

Title	先天性甲状腺機能低下症の分子遺伝学的発機序および病態生理の解明
Sub Title	Molecular mechanisms and pathophysiology of congenital hypothyroidism
Author	長谷川, 奉延(Hasegawa, Tomonobu) 鳴海, 覚志(Narumi, Satoshi)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010. )
JaLC DOI	
Abstract	(1)単一遺伝子病による我が国の先天性甲状腺機能低下症(CH)の有病率1.TSHR:両アリル性変異は中等症～重症CHの4%。2.PAX8:ヘテロ接合性変異はCHの2.0%。3.DUOX2:両アリル性変異はCHの7.8%。4.TG:両アリル性変異はCHの4.9%。5.TPO:両アリル性変異はCHの2.0%。6.その他は稀。(2)多因子遺伝病によるCH:TSHRとDOUX2のdigenic mutation1例あり。(3)1.変異TSHR遺伝子の機能:G132R, A204V, D403N, R450HはいずれもTSH結合能、cAMP産生能ともに低下。2.変異PAX8の機能:K80_A84dupは核内に移行するもののDNA結合能および転写活性能を欠如。
Notes	研究種目：基盤研究(C)  研究期間：2008～2010  課題番号：20591232  研究分野：小児科  科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20591232seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_20591232seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591232

研究課題名(和文)

先天性甲状腺機能低下症の分子遺伝学的発症機序および病態生理の解明

研究課題名(英文)

Molecular Mechanisms and Pathophysiology of Congenital Hypothyroidism

研究代表者

長谷川 奉延 (HASEGAWA TOMONOBU)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20189533

## 研究成果の概要(和文):

(1) 単一遺伝子病による我が国の先天性甲状腺機能低下症(CH)の有病率 1. *TSHR*: 両アリル性変異は中等症～重症CHの4%。2. *PAX8*: ヘテロ接合性変異はCHの2.0%。3. *DUOX2*: 両アリル性変異はCHの7.8%。4. *TG*: 両アリル性変異はCHの4.9%。5. *TPO*: 両アリル性変異はCHの2.0%。6. その他は稀。(2) 多因子遺伝病によるCH: *TSHR* と *DUOX2* の digenic mutation 1例あり。(3) 1. 変異 *TSHR* 遺伝子の機能: G132R, A204V, D403N, R450H はいずれも TSH 結合能、cAMP 産生能ともに低下。2. 変異 *PAX8* の機能: K80\_A84dup は核内に移行するものの DNA 結合能および転写活性を欠如。

## 研究成果の概要(英文):

(1) The prevalence on monogenic disease in Japanese congenital hypothyroidism(CH), 1. biallelic *TSHR* mutations; 4.3% in moderate to severe CH, 2. *PAX8* mutations; 2.0% in CH, 3. biallelic *DUOX2* mutations; 7.8% in CH, 4. *TG* mutations; 4.9% in CH, 5. *TPO* mutations; 2.0% in CH, 6. Other mutations; rare. (2) Polygenic disease; one CH patient having digenic mutations of *TSHR* and *DUOX2*. (3) *In vitro* experiments confirmed loss of functions of 1. four mutations of *TSHR*, namely G132R, A204V, D403N, R450H, having reduced binding activities and cAMP responses, and 2. K80\_A84dup *PAX8* localizing in nucleus, but having severely impaired DNA binding and transactivation.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：小児科

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児内分泌学、先天性甲状腺機能低下症

## 1. 研究開始当初の背景

先天性甲状腺機能低下症 (congenital hypothyroidism; CH) は約 2,000-5,000 出生

に 1 例の頻度で認められる先天性内分泌疾患である。CH の分子遺伝学的発症機序・病態生理については未解明な点が多い。すなわち単

一遺伝子病および多因子遺伝病から構成されるCHの90%以上の病因は特定されていない。本研究ではCHの分子遺伝学的発症機序および病態生理を解明するため、多数のCH患者を対象とした候補責任遺伝子の総括的解析、および変異遺伝子の機能解析を行う。

