

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659495

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いた先天性甲状腺機能低下症の網羅的分子遺伝学診断法の開発

研究課題名(英文)The exhaustive analysis for congenital hypothyroidism using the next generation sequencer

研究代表者

丸尾 良浩 (MARUO, YOSHIHIRO)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：80314160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いた先天性甲状腺機能低下症の網羅的原因遺伝子の解析により、DUOX2異常症、PAX8異常症、Pendred症候群などを含む多数の原因遺伝子の新規変異を同定できた。さらに家族解析を行い、発見した変異が疾患への病因であるかどうかを検討し遺伝的発症要因の解明を行った。

DUOX2については9つの新規変異を同定し、DUOX2異常症の病態解明に寄与する知見を得た。先天性甲状腺機能低下症は原因が同定されない症例が多数あったが、本研究によりDUOX2異常症が主たる原因の一つであることが明らかになった。また、他の遺伝子についても、新規変異を同定でき、病態の解明に寄与するデータを得た。

研究成果の概要(英文)：We detected many novel mutations of the thyroid hormone generating genes including dual oxidase 2 (DUOX2), PAX8 and Pendrin (PDS) and so on by the exhaustive analysis of causative genes of congenital hypothyroidism using the next generation sequencer. Furthermore, We performed family analysis and We considered whether the variation that we discovered was the etiology to congenital hypothyroidism and elucidated the hereditary genetic causes.

We identified nine new mutations about DUOX2 and got knowledge to contribution of DUOX2 mutations to elucidate genetic pathology. In many patients with congenital hypothyroidism, the causative gene could not be detected. But this study showed that DUOX2 defect is one of the main causes of congenital hypothyroidism.

In addition, about other genes, we could identify new mutations and obtained the data which contributed to elucidation of genetic causes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：先天性甲状腺機能低下症 次世代シーケンサー Dual oxidase 2 DUOX2 小児内分泌学

## 1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症は 1/2100 人と、小児の内分泌疾患において多い疾患である。新生児マススクリーニングによる早期診断と、L-thyroxine による早期治療により健全な成長発育がえられる。先天性甲状腺機能低下症の原因は多岐にわたり、学会による先天性甲状腺機能低下症治療のガイドラインに従った検査により最終診断に至らない症例が多々ある。

当科では日本の症例の約 1%にあたる滋賀県の先天性甲状腺機能低下症の診療に当たっている。その中に家族例の 17 家系(双胎 5 組)が含まれ遺伝的素因が強いことを示唆している。しかし、既存のガイドラインに沿った診療では、最終診断に至らないことが多いため、家族例に対する遺伝相談ができない。最終診断に至らない原因として、先天性甲状腺機能低下症の原因遺伝子が 20 以上あるため、既存の検査では同定では、簡易に診断できないことが明らかになってきた。

我々が家族例を中心に、原因遺伝子を検索したところ、8 例に Dual oxidase 2 (DUOX2) の変異が両アレル性にみつかり DUOX2 はホルモン合成障害による先天性甲状腺機能低下症の主要な原因遺伝子であることを明らかになった (Maruo Y, et al. J Clin Endocrinol Metab, 2008;93:4261-4267)。その後も解析でも、先天性甲状腺機能低下症の原因として DUOX2 の異常が多く見つかり、その詳細は本年の日本小児内分泌学会で報告している(平成 23 年 10 月 7 日、さいたま市)。これまで、主要な原因遺伝子と考えられた TPO, TSHR, NIS などの解析だけでは診断に至ることは難しい。

## 2. 研究の目的

近年、先天性甲状腺機能低下症の原因となる遺伝子が多数発見されている。

そこで、先天性甲状腺機能低下症の包括的な

分子遺伝学診断法を確立するための基礎研究を行う。

当科で診療している症例のうち 100 例の症例において臨床像と責任遺伝子の関係を明らかにして、日本における先天性甲状腺機能低下症の分子遺伝学診断法の指標となるデータを明らかにする。

基本的な原因遺伝子の解析をもとに、次世代シーケンサー (illumine Genome Analyzer IIx) を用いて、包括的な先天性甲状腺機能低下症の原因変異の同定できるシステムを構築する。

## 3. 研究の方法

先天性甲状腺機能低下症の症例 100 例について臨床像と併せて、PCR-ダイレクトシーケンス法により、原因遺伝子の解析を行い原因遺伝子と臨床像の検討を行う。各に対して MLPA 法を開発し、遺伝子欠失に対する診断法を確立する。

上記データをもとに、網羅的な先天性甲状腺機能低下症の分子遺伝学的診断法を開発するため、次世代シーケンサー (Illumina Genome Analyzer IIx) を用いて、20 以上ある既知の先天性甲状腺機能低下症の原因遺伝子と、原因の候補遺伝子について解析を行う。

(1) 先天性甲状腺機能低下症に対する従来の方法 (PCR 法~ダイレクトシーケンス法) を用いて、研究機関に 100 例の先天性甲状腺機能低下症の遺伝子解析を行う。

