

原発性副甲状腺機能低下症の包括的遺伝子解析と臨床像の検討

Comprehensive genetic analyses and clinical manifestations of hypoparathyroidism

三井 俊賢* 徳村 光昭* 井ノ口美香子* 康井 洋介*
糸川 麻莉*

慶應保健研究, 33(1), 095-098, 2015

要旨: 原発性副甲状腺機能低下症 (primary hypoparathyroidism : PH) は, 副甲状腺ホルモン分泌低下とそれによる血清カルシウム値の低下をきたす稀な内分泌疾患である。本症の遺伝性の病因として, *AIRE*, *CASR*, *GATA3*, *GCM2*, *PCLN1*, *PTH*, *TBCE*, *TRPM6* などの遺伝子変異が知られているが, PHを対象に上記8遺伝子を包括的に解析した報告はない。また, PHの詳細な臨床像については明確になっていない。

本研究の目的は, PHにおける既知責任遺伝子の変異頻度, およびPHの臨床像を明らかにすることである。PHと診断された日本人20例を対象に, 上記8遺伝子の次世代シーケンシング (next-generation sequencing : NGS) による遺伝子解析および臨床像の検討を行った。

遺伝子解析の結果, 7例に遺伝子変異を認めPHにおける既知責任遺伝子の変異頻度は35%であった。臨床像については, 発症時期は乳児期と学童期に多く, 無症状から複数の合併症候を認める症例まで幅広い表現型を認めた。遺伝子変異の有無を推測できるような臨床的な手掛かりは見いだせなかった。本研究で得られた知見から, PHは遺伝異質性が高く, 臨床的にも病因診断が困難であることが明らかになった。PHの病因診断にはNGSが有用であると考える。

keywords: 副甲状腺機能低下症, 低カルシウム血症, 次世代シーケンシング
hypoparathyroidism, hypocalcemia, next-generation sequencing

はじめに

原発性副甲状腺機能低下症 (primary hypoparathyroidism : PH) は, 副甲状腺ホルモン (parathyroid hormone : PTH) 分泌低下とそれによる血清カルシウム値の低下をきたす稀な内分泌疾患である。正しく診断・治療されない場合, 不応性けいれん, 運動失調, 易疲労感など長期のQOL低下をきたす。本症の遺

伝性の病因として, *AIRE*, *CASR*, *GATA3*, *GCM2*, *PCLN1*, *PTH*, *TBCE*, *TRPM6* などの遺伝子変異が知られているが, PHを対象に上記8遺伝子を包括的に解析した報告はない¹⁾。また, 責任遺伝子が多岐にわたり遺伝異質性が高いため, 病因診断に至らない症例が多い²⁾。そのため, PHの詳細な臨床像については明らかになっていない。

*慶應義塾大学保健管理センター

(著者連絡先) 三井 俊賢 〒223-8521 神奈川県横浜市港北区日吉4-1-1

次世代シーケンシング解析 (next-generation sequencing : NGS) は、従来型の遺伝子解析法である PCR (polymerase chain reaction)-シーケンシングに比べ、少量検体で多数の遺伝子を高速に解析することを可能にし、希少疾患の研究など様々な分野で著しい成果を上げている新しい解析法である。NGSにより、短期間で網羅的に責任遺伝子を探索することが可能になった³⁾。

本研究では、PH患者を対象に上記8既知遺伝子を次世代シーケンサーで網羅的に解析することにより、PHにおける既知責任遺伝子の変異頻度、およびPHの臨床像を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

対象は、小児期 (15歳以下) 発症、永続性のPHと診断した日本人20症例である。本研究におけるPHは日本内分泌学会編「低カルシウム血症の鑑別診断の手引き」における「PTH不足性副甲状腺機能低下症」に準拠した。すなわち、①低カルシウム血症あり、②腎機能低下なし、③低リン血症なし (低リン血症の判断は年齢を考慮する)、④intact PTH 30pg/mL未満が選択基準である。二次性副甲状腺機能低下症、一過性の原発性副甲状腺機能低下症、22q11.2欠失がFISH (fluorescence in situ hybridization) 法などで証明されている例は除外した。なお本研究は慶應義塾医学部研究倫理審査委員会承認されており、患者もしくは患者両親から同意を書面で得た。

次世代シーケンシング解析の方法の詳細については、Mitsui T, *et al.*, J Clin Endocrinol Metab 2014³⁾に記載してあるが、端的に以下に示す。

末梢血白血球由来ゲノムDNA2マイクログラムをCovarisアコースティックソルビライザーで断片化した。DNA末端を化学修飾したのち、SureSelectとオーバーナイトでハイブリダイズし、標的遺伝子のエクソン配列を濃縮した。識別配列を含むプライマーで濃縮された

DNAを増幅し、次世代解析可能なライブラリを構築した。次世代シーケンシングはMiSeq (イルミナ) 300塩基ペアエンドモードで、1ラン24検体のマルチプレックス解析を行った。得られた配列情報は、BWA, GATK, ANNOVARを中心とした標準的パイプラインで解析し、最終的にバリエーションの一覧表であるスプレッドシートを出力した。得られたバリエーションは、多型データベース (日本人のゲノム情報データベース Human Genetic Variation Databaseなど) を参照し、アレル頻度0.002未満であるナンセンス変異、スプライスサイト変異、フレームシフト変異、PolyPhen-2・SIFTの両方で変異と判定されるミスセンスバリエーションを変異と判断した。変異頻度の95%信頼区間はPearsonのカイ2乗検定を用いて求めた。

臨床像については、性別、発症年齢、初発症状、遺伝子型、合併症候、血清カルシウム値、血清リン値、血清PTH値、血清マグネシウム値、尿中カルシウム/クレアチンを検討した。

結果

表1に遺伝子型と臨床像のまとめを示す。

NGSによる上記8遺伝子の変異スクリーニングの結果、PH20症例中、7例に遺伝子変異を認めた (図1)。遺伝子変異はGATA3, GCM2, CASRの順に多かった。

PHの臨床像については、発症年齢の中央値は23か月で、乳児期発症は10例、幼児期発症2例、学童期以降発症8例であった。症状は、けいれんが最も多かったが、無症状で偶然診断された症例は2例であった。20症例 (男9症例、女11症例)のうち13症例に難聴、腎異形成、低身長などの合併症候を認めた。

考察

PHにおける既知責任遺伝子の変異頻度は35% (95%信頼区間14-55%)であることを明らかにした。さらに変異を認めた遺伝子は複数にわたり、PHにおいて遺伝異質性が高いこと

表 1 遺伝子型と臨床像のまとめ

患者	性別	発症年齢 ^c	遺伝子型	初発症状 ^c	S-Ca (mg/dL)	S-IP (mg/dL)	S-Intact PTH (pg/mL)	S-Mg (mg/dL)	Urinary Ca/Cr	合併症候
1	女	7歳	CASR異常症	熱性けいれん	7.2	6.2	11	NA	0.05	難聴
2	女	2か月	GATA3異常症	無症状 ^a	8.3	6.9	13	2.2	0.04	腎異形成
3	女	5か月	GATA3異常症	無熱性けいれん	7.2	8.7	9	NA	NA	難聴, 腎異形成
4	女	9歳	GATA3異常症	無症状 ^a	6.9	9.4	5	NA	0.06	難聴
5	男	4歳	GATA3異常症	無熱性けいれん	5.1	8	検出感度以下	1.3	NA	難聴
6	女	8歳	GCM2異常症	無熱性けいれん	6.4	7.7	7	1.8	0.05	なし
7	女	11か月	GCM2異常症	熱性けいれん	5.6	8	NA ^b	NA	0.05	なし
8	男	8歳	なし	皮下石灰化	7.7	5.6	16	1.8	0.06	難聴
9	男	1か月	なし	無熱性けいれん	4.6	NA	検出感度以下	NA	NA	難聴, 腎異形成, 低身長
10	女	11歳	なし	全身状態不良	7.7	6.3	6	NA	0.25	難聴, 1型糖尿病, 低身長
11	女	10か月	なし	嘔吐	8.0	5.5	57	1.9	0.03	難聴, 腎異形成
12	男	8か月	なし	無熱性けいれん	5.8	8.8	46	NA	0.02	腎異形成
13	男	日齢5	なし	無熱性けいれん	6.7	8.2	5	1.9	NA	難聴, 両眼隔離
14	男	日齢1	なし	全身状態不良	NA	NA	検出感度以下	NA	NA	甲状腺機能低下症, 心奇形, Kenney-Caffey様
15	女	2か月	なし	熱性けいれん	6.5	8.8	検出感度以下	1.4	NA	低身長, 甲状腺機能低下症
16	男	1か月	なし	無熱性けいれん	5.9	10.7	17	2	NA	なし
17	女	3歳	なし	無熱性けいれん	5.1	11.6	5	1.9	NA	なし
18	男	10歳	なし	無熱性けいれん	4.4	8.9	6	1.8	0.06	なし
19	男	13歳	なし	無熱性けいれん	6.4	8.7	5	2.3	0.01	なし
20	女	14歳	なし	無熱性けいれん	6.3	9.8	10	NA	NA	なし
基準値					8.5-10.2	2.4-4.3	10-65	1.8-2.6	0.05-0.15	

