らかにした。本研究成果は、*OTX2* 異常症患者における適切なホルモン補充療法を可能とするという臨床的意義と、下垂体の発生分化にかかわる分子ネットワークの解明に貢献するという基礎医学的意義の両者を有するものである。

研究成果の概要 (英文)：Recent studies have suggested a positive role of *OTX2* in pituitary as well as ocular development and function. In this study, we performed clinical and molecular analyses in patients with *OTX2* mutations, and revealed detailed pituitary phenotype of the mutation positive patients and the mechanism of *OTX2* for development of hypopituitarism. These results allow for an appropriate hormone-replacement therapy in patients with *OTX2* mutations and an understanding of molecular mechanism of pituitary development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：小児内分泌

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 小児科学

キーワード：(1) 遺伝子 (2) 転写因子 (3) 下垂体

## 1. 研究開始当初の背景

*OTX2* は、脳、眼球の発生に重要な転写因子で、paired 型のホメオドメインを有する。*OTX2* を含む 14q22-23 の微小欠失例の一部には、眼奇形のほかに下垂体機能異常をきたす例が存在し、また、下垂体発生に重要な転写因子である *HESX1* のプロモーター部位には

*OTX2* 認識配列が存在していることから、*OTX2* の下垂体発生、分化、機能に対する関与が示唆されてきた。

2009 年度までに、われわれは、*OTX2* が下垂体発生初期から細胞分化にいたる様々な段階で、下垂体形成に関与していることを示唆するデータを得ている。第 1 に、臓器別 cDNA ラ

イブラリーを用いた検討で、*OTX2*が下垂体に発現していることを見いだした。第2に、下垂体発生分化に重要な転写因子である *POU1F1*、*GNRH* のプロモーター領域に *OTX2* 認識配列を同定し、野生型 *OTX2* が *HESX1*、*POU1F1* ならび *GNRH* の転写活性を上昇させることを世界で初めて示した。

さらに、われわれは、眼奇形患者を対象とした変異解析により、無眼球症、成長ホルモン分泌不全性低身長を呈する1女児例において、新規 *OTX2* フレームシフト変異 (c.402insC) を同定した。この変異蛋白は、核移行能、DNA 結合能は保持されていたが、C 末端に存在する転写活性化ドメインを失い、*IRBP*、*HESX1*、*POU1F1* プロモーターを用いた Luciferase assay ではすべてのプロモーターにおいて有意差をもって機能は低下していた。*HESX1* は septo-optic dysplasia や複合型下垂体機能低下症 (CPHD) の原因遺伝子で、そのヘテロ接合性の異常は、CPHD から、成長ホルモン単独欠損症、正常にいたるまで幅広い臨床像をもつとされている。また *POU1F1* 異常症のキャリアーの中には一部低身長例が存在している。これらの事象は、*HESX1* ならびに *POU1F1* の転写活性低下をきたす *OTX2* ヘテロ異常症では、本症例のような成長ホルモン単独欠損症だけでなく、種々の程度の下垂体機能低下症をきたす可能性があることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*OTX2* 変異陽性患者の下垂体機能を含めた臨床像を明らかにすること、および、*OTX2* 変異による下垂体機能異常症発症機序を *in vitro* 機能解析により解明することである。これにより、先天性下垂体機能低下症の発症機序、ならびに下垂体発生・分化の分子基盤を解明することに貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) *OTX2* 変異解析

① 検体集積： 国立成育医療研究センターを中心とする複数の医療機関で継続的に眼奇形ならびに下垂体機能低下症患者の集積を行い、これまでに94例の無・小眼球症、下垂体機能低下症症例を集積した。

② 臨床評価： 診断は各施設において、臨床像、ホルモン学的検査（下垂体前葉ホルモン分泌試験含む）、画像検査を行い決定した。

③ 遺伝子変異解析： 末梢白血球から通常の方法でゲノム DNA を採取し、これをテンプレートとして、*OTX2* 遺伝子の各エクソンならびにその近傍イントロンを PCR にて増幅し、CEQ8000 オートシーケンサー (Beckman Coulter, Fullerton, CA) を用いて直接塩基

