

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591514

研究課題名(和文)日本人小児低身長症を対象としたゲノム機能・構造解析

研究課題名(英文)Genetic identification and functional analysis in Japanese families with a short stature

研究代表者

板倉 光夫 (ITAKURA, Mitsuo)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・非常勤講師

研究者番号：60134227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本人低身長127家系由来のDNAを用いて、我が国の小児低身長における既知原因遺伝子の変異スペクトラムと変異による病態形成メカニズムについて検討を行った。その結果、GHRH受容体にこれまで知られていなかった新規の変異としてp.G136VとIVS2+3a>gを同定した。変異遺伝子の機能解析からp.G136V変異はGHRH刺激への転写誘導が欠落することを、IVS2+3a>g変異はGHRHRのスプライシング異常をおこすことを見いだした。また未だ報告がなかったSHOX遺伝子について解析を行ったが、発症に関連する遺伝子変異や遺伝子欠損を同定するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The genomic DNAs from 127 families with short stature were subjected to genetic studies and further functional studies. We identified two novel compound heterozygous GHRHR gene mutations such as p.G136V substitution (p.G136V) and IVS2+3a>g mutation (IVS2+3a>g) in the patient. Our functional analysis revealed that a p.G136V elicited no transcriptional activity increment in response to GHRH stimulation and the IVS2+3a>g would led to its aberrant splicing. We further analyzed SHOX genes which have not been characterized in Japanese population, but SHOX deletions and point mutations as well as downstream SHOX enhancer deletions were not identified.

研究分野：遺伝学

キーワード：低身長症 遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

集団において身長は正規分布しており、一般に低身長とみなされる「年齢平均身長から-2SD(平均標準偏差)以下」の頻度は2.28%、本邦における総人数は約291万人程度と推定される(H18年推計日本総人口1億2777万人を用いて計算)。すなわち低身長症は common diseases (ありふれた病気)である一方、成人(最終)身長は多数の遺伝子と環境要因が関係する多因子形質の一つであり、遺伝要因が80%(言い換えると genetic heritability が0.8)と非常に高く、その説明は遺伝学中心課題の一つとされている。

近年、genome-wide association study (GWAS)の利用により、多数の common diseases において susceptibility variants (疾患感受性あるいは疾患関連 SNPs) が同定されているが、成人身長表現型においても同様であり、現在まで HMGA2, ZBTB38, HHIP, GDF5-UQCC 等 50 以上の関連遺伝子(または遺伝子座)が報告されてきた。一方で、他の疾患と同様に、各々の SNP の phenotypic variance (表現型変動)への寄与度が非常に小さいことが報告されており、合計しても全体の約5%しか説明し得ず、すなわち身長に関する遺伝的背景の90%以上はまだ解明されていない(missing heritability)。さらに GWAS で同定された各々の身長関連遺伝子(座)においても、“真の原因あるいは機能的変異”の発見には全く至っていない状況であり、これらの点が現時点における GWAS という手法の限界と言える。

このように小児低身長症は、成人低身長症より遺伝要因がさらに大きいと推測されるが、これまでの多くの遺伝子研究では-4SD以下の重篤低身長症を対象としており、軽症から中等症の低身長症における遺伝子異常は、その発生頻度、遺伝形式、浸透度についてまだよくわかっていない。また本邦における小児低身長症の原因遺伝子変異の報告は、他民族と比較して少なく、その理由も不明である。

## 2. 研究の目的

申請者は、日本全国の小児内分泌医との共同研究により収集した日本人小児低身長症127家系のゲノムDNAと不死化リンパ芽球株を保有しており、本研究ではこのリソースを活用して、研究課題「小児低身長症候補遺伝子のディープシーケンス解析」また研究課題「日本人小児低身長症における SHOX 遺伝子微小欠失の検討」を実施する。本研究の成果を、申請者等のこれまでの研究結果と統合することで、本邦の小児低身長症における特に既知原因遺伝子の変異・異常スペクトラム、また病態生理的意義を明らかにする。

## 3. 研究の方法

日本人小児低身長症の分子病態を解明するため、申請者等が保有し、既に整備が完了している日本人小児低身長症127家系(計304名)のゲノムDNA、EBウイルス不死化リンパ芽球、および臨床情報を用いて、具体的には以下の二つの研究課題を、3年間の研究期間に実施する。

### (1)小児低身長症候補遺伝子のディープシーケンス解析

申請者が既に解析した12遺伝子に新たに10個以上の遺伝子を候補遺伝子として追加し、申請者が保有する小児低身長症発端者のディープシーケンス解析を実施、各変異の健常対照群における頻度調査、変異の機能的影響の生化学的検証等を行う。

### (2)日本人小児低身長症における SHOX 遺伝子微小欠失の検討

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)法を用いて SHOX 遺伝子領域(特にエンハンサー領域)の構造解析を行い、低身長症の病因としての SHOX 遺伝子微小欠失の頻度、病態意義を明らかにする。

## 4. 研究成果

全国の小児内分泌医の協力の下に収集した、主に軽症から中等症の日本人低身長症患児およびその家系(計127家系)を対象に、ゲノム・遺伝子解析を行った。ディープシーケンス法による詳細な変異解析により、複数の既知および新規の低身長症原因候補遺伝子(12遺伝子)における変異の同定に成功した。新規変異の例には、グレリンレセプターGHSR1Aにおける稀なミスセンス変異( $\Delta$ Q36, P108L, C173R, D246A; J Clin Endocrinol Metab 96:E373-8, 2011)、GHRHRにおける exon 12 のスプライス変異 E382E (c.1146G>A)およびプロモーター領域の Pit-1 P2 binding element における変異 ATG-166T>C、ATG-164T>C (Clin Endocrinol 74:223-33, 2011)、さらに POU1F1/PIT-1 遺伝子における初めてのエキソン2スプライス変異 (Clin Endocrinol 76: 78-87, 2012)などがあり、これらの変異の機能的影響は生化学的にも実証することが出来た。

平成24年度は研究課題「小児低身長症候補遺伝子のディープシーケンス解析」および研究課題「日本人小児低身長症における SHOX 遺伝子微小欠失の検討」において、特に発端者DNAを用いた一次スクリーニングに相当するアッセイ(DNAシーケンス法とMLPA法)を中心に実施した。

### (1) DNA シーケンス解析

保有している127家系由来の計304名のゲノムDNAの内、これまでにシーケンス解

析が完了している 12 個の遺伝子に加えて、さらに 10 個の候補遺伝子を抽出し、追加解析を開始した。追加遺伝子としては、これまでヒトあるいは動物モデルで低身長症との関連が報告された、下垂体 GH 産生および分泌、GHR シグナル関連、また骨・軟骨形成に関わる重要な分子をコードするものを考慮した。遺伝子変異を同定した患者において、小児科主治医と連携しながら臨床症状、特に身長を含めた身体的形成、低発症、GH 分泌能や rhGH 治療への反応性などの内分泌データなどについて詳細な情報収集を行い、遺伝子あるいは変異に特徴的な表現型の有無を検討した。

## (2)MLPA 法による SHOX 遺伝子微小欠損の検討

SHOX は Turner 症候群の低身長表現型に関与し、ヘテロ機能喪失型遺伝子変異（半量不全）が Leri-Weill 型軟骨骨異形成症また特発性低身長症（ISS）で、ホモ機能喪失変異（完全不全）が Langer 型中肢骨短縮症で報告されている。日本人低身長症における SHOX 遺伝子異常の正確な頻度はまだ報告されておらず、また疾患、人種により異なる遺伝子異常が検出されることが期待されるので、本研究ではまず申請者等が保有する日本人小児低身長症の 127 家系の発端者において、SHOX 遺伝子エンハンサー領域の構造解析、微小欠損同定を MLPA 法にて実施した。

平成 25 年度は保有している 127 家系由来の計 304 名のゲノム DNA の内、これまでにシーケンズ解析が完了している 12 個の遺伝子に加えて、さらに下垂体 GH 産生および分泌、GHR シグナル関連、また骨・軟骨形成に関わる重要な分子をコードする 10 個の候補遺伝子を抽出し、追加解析をおこなった。その結果、GHRH 受容体にこれまで知られていなかった新規の変異として p.G136V(c.407G>T)と IVS2+3a>g を同定することができた。ルシフェラーゼレポーターを用いたプロモーター活性解析から新たに同定した p.G136V(c.407G>T)変異は GHRH 刺激への転写誘導が欠落することを見いだした。一方、IVS2+3a>g を変異は GHRHR のスプライシング異常をおこすことを見いだした。この成果を Growth Horm IGF Res. に論文発表することができた。

平成 26 年度は Turner 症候群の低身長表現型に関与することが知られており、ヘテロ機能喪失型遺伝子変異（半量不全）では Leri-Weill 型軟骨骨異形成症また特発性低身長症（ISS）を発症し、またホモ機能喪失変異（完全不全）が Langer 型中肢骨短縮症を発症することが報告されている SHOX 遺伝子に関して、申請者等が保有する日本人小児低身長症の 127 家系の発端者において、SHOX 遺伝子エンハンサー領域の構造解析を行ったが、発症に関連する遺伝子変異や遺伝子欠損を同定するには至らなかった。

本研究から低頻度の “slightly deleterious variants”ともいうべき遺伝子変異が、正常身長の一般集団においても存在しており、低身長症患者群でより集積する傾向が見出された。例えば、GHR 遺伝子 T51I 変異や GH1 遺伝子 D116E 変異は、過去に private mutations として罹患家系のみで同定、報告されていたが、一方で変異機能解析では病的意義について明確でなく、中間的な結果であった。我々の解析では、両変異とも患者群のみならず一般集団において低頻度（アレル頻度 1-2%）ながら存在し、これ自体は変異の重要性に関し否定的な観察結果であるが、一方で極めてまれな罹患家系で低頻度の変異がやはり偶然に同定されたとも考えにくかった。同様のケースは他の遺伝子でも確認されており、これら rare variants の多く（特にミスセンス変異）は、浸透度が不完全で表現度に差異があるドミナント変異と理解すべきと考えている。他方で、なお約 75%の患者で何ら変異が認められず、さらに解析遺伝子数を増やし、また別のアプローチによる研究の必要と考えられた。

## 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 11 件)

Iwata T, Tamanaha T, Koezuka R, Tochiya M, Makino H, Kishimoto I, Mizusawa N, Ono S, Inoshita N, Yamada S, Shimatsu A, Yoshimoto K: Germline deletion and a somatic mutation of the prkar1a gene in a carney complex-related pituitary adenoma. Eur J Endocrinol 2015;172:K5-10. 査読有 DOI:10.1530/EJE-14-0685.

Tran TT, Tobiume K, Hirono C, Fujimoto S, Mizuta K, Kubozono K, Inoue H, Itakura M, Sugita M, Kamata N: Tmem16e (gdd1) exhibits protein instability and distinct characteristics in chloride channel/pore forming ability. J Cell Physiol 2014;229:181-190. 査読有 DOI: 10.1002/jcp.24431.

Iwata T, Yamada S, Ito J, Inoshita N, Mizusawa N, Ono S, Yoshimoto K: A novel c-terminal nonsense mutation, q315x, of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a japanese familial isolated pituitary adenoma family. Endocr Pathol 2014;25:273-281. 査読有 DOI:10.1007/s12022-014-9318-7.

Li XH, Wang EL, Zhou HM, Yoshimoto K, Qian ZR: Micrnas in human pituitary adenomas. Int J Endocrinol 2014;2014:435171. 査読有 DOI:10.1155/2014/435171.

Nakano-Tateno T, Tateno T, Hlaing MM, Zheng L, Yoshimoto K, Yamada S, Asa SL, Ezzat S: Fgfr4 polymorphic variants modulate phenotypic features of cushing disease. Mol Endocrinol 2014;28:525-533. 査読有  
DOI:10.1210/me.2013-1412.

Ikeda M, Aleksic B, Yamada K, Iwayama-Shigeno Y, Matsuo K, Numata S, Watanabe Y, Ohnuma T, Kaneko T, Fukuo Y, Okochi T, Toyota T, Hattori E, Shimodera S, Itakura M, Nunokawa A, Shibata N, Tanaka H, Yoneda H, Arai H, Someya T, Ohmori T, Yoshikawa T, Ozaki N, Iwata N: Genetic evidence for association between notch4 and schizophrenia supported by a gwas follow-up study in a japanese population. Mol Psychiatry 2013;18:636-638. 査読有  
DOI:10.1038/mp.2012.74.