## 2. 研究の目的

本研究の具体的な目標は以下の3点である。(1) 単一遺伝子病による遺伝性CHの頻度を明らかにする。(2) 多因子遺伝病、すなわち複数の遺伝子の相互作用(例えばdigenic変異;異なる2つの遺伝子の同時変異による発症)による遺伝性CHの存在の有無を明らかにする。および(3) 変異が証明された各遺伝子、とくにTSHRおよびPAX8において変異遺伝子の機能を*in vitro*で解明する。

## 3. 研究の方法

CHの99%以上が新生児マススクリーニングを契機に診断されていることを考慮して、本研究では“新生児マススクリーニング陽性を契機に診断された永続性CH”を対象とする。ただし、甲状腺外要因によりマススクリーニング陽性となる、中枢性CH・染色体異常(Down症候群など)・母体Basedow病による一過性甲状腺機能異常・未熟性に伴う一過性甲状腺機能異常を除外する。最終対象者は102名であった。ただし、変異PDS/SLC26A4および変異甲状腺ホルモン受容体ベータの機能解析については102名以外の該当患者を含めた。

以上の対象に対して、PCRダイレクトシーケンシング法により、12種のCH責任遺伝子の包括的一斉解析をおこなった。すなわちTSHR, PAX8, NKX2-1/TITF1, FOXE1/TITF2, NKX2-5, TG, TPO, NIS/SLC5A5, PDS/SLC26A4, DEHAL1/IYD, DUOX2, DUOX2A2である。なお研究当初は10種の解析を予定していたが、その後の世界からの新規責任遺伝子の報告により最終的に候補遺伝子を12種とした。さらに、変異TSHRおよび変異型PAX8については培養細胞を用いた*in vitro*機能解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 本邦における単一遺伝子病による遺伝性CHの頻度

(1)-1. TSHR遺伝子: 両アリル性TSHR変異の有病率は中等症~重症CHの4%、一般人口の1/118,000である。1アリル性変異の有病率は軽症CHの9%、一般人口の1/172である。創始者変異R450Hが変異全体の70%を占める。

(1)-2. PAX8遺伝子: ヘテロ接合性変異の有病率はCHの2.0%、一般人口の1/176,000である。

(1)-3. DUOX2遺伝子: 両アリル性変異の有病率はCHの7.8%、一般人口の1/44,000である。

(1)-4. TG遺伝子: 両アリル性変異の有病率はCHの4.9%、一般人口の1/71,000である。

(1)-5. TPO遺伝子: 両アリル性変異の有病率はCHの2.0%、一般人口の1/177,000である。

(1)-6. その他の遺伝子: NKX2-1/TITF1, FOXE1/TITF2, NKX2-5, NIS/SLC5A5, PDS/SLC26A4, DEHAL1/IYD, DUOX2A2の7遺伝子の変異を認めず、これらの遺伝子変異によるCHは稀と考えられる。

(2) 多因子遺伝病による遺伝性CHの存在1例において、TSHRとDUOX2のdigenic mutationを認めた。

(3) 変異が証明された各遺伝子における変異遺伝子の*in vitro*での機能

(3)-1. 変異TSHR遺伝子:

G132R, A204V, D403N, R450Hはいずれも細胞表面への125I-TSH結合能、およびTSH依存的cAMP産生能の両者ともに低下しており、機能低下型変異であることを証明した(下図参照)。

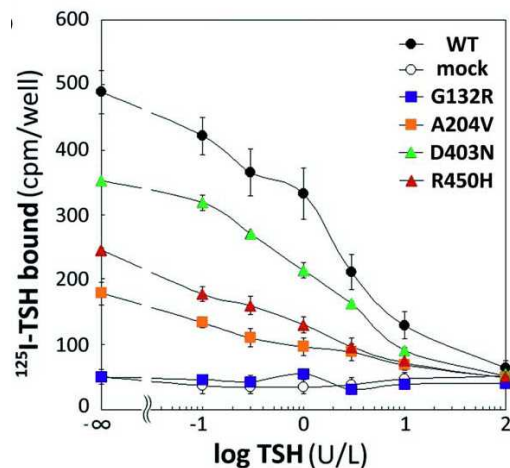


図 変異TSHR遺伝子の機能解析: COS-7細胞表面の変異TSHRへの125I-TSH結合能。横軸は細胞に添加したTSHの濃度、縦軸は細胞表面の変異TSHRへのTSH結合能である。G132R, A204V, D403N, R450Hはいずれも野生型に比してTSH結合能低下を認める(雑誌論文より)。

(3)-2. 変異PAX8遺伝子:

K80\_A84dupは核内に移行するものの、DNA結合能および転写活性能(下図参照)を欠如することを証明した。

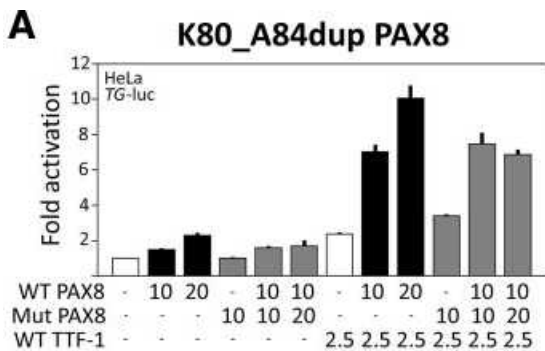


図 変異 *PAX8* 遺伝子の機能解析：HeLa 細胞を用いた転写活性能  
 横軸は細胞に発現させた遺伝子とその濃度、縦軸はサイログロブリンプロモーターを用いた転写活性能である。野生型 *PAX8* および野生型 *TTF-1* はそれぞれ単独で濃度依存性に転写活性を上昇させた。さらに野生型 *PAX8* および野生型 *TTF-1* を共発現させると協調的に (synergistically) 作用した。変異 *PAX8* は単独で転写活性を有さなかった。一方で、変異 *PAX8* および野生型 *TTF-1* を共発現させると野生型の  $21 \pm 2\%$  の転写活性を認めた。さらに、変異 *PAX8* は野生型 *TTF-1* の有無に関わらず優性阻害効果を認めなかった (雑誌論文 より)。

#### (4) その他の CH 遺伝子変異

##### (4) -1. 変異 *PDS/SLC26A4* :

T527P および H723R はいずれも細胞内で小胞体に存在し、細胞膜には局在しないことを証明した (下図参照)。

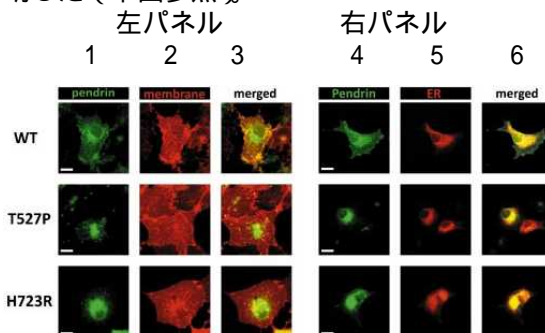


図 変異 *PDS/SLC26A4* の機能解析：発現蛋白の COS-7 細胞内局在

本実験では蛍光顕微鏡下で *PDS/SLC26A4* 遺伝子産物であるペンドリンは緑(左パネル 1 列目および右パネル 4 列目)に、細胞膜に局在する蛋白質は赤(左パネル 2 列目)に、小胞体に局在する蛋白質は赤(右パネル 5 列目)に観察される。左パネル 3 列目(あるいは右パネル 6 列目)はペンドリンと細胞膜に局在する蛋白質(あるいは小胞体に局在する蛋白質)の同時発現 (merged) である。野生型ペンドリン(WT)は、細胞膜に局在し、細胞膜に局在する蛋白質と merge する。変異

*PDS/SLC26A4* の T527P および H723R はいずれも細胞内で小胞体に発現し、小胞体に局在する蛋白質と merge する (雑誌論文 より)。

