

Title	甲状腺発生異常におけるゲノムワイドCopy Number Variation解析
Sub Title	Copy number variation as a cause of thyroid dysgenesis
Author	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	日本人甲状腺発生異常患者57名(甲状腺外合併症あり7名、なし50名)を対象に、ゲノムワイドCopy Number Variation (CNV)解析を行った。その結果、心奇形、口蓋裂など甲状腺外合併症を有する異所性甲状腺患者2名において、それぞれ約3MbのCNV異常(重複1名、欠失1名)を認めた。CNV異常は甲状腺発生異常の稀な原因であるが、甲状腺外合併症を有する例では重要な原因と考えられる。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2010 課題番号：21791006 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
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21791006seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21791006seika</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.

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 6 月 16 日現在

機関番号 : 32612

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2009 ~ 2010

課題番号 : 21791006

研究課題名(和文)

甲状腺発生異常におけるゲノムワイド Copy Number Variation 解析  
研究課題名(英文)

Copy Number Variation as a Cause of Thyroid dysgenesis  
研究代表者

鳴海 覚志 (NARUMI SATOSHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号 : 40365317

研究成果の概要(和文) : 日本人甲状腺発生異常患者 57 名(甲状腺外合併症あり 7 名、なし 50 名)を対象に、ゲノムワイド Copy Number Variation (CNV) 解析を行った。その結果、心奇形、口蓋裂など甲状腺外合併症を有する異所性甲状腺患者 2 名において、それぞれ約 3 Mb の CNV 異常(重複 1 名、欠失 1 名)を認めた。CNV 異常は甲状腺発生異常の稀な原因であるが、甲状腺外合併症を有する例では重要な原因と考えられる。

研究成果の概要(英文) : We screened copy number variation (CNV) abnormalities in 57 Japanese patients with thyroid dysgenesis. Among them, 50 patients had extrathyroidal complications, while the remaining seven did not. The genome-wide CNV analyses showed that two patients with extrathyroidal complications (e.g., cleft palate, cardiac malformation) had a seemingly pathogenic CNV (deletion or duplication), of which size was about 3 Mb. CNV abnormalities are important causes of complicated thyroid dysgenesis, although the overall prevalence among thyroid dysgenesis is low.

### 交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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 : 発生・分化、ゲノム、遺伝学、マイクロアレイ

### 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な先天性内分泌疾患であり、世界的に 1/4,000 出生の頻度で認められる。甲状腺機能低下症の約 80% は甲状腺の形態異常、すなわち、異所性甲状腺、甲状腺無形成、甲状腺低形成を有し、これらは甲状腺発生異常(thyroid dysgenesis、以下 TD)と総称される。

フランスでの疫学研究によると、TD の約 97% は孤発性である。このことから、TD の主因は単一遺伝子異常以外であることが推測

される。*PAX8*, *NKX2-1* など甲状腺転写因子の変異は甲状腺低形成の原因となるが、異所性甲状腺、甲状腺無形成では遺伝的異常の報告は極めて稀である。

Copy number variation (以下 CNV) とは数 kb ~ 数 Mb のゲノムの量的变化(欠失、重複など)を指す。ヒトゲノムプロジェクトおよびそれに引き続く国際 HapMap プロジェクトを端緒に明らかとなったゲノム構造の多様性である。健常者も CNV を有し、これらは Copy number polymorphism (CNP) とも表現される。CNP の総サイズは一塩基多型を上回っており、

ヒト正常形質の多様性および病的形質（疾患など）の主要な規定因子と推測されている。実際、特定の CNV が易罹病性を決定する疾患が存在する（SLE など）。一方、疾患患者のみが有し、その発症に直接関与する CNV（病的 CNV）が存在する。22q11.2 欠失症候群に代表される先天奇形症候群の一部は、病的 CNV が原因である。また、自閉症など従来原因不明であった疾患においても、一部の患者が病的 CNV を持つことが明らかとなりつつある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、TD の発症における CNV の関与の検証である。

## 3. 研究の方法

### 【対象】

患者は、神奈川県立こども医療センター内分泌代謝科、慶應義塾大学病院小児科、新潟大学医歯学総合病院小児科において集められた。本研究では以下の適格基準を満たす患者を対象と設定した。

- (1) 新生児マスククリーニングを契機に診断された先天性甲状腺機能低下症患者
- (2) 異所性甲状腺もしくは甲状腺無形成が超音波検査あるいは甲状腺シンチグラムで証明されている者

なお、異所性甲状腺が超音波もしくは甲状腺シンチで確認されたものを「異所性甲状腺」、超音波で正所に甲状腺が描出されないが、血清サイログロブリン低値でなく甲状腺組織の残存が想定される症例は「異所性甲状腺の疑い」、甲状腺シンチで正所・異所とも描出がない、あるいは甲状腺超音波で正所に甲状腺が描出されず血清サイログロブリンが低値である者を「甲状腺無形成」と定義した。

研究参加に関するインフォームドコンセントは本人もしくは両親に対して説明書を用いて行われ、書面での同意を得た。本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会にて承認された。