Ca: カルシウム, Ca/Cr: カルシウム/クレアチニン比, IP: リン, Mg: マグネシウム, PTH: 副甲状腺ホルモン, S: 血清

a 上気道炎で受診時に偶然採血で判明

b cPTH 0.1 ng/mL (基準値 > 0.15)

c 副甲状腺機能低下症のために初めて受診した年齢と症状を発症年齢と初発症状と定義

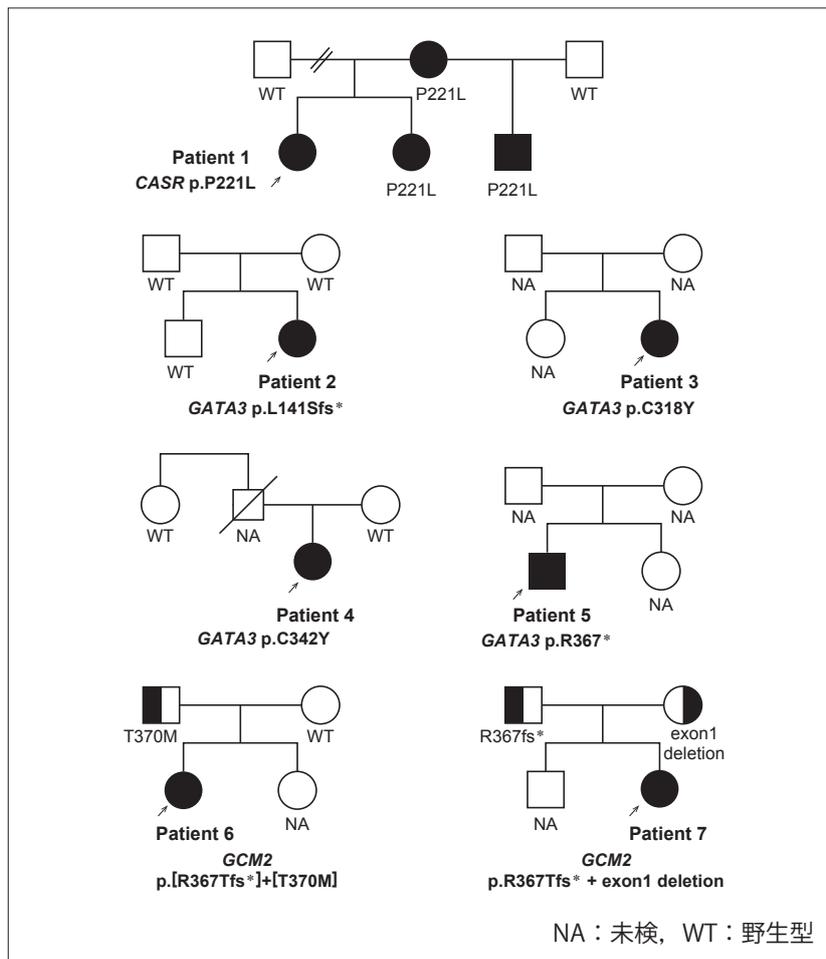


図 1 変異陽性 7 例の遺伝子型と家系図

を確認した。今回算出した変異頻度については、コホートの選択バイアスの可能性があるため、症例数を増やして今後検討する必要がある。65%の変異陰性例については、この中に未知責任遺伝子の異常により説明される症例が存在すると考えられ、さらなる分子遺伝学的検討が必要である。

PHの臨床像については、発症年齢が乳児期と学童期に多く見られ、この時期は発育急進期と一致していた。このことから、乳児期と学童期は成長のためにカルシウム需要が高まり相対的にカルシウムが不足しやすい時期なのではないかと考えるが、明確なデータは今までにないため推察の域を出ない。表現型については、無症状から複数の合併症候を認める症例まで幅広く、表現型と生化学的所見に明らかな関連は見いだせなかった。遺伝子型と表現型の関連については、GATA3異常症の多くに難聴合併（3/4例）を認めた一方、難聴合併例のほとんどは変異陰性で病因不明であった（6/9例）。GCM2異常症は副甲状腺機能低下症のみを有し、それ以外の合併症候は認めなかった。その他、明らかな遺伝子型表現型関連は認めなかった。以上の知見から、遺伝子変異の有無を推測できるような臨床的な手掛かりは見いだせなかった。よって、PHにおいて臨床的に病因診断は困難であり、病因診断には網羅的に解析するNGSが有用であると考え。PHの適切な病因診断を可能とすることで、より適切な遺伝カウンセリングの提供が可能となるはずである。

結語

本研究では、PH患者を対象にNGSで網羅的に遺伝子解析することにより、PHにおける既知責任遺伝子の変異頻度、およびPHの臨床像を明らかにした。

本研究で得られた知見から、PHは遺伝異質性の高い疾患であり、臨床的にも病因診断は困難であることが明らかになった。よって、PH

の病因診断には網羅的な遺伝子解析が可能であるNGSが有用であると考え。

文献

- 1) Fukumoto S, Namba N, Ozono K, et al. Causes and differential diagnosis of hypocalcemia—recommendation proposed by expert panel supported by Ministry of Health, Labour and Welfare, Japan. *Endocr J* 2008 ; 55 : 787-794.
- 2) Ahn TG, Antonarakis SE, Kronenberg HM, et al. Familial isolated hypoparathyroidism: a molecular genetic analysis of 8 families with 23 affected persons. *Medicine (Baltimore)* 1986 ; 65 : 73-81.
- 3) Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature* 2009 ; 461 : 272-276.
- 4) Mitsui T, Narumi S, Inokuchi M, et al. Comprehensive next-generation sequencing analyses of hypoparathyroidism: identification of novel GCM2 mutations. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014 ; 99 (11) : E2421-2428.