配列を決定した。患者においてヘテロの変異が同定された場合には、制限酵素による切断あるいは TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) にサブクローニングして2アールの塩基配列を決定することにより変異を確認した。これまで報告されていない変異が同定された場合は、正常対象者 100 例における当該変異の有無を検討し、その変異が多型か否か、表現型に關与するか検討した。

④ 遺伝子欠失解析： *OTX2* 変異陰性例に対して、*OTX2* 遺伝子を含む欠失の有無を Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA) 法 (MRC-Holland, Amsterdam) を用いて解析した。さらに欠失を疑う所見が得られた場合は、Oligoarray-CGH, Long PCR の手法を用いて、欠失範囲、Break point の決定を行った。

### (2) 変異遺伝子機能解析

① *OTX2* 発現ならびに蛍光ベクターの作製： われわれは、すでに wild type *OTX2* full-length cDNA を pCMV-Myc ベクターならびに pAcGF01-C1 ベクターに組み込んだ発現ベクターを作製していた。変異解析により同定された変異を有する発現ベクターは、mutagenesis の手法で作製した。

② 変異 *OTX2* 蛋白の細胞内局在解析： *OTX2* の核移行シグナルは既報告によりホメオドメインとその3'側に存在していることが判明している。上記の GFP 融合蛋白用い、変異蛋白の細胞内局在を解析した。

③ DNA 結合能解析： *OTX2* 認識配列を含む *IRBP*、*HESX1*、*POU1F1* プロモーター領域のプロローブ、ならびに正常ならびに変異 *OTX2* 遺伝子を transfection した COS-1 細胞の核抽出物と各プロローブを用い、Lightshift chemiluminescent EMSA kit (Pierce, Rockford, IL) にて DNA 結合能を検討した。

④ 転写活性化能解析： われわれはすでに *OTX2* 認識配列を有する *IRBP*、*HESX1*、*POU1F1* プロモーター領域を組み込んだレポーターベクターを作製し、野生型 *OTX2* がすべてのレポーターにて転写活性化能を上昇させることを Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI) にて証明している。変異蛋白の転写活性化能を、これらの手法を用いて検討した。

(3) *OTX2* の *in vitro* 標的遺伝子の *in silico* 同定： *OTX2* 認識配列を有するプロモーターを含む遺伝子をバイオインフォマティクスの手法を用いて同定した。DNA binding assay や transactivation assay により、*OTX2* の標

的遺伝子に対する機能を評価し、下垂体発生分化の転写因子ネットワークにおける OTX2 の役割を明らかとする。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子変異解析

眼症状を有する群において、3種の de novo 新規フレームシフト変異(症例1: c.402insC, p.S135fsX136、症例2: c.221\_236del16, p.K74fsX103、症例3: c.214\_217delGACinsCA, p.A72fsX86)を、また、血族関係のない2例において同一のナンセンス変異(症例4, 5: c.562G>T, p.G188X)をそれぞれヘテロ接合性に同定した。正常コントロール200アリルにこれらの変異は認めなかった。これらの変異は、すべて最後のエクソンに終止コドンが形成されるため、Nonsense mediated mRNA decay を逃れ、異常蛋白を形成すると予測された。眼症状を伴わない下垂体機能低下症患者群には、変異を認めなかった。

##### (2) 遺伝子欠失解析

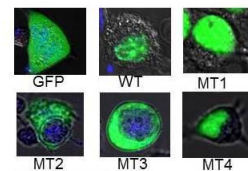
OTX2変異陰性例に対して、欠失解析を行い、無・小眼球症を有する1男児例にOTX2遺伝子を含むヘテロ接合性欠失を同定した(症例6)。Array-CGH, LA-PCRの結果から、この欠失は、OTX2を含む2.86Mbpにおよぶこと、さらに欠失部には上流配列を含む931bpが付加されていることが判明した。この欠失にはOTX2のほか、16の遺伝子が含まれたが、下垂体、眼に参与している遺伝子はOTX2のみであった。

##### (3) OTX2 の in vitro 標的遺伝子の in silico 同定

われわれはバイオインフォマティクスの手法を用い GNRHI 遺伝子のプロモーター領域に OTX2 認識配列が存在すること、さらに OTX2 が同プロモーターに対し、DNA 結合能、転写活性化能を有することを明らかにした。

##### (4) 機能解析

GFP 融合蛋白の細胞内局在、IRBP、HESX1、POU1F1、GNRH1 プロモーターに対する DNA 結合能と転写活性化能を解析した。C 末端の転写活性化ドメインを欠く症例1、4、5の変異蛋白は、核に移行し、DNA 結合能を有したが(図1、2)、全てのプロモーターに対する転写活性化能を優性阻害効果なく喪失していた(図3)。ホメオドメインの一部と転写活性化ドメインを欠く症例2、3の変異蛋白は、核にほとんど移行せず、転写活性化能は喪失していた(図1-3)。



MT1: p.S135fsX136  
MT2: p.K74fsX103  
MT3: p.A72fsX86  
MT4: p.G188X

図1 細胞内局在解析

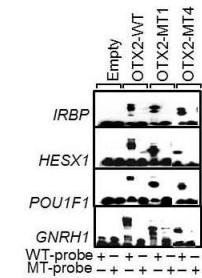


図2 DNA結合能解析

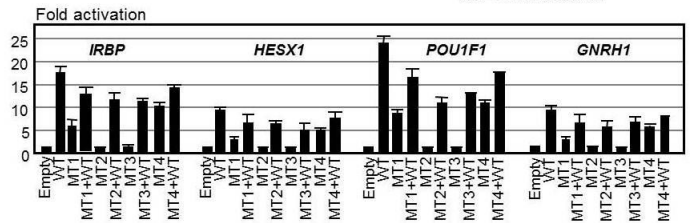


図3 転写活性化能解析

##### (5) 変異・欠失陽性患者の臨床像

変異・欠失陽性例は、全例、さまざまな程度の無・小眼球症と発達遅滞を呈していた。症例1, 2, 4, 6では明らかな成長障害を認め、内分泌学的検査では、フレームシフト変異を伴う症例1, 2ならびに6ではGH単独分泌不全症(GHD)を、症例3ではGH, TSH, PRLの分泌不全を伴う複合型下垂体機能低下症(CPHD)それぞれ認めた。症例3, 5には明らかな下垂体機能異常を認めなかった。MRIでは、症例2, 4に異所性後葉を、症例4, 6に下垂体前葉低形成を認めた。

##### (6) 発現解析

PCR法を用い、ヒトcDNAライブラリースクリーニングを行った。OTX2は下垂体と視床下部において明瞭に発現していた。OTX2には2つのスプライスバリエントが存在することが知られているが、OTX2発現陽性組織においては、exon 4由来の最初の8アミノ酸を欠く short variant の発現が優位であった(図4)。

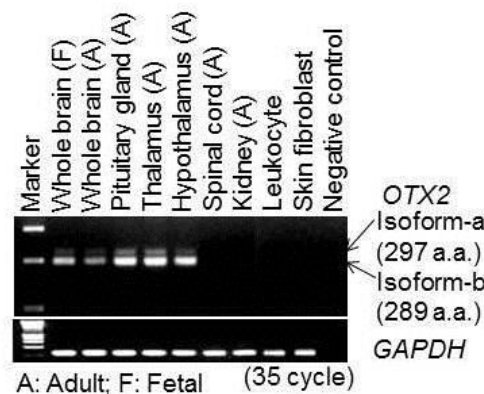


図4 発現解析

### (7) 考察

以上の成績は、① *OTX2*ヘテロ異常症では、複合型下垂体機能低下症から成長ホルモン単独分泌不全症、正常まで多様な下垂体表現型を示すこと。② 下垂体低形成、異所性後葉などの下垂体構造異常を一部に伴うこと。③ *OTX2*変異・欠失陽性例は何かしらの眼の異常を示しており、眼に異常がない下垂体機能低下症における変異陽性例は稀であること。④ *OTX2*異常症では haploinsufficiency がその発症メカニズムであること。⑤ *OTX2*ヘテロ異常症の眼症状ならびに下垂体症状には、遺伝子型-表現型の関連性がないこと。を示すものである。

本研究成果は、*OTX2* 異常症患者における適切なホルモン補充療法、遺伝カウンセリングを可能とするという臨床的意義と、下垂体の発生分化にかかわる分子ネットワークの解明に貢献するという基礎医学的意義の両者を有するものである。

### 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4件)

- ① 伊達木澄人、深見真紀、室谷浩二、安達昌功、小坂喜太郎、長谷川高誠、田中弘之、田島敏広、本村克明、木下英一、森内浩幸、緒方勤 *OTX2* 遺伝子異常症の臨床的、分子遺伝学的解析. ホルモンと臨床 2010 57 巻 pp987-992 (査読無)
- ② Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Ogata T. Mutation and Gene Copy Number Analyses of Six Pituitary Transcription Factor Genes in 71 Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency: Identification of a Single Patient with LHX4 Deletion. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 95 巻 pp4043-4047 (査読有)
- ③ Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T. Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 95 巻 pp756-764 (査読有)
- ④ Ashkenazi-Hoffnung L, Lebenthal Y,

Wyatt AW, Ragge NK, Dateki S, Fukami M, Ogata T, Phillip M, Gat-Yablonski G. A novel loss-of-function mutation in *OTX2* in a patient with anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. *Hum Genet.* 2010 127 巻 pp721-729 (査読有)

[学会発表] (計9件)

- (1) 伊達木澄人. 複合型下垂体機能低下症における包括的変異・ゲノムコピー数解析. 第44回日本小児内分泌学会 2010年10月8日 大阪.
- (2) 伊達木澄人. 複合型下垂体機能低下症における包括的変異・ゲノムコピー数解析. 第33回日本小児遺伝学会学術集会 2010年4月22日 盛岡.
- (3) Dateki S. *OTX2* mutations and hypopituitarism ICE2010 satellite symposia (Pediatric Endocrinology) 2010年4月1日 東京.
- (4) Dateki S. Mutation and Gene Copy Number Analyses of Six Pituitary Transcription Factor Genes in 71 Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency: Identification of a Single Patient with LHX4 Deletion. 14th International Congress of Endocrinology (ICE2010) 2010年3月28日 京都.
- (5) 伊達木澄人. 下垂体の発生と疾患、*OTX2* 遺伝子異常症. Forum on Growth Hormone Research 2009. 2009年10月17日 東京.
- (6) Dateki S. Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary hormone deficiency. The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE. New York, 2009 10<sup>th</sup> September.
- (7) 伊達木澄人. *OTX2* 遺伝子異常症の臨床的および分子遺伝学的解析. 第43回日本小児内分泌学会, 2009年10月1日 宇都宮.
- (8) 伊達木澄人. *OTX2* 遺伝子異常症の臨床的、分子遺伝学的解析. 第54回日本人類遺伝学会, 2009年9月24日 東京.
- (9) 伊達木澄人. 無・小眼球症責任遺伝子 *OTX2* は、下垂体発生・機能に関与する. 第82回日本内分泌学会, 2009年4月23日 群馬.

[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

<http://www.nch.go.jp/endocrinology/kenrin.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊達木 澄人 (DATEKI SUMITO)

独立行政法人国立成育医療研究センター・  
分子内分泌研究部 共同研究員

研究者番号：70462801