患者群（TD 群）として、57 名が含まれた。その対象特性を表 1 に示す。対照群に関しては、TD に非罹患で匿名化された日本人 94 名のゲノム DNA 試料を用いた。

表 1. 対象特性

特 性	人 数 (割 合)
性 別	男 19 (33%) 女 38 (67%)
甲状腺形態	異所性甲状腺 37 (65%) 異所性甲状腺の疑い 12 (21%) 甲状腺無形成 8 (14%)
合併症	口蓋裂 1、小耳症 1、血管腫 1 新生児肺高血圧・動脈管開存・難聴 1 女性化乳房 1、自閉症 1、結節性硬化症 1
	計 7 (12%)

### 【CNV アッセイ】

対象者の患者から末梢血 3-5 mL を採血し、標準的手法でゲノム DNA を抽出した。CNV アッセイを行う前に、既知単一遺伝子異常を除外する目的で、*PAX8*, *NKX2-1*, *FOXE1*, *NKX2-5* 遺伝子解析を、PCR-直接シーケンス法で行った。上記 4 遺伝子に変異を有する患者は認めなかったため、57 名全員をゲノムワイド CNV 解析の対象とした。

ゲノムワイド CNV 解析には、既知 CNV 領域を中心 57,000 か所のプローブを配した deCODE 57K チップを用いた。解析は TD 群 57 名と対照群 94 名に対して行われた。

ゲノムワイド CNV 解析により得られた信号強度の数値データは SMAP 法に基づく処理により、TD 群で有意に高頻度な CNV を検索した。なお、得られた候補領域 16 か所のうち 13 か所（81%）は 500 kb 未満であった。

500 kb 以上の CNV(複数の既知 CNV 領域を包含)を検出するため、前後 5 プローブの信号強度平均値を 5 プローブ毎にプロットし、 $\pm 2 \text{ SD}$  を逸脱する点が 3 つ(500 kb に相当)以上連続する領域を検索した。TD 群にのみ観察され、対照群あるいは CNV データベースに不在であるものを、CNV 异常と判定した。

### 【検証実験】

SMAP 法で検出した候補領域に選択的にプローブを配した Agilent CNV カスタムアレイを作成し、上記解析の精度検証を行った。また、信号強度プロットを用いた解析で検出した領域に関しては、ゲノムワイドオリゴヌクレオチドアレイ CGH (Agilent 180K) を用いた検証を行った。

## 4 . 研究成果

### 【結果】

まず、deCODE 57K チップによるゲノムワイド CNV 解析を 57 名の対象患者および 94 名の正常対照に対して行った。SMAP 解析により、16 か所(38 名)に TD 関連 CNV 候補領域を同定した。一塩基多型のタイピングに基づくチップでの解析は、特に特異度に限界がある(すなわち偽陽性を生じる可能性がある)ことを考慮し、次に CNV 検出法として最も高精度とされている Agilent 社のオリゴヌクレオチドアレイ CGH 法による解析を試みた。この検証実験にはカスタムアレイ、すなわち特定のゲノム領域のみを対象に超高密度にプローブを設定したアレイを用いた。この検証実験では、解析した 16 か所全てにおいて CNV 異常は再現されず、当初の候補領域は全て偽陽性と考えられた。

SMAP 法は連続した複数シグナルの異常の検出に関して低感度と予想されたため、引き続き信号強度プロットを用いて、よりサイズの大きい CNV 異常を検索した。その結果、患者 2 名において、それぞれ 1 か所の約 3 Mb の欠失あるいは重複を同定した(図 1)。この CNV 異常は、オリゴヌクレオチドアレイ CGH 法による検証実験でもその存在が証明された。

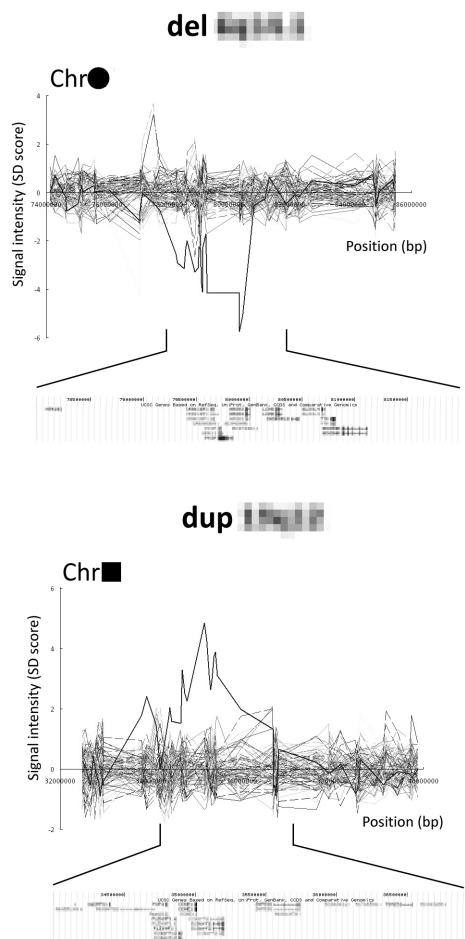
CNV 異常が認められた TD 患者 2 名の甲状腺形態はいずれも異所性甲状腺であった。また、2 名とも甲状腺外合併症を有していた(表 2)。