TSH receptor (TSHR), Na-I synporter (NIS), Pendrin (PDS), Thyroid peroxidase (TPO), Dual oxidase 2 (DUOX2), Dual oxidase maturation factor 2 (DUOXA2), Iodotyrosine deionidase (IYD), Thyroglobulin (TG) の各遺伝子についての解析方法を確立し解析を行う。

## ( 2 ) MLPA 法の開発

従来の PCR 法にて各遺伝子のエクソンを増幅し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列決定する方法では、エクソンの欠失が同定できないため、本方法を用いて、従来の方法で遺伝子変異を発見できない症例は解析する。現在、多くの甲状腺ホルモン合成に関わる遺伝子についての MLPA 法のキットは市販されていないため、独自に開発する必要がある

MLPA 法に必要な PCR プライマーの設計

MLPA 法 Kit による各遺伝子のエクソン対応部位の増幅

増幅した DNA フラグメント解析 (PRISM310, 滋賀医科大学実験支援センターを使用)

初年度は DUOX2, TPO, NIS, PDS, TG の各遺伝子について開発を行う。

## ( 3 ) 次世代シーケンサーによる網羅的な先天性甲状腺機能低下症の原因遺伝子の解析法の開発

初年度、および本年度にえられた、以下の先天性甲状腺機能低下症原因遺伝子の解析結果を元に、次世代シーケンサー (Illumina Genome Analyzer IIx : 滋賀医科大学実習実験支援センター所有) を用い、網羅的に原因遺伝子の解析を行う。

解析対象遺伝子 : PROP-1, POU1F1, TRH, TRH-R, TSH- , HESX1, LHX3, LHX4, TTF-1, TTF-2, PAX8, FOXP3, TSHR, NIS, PDS, TPO, DUOX2, DUOX2A2, DUOX1, DUOX1A1, IYD, TG, MCT8, THRB, その他の甲状腺機能低下症にかかわる遺伝子

サンプルの調整 : TruSeq DNA Sample Prep Kit を用いて DNA の調整を行う

クラスター形成 : TruSeq PE Cluster Kit v2 を用いて、調整したサンプルのクラスター形成を行う

シーケンス反応 : TruSeq SBS Kit v5 を用いてシーケンス反応を行う

解析 : シーケンス反応後のサンプルを Illumina Genome Analyzer IIx かけ、得られた結果をサーバで解析し、解析対象遺伝子の全配列を得る。

( 4 ) 上記の解析結果をもとに、先天性甲状腺機能低下症の臨床像と責任遺伝子の関係を解析する。

## 4 . 研究成果

本研究は途中より成育医療研究センター分子内分泌研究部、長崎啓祐氏、深見真紀室長との連携研究をおこない、次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンス方法を行い、多数の遺伝子変異を同定するに至った。

( 1 ) 先天性甲状腺機能低下症に対する従来の方法 (PCR法~ダイレクトシーケンス法) を用いた伝子解析

上記補方にて TSHR, NIS, PDS, TPO, DUOX2, DUOX2A2, IYD, THRB, の各遺伝子の解析方法を確立した。

後に述べる次世代シーケンサーによるターゲットリシーケンスを用いて行い同定できた、甲状腺ホルモン合成にかかわる遺伝子の新規変異同定後の確認、家族解析を行うことができた。

## ( 2 ) MLPA法の開発

後術の次世代シーケンサーによる先天性甲状腺機能低下症の解析で変異のできなかった症例に対する変異検出法であるが、現在開発中である。前実験として PAH 遺伝子の MLPA 法の解析を行い新たなエクソンの欠失を検出した。

( 3 ) 次世代シーケンサーを用いた先天性甲状腺機能低下症の網羅的原因遺伝子の解析により、dual oxidase 2 (DUOX2) 異常症、PAX8

異常症、Pendred症候群などを含む多数の原因遺伝子の新規変異を同定できた。次世代シーケンサーで得られた変異をもとに家族解析を行い、発見した変異の実際の疾患への病因であるかどうかの検討を行い、DUOX2については多くの病因変異の同定ができた。

DUOX2については9つの新規変異を同定し、DUOX2異常症の病態解明に寄与する知見を得られた。これまで、先天性甲状腺機能低下症は原因が同定されない症例が多数みられてきたが、本研究によりDUOX2異常症が、先天性甲状腺機能低下症には多くみられその主たる原因の一つであることが明らかになった。また、他の責任遺伝子についても、新規変異を同定でき、病態の解明に寄与するデータが得られた。

次世代シーケンサーによる先天性甲状腺機能低下症の原因遺伝子の網羅的解析は、これまで多くの症例において原因解明ができなかったが、これらを解明してゆくのに有用であることが明らかになった。

## 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10件)

Maruo Y, Morioka Y, Fujito H, Nakahara S, Yanagi T, Matsui K, Mori A, Sato H, Tukey RH, Takeuchi Y. Bilirubin Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase Variation Is a Genetic Basis of Breast Milk Jaundice. J Pediatr. 査読有 2014 ; 17. pii: S0022-3476(14)00088-2. doi: 10.1016/j.jpeds.2014.01.060. [Epub ahead of print]

Kawakita R, Hosokawa Y, Fujimaru R, Tamagawa N, Urakami T, Takasawa K, Moriya K, Mizuno H, Maruo Y, Takuwa M, Nagasaka H, Nishi Y, Yamamoto Y, Aizu K, Yorifuji T. Molecular and clinical

characterization of glucokinase maturity-onset diabetes of the young (GCK-MODY) in Japanese patients. Diabet Med. 査読有 2014. doi: 10.1111/dme.12487. [Epub ahead of print]

Maruo Y, Suzaki M, Matsui K, Mimura Y, Mori A, Shintaku H, Takeuchi Y, A novel large deletion (exons 12, 13) and a missense mutation (p.G46R) in the PAH in a Japanese patient with phenylketonuria, World J Pediatr (in press).

Yorifuji T, Fujimaru R, Hosokawa Y, Tamagawa N, Shiozaki M, Aizu K, Jinno K, Maruo Y, Nagasaka H, Tajima T, Kobayashi K, Urakami T. Comprehensive molecular analysis of Japanese patients with pediatric-onset MODY-type diabetes mellitus. Pediatr Diabetes. 査読有 2013 May;14(3):230.

三村由卯、丸尾良浩、森岡依子、佐藤浩、竹内義博、UDP-グルクロン酸転移酵素1型ファミリー共通エクソン変異(p.P364L)の薬物代謝に及ぼす影響、日本小児臨床薬理学会雑誌、査読有、25巻、2012、129-134.

Maruo Y, Ozgenc F, Mimura Y, Ota Y, Matsui K, Takahashi H, Mori A, Taga T, Takano T, Sato H, Takeuchi Y. Compound heterozygote of a novel missense mutation (p.K402T) and a double missense mutation (p.[G71R;Y486D]) in type II Crigler-Najjar syndrome. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2011 Mar;52(3):362-5.

Ota Y, Maruo Y, Matsui K, Mimura Y, Sato H, Takeuchi Y. Inhibitory effect of 5-pregnane-3,20-diol on transcriptional activity and enzyme activity of human bilirubin UDP-glucuronosyltransferase. Pediatr Res. 2011 Nov;70(5):453-7.

Ohta M, Taga T, Nomura A, Kato H, Takano

T, Maruo Y, Takeuchi Y, Ishida M, Ohta S. Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disorder, cytomegalovirus reactivation, and varicella zoster virus encephalitis during treatment of medulloblastoma. J Med Virol. 2011 Sep;83(9):1582-4.

Mimura Y, Maruo Y, Ohta Y, Sato H, Takeuchi Y. Effect of common exon variant (p.P364L) on drug glucuronidation by the human UDP-glucuronosyltransferase 1 family. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2011 Dec;109(6):486-93.

丸尾良浩、三村由卯、森岡依子、松井克之、森麻美、佐藤浩、竹内義博、Dual oxidase 2 (DUOX2)の両アレル変異による一過性甲状腺機能低下症の8例。ホルモンと臨床 査読無し 59巻12号 2011, 1057-1062

〔学会発表〕(計 5件)

丸尾良浩、長崎啓祐、森麻美、松井克之、三村由卯、深見真紀、竹内義博、Dual oxidase 2 (DUOX2)異常症の臨床像の解明 23例の解析より、第117回日本小児科学会学術集会、2014年4月11-13日、名古屋市 口演・一般

丸尾良浩。小児の成長発達と内分泌。第199回大阪小児科学会 2013年9月29日 大阪市 シンポジウム

長崎啓祐、丸尾良浩、佐藤英利、小川洋平、菊池透、浅見直、深見真紀。先天性甲状腺機能低下症に対する次世代シーケンサーを用いたターゲットリシーケンス解析。第47回日本小児内分泌学会学術集会。2013年10月10日-12日、東京 口演・一般

丸尾良浩、森宗孝夫、國津智彬、松井克之、森麻美、三村由卯、竹内義博。AVP遺伝子に変異を認めた家族性中枢性尿崩症の2家系。第47回日本小児内

分泌学会学術集会。2013年10月10日-12日、東京 ポスター・一般  
丸尾良浩、川北理恵、松井克之、森麻美、森岡依子、西尾友宏、岡本暢之、宮下文、西澤嘉四郎、竹内義博。  
Hutchinson-Gilford-Progeria Syndromeに認められた甲状腺機能低下症の検討。第115回日本小児科学会学術集会、平成24年4月20日-22日福岡市 ポスター、一般

〔図書〕(計 1件)

丸尾良浩。新生児黄疸。大関武彦、古川漸、横田俊一郎、水口雅編、今日の小児治療指針第15版、2012、pp162-163。

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

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)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
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  
丸尾 良浩 (MARUO, Yoshihiro)  
滋賀医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80314160

(2)研究分担者  
松井 克之 (MATSUI Katsuyuki)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60595924

森 麻美 (MORI, Asami)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：70437151