Soneda A, Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Takagi M, Hasegawa T, Inoue H, Itakura M: Novel compound heterozygous mutations of the growth hormone-releasing hormone receptor gene in a case of isolated growth hormone deficiency. Growth Horm IGF Res 2013;23:89-97. 査読有  
DOI:10.1016/j.ghir.2013.03.003.

Kinoshita M, Numata S, Tajima A, Ohi K, Hashimoto R, Shimodera S, Imoto I, Itakura M, Takeda M, Ohmori T: Meta-analysis of association studies between disc1 missense variants and schizophrenia in the japanese population. Schizophr Res 2012;141:271-273. 査読有  
DOI: 10.1016/j.schres.2012.07.020.

Takeshita S, Kitayama S, Suzuki T, Moritani M, Inoue H, Itakura M: Diabetic modifier qtl, dbm4, affecting elevated fasting blood glucose concentrations in congenic mice. Genes Genet Syst 2012;87:341-346. 査読有  
DOI:10.1266/ggs.87.341

Takeshita S, Suzuki T, Kitayama S, Moritani M, Inoue H, Itakura M: Bhlhe40, a potential diabetic modifier gene on dbm1 locus, negatively controls myocyte fatty acid oxidation. Genes Genet Syst 2012;87:253-264. 査読有  
DOI:10.1266/ggs.87.253

Watanabe SY, Iga J, Numata S, Nakataki M, Tanahashi T, Itakura M, Ohmori T: Association study of fat-mass and obesity-associated gene and body mass index in japanese patients with schizophrenia and healthy subjects. Clin Psychopharmacol Neurosci 2012;10:185-189. 査読有  
DOI:10.9758/cpn.2012.10.3.185.

〔学会発表〕(計 4 件)

肥塚諒、玉那覇民子、菱田藍、椽谷真由、大畑洋子、榎野久士、島津章、岩田武男、

吉本勝彦、井下尚子、山田正三、岸本一郎  
PRKARIA を含む広範な胚細胞性欠失を  
認めた下垂体性巨人症の一例  
第 24 回臨床内分泌代謝 Update  
2014 年 11 月 29 日

大宮ソニックシティ(埼玉県・さいたま市)  
小野信二、岩田武男、水澤典子、山田正三、  
吉本勝彦  
成長ホルモン産生腺腫における PRKACA  
遺伝子活性化変異の検討  
第 14 回日本内分泌学会四国地方会  
2014 年 9 月 6 日  
徳島大学(徳島県・徳島市)

肥塚諒、玉那覇民子、菱田藍、椽谷真由、  
大畑洋子、榎野久士、島津章、岩田武男、  
吉本勝彦、井下尚子、山田正三、岸本一郎  
下垂体腫瘍組織に PRKARIA 遺伝子の体  
細胞変異を認めた下垂体巨人症の一例  
第 86 回京都市内分泌同好会  
2014 年 3 月 1 日  
メルバルク京都(京都府・京都市)

Katsuhiko Yoshimoto  
Mechanisms of tumorigenesis in GH  
adenomas.  
2nd Pituitary Expert Meeting in Asia (PEMA)  
2013 年 8 月 30 日 ~ 8 月 31 日  
ソウル(韓国)

〔図書〕(計 0 件)  
該当なし

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)  
該当なし

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)  
該当なし

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板倉 光夫 (ITAKURA, Mitsuo)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究  
部・非常勤講師  
研究者番号：60134227

(2) 研究分担者

井上 寛 (INOUE, Hiroshi)  
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センタ  
ー・講師  
研究者番号：20294639

山下 裕紀子 (YAMASHITA, Yukiko)  
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センタ  
ー・技術補佐員  
研究者番号：40532502

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, Katsuhiko)  
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究  
部・教授  
研究者番号：90201863

親泊 政一 (OYADOMARI, Seiichi)  
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センタ  
ー・教授  
研究者番号：90502534

(3) 連携研究者

該当者なし