(4) -2. 変異甲状腺ホルモン受容体ベータ：R320H, R383C, I431M はいずれも 3 次元構造の異常をきたすことを証明した (下図参照)。

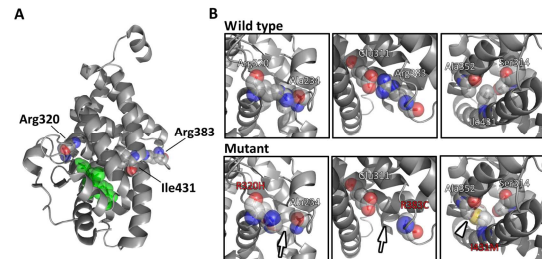


図 甲状腺ホルモン受容体ベータと甲状腺ホルモン結合体の 3 次元構造モデル  
 コンピューターを用いて甲状腺ホルモン受容体ベータ - 甲状腺ホルモン結合体の 3 次元構造モデルを作成した。左側 (A) に、野生型 Arg320, Arg383, Ile431 の位置を“球”で示した。右側 (B) に R320H, R383C, I431M (下段) を野生型 (上段) とともに示した。R320H は Arg320 と Ala234 の間の水素結合 (矢印) を失う。同様に R383C は Arg383 と Glu311 の間の水素結合 (矢印) を失う。I431M は、変異 Met431 と Ala352 の間に新たな接触面 (矢頭) を生み出す。(赤は酸素、青は窒素、黄色は硫黄、灰色はその他の原子を意味する。甲状腺ホルモンは緑色で示した。)(雑誌論文 より)

#### 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 7 件)

鳴海覚志、長谷川奉延．先天性甲状腺機能低下症 水と臨床 査読無し in press

Narumi S, Cho H, Tamada I, Kozu Y, Tsuchiya T, Nagai T, Hasegawa T. One novel and two recurrent THRB mutations associated with resistance to thyroid hormone: Structure based computational mutation prediction. Clin Pediatr Endocrinol 査読有 19: 2010, 91-99.

Asakura Y, Narumi S, Muroya K, Fujita K, Aida N, Hasegawa T, Adachi M. Progression of Goiter in Pendred Syndrome is Associated with Increase of Thyroidal Iodine Uptake but not with Iodine Organification Defect: Report of a Patient with *SLC26A4* Mutations. Am J Med Genet 査読有 152A: 2010, 1793-1797.

長崎啓祐、鳴海覚志、浅見直、小川洋平、菊池透、長谷川奉延、内山聖。家族性先天性甲状腺機能低下症の臨床的・分子遺伝学的検討。ホと臨床 査読無し 57:2010, 1001-1005.

Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. Transcription-factor mutations and congenital hypothyroidism: Systematic genetic screening of a population-based cohort of Japanese patients. J Clin Endocrinol Metab 査読有 95: 2010, 1981-1985.

Narumi S, Muroya K, Abe Y, Yasui M, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. TSHR mutations as a cause of congenital hypothyroidism in Japan: a population-based genetic study. J Clin Endocrinol Metab 査読有 94:2009, 1317-1323.

長崎啓祐、鳴海覚志、浅見直、菊池透、長谷川奉延、内山聖。先天性甲状腺機能低下症における TSH 不応症の臨床的および遺伝学的検討。ホと臨床 査読無し 56:2008, 1213-1216.

[学会発表](計 17 件)

鳴海覚志、室谷浩二、朝倉由美、安達昌功、長崎啓祐、天野直子、石井智弘、石井美穂、江見充、長谷川奉延。甲状腺形成異常における Copy number variation 異常解析。第 53 回日本甲状腺学会 2010 年 11 月 11 日-13 日 長崎

長崎啓祐、鳴海覚志、小川洋平、菊池透、浅見直、長谷川奉延、内山聖。一過性甲状腺機能低下症における DUOX2 遺伝子解析の検討。第 53 回日本甲状腺学会 2010 年 11 月 11 日-13 日 長崎

鳴海覚志、室谷浩二、朝倉由美、安達昌功、長谷川奉延。PAX8 変異の機能喪失の機序は多様である：転写因子解析のピットフォール。第 44 回日本小児内分泌学会学術集会 2010 年 10 月 7 日-9 日 大阪

後藤元秀、河田泰定、山本幸代、石井雅宏、荒木俊介、川越倫子、久保和泰、楠原浩一、鳴海覚志、長谷川奉延。甲状腺ホルモン受容体 遺伝子にヘテロ接合性変異を認めた甲状腺ホルモン不応症の 7 歳女児例。第 44 回日本小児内分泌学会学術集会 2010 年 10 月 7 日-9 日 大阪

Narumi S, Amano N, Ishii T, Murota K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. Genetic congenital hypothyroidism: who's at risk?, and how do we identify them? Pediatric Academic Societies' 2010 Annual meeting 2010.5.1-5.4

Tronto

Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Amano N, Ishii T, Adachi M, Hasegawa T. Congenital hypothyroidism due to PAX8 mutations: Clinical and genetic features. International Symposium on Pediatric Endocrinology, official ICE 2010 Satellite Symposium 2010.3.31-4.1 Tokyo

小野真、鳴海覚志、宮井健太郎、松原洋平、高澤啓、滝沢文彦、鹿島田健一、長谷川奉延、大西寿和。TSH 受容体遺伝子 (TSHR) に新規変異 V711fs を認めた甲状腺機能低下症の 1 家系。第 83 回日本内分泌学会学術総会 2010 年 3 月 26 日 京都  
鳴海覚志、吉田明、安達昌功、朝倉由美、室谷浩二、亀山香織、長谷川奉延。PAX8 変異陽性甲状腺細胞は胎児甲状腺様の組織像を呈する。第 52 回日本甲状腺学会 2009 年 11 月 4 日 名古屋

吉田彩子、鈴木潤一、齊藤宏、和田美夏、浦上達彦、鳴海覚志、長谷川奉延。重症型甲状腺機能低下、Tg の高値を示し、DUOX2 異常をヘテロ接合性に認めた同胞例 第 43 回日本小児内分泌学会 2009 年 10 月 3 日 宇都宮

小野真、鳴海覚志、大西寿和、宮井健太郎、松原洋平、高澤啓、滝沢文彦、鹿島田健一、長谷川奉延、水谷修紀。TSH 受容体遺伝子に新規変異を認めた甲状腺機能低下症の 1 家族例。第 43 回日本小児内分泌学会 2009 年 10 月 1 日 宇都宮

鳴海覚志、吉田明、安達昌功、朝倉由美、室谷浩二、亀山香織、長谷川奉延。PAX8 変異陽性甲状腺細胞は胎児甲状腺様の組織像を呈する。第 43 回日本小児内分泌学会 2009 年 10 月 1 日 宇都宮

Narumi S, Murota K, Asakura Y, Amano N, Ishii T, Adachi M, Hasegawa T. Genetic congenital hypothyroidism: who's at risk?, and how do we identify them? LWPES/ESPE 8<sup>th</sup> Joint Meeting 2009.9.12 New York

山本幸代、荒木俊介、久保和泰、川越倫子、河田泰定、土橋一重、白幡聡、鳴海覚志、長谷川奉延。新生児マススクリーニングでは発見されなかった PAX-8 遺伝子異常による原発性甲状腺機能低下症の 1 家系。第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009 年 4 月 23 日 前橋

鳴海覚志、井ノ口美香子、天野直子、石井智弘、長谷川奉延。TG を含む 3 遺伝子に配列変化を認めた甲状腺機能低下症の同胞例。第 19 回臨床内分泌代謝 Update 2009 年 3 月 13 日 東京

長崎啓祐、鳴海覚志、浅見直、小川洋平、菊池透、長谷川奉延、内山聖。先天性甲

甲状腺機能低下症における TSH 不応症の臨床的及び遺伝学的検討. 第 51 回日本甲状腺学会 2008 年 11 月 22 日 宇都宮  
鳴海覚志、室谷浩二、朝倉由美、天野直子、石井智弘、安達昌功、長谷川奉延. 先天性甲状腺機能低下症における甲状腺転写因子群の包括的遺伝子解析. 第 42 回日本小児内分泌学会 2008 年 10 月 2 日 米子  
長崎啓祐、鳴海覚志、小川洋平、菊池透、長谷川奉延、浅見直. 家族性先天性甲状腺機能低下症の臨床的・分子遺伝学的検討. 第 42 回日本小児内分泌学会 2008 年 10 月 2 日 米子

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷川奉延 (HASEGAWA TOMONOBU)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：20189533

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

鳴海覚志 (NARUMI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：21791006