

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791088

研究課題名(和文) TSH受容体とDUOX2の二重変異は先天性甲状腺機能低下症の病因となりうるか？

研究課題名(英文) Can simultaneous mutations in TSHR and DUOX2 cause congenital hypothyroidism?

## 研究代表者

諏訪内 亜由子 (Suwanai, Ayuko)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90383851

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：先天性甲状腺機能低下症(CH)の発症機序の大部分は不明であるが、一部は単一遺伝子異常による。複数遺伝子の同時変異保有がCHの発症要因となり得るかは検証されていない。本研究では、CH患者401名を遺伝子解析し、TSHR/DUOX2二重変異保有者4名を同定した。二重変異保有者の頻度は一般人口で1/11,524であり、これに比べ、患者群での頻度(4/401)は有意に高いものの、保有者の一部のみがCHを発症すると考えられた。以上から、TSHR/DUOX2二重変異はそれのみではCHを発症しないが、発症の強力なリスク因子となることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：The etiology of congenital hypothyroidism (CH) is largely unknown. A minor subset of CH patients has single gene mutation. However, it has not been studied whether simultaneous mutations in two or more genes can cause CH. In the present study, we enrolled and sequenced 401 CH patients, and found 4 patients that had heterozygous mutations in the TSH receptor gene (TSHR) and the dual oxidase 2 gene (DUOX2) simultaneously ("double heterozygotes"). Based on the frequencies of heterozygotes of TSHR (1/172) and DUOX2 (1/67), such double heterozygotes are expected to be observed in 1/11,524 in the general population. Thus, considering the frequency of CH (1/3,000) and the frequency of double heterozygotes among CH patients (4/401), most double heterozygotes are not affected by CH. Nonetheless, extremely high rate of double heterozygotes among CH patients, as compared with among the general population, indicates that simultaneous mutations in TSHR and DUOX2 acts as a strong risk factor for CH.

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 遺伝 リスク因子 小児

## 1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症は、最も高頻度の先天性内分泌疾患で約 3000 出生に 1 名の頻度で認められる。従来、先天性甲状腺機能低下症患者の 90%以上は環境因子により発症すると考えられてきた。申請者の所属する研究室では 2006 年以来、先天性甲状腺機能低下症患者を対象とした包括的遺伝子解析研究を行っており、これまで日本人患者の 20%以上が単一遺伝子異常を有することを明らかにしてきた。その過程で、典型的には常染色体劣性遺伝すなわち両アレル性に変異を有することにより先天性甲状腺機能低下症を発症すると考えられる *TSHR* 受容体遺伝子 (*TSHR*)および *Dual Oxidase 2* 遺伝子 (*DUOX2*) の変異を、片アレル性に有する先天性甲状腺機能低下症患者が存在することが明らかになった。

集団における片アレル性変異保有者の頻度は、*TSHR* 1/172、*DUOX2* 1/67 と先天性甲状腺機能低下症の罹患率そのものより高く、片アレル性変異保有者のごく一部のみが発症すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、「片アレル性変異保有者の発症要因の一つに、多遺伝子に同時に変異を保有することが関与する」と作業仮説を立てた。この仮説の検証を目的に、片アレル性 *TSHR* 変異保有および *TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有による先天性甲状腺機能低下症罹患リスクを定量的に検討した。

## 3. 研究の方法

### 対象

日本人先天性甲状腺機能低下症患者 401 名を対象とした。このうち 142 名は軽症例 (最終観察非投薬時  $TSH < 10 \mu U/mL$ )、159 名は中等症もしくは重症例 (同  $TSH \geq 10 \mu U/mL$  または甲状腺形態異常)、100 名は重症度不明であった。

### 方法

#### (1) 変異スクリーニング

対象者の末梢血より DNA を抽出し、PCR-直接シーケンス法を用いて、以下のように遺伝子解析を行った。まず、対象全例に *TSHR* を解析し、片アレル性 *TSHR* 変異保有者を同定した。次に同定した片アレル性 *TSHR* 変異保有者に *DUOX2* を解析し、*TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有者を同定した。

#### (2) 検出した変異の機能解析

変異スクリーニングで検出した *TSHR* 変異および *DUOX2* 変異のうち、新規変異の機能について HEK293 細胞を用いた一

過性発現系で評価した。

*TSHR* 変異機能は、HEK293 細胞に *TSHR* と cAMP response element を挿入したプラスミドを共発現させ、TSH で刺激し、Gs シグナルを介して産生された cAMP に応じて上昇する luciferase 活性を測定した。

*DUOX2* 変異機能は、HEK293 細胞に *DUOX2* と *DUOX2A2* を共発現させ、Amplex Red 試薬を加えると、*DUOX2* が産生した  $H_2O_2$  依存性に蛍光物質であるレゾルフィンが産生されるため、それを測定した。

#### (3) 統計学的解析

先天性甲状腺機能低下症患者集団と一般集団での片アレル性 *TSHR* 変異および *TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異の頻度を算出した。それぞれの頻度をもとに、片アレル性 *TSHR* 変異および *TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有による先天性甲状腺機能低下症罹患のオッズ比 (OR) を算出した。また *TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有者の先天性甲状腺機能低下症罹患率をベイズの定理から求めた。

## 4. 研究成果

#### (1) 変異スクリーニング

片アレル性 *TSHR* 変異保有者を 27 名同定した。これら 27 名のうち、4 名に片アレル性 *DUOX2* 変異を同定した (図 1)。片アレル性 *TSHR* 変異保有者および *TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有者は、いずれも非内服時  $TSH < 10 mU/L$  未満の軽症先天性甲状腺機能低下症であった。

#### (2) 検出した変異の機能解析

*TSHR*\_L669H、*TSHR*\_A705fs 変異は、ともに野性型に比して、有意に活性低下を認めた (図 2-1)。*DUOX2*\_E327X、*DUOX2*\_K530X、*DUOX2*\_V779M 変異はいずれも野性型に比して有意に活性低下を認めた (図 2-2)。

#### (3) 統計学的解析

片アレル性 *TSHR* 変異の頻度は、患者集団で 6.7% (27/401)、一般集団で 0.58% (1/172) であった。*TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有の頻度は、患者集団で 1.0% (4/401)、一般集団で 0.0087% (1/172 × 1/67) であった。以上の成績から、先天性甲状腺機能低下症罹患の OR は、片アレル性 *TSHR* 変異保有では 12.3、*TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有では 116.1 と算出した (図 3-1)。またベイズ推定による先天性甲状腺機能低下症罹患率は、片アレル性 *TSHR* 変異保有者で 0.38%、*TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有者で 3.7% と推定した (図 3-2)。

[考察]

これまでの先天性甲状腺機能低下症発症機序に関する研究は、主に甲状腺形成異常や甲状腺ホルモン合成障害による中等症から重症の症例に対して行なわれており、軽症先天性甲状腺機能低下症発症機序の大部分は不明であった。近年、両アレル性変異で中等症から重症先天性甲状腺機能低下症を来す遺伝子 (*TSHR*、*DUOX2*) の片アレル性変異が、先天性甲状腺機能低下症の原因となりうる と報告されたが、その妥当性に関する定量的検証はなされていなかった。本研究により、片アレル性 *TSHR* 変異保有による先天性甲状腺機能低下症罹患リスクは約 10 倍、*TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異では 100 倍に上昇することが示された。一方、ベイズ推定による *TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有者の罹患率はわずか 4% であり、*TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有者であってもその大部分は発症しないことが示された。これらの成績は、*TSHR* および *DUOX2* の片アレル性変異にメンデル遺伝優性則を適用する all or none の発症規定因子ととらえる従来の考え方の限界を端的に示すものである。本研究結果より、片アレル性変異は疾患発症におけるリスク因子のひとつであり、これらのリスク因子は単独で存在するよりも重積して存在することで相乗的な効果をもたらすと考えることができる。このような複数のリスク因子を前提とした疾患モデルは、生活習慣病に代表される多因子疾患のモデルとして広く用いられている。リスク因子重積による発症モデルでは、因子数が増えれば増えるほど、そのような個体の発現頻度が減少するため重症例が発症しにくい。本研究では、検出された 4 名の *TSHR*・*DUOX2* 二重片アレル性変異保有者はいずれも軽症例であったが、このような臨床的観察もリスク因子重積による発症モデルに矛盾しない。

片アレル性変異をリスク因子の一つとみなす本研究モデルが妥当であるならば、片アレル変異を持つ先天性甲状腺機能低下症患者には、既検出の片アレル性変異のみならず、未検出の遺伝的リスク因子やヨード過剰などの環境的リスク因子が更に重積して存在すると想定される。このような知見の統合的な説明として、先天性甲状腺機能低下症責任遺伝子の片アレル性変異、ヨード過剰、未熟児出生などの遺伝、環境因子が、甲状腺器官形成・機能系に対して一個体内で重積することにより先天性甲状腺機能低下症が惹起されると考えられる。この考えは、集団的遺伝学的データに基づき形成された世界初の考え方である。今後は、一個体内の因子の遺伝因子重積を、次世代シーケンサー等を用いて検証することが可能であると考えられる。

図 1

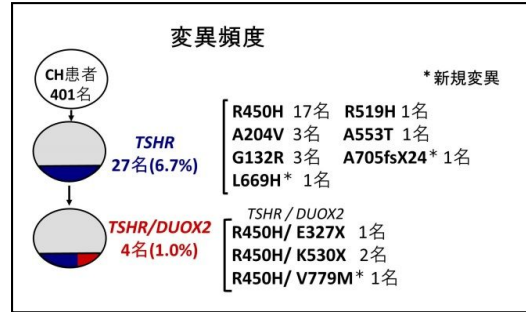


図 2 -1

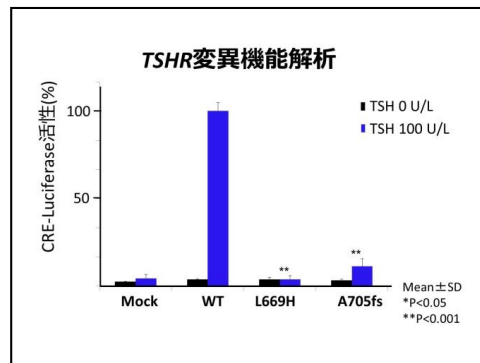


図 2 -2

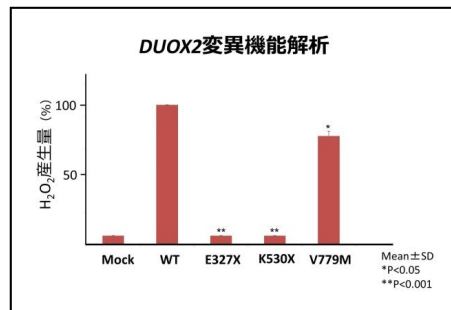


図 3 -1

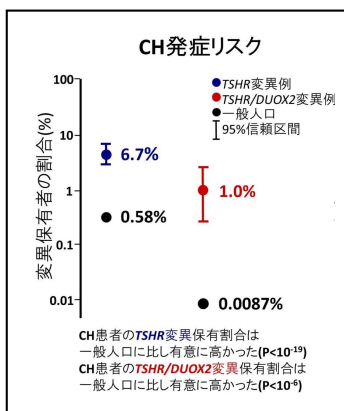
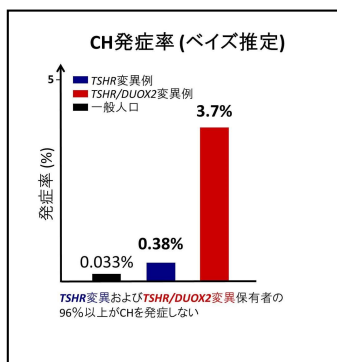


図 3-2



(2)研究協力者

長谷川 奉延 (HASEGAWA Tomonobu)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20189533

鳴海 覚志 (NARUMI Satoshi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：40365317

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

諏訪内 亜由子 (SUWANAI Ayuko)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：90383851