

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月14日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790614

研究課題名（和文） 新規迅速遺伝子解析技術を用いたTSH受容体遺伝子変異診断法の臨床応用

研究課題名（英文） Clinical application of the detection of the mutation in TSH receptor gene using a novel rapid gene analyzing method

研究代表者

常川 勝彦（TSUNEKAWA KATSUHIKO）

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：30436307

研究成果の概要（和文）：本邦のTSH不応症において高頻度に検出されるTSH受容体遺伝子（*TSHR*）のR450H変異は、日本人において新生児のみならず成人の甲状腺機能にも影響を及ぼしている可能性があり、この変異の検出は甲状腺機能低下症の原因診断として有用と考えられる。本研究では、新規迅速遺伝子解析技術であるSmartAmp法による*TSHR* R450H変異の診断試薬を作製し、変異の頻度および甲状腺機能に及ぼす影響を解析した。

研究成果の概要（英文）：The R450H mutation in the TSH receptor gene (*TSHR*), observed frequently in Japanese patients with TSH resistance, may affect not only newborn but also adult thyroid function in Japanese. Detection of this mutation will be useful for examining the cause of hypothyroidism in Japanese. We developed the primer set to detect the R450H mutation in *TSHR* by a novel rapid gene analyzing technique, SmartAmp, investigated the frequency of this mutation and analyzed the association between this mutation and thyroid function in Japanese adults.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：遺伝子検査

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：遺伝子変異、甲状腺、TSH、TSH受容体

1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症の早期診断のために行われている新生児マススクリーニングにおいて高TSH血症を認め、TSH不応症が疑われた症例の解析の結果、研究代表者らはTSH受容体遺伝子（*TSHR*）においてこれまで報告されていないR450HとG498Sの変異を同

定し、本邦で最初の*TSHR*異常によるTSH不応症の一家系を報告した（Nagashima T et al. Thyroid 11:551-559, 2001）。その後、症例を集積し、TSH不応症例の更なる解析により研究代表者はV473I、R519CおよびR519Gの新たな変異を同定し、変異TSH受容体の機能解析を行ってきた（Tsunekawa K et al.

Thyroid 16:471-479, 2006)。特に、*TSHR* における R450H 変異はこれまでに欧米を初めとする国外では報告されていないのに対し、本邦の TSH 不応症ではこの変異が高頻度で検出されており、本邦の TSH 不応症に特有の変異であると考えられている。さらに、この変異が日本人において新生児のみならず成人における甲状腺機能にも影響を及ぼしている可能性が示唆されるが、日本人の成人におけるこの変異の出現頻度は不明である。R450H 変異の頻度および成人の甲状腺機能の低下に及ぼす影響を明らかにすることができれば、甲状腺機能低下症の原因診断の一つとして *TSHR* R450H 変異の診断が有用となると考えられる。

これまでの遺伝子変異の検出には、検体からゲノム DNA を抽出し、PCR などの方法で増幅した後に解析するという複数のステップが必要なため、操作が煩雑で長時間を要し、感度や特異度が低いことが問題であった。近年、理化学研究所オミックス基盤研究領域（林崎良英領域長）では、簡便、迅速かつ正確な新規迅速遺伝子解析技術である SmartAmp 法を開発し、研究代表者も共同研究者として検討を行い、成果は Nature Methods 誌 (4:252-262, 2007) に掲載された。SmartAmp 法の特徴として、①DNA を抽出することなく血液から直接増幅可能、②特徴的な非対称のプライマーセットを使用、③60 度の等温下で増幅、④増幅効率がよく 30 分程度で増幅完了、⑤プライマーに変異認識部位を設定することでミスマッチ結合による増幅を抑制、などがある。これらの特徴により、SmartAmp 法は、ゲノム DNA を抽出することなく血液などの検体から増幅の有無により直接 30 分程度で変異を検出することができる。

TSHR における R450H 変異の検出にこの SmartAmp 法を用いることができれば、新生児において TSH によるマスキングに次いで行われる検査の一つとして有用であるだけでなく、成人の甲状腺機能低下症の原因診断のためにもより簡便で有用であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、新規迅速遺伝子解析技術である SmartAmp 法による *TSHR* の R450H 変異を診断する試薬開発を最初の目的とし、これを用いて本邦の成人における R450H 変異の出現頻度と甲状腺機能に与える影響を評価することで、甲状腺疾患症例に対する試薬の有用性の確立と臨床応用を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、理化学研究所オミックス基盤研究領域との緊密な連携のもとに試薬開発を行う。

まず、*TSHR* における R450H 変異を認識する SmartAmp 法のプライマーセットを作製する。プライマーを作製する上でのテンプレートとして、これまでに機能解析で使用してきた 450R の野生型 *TSHR* cDNA および 450H の変異型 *TSHR* cDNA を用いる。これにより変異を良好に判定できるプライマーセットを用いて、ヒトのゲノム DNA および血液による診断の評価を行う。最終的な目標が微量の血液による変異認識であるため、プライマーやバッファーなどの条件設定により、最適な試薬を作製する。

ゲノム DNA および血液での診断が可能と判断できる試薬が作製された後、この試薬を用いて日本人の成人を対象とした *TSHR* R450H 変異の検討を行う。これまでに研究代表者が所属する群馬大学大学院医学系研究科臨床検査医学は、教育学研究科保健体育教育専修（柳川益美教授）との共同事業として、群馬県内の複数地域の住民を対象として、健康調査ならびに運動指導による健康増進活動を継続して行っている。この活動を通して、研究の協力を得た後に採取された、群馬県内住民の全血およびゲノム DNA を用いて *TSHR* R450H 変異の解析を行う。これにより日本人成人における *TSHR* R450H 変異の出現頻度の解析を行う。さらに、この健康調査の際に身体測定、甲状腺腫の有無、甲状腺機能を含めた血液、臨床化学検査、甲状腺自己抗体を含む免疫検査を測定する。

この解析により *TSHR* R450H の変異を保有する症例に対し、甲状腺機能、自己抗体検査に加えて甲状腺超音波検査に加えて、TRH 負荷に対する TSH および甲状腺ホルモンの変化を確認し、TSH 不応についての詳細を評価する。

さらに甲状腺機能低下症で治療中の症例を対象を拡大する。甲状腺機能低下症の原因としては、甲状腺ペルオキシダーゼ抗体およびサイログロブリン抗体などの自己抗体による橋本病の頻度が最も高いが、自己抗体が陽性であり、抗体価が高い症例でも甲状腺機能は低下する例も安定していて補充治療を必要としない例も存在する。この違いに *TSHR* R450H 変異が影響していないか検討する。自己抗体陽性例での甲状腺機能正常例と機能低下例とでそれぞれ *TSHR* R450H 変異の頻度を比較する。また、機能低下症例では、甲状

腺ホルモン投与量と変異の関係を評価する。

4. 研究成果

はじめに変異を認識するプライマーセットの作製を行った。*TSHR* codon450 周囲の配列から SmartAmp 法のそれぞれのプライマーの候補を挙げ、cDNA テンプレートを用いて増幅効率の良いプライマーを選択した。さらに野生型 cDNA、R450H 変異型 cDNA に対して変異を明瞭に識別する SmartAmp 法のプライマーセットを作製した。さらにヒトのゲノム DNA、血液を用いて SmartAmp 法による増幅、変異検出が得られる条件設定を検討し、変異認識に良好な試薬を作製した。

この試薬を用いて、甲状腺疾患の既往がなく、明らかな甲状腺腫を有しない群馬県内健康調査の 400 例あまりを対象として解析を行った。全例について甲状腺自己抗体を評価した結果、自己抗体陽性例は自己抗体陰性例と比較して有意に血中 TSH 濃度が上昇していた。SmartAmp 法による *TSHR* R450H 変異の解析の結果、400 例あまりの中でこの変異を有する症例が数例存在することが確認された。成人の健康調査受診者を対象とした研究で *TSHR* R450H 変異を検出した報告はこれまでに報告がなく、今回初めて日本人の成人からこの変異を検出した。*TSHR*R450H 変異を有する例は、すべて自己抗体が陰性であったが、自己抗体陽性例の血中 TSH 濃度の平均と比較して変異保有例は高値を示していた。また、TRH 負荷に対する反応では、血中 TSH 濃度は持続高値を示したものの血中 FT4、FT3 濃度は変化を示さず、TSH 不応の状態が確認された。

これらの結果より、日本人の成人において *TSHR*R450H 変異は多型ほどの頻度ではないもののある程度の頻度で出現することが明らかとなった。また、この変異を有すると血中 TSH 濃度が上昇し、TSH 不応の状態を呈する可能性が高いことが明らかとなった。このため、日本人における潜在性甲状腺機能低下症および甲状腺機能低下症の原因として、甲状腺自己抗体のほか、ある程度の頻度で出現する *TSHR* における R450H 変異が関連している可能性が示唆され、これらの症例に対してこの変異を評価することは臨床的に有用であると考えられる。さらにこの変異を微量の血液から簡便、迅速かつ正確に検出可能な SmartAmp 法の試薬を開発し、これは成人のみならず十分量の血液を採取することが困難な新生児でも有用な方法と言える。本邦で現在行われている新生児マススクリーニングで高 TSH 血症が認められる際、その後に行わ

れる精査の一つとして、一滴の血液から簡便に診断が可能である SmartAmp 法の試薬は臨床的に有用であると考えられる。

今回の期間では甲状腺機能低下症の症例に対する *TSHR* R450H 変異については、十分な解析を行うことができなかったが、現在自己抗体陽性例での *TSHR* R450H 変異の解析について進行中である。今後甲状腺機能低下症に対する検討を進めることで、甲状腺機能低下症におけるこの変異の影響が明確となり、甲状腺機能低下症の診断における重要性もより明らかとなる可能性が示唆される。

現在も、新生児から成人まで *TSHR* における R450H 変異が甲状腺機能に与える影響を明らかとするため、甲状腺疾患の既往のない例および甲状腺疾患例とさらに対象者を増やして検討を継続中である。これにより、SmartAmp 法による *TSHR* R450H 変異の検出試薬の有用性を確立して、臨床的に応用すべく検討を続けている。

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 1 件)

- ① Tsunekawa K, Yanagawa Y, Aoki T, Morimura T, Araki O, Ogiwara T, Kawai Y, Mitani Y, Lezhava A, Yanagawa M, Hayashizaki Y, Murakami M: Association between accumulation of visceral fat and the combination of $\beta 3$ adrenergic receptor Trp64Arg, $\beta 2$ adrenergic receptor Arg16Gly and uncoupling protein 1 -3826A>G polymorphisms detected by Smart Amplification Process 2. *Endocr J* 査読有 58, 2011, 1079-86.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 常川勝彦、青木智之、森村匡志、荒木修、木村孝穂、荻原貴之、三谷康正、林崎良英、村上正巳、運動による耐糖能の変化に及ぼす 2 型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子多型の影響、第 55 回日本甲状腺学会学術集会、2012. 11. 30、福岡
- ② 常川勝彦、青木智之、森村匡志、荒木修、荻原貴之、三谷康正、林崎良英、村上正巳、新規迅速遺伝子解析技術 SmartAmp 法を用いた TSH 受容体遺伝子変異の解析、第 19 回日本遺伝子診療学会大会、2012. 7. 27、千葉

- ③常川勝彦、青木智之、森村匡志、荒木修、荻原貴之、川井雄輝、三谷康正、林崎良英、村上正巳、運動による耐糖能の改善効果に2型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子多型が及ぼす影響、第85回日本内分泌学会学術総会、2012.4.19、名古屋
- ④常川勝彦、柳川美麿、青木智之、森村匡志、荒木修、荻原貴之、古田島伸雄、四方田幸恵、三谷康正、林崎良英、村上正巳、耐糖能の変化における2型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子多型と最大酸素摂取量の関連性の検討、第58回日本臨床検査医学会学術集会、2011.11.18、神戸
- ⑤常川勝彦、青木智之、森村匡志、荒木修、荻原貴之、川井雄輝、三谷康正、林崎良英、村上正巳、日本人における2型甲状腺ホルモン脱ヨード酵素遺伝子多型の糖代謝に及ぼす影響、第84回日本内分泌学会学術総会、2011.4.21、神戸

〔図書〕(計1件)

- ①常川勝彦、医学書院、標準臨床検査学 臨床医学総論、2011、418

6. 研究組織

(1) 研究代表者

常川 勝彦 (TSUNEKAWA KATSUHIKO)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30436307

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし