

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461537

研究課題名(和文)GNAS関連インプリンティング疾患の包括的分子遺伝学的解析と疾患発症機序の解明

研究課題名(英文)Molecular evolutionary genetics analysis and elucidation of pathogenic mechanism of GNAS related imprinting disease

研究代表者

佐野 伸一郎 (Sano, Shinichiro)

浜松医科大学・医学部・協定訪問共同研究員

研究者番号：60535574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究期間を通じ集積した偽性副甲状腺機能低下症患者サンプルと臨床情報は80例に至った。現在も症例数は増加傾向である。このうち70症例については既に分子遺伝学的解析を終えることができた。目標症例数の50症例を大きく上回る症例数となった。研究期間に下記の重要な成果を発表した。複雑な遺伝子構造異常に起因するGNASメチル化異常を呈する症例を同定することができた。詳細な臨床情報を入力可能であった69症例に関しepigenotype-phenotype correlationの検討を行い、本邦における最大の症例数を用いた解析として発表した。

研究成果の概要(英文)：We accumulated more than 80 clinical history of PHP patients and performed molecular analysis in 70 cases of them. During the research period, we published some papers as follows:

Sano S, et al., Growth hormone deficiency in monozygotic twins with autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b. *Endocr J* 62(6), 523-529(2015); Nakamura A, Sano S, et al., Complex Genomic Rearrangement Within the GNAS Region Associated With Familial Pseudohypoparathyroidism Type 1b. *J Clin Endocrinol Metab* 101(7), 2623-2627, (2016); Sano S, et al., Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type 1b in a patient with multilocus imprinting disturbance: a female-dominant phenomenon?. *J Hum Genet* 61(8), 765-769, (2016); Sano S., et al., (Epi) genotype-Phenotype Analysis in 69 Japanese Patients With Pseudohypoparathyroidism Type I *J Endocr Soc*, 2(1),9-23, (2018)

研究分野：小児内分泌

キーワード：偽性副甲状腺機能低下症 GNAS インプリンティング

1. 研究開始当初の背景

ヒト染色体 20q13.3 には親由来依存的に発現するインプリンティング遺伝子 *GNAS* が存在し、本領域の遺伝子異常により偽性副甲状腺機能低下症 (PHP)、偽性偽性不甲状腺機能低下症 (PPHP)、Progressive osseous heteroplasia (POH) を発症する。20q13.3 に位置する *GNAS* 領域には *Gα* 蛋白をコードする領域 (exon1-13) と 4 か所 (A/B, XL, AS, NESP55) のメチル化可変領域 (DMR) が含まれる。母親由来アレレル *GNAS* 遺伝子変異により PHP を、父親由来アレレル *GNAS* 遺伝子の変異によるハプロ不全により PPHP/POH を発症する。従来、PHP は大きく PHP-1a と PHP-1b に分類され、PHP-1a では *Gα* 遺伝子変異によるもの、PHP-1b は *GNAS*-DMR メチル化異常によるものと分類されてきた。しかし PHP-1a と診断された症例の中に *Gα* 遺伝子変異が無く、*GNAS*-DMR メチル化異常を呈する症例が存在し、従来の臨床診断と分子遺伝学的診断が一致しない症例が多数報告されている。従って本疾患においては、新たな臨床診断分類の確立が必要とされている。

近年、責任インプリンティング領域以外に複数の DMR メチル化異常を有する症例 (Multiple Methylation Defects: MMD) が報告されている。疾患責任領域以外のメチル化異常が患者の臨床像に及ぼす影響や、MMD 発症機序は現在ところわかっていない。

2. 研究の目的

研究の目的は以下の3点とする。

1) 本邦における PHP 及び PPHP/POH の遺伝学的異常の頻度は不明である。そこで研究期間内で PHP 50 症例、PPHP/POH 10 症例を目標に症例の集積を行い本疾患の分子遺伝学的異常の発生頻度を同定する。更に上記解析より本疾患の (epi)genotype - phenotype correlation を明らかにする。

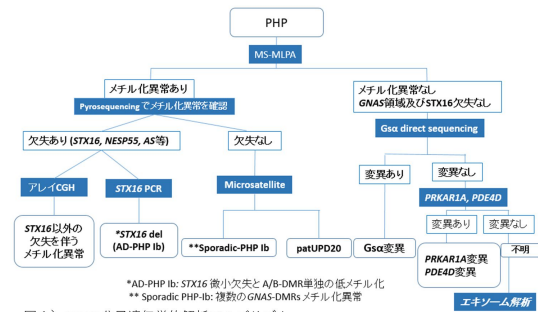
2) MMD 症例を有する PHP と MMD のない PHP との臨床像を比較検討する。

3) MMD 患者で破綻していると想定される複数の DMR 異常を引き起こすメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

1) 我々は、本疾患の包括的分子遺伝学的診断アルゴリズム (図1) を構築し約 30 症例の分子遺伝学的解析を行ってきた。効率的な解析のため本アルゴリズムは、分子遺伝学的異常を MS-MLPA を用いて *GNAS*-DMR メチル化異常の有無で 2 群に分けることから始まる。その後各種解析ツール (Direct sequencing, aCGH, エキソーム解析) を用いて遺伝子異常を同定する。本アルゴリズムでは、*Gα* シグナル伝達下流に参与する PDE4D と PRKAR1A の解析も含まれている。

2) パイロシーケンス法を用いて、代表的なインプリンティング疾患に参与する 8 つの DMR メチル化解析を行い MMD 症例の同定を行



う。MMD 症例の有する DMR メチル化異常とそれに対応する表現型を明らかにし、MMD の無い PHP との臨床像を比較検討する。

3) MMD 患者で破綻していると想定されるインプリンティング制御メカニズムを明らかにする。具体的には MMD 症例の DNA を用いて、ゲノムワイドなインプリンティング制御因子の同定を目的にエキソーム解析を行う。

エキソーム解析で原因の同定ができない場合は全ゲノム解析を行う。

4. 研究成果

1) 研究期間を通じ集積した偽性副甲状腺機能低下症患者サンプルと臨床情報は 80 例に至った。現在も症例数は増加しており順次解析を行っていく予定である。このうち 70 症例については、既に分子遺伝学的解析を終えることができた。目標症例数の 50 症例を大きく上回る症例数となった。

分子遺伝学的解析が終了した 70 症例の内訳は、*GNAS* 変異 28 例、*GNAS* メチル化異常症例 41 例 (Sporadic type :21 例、Autosomal dominant type: 20 例)、*GNAS* 領域の遺伝子構造異常に伴うメチル化異常を呈する症例 1 例であった。この *GNAS* 領域の遺伝子構造異常を呈する症例に関しては次世代シーケンサーを用いて、その遺伝子構造異常を明らかにし、既報にない複雑な遺伝子構造異常に起因する *GNAS* メチル化異常であることを同定し報告した (Nakamura A, J Clin Endocrinol Metab, 2016;101(7):2623-7)。

PHP では PTH 抵抗性以外に TSH 抵抗性をはじめとする複数のホルモン抵抗性を呈することが知られているが、そのほとんどが *GNAS* 遺伝子変異を有する症例において確認されている。また STX16 微小欠失を有する PHP では、成長ホルモン分泌不全を呈する症例の報告はこれまでになかった。我々は STX16 微小欠失を伴う PHP 症例において成長ホルモン分泌不全を伴う世界初症例を同定し報告した (Sano S, Endocr J, 2015;62(6): 523-529)。このことは、PHP において分子遺伝学的異常の種類を問わず様々なホルモン抵抗性が生じている可能性を考えなければならないことを示した重要な症例となった。

詳細な臨床情報が入手可能であった 69 症例を用いて (epi)genotype-phenotype correlation の検討を行い、本邦における最大の症例数を用いた解析として発表した

(Sano S, *J Endocr Soc*, 2017;2(1):9-23)。上記解析では以下のことが判明した。GNAS 変異を有する症例は、GNAS メチル化異常を有する症例よりも診断時年齢が有意に若く、その理由として前者では皮化骨腫、低身長、肥満などの臨床像が乳幼児期に顕性化する一方、後者では思春期以降に低カルシウム血症によるテタニーが出現するためということが判明した。また皮化骨腫は、GNAS 変異患者の中でも無機能型変異 (nonsense mutation, frameshift mutation, deletion) を有する患者に認められる有意な臨床像であった。このことは Gs α タンパクの著しい発現低下が皮下骨腫を引き起こすことを示唆している。残念ながら今回の検討では、皮下骨腫以外に、分子遺伝学的異常と関連する特異な臨床像は認められなかった。従来 PHP では低身長、丸顔、肥満、知的障害、短指症、皮下骨腫といった Albright's hereditary osteodystrophy (AHO) を呈することが知られている。今回の検討では、AHO 以外の臨床像として斜視を呈するが複数存在することが判明した。69 症例のなかに先天性甲状腺機能低下症 (CHT) として治療されていた 8 症例の PHP がいた。この 8 名の臨床像を検討すると、生後速やかに甲状腺ホルモン補充療法が開始されているにもかかわらず、乳児期に発達遅延や著しい肥満が認められていた。従って CHT 患者の中に PHP 症例が存在するため、発達遅延や乳児期肥満を認めた際は、PHP を疑う必要があると考える。

2) 研究期間内で同定できた MMD 症例は 2 例であった。そのうち 1 例は PHP と Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) の臨床像 (過成長、巨舌、臍ヘルニア) を併せ持っていた。本例は PHP 疾患責任領域である GNAS-DMR の広範なメチル化異常を有しかつ BWS 疾患責任領域 Kv-DMR の低メチル化を有していることが判明した (図 2)。

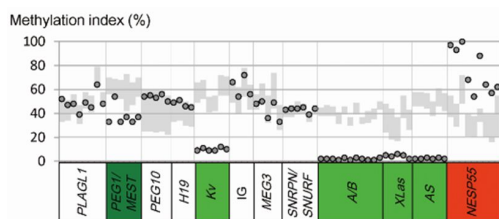


図2) グレーの帯は正常範囲のMethylation indexを示す。●は患者データを示す。Kv-DMRとGNAS-DMRsのメチル化異常を認める

更に全染色体にわたる網羅的メチル化解析を行い前述の2か所以外にも複数の染色体に DMR メチル化異常を有する MMD 症例であることを明らかにした。本例は、PHP と BWS の臨床像を併せ持つ世界 2 例目の MMD を呈した症例として報告した (Sano S, *J Hum Genet*, 2016;61(8):765-769)。また同時に 2 つのインプリンティング疾患を有する MMD 症例を文献的に検索すると本児を含めて確認できた MMD 症例は 9 例であった。全例とも BWS に加えて他のインプリンティング疾患を発症し

ていると報告されていた。このことは、BWS の臨床像が、過成長や巨舌や臍ヘルニアといった比較的気づかれやすい臨床像を呈することが影響していると考えられた。さらに 8 例はすべて女性であった。このことより我々は、X 染色体不活化の際に必要な DNA methyltransferase-1 (DNMT1) の不足が MMD 発症と関係するのではという新たな仮説を提唱した。

3) 本研究期間内に集積した症例の中で A/B-DMR 単独の低メチル化異常を呈する世界初の PHP の 1 家系を同定できた。本家系の患者では、既報の GNAS 遺伝子変異および遺伝子構造異常を有しないことを確認した。興味深いことに本家系患者の A/B-DMR 低メチル化の程度は、他の GNAS メチル化異常患者で認められる A/B-DMR 低メチル化の程度と比してマイルドであった。上記より本家系の患者には共通した分子遺伝学的異常が存在し、その異常により A/B-DMR 低メチル化異常が生じていると想定される。われわれは、本家系の分子遺伝学的異常を解明することにより、新たな PHP 発症メカニズムを提唱できると考えている。今後さらに研究を進めていく予定である。

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6件)

以下 ~ すべて査読あり

Sano S, et al., Growth hormone deficiency in monozygotic twins with autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b. *Endocr J* 62(6), 523-529(2015), DOI: 10.1507/endocrj.EJ15-0033

Nakamura A, Sano S, et al., Complex Genomic Rearrangement Within the GNAS Region Associated With Familial Pseudohypoparathyroidism Type 1b. *J Clin Endocrinol Metab* 101(7), 2623-2627, (2016), DOI: 10.1210/jc.2016-1725

Goto M, Sano S, et al., Sporadic pseudohypoparathyroidism type-1b with asymptomatic hypocalcemia. *Pediatr Int* 58(11), 1229-1231, (2016), DOI: 10.1111/ped.13096

Sano S, et al., Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type 1b in a patient with multilocus imprinting disturbance: a female-dominant phenomenon?. *J Hum Genet*

61(8), 765-769, (2016), DOI:

10.1038/jhg.2016.45

Sano S., et al., (Epi)genotype-Phenotype

Analysis in 69 Japanese Patients With

Pseudohypoparathyroidism Type I. *J Endocr Soc*,

2(1),9-23, (2018), DOI: 10.1210/js.2017-00293

Suzuki E, Sano S., et al., A de novo 50-bp

GNAS Intragenic Duplication in a Patient with

Pseudohypoparathyroidism Type 1a. *Cytogenet*

Genome Res 153(3), 125-130, (2018), DOI:

10.1159/000485644

〔学会発表〕(計 9 件)

佐野伸一朗、他. 偽性副甲状腺機能低下症における TSH 抵抗性に関する検討 第 49 回日本小児内分泌学会学術集会, 2015.

佐野伸一朗、他. 偽性副甲状腺機能低下症における TSH 抵抗性に関する検討 日本人類遺伝学会大 60 回大会, 2015.

佐野伸一朗、他. 偽性副甲状腺機能低下症における分子遺伝学的分類に基づいた TSH 抵抗性に関する検討 第 89 回日本内分泌学会学術集会, 2016.

Shinichiro Sano, Tsutomu Ogata, et al., Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type 1b in a patient with Multilocus methylation disturbance. The 13th International Congress of Human Genetics, 2016.

Shinichiro Sano, Tsutomu Ogata, et al., Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type 1b in a patient with Multilocus methylation disturbance. The 9th Biennial scientific meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society, 2016.

佐野伸一朗、他. Beckwith-Wiedemann syndrome と PHP-1b の臨床像を呈した Multilocus imprinting disturbance の女児例. 第 90 回日本内分泌学会学術総会, 2017.

佐野伸一朗、他. PHP における (epi)genotype-phenotype correlation の検討. 第 51 回日本小児内分泌学会学術集会, 2017.

佐野伸一朗、他. 偽性副甲状腺機能低下症の 69 例における (エピ) 遺伝子型-表現型解析. 日本人類遺伝学会第 62 回大会, 2017.

佐野伸一朗、他. PHP における (エピ) 遺伝子型 - 表現型解析. 第 40 回日本小児遺伝学会, 2018

〔図書〕(計 1 件)

佐野伸一朗 医歯薬出版 医学のあゆみ 2017 Vol263 No.4 307-312

〔産業財産権〕

なし

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

佐野 伸一朗 (SANO, Shinichiro)

浜松医科大学・医学部・協定訪問共同研究員

研究者番号: 6 0 5 3 5 5 7 4

(2) 研究分担者

鏡 雅代 (Kagami, Masayo)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・室長

研究者番号: 7 0 3 9 9 4 8 4

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()