### 【考察】

本研究では世界で初めて、多数の異所性甲状腺患者を含む TD 患者集団に対して CNV 異常(疾患関連 CNP、病的 CNV)のスクリーニングが行われた。その結果、病的 CNV が発症に関与したと推測される異所性甲状腺患者 2 名を同定した。なお、病的 CNV が原因と推測される異所性甲状腺患者の文献的報告はない。

全ての稀な CNV が病的とは限らないことから、我々が患者で同定した CNV が TD の病因であるとすぐさま結論することはできない。しかし、CNV 領域のサイズが大きく、複数の遺伝子を含むこと 患者 2 名とも比較的低頻度の甲状腺外合併症を有すること は、2 つの CNV が病因であることを支持する所見である。一般的に病的 CNV は *de novo* で発生するとされる。本研究では *de novo* か否かは未検討であるが、優先度の高い検討課題と思われる。

図 1. TD 患者 2 名における CNV 異常の同定



ゲノムワイド CNV 解析で同定された CNV 異常。(上) 口蓋裂合併異所性甲状腺の患者で見いだされた約 3 Mb のゲノム欠失(太線は患者の当該信号、細線はその他の患者の信号を示す)。当該領域には 7 個の遺伝子が含まれる。(下) 心奇形と難聴を合併した異所性甲状腺患者で見いだされた約 3 Mb のゲノム重複。当該領域には 8 個の遺伝子が含まれる。

表 2. 病的 CNV による TD を疑われる 2 症例の臨床情報

症例	性	年齢	CNV	甲状腺形態	甲状腺外合併症
1	男	14	del●	異所性	口蓋裂
2	女	18	dup■	異所性	新生児肺高血圧、動脈管開存、難聴

Thorwarth らは、甲状腺無形成 37 名、甲状腺低形成 34 名、異所性甲状腺 5 名からなる TD 患者集団 76 名を対象に、BAC-aCGH 法による CNV スクリーニングを行った。その結果、甲状腺無形成 5 名と甲状腺低形成 2 名で計 10 か所の稀な CNV を同定したが、複数患者が共有する領域はなかった。患者構成と CNV 検出法の差異が著しく、本研究との比較は注意を要するが、「TD の大部分を説明しうる単一の病的 CNV は存在しない」との結論は一致した。TD の主因は依然不明と考えるのが妥当であろう。

一方、甲状腺外合併症を有する症例に限定すると、7 名中 2 名(29%)に CNV 異常が認められた。従来から、TD は一般集団に比し高頻度に奇形徵候が認められると報告されている。解剖学的に甲状腺と隣接する器官(心臓、食道など)では、発生を制御する分子機構(例：遊走・移動に関与する液性因子、受容体など)に関して甲状腺との相互作用が生じるため、なんらかの発生過程の異常に於いて、両者が同時に障害された結果として説明されてきた。一方、我々の症例ではゲノム構造異常を有することから、異なった説明が可能である。すなわち、ゲノム構造異常は通常複数の遺伝子に影響を及ぼすため、複数の器官系統に異常が生じうる。具体的には、器官形成過程が複雑であり、多数の遺伝子が関与する中枢神経および循環器は影響を受ける確率が高いと予想される。

以上、本研究は主に異所性甲状腺患者からなる TD 患者 57 名を対象に行われた世界初のゲノムワイド CNV 解析であり、心奇形、口蓋裂など甲状腺外合併症を有する異所性甲状腺患者 2 名において CNV 異常を同定した。TD 全体においては CNV 異常は稀であるが、甲状腺外合併症を有する例に限定すれば約 30% と高頻度であり、重要な原因と考えられる。今後、CNV 異常領域に存在する遺伝子の機能解析などを通じて、甲状腺外合併症を伴わない TD の分子機序解明が期待される。

## 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 2 件)

Narumi S et al. Transcription Factor Mutations and Congenital Hypothyroidism: Systematic Genetic Screening of a Population-Based Cohort of Japanese Patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 査読有り 2010;95:1981-1985.

Narumi S et al. One Novel and Two Recurrent THRB Mutations Associated with Resistance to Thyroid Hormone: Structure-based Computational Mutation Prediction. *Clin Pediatr Endocrinol.* 査読有り 2010;19:91-99.

### [学会発表](計 2 件)

鳴海 覚志ほか、甲状腺形成異常における Copy number variation 異常解析、日本甲状腺学会、2010 年 11 月 12 日、長崎  
鳴海 覚志ほか、PAX8 変異の機能喪失機序は多様である：転写因子解析のピットフォール、2010 年 10 月 8 日、日本小児内分泌学会、大阪

### [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]

ホームページ等  
なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

鳴海 覚志 (NARUMI SATOSHI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号 : 40365317

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし