HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新生児マス・スクリーニング陽性の先天性甲状腺機能低下症に対する次世代シークエンサーを用いたターゲットリシークエンス
Author(s)	山口, 健史
Description	配架番号：2561
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14095号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14095
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/94591
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Yamaguchi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

新生児マス・スクリーニング陽性の先天性甲状腺機能低下症に対する
次世代シークエンサーを用いたターゲットリシークエンス

(Targeted next-generation sequencing for congenital hypothyroidism with positive neonatal TSH screening)

2020 年 3 月

北海道大学

山口　健史

Takeshi Yamaguchi

学位論文

新生児マス・スクリーニング陽性の先天性甲状腺機能低下症に対する
次世代シークエンサーを用いたターゲットリシークエンス

(Targeted next-generation sequencing for congenital hypothyroidism with positive neonatal TSH screening)

2020 年 3 月

北海道大学

山口　健史

Takeshi Yamaguchi

目次

発表論文目録および学会発表目録　・・・・・・・・・・・・1 頁

要旨　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・2 頁

略語表　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5 頁

緒言　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・7 頁

解析対象と実験方法　・・・・・・・・・・・・・・・・・17 頁

結果　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・26 頁

考察　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49 頁

総括および結論　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・59 頁

謝辞　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・61 頁

利益相反　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・62 頁

引用文献　・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・63 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文として投稿中である。

Targeted next-generation sequencing for congenital hypothyroidism with positive neonatal TSH screening
Takeshi Yamaguchi, Akie Nakamura, Kanako Nakayama, Nozomi Hishimura, Shuntaro Morikawa, Katsura Ishizu, Toshihiro Tajima
(The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism へ submit 済み)

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. 第 92 回　日本内分泌学会学術集会
「新生児マス・スクリーニング陽性の先天性甲状腺機能低下症児に対する、次世代シークエンサーを用いた網羅的遺伝子解析」
2019 年 5 月　仙台

2. The 58th Annual Meeting of the European Society of Paediatric Endocrinology
「Targeted next-generation sequencing for congenital hypothyroidism with positive neonatal TSH screening results」
2019 年 9 月　ウィーン（オーストリア）

要旨

【背景と目的】　先天性甲状腺機能低下症（congenital hypothyroidism: CH）は、頻度の高い先天性内分泌疾患で、そのほとんどが新生児マス・スクリーニング（newborn screening: NBS)で発見される。原発性 CH は病因から甲状腺形成異常と甲状腺ホルモン合成障害に分類され、単一遺伝子異常による CH として複数の疾患責任遺伝子が知られていたが、近年、次世代シークエンス解析の普及により、更に新規の疾患責任遺伝子が報告されている。しかし、候補遺伝子の解析による診断率はこれまで 10-20%とされ、分子遺伝学的要因は不明な点が多い。また、日本からの CH に対する次世代シークエンサー（next-generation sequencing: NGS)を用いた網羅的遺伝子解析の報告はない。

【目的】　NBS 陽性、日本人 CH の候補遺伝子の網羅的解析によるバリアント同定率を調査する。同定されたバリアントとその臨床像を解析し、CH 発症の分子遺伝学的要因を検討する。

【対象と方法】　NBS で発見され、レボチロキシン（L-T4)補充歴のある原発性 CH を対象とした。対象となった 168 名(合成障害 57 名、形成異常 33 名、病型診断未施行 78 名)に対して、NGS を用いて既知の CH 疾患責任遺伝子（24 遺伝子）をターゲットとして網羅的解析を行った。コールされたバリアントは、The American College of Medical Genetics and Genomics（ACMG)ガイドラインに従い分類し、pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance を病的バリアントとして抽出した。バリアントを保有する形式により、メンデル遺伝（常染色体優性遺伝形式をとる責任遺伝子に単一の病的バリアントを同定する、あるいは、常染色体劣性遺伝形式をとる責任遺伝子に複数の病的バリアントを複合型ヘテロ接合性あるいはホモ接合性に同定される症例)、Oligogenic 群（メンデル遺伝形式のバリアントは同定されなかったが、常染色体劣性遺伝形式をとる複数の責任遺伝子それぞれに単一の病的バリアントを組み合わせて同定された症例)、Monogenic 群（メンデル遺伝形式のバリアントは同定されなかったが、常染色体劣性遺伝形式をとる一つの責任遺伝子に単一の病的バリアントを同定された症例)に分類し、バリアントの同定率を検討した。さらに、バリアント保因数と重症度の相関を検討するため、合成障害による CH において Oligogenic 群と Monogenic 群の臨床像を比較した。

【結果】　全体で 168 名中 112 名(66.7%)にバリアントを同定した。メンデル遺伝は 14.9% (25 名/168 名)に同定し、その内訳は *DUOX2* 13 名、*TSHR* 4 名、*TG* 2 名、*TPO* 2 名 (以上は常染色体劣性遺伝形式の責任遺伝子)、*PAX8* 3 名 (常染色体優性遺伝形式)、*TSHR+PAX8* 1 名だった。また、Oligogenic 群が 18.5% (31 名/168 名)、Monogenic 群が 33.3% (56 名/112 名)みられた。合成障害を来す CH のうち、Oligogenic 群 11 名と Monogenic 群 23 名で臨床像を検討したところ、Oligogenic 群は Monogenic 群に比較し、初診時 TSH 値が有意に高かった。また、治療開始時および現在の L-T4 投与量に統計学的な有意差はなかったが、Oligogenic 群で多い傾向を認めた。今回の解析では兄弟例が 11 名 (5 家系) 含まれ、8 名 (72.7%)にバリアントを同定したが、そのうちメンデル遺伝は 1 家系 (2 名)のみだった。

【考察】　本研究は、日本人における CH の網羅的遺伝子解析としてこれまでで最大の報告となる。近年、CH に対する NGS を用いた候補遺伝子の網羅的解析に関する報告は増えているが、対象の選定・バリアントのフィルタリング・病原性の判断等により同定率は報告により大きく異なる。かつて、NGS 普及前に行われた遺伝子解析による遺伝子変異の同定率は 10-20%程度とされてきたが、これはメンデル遺伝としての報告が多く、本研究におけるメンデル遺伝のバリアント同定率 14.9% (25 名/168 名)とほぼ同等の結果であった。一方、近年、NGS を用いた研究では、メンデル遺伝に限らず、同定された病的バリアント全てを報告しており、その同定率は 33.0-51.5%であり、本研究の同定率 66.7% (112 名/168 名)とほぼ同等であった。

メンデル遺伝に関して、*DUOX2* 異常症 13 名、*TSHR* 異常症 4 名、*PAX8* 異常症 3 名、*TG* 異常症 2 名、*TPO* 異常症 2 名、*TSHR*＋*PAX8* 異常症 1 名を同定した。アジアからの既報と同様に *DUOX2* 異常症が最多で、臨床像は経時的に甲状腺機能が改善する経過に矛盾しなかった。*TSHR* 異常症おいて、全例で日本人に多いとされる p.R450H を保因していた。*TSHR* 異常症では形成異常を来す症例が報告されるが、本研究でも 5 名中 3 名は低形成だった。*PAX8* 異常症は、同定した 4 名のうち形成異常を認めたのは、*TSHR* 遺伝子のバリアントを複合ヘテロ接合性に合わせて保因していた 1 名 (低形成) のみであった。*TG* 異常症を 2 名同定したが、いずれも血清 Tg が低めであり、既報の特徴に合致した。*TPO* 異常症は 2 名同定し、1 名は左葉欠損であったが、*TPO* 異常症による片葉欠損の報告は検索の限り存在しなかった。

CH は、単一遺伝子疾患として発症する例もあるが、近年では複数の疾患責任遺伝子におけるバリアントの組み合わせで発症する oligogenic model も提唱さ

れている。本研究においても、Oligogenic 群が存在し、Oligogenic 群と Monogenic 群で初診時の血液検査データや L-T4 投与量を検討したところ、Oligogenic 群で重症の傾向を認めた。Oligogenic と Monogenic の重症度を比較した報告はこれまでないが、バリアント保因数と重症度に相関がある可能性が示唆された。

今回の解析における兄弟例 5 家系 11 名の解析では、メンデル遺伝形式のバリアントが同定されたのは 1 家系のみであった。家族例でも候補遺伝子の解析でバリアントが同定されないことがあることは知られているが、今後、両親を含めたエクソーム解析を検討している。

【結論】　日本人先天性甲状腺機能低下症において、既報と同程度バリアントが同定された。疾患責任遺伝子のメンデル遺伝として同定されることは一部であり、単一遺伝子疾患以外の原因として発症することの方が多いと考えられる。バリアントを複数保因する症例は、1 つで保因する症例に比較し、より重症となる傾向がみられた。複数の疾患責任遺伝子のバリアントを合わせ持つと、バリアントの効果が相加的に作用し CH 表現型の重症化に関与する可能性が考えられた。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

CDCA8	Cell division cycle associated 8
CH	Congenital hypothyroidism
DIO1	Deiodinase, iodothyronine, Type 1
DIO2	Deiodinase, iodothyronine, Type 2
DIO3	Deiodinase, iodothyronine, Type 3
DUOX1	Dual oxidase 1
DUOXA1	Dual oxidase maturation factor 1
DUOX2	Dual oxidase 2
DUOXA2	Dual oxidase maturation factor 2
ExAC	The Exome Aggregation Consortium
FOXE1	Forkhead box E1
FT3	free T3
FT4	free T4
gDNA	genomic DNA
GLIS3	Glis family zinc finger 3
GNAS	Guanine nucleotide binding protein
GWAS	Genome Wide Association Study
HGMD	The Human Gene Mutation Database
HHEX	Hematopoietically-expressed homeobox protein
IYD	Iodotyrosine deiodinase
JAG1	Jagged canonical notch ligand 1
L-T4	Levothyroxine
MAF	Minor allele frequency
M-CAP	Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity
NBS	Newborn screening
NGS	Next-generation sequencing
NKX2-1	NK2 homeobox 1
NKX2-5	NK2 homeobox 5
PCR	Polymerase chain reaction
PAX8	Paired box gene 8

Polyphen-2	Polymorphism phenotyping v2
SECISBP2	Selenocysteine insertion sequence-binding protein 2
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SLC16A2	Solute carrier family 16 member 2
SLC26A4	Solute carrier family 26 member 4
SLC5A5	Solute carrier family 5 member 5
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TG (Tg)	Thyroglobulin
TPO	Thyroid peroxidase
TSH	Thyroid-stimulating hormone
TSHR	Thyroid-stimulating hormone receptor

緒言

・ 先天性甲状腺機能低下症

先天性甲状腺機能低下症（congenital hypothyroidism: CH)の歴史は古く、かつて1750年代のヨーロッパでは、聾唖、知的障害、甲状腺腫、低身長を伴う人たちは「クレチン症」と呼ばれていた。クレチン症の原因が食事のヨード欠乏によることが広く明らかにされたのは19世紀であり、さらに1950年以降に甲状腺に関する検査方法が進歩し、異所性甲状腺などのヨード欠乏以外の原因のCHがようやく認識された。その後、新生児マス・スクリーニング（newborn screening: NBS)の導入により、CHの知的予後、身長予後は劇的に改善した。さらに近年は遺伝学的検査の進歩により、分子遺伝学的成因が徐々に明らかになってきている。

CHの発症頻度は、かつては6,000-7,000人に1人と考えられてきたが、NBS開始後、世界各地のスクリーニングで3,000-4,000人に1人程度と報告されており、最近では軽症CH/サブクリニカルCHを含めると補充療法を要するCHは2,000人に1人程度と考えられている （Nagasaki K et al., 2015)。

・新生児マス・スクリーニング

先天性甲状腺機能低下症のNBSは、日本では1976年から北海道大学小児科などでパイロット・スクリーニングが開始され、1978年から札幌市で自治体として初めて公的なスクリーニングが開始され、1979年10月から全国でのスクリーニングが開始された。

甲状腺ホルモンは、神経発達や骨成熟に必須のホルモンであり、重篤なCHでは重度の低身長や精神運動発達遅滞を呈する。CHは、低身長や精神運動発達遅滞を起こす疾患の中で、早期発見、早期治療により予防できる数少ない疾患であり、世界的にNBSが施行され、効果をあげてきた(Nagasaki K et al., 2015)。

日本では実際には、日齢4-6に足踵外縁部を穿刺して採取した血液を濾紙に吸収させた濾紙血を用いてTSHを測定する。ただし、TSHのみの測定では、中枢性甲状腺機能低下症や一部の甲状腺ホルモン不応症を見逃してしまうため、札幌市を含めた一部の地域では、free T4 (FT4)を同時に測定している。札幌市では、①TSH ≧ 30 mIU/L, ②FT4 ≦ 0.4 ng/dL, ③FT4 ≧ 6.0 ng/dL, ④TSH ≧10 mIU/L かつFT4 ≦ 0.9 ng/dLのいずれかの場合は要精密検査、① 30 ＞ TSH ≧ 10 mIU/L, ② 0.4 ＜ FT4 ≦ 0.9 ng/dL, ③ 6.0 ＞ FT4 ≧ 4.0 ng/dLのいずれかであれば再検査となり、再検査でも上記基準を満たした場合は精査

としている。ただし、低出生体重児や早産児は、満期産児と比較して FT4 は低くなる傾向にあるため、別に基準値が設定されている（図 1）。

A	・ 出生体重 2000 g未満 ・ 在胎38週未満 ・ 採血日齢 10以上 ・ TSH ＜ 2.0
B	・ 出生体重 1800 g未満 ・ 採血時体重 1800 g未満 ・ 在胎32週未満 ・ 採血日齢 21以上 ・ 採血日齢11以上かつ在胎32週以上36週未満
C	・ 出生体重 1500 g未満かつTSH ＜ 5.0 ・採血時体重 1500 g未満 ・ 在胎 28週未満かつ日齢30前 ・ 出生体重 1800 g未満かつ採血時体重 1800g 未満かつTSH<5.0

図 1　札幌市における甲状腺新生児マス・スクリーニングの判断基準

・ **甲状腺ホルモン値による重症度**

先天性甲状腺機能低下症マス・スクリーニングガイドライン(2014 年改訂版、以下、ガイドライン)では、FT4 による分類として、最重症を<0.4 ng/dL、重症を 0.4-0.7 ng/dL、中等症を 0.7-1.5 ng/dL をエキスパートオピニオンとしている (Nagasaki K et al., 2015)。

・ **治療開始基準**

ガイドラインでは、以下の場合には直ちにレボチロキシン(levothyroxine: L-T4)による治療開始を推奨している (Nagasaki K et al., 2015)。

① 有症状例(チェックリスト≧2 点)、または大腿骨遠位端骨核未出現の場合、または超音波検査にて甲状腺が同定できない場合、または甲状腺腫を認めた場合

CH チェックリスト

1. 遷延性黄疸
2. 便秘
3. 臍ヘルニア
4. 体重増加不良
5. 皮膚乾燥
6. 活動不活発
7. 舌が大きい
8. 泣き声がかすれている
9. 手足が冷たい
10. 浮腫がある
11. 小泉門開大
12. 甲状腺腫

② 無症状で、甲状腺超音波検査を行なっていない場合でも、TSH ≧ 30 mIU/L または TSH 15-30 mIU/L かつ FT4 < 1.5 ng/dL の場合

③ TSH ＜ 15 mIU/L の場合には、エビデンスレベルの高い研究はないが、慎重に経過観察し、以下の場合には治療開始を考慮する。

1）生後 6 ヶ月未満で TSH ≧ 10 mIU/L の場合
2）生後 12 ヶ月で TSH ≧ 5 mIU/L の場合

・ 治療開始後の再評価、病型診断

新生児期に正所性と診断され L-T4 補充を受けている症例の 10-30%は一過性であるという報告(Gaudino R et al.,2005)があるため、 CH の原因が明確に診断されていない場合、特に正所性と診断されている症例については L-T4 を中止しての再評価または病型診断が必要である (Nagasaki K et al., 2015)。再評価や病型診断は、神経細胞の発達が完了する 3 歳以降に行うことを推奨されている (Parazzini C et al.,2002)。超音波検査で形成異常と診断されている場合にも、超音波での異所性の診断は難しい場合もあるので (Kobayashi H et al., 2005; Jones JH et al., 2010)、正確な診断には信頼性の高い甲状腺シンチグラフィー検査を行うことが望ましい (Panoutsopoulos G et al., 2001; Schoen EJ et al., 2004; Clerc J et al., 2008)。

・ CH の病因による分類

a. 甲状腺形成異常

甲状腺転写因子は、甲状腺細胞の発生、分化、増殖に関与し、*NKX2-1（TTF1）*異常症、*FOXE1（TTF2）*異常症、*PAX8* 異常症による甲状腺形成異常が知られている。また、*NKX2-5* 異常症による異所性と無形成、*TSHR* 異常症による低形成も報告されている（図 2、表 1）。しかし、一卵性双胎の研究や大規模観察研究から、甲状腺形成異常の家族歴のある患者は極めて低頻度であり、主病因は単一遺伝子異常以外であると考えられている。

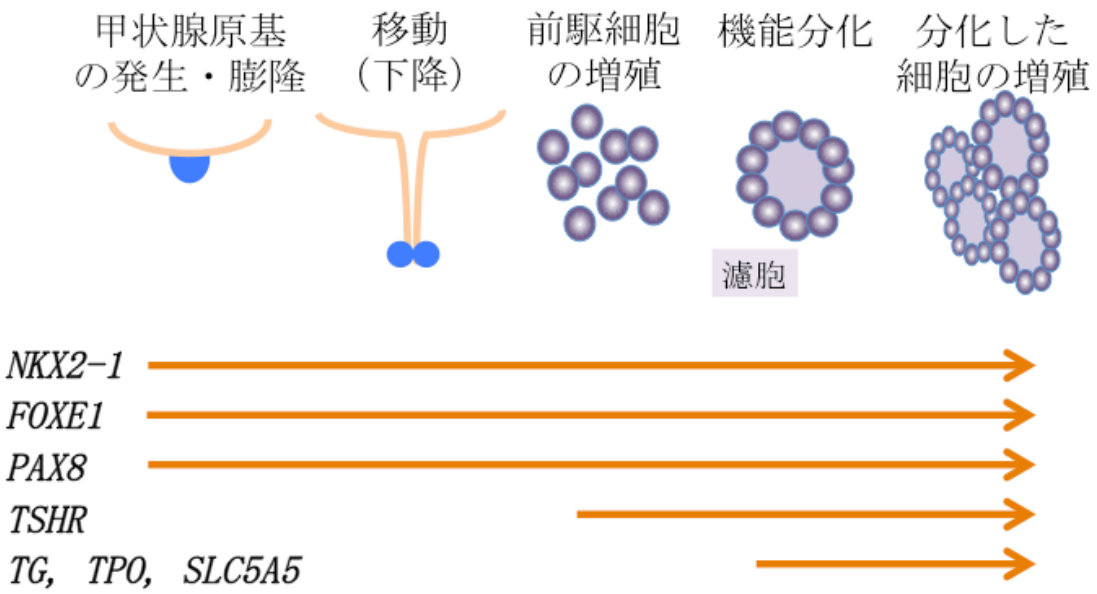


図 2　甲状腺の発生段階と遺伝子発現パターン

表 1　甲状腺形成異常の責任遺伝子

	機能	遺伝子	遺伝形式*	染色体	合併症
TTF1	転写因子	*NKX2-1*	常優	14q13	呼吸障害、アテトーゼ
TTF2	転写因子	*FOXE1*	常劣	9q22	口蓋裂、後鼻腔閉鎖
NKX2.5	転写因子	*NKX2-5*	常優	5q35	卵円孔開存
PAX8	転写因子	*PAX8*	常優	2q13	稀に片腎無形成
TSH 受容体		*TSHR*	常劣	14q31	なし

＊ 常優：常染色体優性遺伝、常劣：常染色体劣性遺伝

b. 甲状腺ホルモン合成障害

甲状腺ホルモン合成障害は、甲状腺ホルモン合成経路に関わる分子に先天的な異常があり、正常に甲状腺ホルモンを合成できない病態の総称である（図 3、表 2)。合成障害は形成異常に比較して遺伝性が高いことが知られ、これら合成経路の分子をコードする遺伝子の病的変異により、甲状腺ホルモン合成障害が起こる。

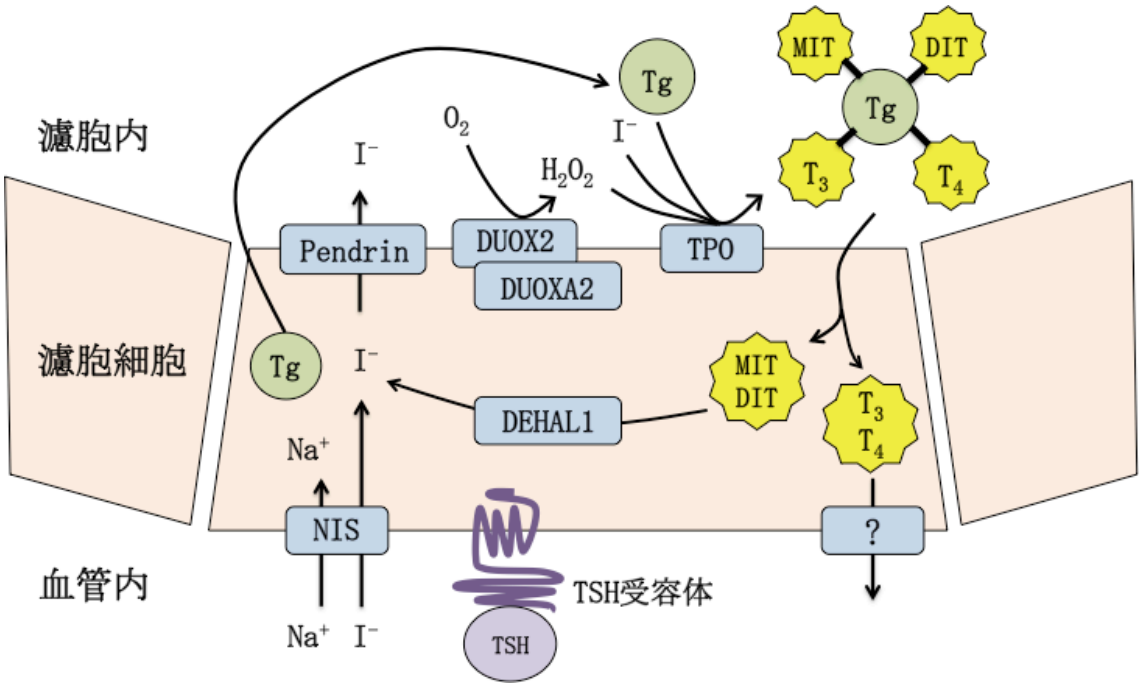


図 3　甲状腺濾胞細胞における甲状腺ホルモン合成

表 2　甲状腺ホルモン合成障害の責任遺伝子

	機能	遺伝子	遺伝形式*	染色体	特徴・合併症
NIS	ヨード共輸送（ｼﾝﾎﾟｰﾀｰ）	*SLC5A5*	常劣	19p13	ヨード取り込み低下 ^{123}I 唾液血清比の低下
Pendrin	濾胞へのヨードの輸送	*SLC26A4*	常劣	7q31	感音性難聴、甲状腺腫、有機化障害
Tg	ホルモン合成の基質	*TG*	常劣	8q24	甲状腺癌、血清サイログロブリン低値
TPO	有機化酵素	*TPO*	常劣	2p25	有機化障害
DUOX2	H_2O_2産生	*DUOX2*	常劣	15q15	永続性/一過性 有機化障害
DUOXA2	H_2O_2産生	*DUOXA2*	常劣	15q15	有機化障害
DEHAL1	ヨード再利用	*IYD*	常劣	6q25	NBS で発見されない場合 甲状腺腫

＊ 常劣：常染色体劣性遺伝

・ **遺伝子解析技術の進歩**

1970 年代に開発された DNA 配列解読技術である Sanger 法は、約 30 年にわたり唯一の DNA 配列解読技術であったが、１本のキャピラリーで１種の DNA 断片しか解読できないため、解読速度に限界があった。次世代シークエンサー(Next generation Sequencer: NGS)では、キャピラリーを用いず、解析基板上に固定された DNA 分子に対して、1 塩基対の伸長反応と CCD カメラによる画像データの取得を繰り返すが、数百万～数億本以上の独立した DNA を並列に解析する。そのため、Sanger 法の数万倍以上の解析速度で、1 塩基あたり数百分の 1 以下の費用で解析可能となった（表 3)。

表 3 本研究で使用した NGS(Miseq)とキャピラリーシークエンサー（ABI3130）の比較

	NGS (Miseq)	キャピラリーシークエンサー (ABI3130)
1 ランあたり		
時間	1 日	60 分
コスト	120 万円	1 万円
得られるデータ量	4.5Gb	2.5Kb
1Mb あたり		
時間	3 分	16.7 日
コスト	267 円	40 万円

・CH と遺伝子解析

CH の少なくとも一部が遺伝性であることは古くから知られており、Pendrin (*SLC26A4*)による Pendred 症候群の同胞例の初報告は 1896 年に遡る。1990 年以降、Sanger 法による遺伝子解析が CH 症例に適応され、表 1，表 2 の 12 の責任遺伝子が判明した。

その後の NGS の登場が CH の病因解明に与えた影響は大きい。甲状腺形成異常における単一遺伝子疾患の寄与は限定的と考えられ、新規の疾患責任遺伝子は報告されないままであった。しかし、2017 年、フランスの甲状腺形成異常患者 134 人に対してエクソーム解析を行い、3 人に *CDCA8* 遺伝子に変異が見つかった。2016 年の *JAG1* 遺伝子に続き、*CDCA8* 遺伝子が甲状腺形成異常の新規候補遺伝子に加わった。

さらに NGS は、多くの候補遺伝子を網羅的に、多くの患者に対して解析することが可能となったため、Sanger 法によるバリアント同定率よりも正確な疫学的研究が可能となった。

このように NGS の普及により CH の遺伝学的病因解明が急速に進んでいるが、まだ不明な点も多い。

・CH の網羅的遺伝子解析の課題と問題点

近年、CH に対する NGS を用いた網羅的な候補遺伝子の解析の報告が増えているが、その同定率は報告により異なる。

その主な理由は以下があげられる。

1. 候補遺伝子数が異なる
2. 対象数や対象の選定が異なる
3. バリアントのフィルタリング、病原性の判断基準が異なる
4. メンデル遺伝形式に従わないバリアントについても含めている

NGS を用いた場合は多数のバリアントがコールされるが、その病原性の判断（アリル頻度のカットオフをいくつにするか、*in-silico* 解析をどの程度重視するかなど）はこれまで報告により異なっていた。近年は、2015 年のアメリカ臨床遺伝学会(The American College of Medical Genetics and Genomics)（ACMG）が発表したガイドライン（Richards S et al., 2015）に準じて、pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign, benign の 5 つに分類しバリアントの病原性が判定されるようになった。しかし、benign も含めた同定された全てのバリアントをまとめた報告もあれば、一方で、pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance のみを示す報告もあり、統一されていない。

メンデル遺伝形式に従わないバリアントに関して、常染色体劣性遺伝形式をとる遺伝子で、病的バリアントを片アリルにのみ同定した場合や、複数の遺伝子に片アレルにのみ病的バリアントを組み合わせて有する場合（いわゆる oligogenic）は、メンデル遺伝に従うと CH の発症原因とはならない。しかし近年の報告では上記のような場合でも、何らかのバリアントを同定した症例として報告されている。

解析対象と実験方法

1. 対象患者

当科通院中、NBS 陽性、L-T4 補充歴のある CH を対象とした。

なお、母体バセドウ病、ヨード過剰、ダウン症など症候群、中枢性甲状腺機能低下症、同意が得られなかった症例は除外した。

本研究は北海道大学倫理委員会に研究倫理審査申請し承認された（医 16-023)。インフォームドコンセントは書面により本人あるいは親から取得した。

2. 病型診断

CH 患者は原則的に病型診断を行なっている。具体的には、カプセル内服可能となった 5-6 歳に達した時点で、4 週間前から L-T4 を休薬し、1/4 量のリオチロニンナトリウムに切り替えて、7-10 日前からリオチロニンナトリウムも休薬の後に、^{123}I 甲状腺摂取率、唾液/血液ヨード比、パークロレイト放出試験、シンチグラフィー、および血清 TSH, FT4, FT3, Tg の測定、TRH 負荷試験を行う。無形成、低形成、異所性、合成障害（ホルモン有機化障害、ヨード濃縮障害、その他の合成障害）の確定診断を得られる。

病型診断で形成異常とホルモン有機化障害、ヨード濃縮障害が否定された症例はその他の合成障害に分類した。

対象者の特徴と病型診断による分類を表 4, 5 に示す。

表 4　対象者の特徴

症例数（名）	168	（男 75 ： 女 93）
現在の年齢（歳）	9.0	(0.2 - 26.2)*
家系例（名）	11	(5 家系)
病型診断例数（名）	76	
在胎週数（週）	39	(25 - 42)*
出生時体重（g）	2,953	(700 - 4,028)*
<2,500 g（名）	22	
<1,500 g（名）	4	
初回 NBS 検査時日齢（日）	5	(4 - 28)*
初回 NBS-TSH（μIU/mL）	15.6	(1.1 - 275.3)*
初回 NBS-FT4（ng/mL）	1.59	(0.11 - 3.32)*
治療開始（日）	22	(7 - 2,301)*
治療開始-TSH（μIU/mL）	27.9	(4.4 - 1,078.7)*
治療開始-FT4（ng/mL）	1.24	(0.1 - 2.12)*
L-T4 開始量（μg/day）	25	(10 - 50)*
L-T4 開始量（μg/kg/day）	6.2	(1.9 - 15.6)*
L-T4 現在量（μg/day）	40	(0 - 150)*
L-T4 現在量（μg/kg/day）	1.6	(0 - 5.2)*

＊ 中央値（範囲）

表 5　対象者の分類

乳幼児が多数存在するため、病型診断未評価例や、一過性の未評価例が多く含まれる。

病型による分類	（名）
合成障害	57
形成異常	33
異所性	19
無形成	7
低形成	5
片葉欠損	2
未評価	78

治療経過による分類	
永続性 or 未評価継続中	128
一過性	40

2. 患者白血球からの DNA 抽出

対象患者から血液を 3-5ml 採取し、Gentra Puregene® (QIAGEN, Valencia, CA) を用いて、プロトコールに従い genomic DNA (gDNA)を抽出した。

3. 次世代シークエンサーを使用したターゲットリシークエンス

SureDesign (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて、先天性甲状腺機能低下症の 24 候補遺伝子(*NKX2-1, NKX2-5, FOXE1, PAX8, HHEX, GLIS3, TSHR, JAG1, TG, TPO, DUOX2, DUOXA2, DUOX1, DUOXA1, SLC5A5, SLC26A4, IYD, SLC16A2, SECISBP2, GNAS, DIO1, DIO2, DIO3, CDCA8*)のコーディング領域とそのエクソン-イントロン境界領域10 bpをターゲットとしたカスタマイズパネルを作成した。

gDNA を制限酵素処理により目的サイズに断片化後、Haloplex カスタムキット (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて、アダプターをライゲーションし、上記領域をハイブリダイゼーションにより濃縮した。磁性ビーズを用いてキャプチャーし、PCR 増幅後、Miseq (Illumina, San Diego, CA, USA)でシークエンシングした。

4. データ解析

SureCall ソフトウェア (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて、アライメントとバリアント検出を行った。得られたバリアントは、以下のデータベースを使用しフィルタリングした。

- アリル頻度{1000 Genomes, Exome Aggregation Consortium (ExAC), The Genome Aggregation Database (gnomAD)}
- バリアントと疾患の関連 {(ClinVar, Human Gene Mutation Database (HGMD))
- *in-silico* 解析{Polymorphism phenotyping v2 (PolyPhen-2), Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT), Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity (M-CAP)}

コールされたバリアントは、ACMG ガイドラインに従い、pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance, likely benign, benign に分類した。以下にその概略を示す。

・Evidence of pathogenicity

(1) PVS (Very strong)
PVS1　機能が完全に喪失となるバリアント(ナンセンス変異、フレームシフト、複数エクソンの欠失など)

(2) PS (Strong)
PS1　既報変異と同じアミノ酸置換をおこすバリアント
PS2　家族歴のない患者において同定された *de novo* のバリアント
PS3　*in vitro* / *in vivo* で機能異常が示されているバリアント
PS4　アリル頻度が正常コントロールより有意に低い(少なくともオッズ比>5.0)

(3) PM (Moderate)
PM1　ホットスポットや重要な機能ドメインに存在するバリアント
PM2　大規模な正常コントロールデータにおいて報告のないバリアント(劣性遺伝疾患の場合は非常に頻度の低いバリアント)
PM3　劣性遺伝で家族解析にてトランスに存在する事が確認されたバリアント
PM4　繰り返し配列以外の部位における in-flame の挿入または欠失、あるいは終止コドンが変化することによりタンパク質長に変化をもたらすバリアント
PM5　新規のアミノ酸置換だが、同部位に既報のアミノ酸置換がある
PM6　*de novo* と考えられるが両親の遺伝子解析は行われていない

(4) PP (Supporting)
PP1　複数の家系内罹患者に、発症者と同じバリアントが同定される
PP2　病的意義がないミスセンス変異が少なく、ミスセンス変異が主な発症原因である遺伝子での新規ミスセンス変異
PP3　複数の *in silico* 解析で pathogenic と判定されるバリアント
PP4　表現型あるいは家族歴の特異性が高く、単一遺伝子疾患である可能性が高い疾患
PP5　信頼性の高いソースが病原的意義のあるバリアントとして報告しているが、単独で十分な根拠はない

・Evidence of benign

(5) BA (stand-alone)

BA1　大規模な正常コントロールデータにてアレル頻度が 5%を超える

(6) BS (strong)

BS1　アレル頻度がその疾患における予想よりも高い

BS2　健常者に存在するバリアント（常染色体優性遺伝のときはヘテロ接合性、常染色体劣性遺伝のときはホモ接合性、X 染色体劣性遺伝のときはヘミ接合性に存在する）

BS3　よく計画された *in vitro* / *in vivo* の研究において機能異常やスプライシング異常を生じない事が確認されたバリアント

BS4　家系内の罹患者に、発症者と同じバリアントが同定されない

(7) BP (supporting)

BP1　短縮型変異により生じる疾患でのミスセンス変異

BP2　浸透率の高い優性遺伝疾患で病的変異とはトランスに存在するバリアント、あるいは全ての遺伝形式において病的変異とシスに存在するバリアント

BP3　機能を持たない繰り返し配列内の in-flame 欠失または挿入

BP4　複数の *in silico* 解析で benign と判定される

BP5　明らかな病因が存在し、それと別に保因しているバリアント

BP6　信頼性の高いソースが良性を示しているが、単独で十分な根拠はない

BP7　アミノ酸が変わらないミスセンス変異であり、スプライシングに影響がなく、保存性も低い

・ 病原性の判定

・pathogenic

1. PVS + PS / PVS + PM×2 / PVS + PM + PP / PVS + PP×2
2. PS×2
3. PS + PM×3 / PS + PM×2 + PP×2 / PS + PM + PP×4

・likely pathogenic

1. PVS + PM
2. PS + PM
3. PS + PP×2
4. PM ×3
5. PM ×2 + PP×2
6. PM + PP×4

・benign

1. BA1
2. BS×2

・likely benign

1. BS + BP
2. BP×2

・uncertain significance

上記の基準に当てはまらない場合

5. 保因するバリアントによる分類

同定されたバリアントを上記の基準で判定し、pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance に分類されたバリアントを抽出した。

バリアントを保有する形式により、以下の 3 つに分類した。

- メンデル遺伝： 常染色体優性遺伝形式をとる責任遺伝子に単一の病的バリアントを同定する、あるいは、常染色体劣性遺伝形式をとる責任遺伝子に複数の病的バリアントを複合型ヘテロ接合性あるいはホモ接合性に認める症例
- Oligogenic： メンデル遺伝形式のバリアントは同定されなかったが、常染色体劣性遺伝形式をとる複数の責任遺伝子それぞれに単一の病的バリアントを組み合わせて保因していた症例
- Monogenic： メンデル遺伝形式のバリアントは同定されなかったが、常染色体劣性遺伝形式をとる一つの責任遺伝子に単一の病的バリアントを保因していた症例

メンデル遺伝、Oligogenic、Monogenic に分け、それぞれのバリアントの同定率を検討した。

5. バリアント保因数と重症度の相関

バリアント保因数と重症度の相関を検討するため、Oligogenic 群と Monogenic 群の臨床像を比較した。

なお、ここでの対象は、形成異常の症例は最重症例が多いため、病型診断を行い合成障害と診断された CH に限定した。

比較項目は、両群間で重症度に関連する項目(初回 NBS-TSH, 初回 NBS-FT4, 初診時 TSH、初診時 FT4、大腿骨遠位端骨核/大腿骨遠位横径比、治療開始時の L-T4 量、病型診断時 TSH, 病型診断時 FT4、現在の L-T4 量)とした。

7. Polymerase chain reaction (PCR)法によるダイレクトシークエンス

pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance に分類されたバリアントは、Sanger 法での確認を行った。その方法は、DNA ポリメラーゼ (AmpliTaq Gold PCR Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, CA))を使用し、Veriti® 96 well サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて、採取した gDNA から PCR を施行した。 PCR に用いるプライマー、サーマルサイクラーの温度条件は過去の報告を元に行った。得られた PCR 産物は 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色の上、目的のサイズのバンドが検出されることを確認後、ExoSAP-IT™ Express (Thermo Fisher Scientific, Baltics, UAB)で精製した。精製した PCR 産物とプライマーを Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用し、96℃ (10 秒)、50℃ (5 秒)、60℃ (4 分) のサイクルを 25 回繰り返す条件で PCR 反応を行った。サンプルは 70%エタノール沈殿で精製し、ホルムアミドに溶解し、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて塩基配列を決定した。

8. 統計解析

統計解析には、JMP Pro 12.2.0. を用いた。2 群間比較は Wilcoxon の順位和検定にて行った。

結果

・ 同定されたバリアント

同定したバリアントを、ACMG ガイドラインに従い 5 つに分類したうち、pathogenic, likely pathogenic, uncertain significance の 3 つに分類されたバリアントを抽出した(likely benign, benign は除外した）。

同定されたバリアントを、メンデル遺伝、Oligogenic, Monogenic（それぞれの定義は前述)に分けて、提示する(表 6-8)。*DUOX2, TSHR, PAX8, TG, TPO, DUOXA2, JAG1, GLIS3, DUOX1, IYD, SLC26A4, SLC5A5, DIO1, DIO3, SECISBP2* の 15 遺伝子にバリアントが同定された。

表 6　メンデル遺伝のバリアント

症例	遺伝子	塩基置換	アミノ酸置換	病原性	接合性	ExAC (East Asia)	gnomAD (East Asia)	HGMD
1	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	Hom	0.0015	0.0012	報告あり
	JAG1	c.2021A>C	p.N674T	US	Het	0	0	報告なし
2	*DUOX2*	c.3442A>G	p.N1148D	US	Hom	0.00093	0.0006	報告なし
	TG	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
3	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	ComHet	0.0015	0.0012	報告あり
	DUOX2	c.3329G>A	p.R1110Q	LP	ComHet	0.0025	0.0025	報告あり
	SLC5A5	c.1679C>T	p.P560L	US	Het	0	0	報告なし
4	*DUOX2*	c.3329G>A	p.R1110Q	LP	ComHet	0.0025	0.0025	報告あり
	DUOX2	c.3540T>A	p.Y1180X	P	ComHet	0.00017	0	報告あり
5	*DUOX2*	c.1946-2insG		LP	ComHet	0	0	報告なし
	DUOX2	c.1946-2T>C		LP	ComHet	0	0	報告なし
	DUOX2	c.215G>A	p.Q71X	LP	ComHet	0	0	報告なし
6	*DUOX2*	c.2654G>A	R885Q	LP	ComHet	0.0015	0.0011	報告あり
	DUOX2	c.3328C>T	p.R1110X	LP	ComHet	0.0003	0.00011	報告なし
	TPO	c.2017C>T	p.R673W	US	Het	0.0032	0.0017	報告なし
7	*DUOX2*	c.3329G>A	p.R1110Q	LP	ComHet	0.0025	0.0025	報告あり
	DUOX2	c.3475_3477delCTG	p.L1160-	LP	ComHet	0.00046	0.00038	報告あり
8	*DUOX2*	c.2380_2381insTC	p.S794Afs*9	P	ComHet	0	0	報告あり
	DUOX2	c.3475_3477delCTG	p.L1160-	LP	ComHet	0.00046	0.00038	報告あり
9	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	ComHet	0.0015	0.0012	報告あり
	DUOX2	c.2654G>A	p.R885Q	LP	ComHet	0.0015	0.0011	報告あり
10	*DUOX2*	c.1883delT	p.K628Rfs*11	P	ComHet	0.00023	0.0003	報告あり
	DUOX2	c.2428G>A	p.E810K	US	ComHet	0.00023	0.00016	報告なし
11	*DUOX2*	c.1946G>T	p.A649E	US	ComHet	0.00036	0.00046	報告あり
	DUOX2	c.4171G>C	p.P1391A	US	ComHet	0.00011	0.00016	報告あり
	TPO	c.2128C>T	p.P710S	US	Het	0.0067	0.006	報告なし
12	*DUOX2*	c.127T>A	p.N43Y	US	ComHet	0.0011	0.00044	報告なし
	DUOX2	c.3239A>G	p.I1080T	US	ComHet	0.00023	0.0002	報告あり
	GLIS3	c.2006A>G	p.H669R	US	Het	0.007	0.0052	報告なし

症例	遺伝子	塩基置換	アミノ酸置換	病原性	接合性	ExAC (East Asia)	gnomAD (East Asia)	HGMD
13	*DUOX2*	IVS24+3insT		US	ComHet	0	0	報告なし
	DUOX2	c.3442A>G	p.N1148D	US	ComHet	0.00093	0.0006	報告なし
	JAG1	c.2021A>C	p.N674T	US	Het	0	0	報告なし
	TG	c.2281C>T	p.P761S	US	Het	0.00012	0.00025	報告あり
14	*TSHR*	c.1349G>A	p.R450H	P	Hom	0.00012	0.0024	報告あり
15	*TSHR*	c.1349G>A	p.R450H	P	Hom	0.00012	0.0024	報告あり
	TG	c.2488C>G	p.Q830K	US	Het	0.00058	0.00045	報告なし
	GLIS3	c.2006A>G	p.H669R	US	Het	0.007	0.0052	報告なし
16	*TSHR*	c.1169G>T	p.C390F	LP	ComHet	0.00012	0.00005	報告あり
	TSHR	c.1349G>A	p.R450H	P	ComHet	0.00012	0.0024	報告あり
	DUOX2	c.3427G>A	p.A1143T	US	Het	0	0	報告なし
	TPO	c.2128C>T	p.P710S	US	Het	0.0067	0.006	報告なし
17	*TSHR*	c.1169G>T	p.C390F	LP	ComHet	0.00012	0.00005	報告あり
	TSHR	c.1349G>A	p.R450H	P	ComHet	0.00012	0.0024	報告あり
	TPO	c.2039C>T	p.S680L	US	Het	0.00012	0.000054	報告なし
	TG	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
18	*TSHR*	c.1349G>A	p.R450H	P	ComHet	0.00012	0.0024	報告あり
	TSHR	c.1714A>T	p.M572L	US	ComHet	0	0	報告なし
	PAX8	c.280G>A	p.D94N	US	Het	0	0	報告なし
	JAG1	c.2021A>C	p.N674T	US	Het	0	0	報告なし
19	*PAX8*	c.535_556dup	p.L186Hfs*22	P	Het	0	0	報告なし
20	*PAX8*	c.268_270delGAG	p.Glu90del	LP	Het	0	0	報告なし
21	*PAX8*	c.172C>T	p.V58I	US	Het	0.00012	0.000051	報告なし
22	*TG*	c.2330C>T	p.P777L	US	ComHet	0.0027	0.0023	報告なし
	TG	c.5791A>G	p.I1931V	US	ComHet	0.0021	0.0025	報告あり
	TG	c.7184A>G	p.H2395R	US	ComHet	0	0	報告あり
23	*TG*	c.1472C>T	p.T491I	US	ComHet	0	0.00027	報告なし
	TG	c.7364G>A	p.R2455H	US	ComHet	0.0092	0.00997	報告なし
	DUOX2	c.2335G>A	p.V779M	US	Het	0.0056	0.0041	報告あり
24	*TPO*	c.747C>A	p.S249R	US	ComHet	0	0	報告なし
	TPO	c.2230G>A	p.E744K	US	ComHet	0	0	報告なし

症例	遺伝子	塩基置換	アミノ酸置換	病原性	接合性	ExAC (East Asia)	gnomAD (East Asia)	HGMD
25	*TPO*	c.1099C>T	p.R367X	P	Het	0	0	報告あり
	TPO	c.2128C>T	p.P710S	US	Het	0.0067	0.006	報告なし

P: pathogenic, LP: likely pathogenic, US: uncertain significance

Hom: homozygous, Het: heterozygous, ComHet: compound heterozygous

表7　Oligogenic のバリアント

症例	遺伝子	塩基置換	アミノ酸置換	病原性	接合性	ExAC (East Asia)	gnomAD (East Asia)	HGMD
26	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	Het	0.0015	0.0012	報告あり
	GLIS3	c.1061C>T	p.A354V	US	Het	0.00012	0.000065	報告なし
	TG	c.3197G>A	p.R1066H	US	Het	0.004	0.0016	報告なし
27	*DUOX2*	c.1883delT	p.K628Rfs*11	P	Het	0.00023	0.0003	報告あり
	DUOXA2	c.111C>A	p.S37R	US	Het	0.000015	0	報告なし
	JAG1	c.2021A>C	p.N674T	US	Het	0	0	報告なし
28	*DUOX2*	c.2635C>T	p.E879K	US	Het	0.00058	0.0009	報告あり
	DUOX1	c.415C>A	p.R139S	US	Het	0.00023	0.00035	報告なし
29	*DUOX2*	c.3179C>T	p.A1060V	LP	Het	0.0022	0.0017	報告あり
	GLIS3	c.2258C>T	p.A753V	US	Het	0.004	0.0041	報告あり
30	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	Het	0.0015	0.0012	報告あり
	TG	c.3197G>A	p.R1066H	US	Het	0.004	0.0016	報告なし
31	*DUOX2*	c.2894C>T	p.S965L	US	Het	0.00047	0.00045	報告あり
	TG	c.5992C>T	R1998X	US	Het	0	0	報告なし
32	*DUOX2*	c.3179C>T	p.A1060V	LP	Het	0.0022	0.0017	報告あり
	TG	c.3197G>A	p.R1066H	US	Het	0.004	0.0016	報告なし
33	*DUOX2*	c.1883delT	p.K628Rfs*11	P	Het	0.00023	0.0003	報告あり
	TSHR	c.1349G>A	p.R450H	P	Het	0.00012	0.0024	報告あり
34	*GLIS3*	c.1123C>G	p.G376A	US	Het	0	0	報告なし
	DUOX1	c.2029G>A	p.V677M	US	Het	0.00058	0.0006	報告なし
35	*GLIS3*	c.2258C>T	p.A753V	US	Het	0.004	0.0041	報告あり
	IYD	c.857T>C	p.M286T	US	Het	0	0.000054	報告なし
36	*TSHR*	c.733G>A	p.G245S	US	Het	0.002	0.012	報告あり
	TG	c.2083C>T	p.P695S	US	Het	0	0	報告なし
37	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	Het	0.0015	0.0012	報告あり
	TG	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
	DIO3	c.808A>G	p.M270V	US	Het	0.001	0.00081	報告なし

症例	遺伝子	塩基置換	アミノ酸置換	病原性	接合性	ExAC (East Asia)	gnomAD (East Asia)	HGMD
38	*DUOX2*	c.2917G>A	p.E973K	US	Het	0.00024	0.00011	報告なし
	TG	c.3086_3087delCA	p.P1029Pfs*2	US	Het	0	0	報告なし
	JAG1	c.2021A>C	p.N674T	US	Het	0	0	報告なし
39	*DUOX2*	c.3179C>T	p.A1060V	LP	Het	0.0022	0.0017	報告あり
	TPO	c.1498G>A	p.E500K	US	Het	0.00071	0.00065	報告なし
	JAG1	c.3521C>T	p.P1174L	US	Het	0.00035	0.0011	報告なし
40	*JAG1*	c.2021A>C	p.N674T	US	Het	0	0	報告なし
	TSHR	c.1349G>A	p.R450H	P	Het	0.00012	0.0024	報告あり
	TG	c.8198A>T	p.K2733M	US	Het	0	0	報告なし
41	*DUOX2*	c.2917G>A	p.E973K	US	Het	0.00024	0.00011	報告なし
	GLIS3	c.2006A>G	p.H669R	US	Het	0.007	0.0052	報告なし
42	*DUOX2*	c.3367C>T	p.A1123T	US	Het	0.000015	0.0008	報告なし
	JAG1	c.3281G>A	p.R1094Q	US	Het	0.0003	0	報告なし
43	*DUOX2*	c.2335G>A	p.V779M	US	Het	0.0056	0.0041	報告あり
	JAG1	c.2021A>C	p.N674T	US	Het	0	0	報告なし
44	*DUOX2*	c.4246T>A	p.F1416I	US	Het	0	0	報告なし
	TG	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
45	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	Het	0.0015	0.0012	報告あり
	TG	c.3197G>A	p.R1066H	US	Het	0.004	0.0016	報告なし
46	*DUOX2*	c.2335G>A	p.V779M	US	Het	0.0056	0.0041	報告あり
	TG	c.2488C>G	p.Q830K	US	Het	0.00058	0.00045	報告なし
47	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	Het	0.0015	0.0012	報告あり
	TSHR	c.929G>A	p.R310H	US	Het	0.0043	0.00025	報告なし
48	*DIO1*	c.530G>A	p.R177H	US	Het	0.0017	0.001	報告なし
	TSHR	c.1012A>C	p.K338Q	US	Het	0.00012	0	報告なし
49	*DIO3*	c.895G>A	p.A299T	US	Het	0.000087	0.000018	報告なし
	TG	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
50	*DIO3*	c.243G>T	p.E81D	US	Het	0.0013	0.0011	報告なし
	TG	c.4366G>A	p.G1456R	US	Het	0.00058	0.0007	報告なし

症例	遺伝子	塩基置換	アミノ酸置換	病原性	接合性	ExAC (East Asia)	gnomAD (East Asia)	HGMD
51	*DUOXA2*	c.413_414insA	p.Y138X	US	Het	0.0028	0.0033	報告あり
	TG	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
52	*GLIS3*	c.2216C>T	p.S739L	US	Het	0.0008	0.00082	報告なし
	DUOX1	c.3312G>A	p.M1104I	US	Het	0.00046	0.0004	報告なし
53	*GLIS3*	c.1454A>T	p.D485V	US	Het	0	0	報告なし
	SLC26A4	c.2168A>G	p.H723R	US	Het	0.0017	0.0016	報告あり
54	*GLIS3*	c.2288G>A	p.R763H	US	Het	0.00046	0.00082	報告なし
	TSHR	c.1349G>A	p.R450H	P	Het	0.00012	0.0024	報告あり
55	*TG*	c.385G>A	p.V129I	US	Het	0.00023	0.00027	報告なし
	TPO	c.1099C>T	p.R367X	P	Het	0	0	報告あり
56	*TSHR*	c.1349G>A	p.R450H	P	Het	0.00012	0.0024	報告あり
	DUOXA2	c.460G>A	p.V154M	US	Het	0	0	報告なし

P: pathogenic, LP: likely pathogenic, US: uncertain significance
Hom: homozygous, Het: heterozygous, ComHet: compound heterozygous

表 8　Monogenic のバリアント

症例	遺伝子	塩基置換	アミノ酸置換	病原性	接合性	ExAC (East Asia)	gnomAD (East Asia)	HGMD
57	*DUOX1*	c.3920G>A	p.R1307Q	US	Het	0.0029	0.003	報告あり
58	*DUOX2*	c.1810G>A	p.A604T	US	Het	0	0	報告なし
59	*DUOX2*	c.3442A>G	p.N1148D	US	Het	0.00093	0.0006	報告なし
60	*DUOX2*	c.4408G>A	p.R1470W	US	Het	0.0019	0.0022	報告あり
61	*DUOX2*	c.2654G>A	p.R885Q	LP	Het	0.0015	0.0011	報告あり
62	*DUOXA2*	c.412_413insA	p.Y138X	P	Het	0.0028	0.0033	報告あり
63	*GLIS3*	c.1819C>T	p.A607T	US	Het	0.00029	0.00024	報告なし
64	*GLIS3*	c.2258C>T	p.A753V	US	Het	0.004	0.0041	報告あり
65	*GLIS3*	c.2006A>G	p.H669R	US	Het	0.007	0.0052	報告なし
66	*GLIS3*	c.1234T>G	p.N412H	US	Het	0.00092	0.00049	報告なし
67	*GLIS3*	c.2288G>A	p.R763H	US	Het	0.00046	0.00082	報告なし
68	*SLC26A4*	c.2168A>G	p.H723R	US	Het	0.0017	0.0016	報告あり
69	*TG*	c.4243A>C	p.K1415Q	US	Het	0.00035	0.00022	報告なし
70	*TG*	c.7372C>T	p.P2458S	US	Het	0.0013	0.00082	報告なし
71	*TG*	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
72	*TG*	c.2488C>G	p.Q830K	US	Het	0.00058	0.00045	報告なし
73	*TG*	c.2488C>G	p.Q830K	US	Het	0.00058	0.00045	報告なし
74	*TG*	c.7664G>A	p.R2555H	US	Het	0.00035	0.00015	報告なし
75	*TG*	c.7753C>T	p.R2585W	US	Het	0.0055	0.0055	報告あり
76	*TG*	c.7666G>A	p.V2556I	US	Het	0.00087	0.0003	報告なし
77	*TSHR*	c.1349G>A	p.R450H	P	Het	0.00012	0.0024	報告あり
78	*TSHR*	c.1349G>A	p.R450H	P	Het	0.00012	0.0024	報告あり
79	*DUOX2*	c.3179C>T	p.A1060V	LP	Het	0.0022	0.0017	報告あり
80	*DUOX2*	c.530G>A	p.G177D	US	Het	0	0	報告なし
81	*DUOX2*	c.1462G>A	p.G488R	LP	Het	0.0015	0.0012	報告あり
82	*DUOX2*	c.2000delA	p.L667Rfs*9	P	Het	0.00081	0.00054	報告あり
83	*DUOX2*	c.2654G>A	p.R885Q	LP	Het	0.0015	0.0011	報告あり
84	*DUOX2*	c.2335G>A	p.V779M	US	Het	0.0056	0.0041	報告あり
85	*DUOXA2*	c.340+2T>C		LP	Het	0	0	報告なし
86	*GLIS3*	c.2006A>G	p.H669R	US	Het	0.007	0.0052	報告なし

症例	遺伝子	塩基置換	アミノ酸置換	病原性	接合性	ExAC (East Asia)	gnomAD (East Asia)	HGMD
87	*GLIS3*	c.2006A>G	p.H669R	US	Het	0.007	0.0052	報告なし
88	*GLIS3*	c.2288G>A	p.R763H	US	Het	0.00046	0.00082	報告なし
89	*GLIS3*	c.2288G>A	p.R763H	US	Het	0.00046	0.00082	報告なし
90	*GLIS3*	c.2288G>A	p.R763H	US	Het	0.00046	0.00082	報告なし
91	*JAG1*	c.3038A>T	p.H1013L	US	Het	0	0	報告なし
92	*JAG1*	c.493C>T	p.R165W	US	Het	0	0	報告なし
93	*JAG1*	c.3398C>T	p.T1133M	US	Het	0.00023	0.00035	報告なし
94	*SECISBP2*	c.1661G>A	p.R554H	US	Het	0.00026	0.0001	報告なし
95	*SLC26A4*	c.697G>C	p.V233L	US	Het	0.00035	0.0014	報告あり
96	*SLC5A5*	c.958G>A	p.A320T	US	Het	0.00012	0.00011	報告なし
97	*SLC5A5*	c.1126C>T	p.R376W	US	Het	0.00011	0.00005	報告なし
98	*TG*	c.5791A>G	p.I1931V	US	Het	0.0021	0.0025	報告あり
99	*TG*	c.941C>G	p.P314R	US	Het	0	0	報告なし
100	*TG*	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
101	*TG*	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
102	*TG*	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
103	*TG*	c.2330C>T	p.P777L	US	Het	0.0027	0.0023	報告なし
104	*TG*	c.2488C>G	p.Q830K	US	Het	0.00058	0.00045	報告なし
105	*TG*	c.7364G>A	p.R2455H	US	Het	0.0092	0.00997	報告なし
106	*TG*	c.7753C>T	p.R2585W	US	Het	0.0055	0.0055	報告あり
107	*TG*	c.7724C>T	p.S2575F	US	Het	0	0.000054	報告なし
108	*TG*	c.7666G>A	p.V2556I	US	Het	0.00087	0.0003	報告なし
109	*TPO*	c.2017C>T	p.R673W	US	Het	0.0032	0.0017	報告なし
110	*TPO*	c.820-2A>G		LP	Het	0	0	報告なし
111	*TSHR*	c.1349G>A	p.R450H	P	Het	0.00012	0.0024	報告あり
112	*TSHR*	c.611C>T	p.A204V	US	Het	0.00023	0.00027	報告あり

P: pathogenic, LP: likely pathogenic, US: uncertain significance

Hom: homozygous, Het: heterozygous, ComHet: compound heterozygous

・ バリアントの同定率

病的バリアントは全体で 168 名中 112 名(66.7%)に同定された。このうち、メンデル遺伝は 14.9% (25 名/168 名)、Oligogenic は 18.5% (31 名/168 名)、Monogenic は 33.3% (56 名/168 名)だった。病型別では、メンデル遺伝、Oligogenic, Monogenic の全てにおいて、合成障害の方が形成異常よりも同定率が高い結果だった。(表 9)。

表 9 バリアントの同定率

	全て	メンデル遺伝	Oligogenic	Monogenic
全体	66.7% (112名/168名)	14.9% (25 名/168 名)	18.5% (31 名/168 名)	33.3% (56 名/168 名)
合成障害	75.4% (43 名/57 名)	15.8% (9 名/57 名)	19.2% (11 名/57 名)	40.4% (23 名/57 名)
形成異常	60.6% (20 名/33 名)	12.1% (4 名/33 名)	9.1% (3 名/33 名)	39.3% (13 名/33 名)
病型診断未施行	62.8% (49 名/78 名)	15.4% (12 名/78 名)	21.8% (17 名/78 名)	25.6% (20 名/78 名)

・ **メンデル遺伝**

メンデル遺伝は 25 名に同定され、内訳は *DUOX2* 異常症を 13 名、*TSHR* 異常症を 4 名，*PAX8* 異常症を 3 名、*TG* 異常症 2 名、*TPO* 異常症 2 名、*TSHR* 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異と、*PAX8* 遺伝子のヘテロ接合性変異を合わせて保因していた症例が 1 名だった。

① *DUOX2* 異常症

13 名を *DUOX2* 異常症と診断した。2 名はホモ接合性、11 名は複合ヘテロ接合性に病的バリアントを同定した。p.N674T, p.N1148D, c.1946-2insG, c.1946-2T>C, p.Q71X, p.R1110X, p.R673W, p.E810K, p.N43Y, IVS24+3insT の新規バリアントを同定した。

臨床像を表 10 に示す。13 名中、病型診断した 7 名は全例合成障害（1 名は有機化障害)、5 名は病型診断未施行例だった。13 名中 5 名は一過性だった。初診時 TSH 値と比較し、病型診断時の TSH 値は全例で低下していた。

13 名中、7 名は *DUOX2* 以外の遺伝子にバリアントをヘテロ接合性に保因していた（症例 1:*JAG1* p.N674T, 症例 2:*TG* p.P777L, 症例 3:*SLC5A5* p.P560L, 症例 6:*TPO* p.R673W, 症例 11:*TPO* p.P710S, 症例 12:*GLIS3* p.H669R, 症例 13:*JAG1* p.PN674T, *TG* p.P761S)。これらの *DUOX2* 以外の遺伝子にバリアントを保因していた 7 名と、保因していなかった 6 名との比較では、データや L-T4 投与量などにおける臨床的に有意な差は認めなかった。

表 10　*DUOX2* 異常症 13 名の臨床像

症例	年齢(歳), 性別	NBS, TSH (mU/L)	初診時 TSH (mU/L)	初診時 FT4 (ng/dL)	初診時 Tg (ng/mL)	L-T4 現在量 (μg/day)	L-T4 現在量 (μg/kg/day)	ヨード摂取率 (%)	パークロレート放出率 (%)	TRH 負荷試験 (TSH, mU/L)		
										前値	頂値	120 分
1	7.3, 男	14.9	51.8	0.81	2190.0	35	1.8	32.62	27.2	3.48	28.56	8.85
2	4.2, 女	14.8	101.8	0.43	3165.0	0		NR	NR	NR	NR	NR
3	9.2, 女	11.7	28.5	0.59	799.0	0		NR	NR	NR	NR	NR
4	20.0, 女	24.2	110.3	0.48	NR	0		20.66	NR	3.90	40.60	12.0
5	3.4, 男	134.6	394.8	0.14	2590.0	35	2.5	NR	NR	NR	NR	NR
6	16.4, 男	15.0	66.0	0.83	NR	75	1.5	43.69	0.0	5.37	36.01	8.76
7	15.4, 男	14.6	50.0	1.0	NR	50	0.7	42.00	4.5	3.51	31.36	8.93
8	7.3, 男	9.5	260.0	0.1	1821.0	0		32.53	0.0	1.98	12.86	2.98
9	2.8, 女	13.7	43.5	0.78	623.4	30	2.2	NR	NR	NR	NR	NR
10	1.6, 男	80.0	332.2	0.1	1339.0	35	3.8	NR	NR	NR	NR	NR
11	9.8, 女	39.9	16.2	1.4	NR	50	0.9	NR	NR	NR	NR	NR
12	7.2, 女	19.4	164.6	0.37	1249.0	0		36.88	10.8	2.87	24.94	7.15
13	16.6, 男	76.0	323.2	0.3	NR	12.5	0.2	71.30	9.4	3.14	28.88	11.0

NR: no records

② *TSHR* 異常症

5 名を *TSHR* 異常症と診断した。2 名(症例 14 と症例 15)は兄弟例で、ホモ接合性、残り 3 名は複合ヘテロ接合性にバリアントを同定した。全例、p.R450H を保因しており、p.M572L の新規バリアントを同定した。1 名は *PAX8* のバリアントを保因していた。

臨床像は、兄弟例の 2 名を含めた 3 名が甲状腺低形成だった（表 11)。

5 名中、4 名は *TSHR* 以外の遺伝子にバリアントをヘテロ接合性に保因していた(症例 15: *TG* p.Q830E, *GLIS3* p.H669R, 症例 16:*DUOX2* p.A1143T, *TPO* p.P710S, 症例 17:*TPO* p.S680L, 症例 18:*PAX8* p.D94N)。これらの *TSHR* 以外の遺伝子にバリアントを保因していなかった症例 15 は、保因していた 4 名（兄である症例 14 を含めて）と比較し、データや L-T4 投与量、経過などの明らかな臨床的な差は認めなかった。

表 11　*TSHR* 異常症 5 名の臨床像

症例	年齢(歳), 性別	NBS, TSH (mU/L)	初診時 TSH (mU/L)	初診時 FT4 (ng/dL)	初診時 Tg (ng/mL)	L-T4 現在量 (μg/day)	L-T4 現在量 (μg/kg/day)	甲状腺エコー
14	7.5, 男	31.9	27.6	2.12	65.4	60	3.3	低形成
15	4.6, 女	30.6	18.4	1.84	103.8	45	3.0	低形成
16	10.7, 女	35.6	11.3	1.44	NR	70	2.2	正常
17	3.0, 女	30	9.9	1.67	NR	40	3.1	正常
18	10.7, 男	11.8	10.5	1.44	NR	50	1.4	低形性

NR: no records

③ *PAX8* 異常症

4名を*PAX8*異常症と診断した。症例19は22塩基重複のフレームシフト変異、症例20は1アミノ酸欠失、症例18と21はミスセンス変異で、いずれも既報にないバリアントだった。

症例18は*TSHR*のバリアントを複合ヘテロ接合性に保因しており、この1名のみ低形成で、残り3名に形成異常は認めなかった（表12)。

表12　*PAX8* 異常症4名の臨床像

症例	年齢(歳), 性別	NBS,TSH (mU/L)	初診時 TSH (mU/L)	初診時 FT4 (ng/dL)	初診時 Tg (ng/mL)	L-T4 現在量 (μg/day)	L-T4 現在量 (μg/kg/day)	甲状腺 エコー
18	10.7, 男	11.8	10.5	1.44	NR	50	1.4	低形性
19	15.7, 男	37.1	120.9	0.68	28.2	50	0.8	正常
20	2.6, 女	16.4	22.6	1.71	145.0	20	1.7	正常
21	7.3, 男	NR	NR	NR	NR	15	0.7	NR

NR: no records

④ *TG*異常症

2名を*TG*異常症と診断した。いずれも複合ヘテロ接合性にバリアントを保因しており、p.P777L, p.V779M, p.R2455Hは新規バリアントであった。

症例22は*TG*遺伝子に3つのバリアントを保因していた。

症例23は*TG*遺伝子の他に、*DUOX2* p.V779Mをヘテロ接合性にバリアントを保因していた。

症例22の血清Tg値は、初診時66.88 ng/mLとやや高めだったが、その後、1歳時 44.8 ng/mL, 2歳時 15.5 ng/mL, 11歳時 11.4 ng/mL, 12歳時 7.98 ng/mLと基準範囲内ではあるが低めで経過していた。甲状腺エコーは正常だった。

症例23は血清Tg値の初診時データはないが、6歳時 7.7 ng/mLで、11歳時 8.3 ng/mL、14歳時 3.6 ng/mLと正常下限で経過していた。甲状腺エコーは未施行である（表13)。

* 血清Tg基準値(ng/mL)
0-2歳: 10.6 - 92.0
3-11歳: 5.6 - 41.9
12-17歳: 2.7 - 21.9

表13　*TG*異常症2名の臨床像

症例	年齢(歳), 性別	NBS,TSH (mU/L)	初診時 TSH (mU/L)	初診時 FT4 (ng/dL)	初診時 Tg (ng/mL)	L-T4 現在量 (μg/day)	L-T4 現在量 (μg/kg/day)	甲状腺エコー
22	10.8, 男	33.8	15.6	1.37	66.88	30	0.9	正常
23	15.1, 男	12.2	12.8	1.09	7.70*	25	0.6	NR

NR: no records

*6歳時

⑤ *TPO* 異常症

2 名を *TPO* 異常症と診断した。いずれも複合ヘテロ接合性にバリアントを保因しており、p.S249R, p.E744K, p.P710S の 3 つは新規バリアントだった。

いずれも病型診断未施行例で、症例 24 は左葉欠損だった（表 14)。

表 14　*TPO* 異常症 2 名の臨床像

症例	年齢(歳), 性別	NBS,TSH (mU/L)	初診時 TSH (mU/L)	初診時 FT4 (ng/dL)	初診時 Tg (ng/mL)	L-T4 現在量 (μg/day)	L-T4 現在量 (μg/kg/day)	99mTc 甲状腺シンチ
24	16.8, 男	28.6	53.0	1.90	NR	125	1.8	左葉欠損
25	5.2, 女	10.5	21.4	0.76	4.31	45	2.6	NR

NR: no records

・ バリアント保因数と重症度の相関

合成障害と診断された CH 症例で、Oligogenic 群 11 名、Monogenic 群 23 名を対象とした。それぞれのバリアントは表 7 の症例 26-36 と、表 8 の症例 57-79 である。

それぞれの臨床像を表 15, 16 に示す。

表 15　Oligogenic の臨床像

症例	年齢(歳), 性別	NBS, TSH (mU/L)	初診時 TSH (mU/L)	初診時 FT4 (ng/dL)	初診時 Tg (ng/mL)	L-T4 現在量 (μg/day)	L-T4 現在量 (μg/kg/day)	L-T4 中止年齢 (歳)	ヨード摂取率 (%)	パークロレート放出率 (%)	TRH 負荷試験 (TSH, mU/L)		
											前値	頂値	120 分値
26	16.9, 女	18.6	216.3	0.61	NR	75	1.6		57.57	3.6	4.60	43.31	9.53
27	15.9, 男	19.6	19.5	1.1	NR	100	1.5		46.51	1.0	4.30	32.87	9.00
28	15.3, 男	14.2	180.9	0.27	NR			10.0	51.01	0.0	2.54	22.15	7.64
29	13.3, 女	32.9	54.4	1.51	NR	75	1.5		31.46	0.0	15.1	54.28	27.26
30	19.2, 男	12.9	27.9	0.63	NR			13.0	24.60	NR	4.66	25.30	8.56
31	8.9, 男	NR	NR	NR	NR	50	2.2		35.35	8.2	5.61	52.26	16.88
32	5.2, 男	17.5	24.0	1.65	NR			5.2	16.50	NR	3.07	12.58	3.57
33	6.2, 男	22.7	61.5	0.93	NR	65	3.3		24.00	4.3	3.04	50.12	12.65
34	13.5, 男	17.5	NR	NR	NR			5.5	32.81	2.5	1.97	14.17	4.26
35	9.8, 男	9.0	51.5	0.96	949,0	30	1.0		31.96	0.0	4.19	27.60	10.27
36	11.1, 男	12.5	15.4	1.12	191.2	50	1.4		49.84	0.0	8.35	76.75	22.68

NR: no records

表 16　Monogenic の臨床像

症例	年齢(歳), 性別	NBS, TSH (mU/L)	初診時 TSH (mU/L)	初診時 FT4 (ng/dL)	初診時 Tg (ng/mL)	L-T4 現在量 (μg/day)	L-T4 現在量 (μg/kg/day)	L-T4 中止年齢 (歳)	ヨード摂取率 (%)	パークロレート放出率 (%)	TRH 負荷試験 (TSH, mU/L)		
											前値	頂値	120 分値
57	11.4, 男	15.7	6.0	1.12	NR	40	0.9		18.67	3.8	4.59	35.90	10.50
58	14.6, 男	14.5	9.2	1.14	NR	50	0.9		28.98	0.0	6.04	54.04	17.46
59	13.0, 女	14.2	24.2	1.28	NR	25	0.8		50.94	0.0	4.55	64.80	13.20
60	13.6, 男	11.2	12.4	1.52	NR			7.1	33.89	0.0	2.69	28.45	7.76
61	8.6, 女	10.6	63.9	0.76	182.0	50	2.0		38.90	10.3	15.66	146.74	28.90
62	12.6, 男	10.9	40.4	1.09	NR			4.5	23.23	NR	2.99	32.78	11.25
63	8.7, 女	14.0	11.2	1.41	518.0			5.9	24.68	12.7	2.62	33.87	7.05
64	18.9, 男	27.2	15.9	1.4	NR	50	0.8		36.60	2.7	7.87	67.93	26.59
65	11.4, 女	11.7	14.3	1.19	NR	50	1.1		37.62	0.0	7.85	82.48	25.32
66	17.2, 女	14.6	NR	NR	NR			16.5	30.13	NR	4.07	25.54	7.63
67	10.1, 女	37.8	42.9	1.17	NR			6.4	20.12	0.0	2.68	16.81	4.15
68	7.4, 男	38.8	16.9	1.37	NR	35	1.7		37.92	0.0	10.66	94.66	25.01
69	18.8, 女	NR	19.5	0.86	NR			16.0	28.67	NR	3.32	43.99	13.19
70	15.8, 男	15.5	9.0	1.24	NR			14.6	43.57	NR	0.17	22.68	8.08
71	9.1, 女	10.0	16.2	1.25	NR	35	1.4		33.75	0.0	3.93	33.20	11.87
72	15.4, 女	68.1	56.3	1.58	NR	75	1.9		34.19	6.1	17.83	106.46	30.64
73	11.4, 男	7.1	10.1	1.27	176.0	60	1.8		20.84	0.7	7.12	42.80	20.40
74	18.1, 男	12.9	25.1	NR	NR			18.0	27.99	0.0	3.12	17.28	5.86
75	7.7, 男	10.8	19.8	1.51	295.0			6.3	46.07	0.0	3.00	28.07	8.27
76	16.8, 男	14.6	18.0	1.40	NR			15.8	35.71	0.0	4.20	20.43	6.80
77	14.8, 男	18.0	10.2	1.06	NR	30	0.6		35.51	3.4	4.42	43.05	11.77
78	13.7, 女	13.9	6.1	1.30	NR	40	0.9		20.60	0.0	4.08	40.68	8.28
79	8.0, 女	33.8	33.5	1.57	178.1	20	0.9		29.25	0.0	6.66	56.23	15.25

NR: no records

Oligogenic 群 11 名と Monogenic 群 23 名で、重症度に関わる検査値、治療量を比較した。Oligogenic 群は、Monogenic 群に比較し、複数の項目で重症の傾向を認めた（表 17)。

特に、Oligogenic 群は初診時 TSH 値が有意に高く(p <0.05)、初診時 FT4 値に有意差はなかったものの低い傾向があった（図 4)。また、現在の L-T4 投与量および体重あたりの投与量は Oligogenic 群で多い傾向があった(図 5)。

表 17　Oligogenic 群と Monogenic 群の比較

	Oligogenic	Monogenic	p
初回 NBS-TSH（μIU/mL)	17.5 (9.0-32.9)	14.5 (7.1-68.1)	0.678
初回 NBS-FT4（ng/mL)	1.74 (1.24-2.85)	1.70 (1.13-3.00)	0.528
初診時 TSH（μIU/mL)	39.7 (14.3-216.3)	16.9 (6.0-63.9)	0.025
初診時 FT4（ng/mL)	1.03 (0.27-1.65)	1.28 (0.76-1.58)	0.056
大腿骨遠位端骨核/大腿骨遠位横径比	0.34 (0.16-0.41)	0.28 (0-0.38)	0.427
治療開始時の L-T4 量（μg/day)	25 (20-35)	20 (10-40)	0.205
治療開始時の L-T4 量（μg/kg/day)	7 (5.7-9.2)	5.6 (2.0-11.9)	0.167
病型診断時 TSH（μIU/mL)	4.5 (2.0-15.1)	4.1 (0.2-17.8)	0.912
病型診断時 FT4（ng/mL)	1.23 (1.07-1.62)	1.31 (0.84-1.67)	0.924
現在の L-T4 量（μg/day)	50 (0-100)	22.5 (0-75)	0.200
現在の L-T4 量（μg/kg/day)	1.26 (0-3.3)	0.65 (0-1.97)	0.252

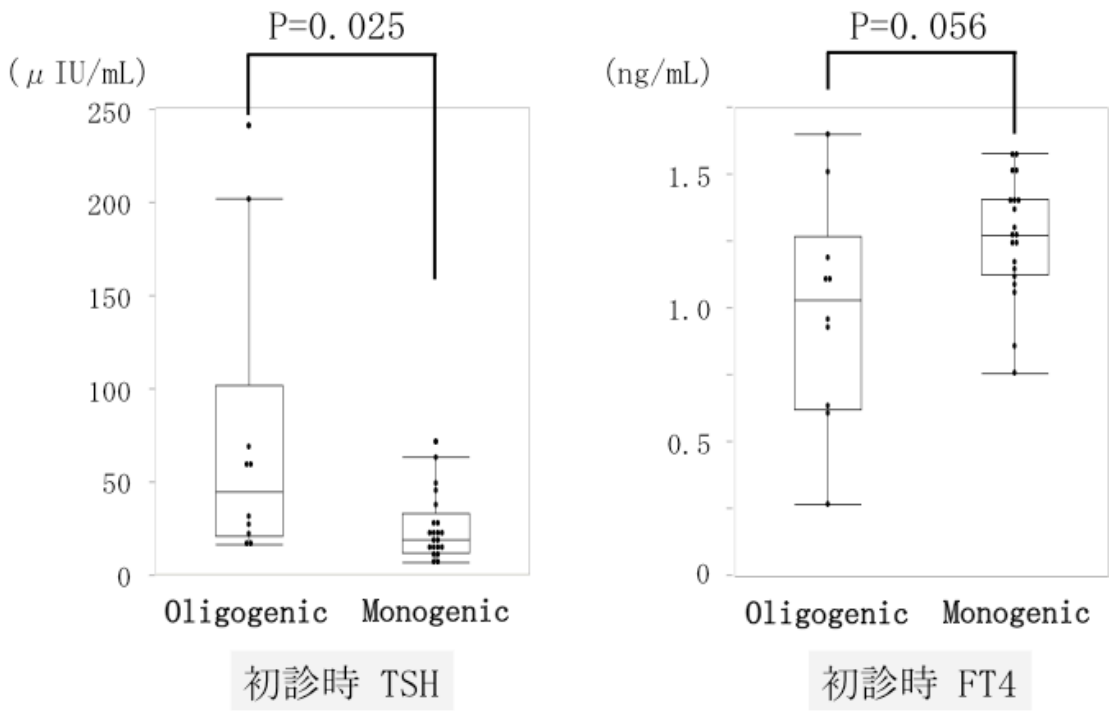


図 4　Oligogenic 群と Monogenic 群の比較（初診時データ）

Oligogenic 群は Monogenic 群に比較し、初診時 TSH 値が有意に高く、FT4 値について有意差はなかったものの低い傾向があった。

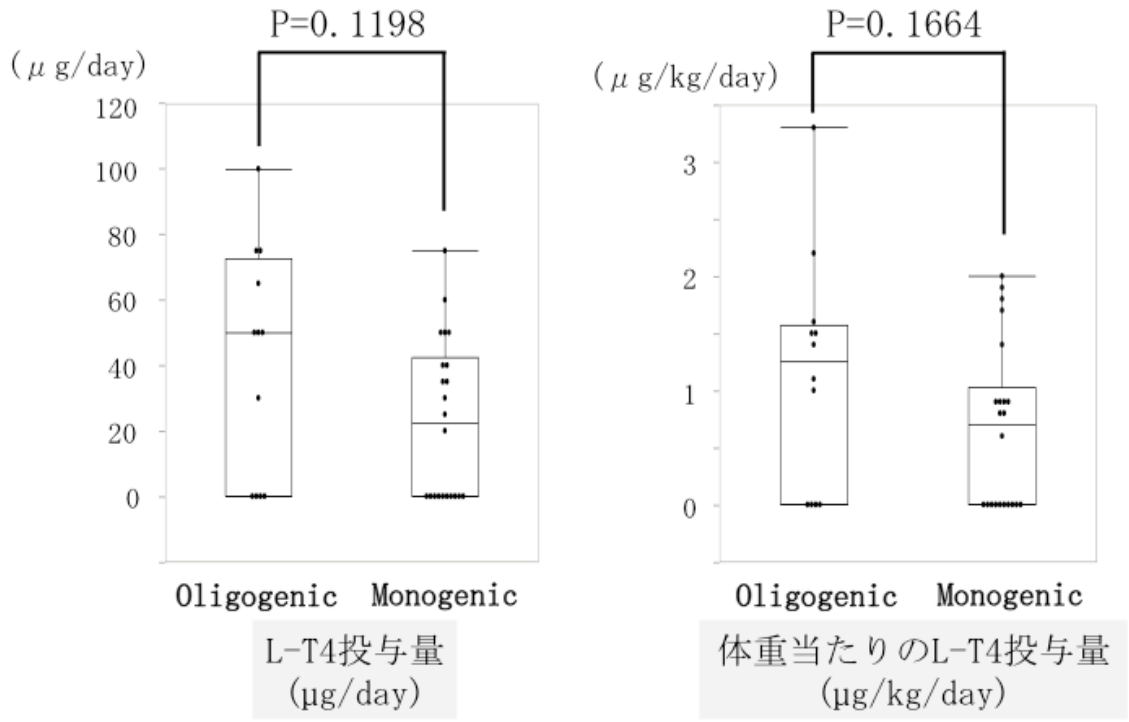
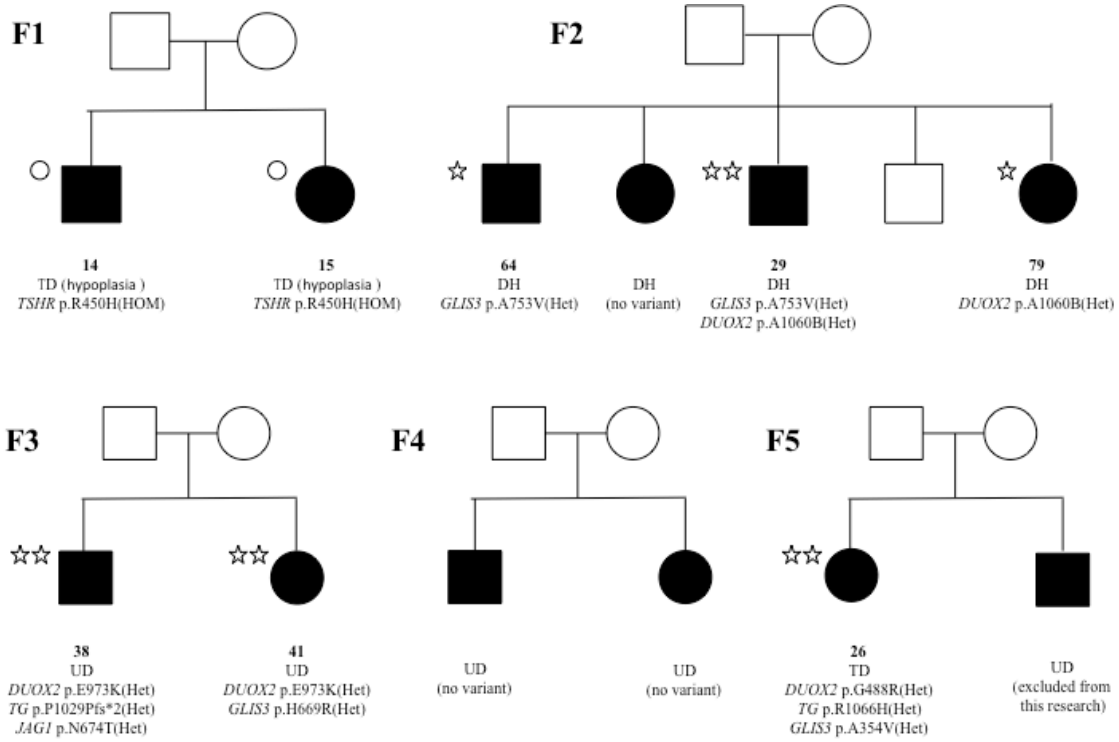


図 5　Oligogenic 群と Monogenic 群の比較（現在の L-T4 投与量）

Oligogenic 群は Monogenic 群に比較し、現在の L-T4 投与量、体重あたりの投与量ともに有意差はないものの多い傾向があった。

・ 兄弟例の検討

今回の解析で、兄弟例を 11 名（5 家系）解析し、8 名(72.7%)にバリアントを同定した（図 6)。そのうち、メンデル遺伝は 1 家系、2 名のみであった。(家系 1:表 5 の症例 14, 15)。Oligogenic は 4 名（家系 2:表 6 の症例 29, 家系 3:表 6 の症例 38, 41, 家系 5: 表 6 の症例 26)、Monogenic は 2 名（家系 2:表 7 の症例 64, 79）に同定した。



○：メンデル遺伝、 ☆☆：Oligogenic、 ☆：Monogenic

TD：形成異常、 DH：合成障害、 UD：病型診断未施行

図 6　兄弟例に同定されたバリアント

家系 2 の第 2 子と、家系 4 の兄妹にはバリアントは同定されなかった。

家系 5 の第 2 子は、新生児マス・スクリーニング陰性の甲状腺機能低下症のため研究対象外であったが、NGS 解析は行い、バリアントは同定されなかった。

考察

本研究は、NBS 陽性 CH 168 名の網羅的遺伝子解析であるが、日本からの CH の網羅的遺伝子解析としてこれまでで最大の報告となる。

・メンデル遺伝の同定率

NGS が普及する前、Sanger 法による CH 候補遺伝子の解析の多くは、メンデル遺伝として報告され、そのバリアント同定率は 10-20%程度とされてきた（Narumi S et al., 2009; Narumi S et al., 2010; Narumi S et al., 2011; Al Taji E et al., 2007)。本研究のメンデル遺伝の診断率 14.9%（25 名/168 名）はほぼ同等の結果であった（表 18)。

しかし、報告数は限られ、候補遺伝子を網羅的に解析した報告はなかった。また、対象の選定、解析遺伝子、人種差などにより、報告毎に同定率は大きく異なっていた。

表 18　NGS 普及前の CH の大規模な遺伝子解析の報告

	Narumi 2009, 2010, 2011 日本	Taji 2007 ドイツ	**本研究** **2019** **日本**
対象数	102 人	170 人	**168 人**
対象基準	NBS 陽性 永続性	甲状腺腫なし 永続性	**NBS 陽性** **L-T4 治療歴** **あり**
解析 遺伝子数	8	5	**24**
解析 遺伝子	*TSHR* *PAX8, NKX2-1, FOXE1, NKX2-1* *DUOX2, TG, TPO*	*PAX8* *NKX2-1* *FOXE1* *NKX2-5* *HHEX*	**(本文参照)**
同定率	15.7% (16/102)	2.8% (3/107)	**14.9%**** **(25/168)**
バリアント が同定され た遺伝子 (症例数) *	*TSHR(3)* *PAX8(1)* *NKX2-1(1)* *DUOX2(4)* *TG(5)* *TPO(2)*	*PAX8*(3)	***DUOX2*(13)** ***TSHR*(4)** ***PAX8*(3)** ***TG*(2)** ***TPO*(2)** ***TSHR+PAX8*** **(1)**

* 常染色体優性遺伝（*PAX8, NKX2-1*)は片アリル性、常染色体劣性遺伝(*TPO, TSHR, DUOX2, TG*)は両アリル性にバリアントを同定している

** メンデル遺伝に限る

・ メンデル遺伝

メンデル遺伝に関して、*DUOX2* 異常症 13 名、*TSHR* 異常症 4 名、*PAX8* 異常症 3 名、*TG* 異常症 2 名、*TPO* 異常症 2 名、*TSHR*+*PAX8* 異常症 1 名を同定した。*DUOX2* 異常症が最多であったが、これは日本人含めたアジアからの既報と同様の傾向である（Narumi S et al., 2009; Narumi S et al., 2010; Narumi S et al., 2011; Long W et al., 2018; Sun F et al., 2018)。

DUOX2 異常症おいて、同定されたバリアントは p.G488R が最多で、新規バリアントを 10 個同定した。臨床像として、TSH 値は初診時よりも病型診断時に低下しており、一過性の症例が多くみられ、*DUOX2* 異常症の特徴とされる経時的に改善する経過に矛盾しない結果だった（Moreno JC et al., 2002; Maruo Y et al., 2008)。

TSHR 異常症おいては、日本人に多いとされる p.R450H を全例で保因していた(Narumi S et al., 2009; Tsunekawa K et al., 2006)。*TSHR* 異常症では形成異常を来す症例が報告されているが（Park SM et al., 2004)、本研究では 5 名中 3 名が低形成だった。

PAX8 異常症は 4 名に同定し、22 塩基重複のフレームシフト変異と、1 アミノ酸欠失の in-flame 変異を 1 名ずつ同定し、2 名にミスセンス変異を同定し、全て新規バリアントだった。*PAX8* は甲状腺発生に関わる転写因子で典型的には形成異常を来すとされるが（Carvalho A et al., 2013)、低形成を認めたのは *TSHR* にも複合ヘテロ接合性変異を保因していた 1 名のみであった。*PAX8* 異常症で形成異常を認めない CH の報告は存在するが、その正確な機序は不明である。

TG 異常症の特徴としては血清 TG 低値や甲状腺腫が挙げられる（Targovnik HM et al., 2011)。本研究で同定した 2 名も血清 TG は低めであった。1 名はエコーで甲状腺腫は認めなかったが、*TG* 異常症として甲状腺癌に注意してフォローする必要がある。

TPO 異常症は 2 名診断したが、2 名とも病型診断未施行であり、特徴とされるシンチグラフィーでの摂取率高値やパークロレイト放出試験陽性を確認できていない（Clerc J et al., 2008)。1 名は左葉欠損であったが、片葉欠損の原因遺伝子としては NKX2-1, *FOXE1, PAX8* の転写因子、*SHH, TBX1* を含む 22q11.21 領域、プロテアソーム関連遺伝子が候補となっているが、バリアントが同定されることは稀である（Szczepanek-Parulska E et al., 2017, Budny B et al., 2017)。検索の限り、*TPO* 異常症による片葉欠損の報告はない。

また、*DUOX2* 異常症 13 名中 7 名、*TSHR* 異常症 5 名中 4 名、*TG* 異常症 2 名中 1 名に、別の疾患責任遺伝子にもヘテロ接合性にバリアントを同定した。*TSHR* 異常症で *PAX8* の病的バリアントを認めた 1 症例以外は、同定されたバリアント

は、常染色体劣性遺伝形式の疾患責任遺伝子のものであった。臨床経過や検査データなどを検討したが、特異的な経過などはみられず、検査データや L-T4 投与量について、*DUOX2* 、*TSHR*、*TG* 単独にバリアントを有する症例と比較検討したが有意差はみられなかった。よって、病的意義はないと考えられる。

・バリアント同定率

近年、CH に対する NGS を用いた候補遺伝子の網羅的解析の報告が増えているが、対象の選定・バリアントのフィルタリング・病原性の判断等により同定率は報告により大きく異なる。

また近年は、メンデル遺伝形式に限らず、病的バリアントが同定された全ての症例を含める、すなわち常染色体劣性遺伝形式の遺伝子を片アリル性に保因する場合も含めて報告されることが多い。その同定率は 33.0-51.5%とされ(Löf C et al., 2016; Nicholas AK et al., 2016; de Filippis T et al., 2017; Long W et al., 2018; Sun F et al., 2018; Makretskaya N et al., 2018)、本研究の同定率 66.7% (112 名/168 名)はほぼ同等であった (表 19)。

本研究の新規性は、日本で最大の報告であることのほかに、対象の選択基準が明確であること、すなわち新生児マス・スクリーニング陽性症例、かつ L-T4 治療歴がある症例に限ったこと、病型診断症例が多いことがある。加えて、病原性の判断において、ACMG ガイドラインに従い分類したことが挙げられる。ACMG ガイドラインが広く使用される以前は、病原性の判断が統一されておらず、報告によって異なっていた。ACMG ガイドラインに従い病原性の判断を行った既報は、Sun ら、Makretskaya らの 2 報のみである。Sun らは、pathogenic, likely pathogenic、uncertain significance だけでなく、likely benign, benign を加えていたが、本研究は Makretskaya らと同様に、pathogenic と likely pathogenic、uncertain significance に限定した。

既報よりもバリアントをより厳しくフィルタリングし病原性の判断を行ったが、バリアントの同定率、メンデル遺伝の同定率ともに既報とほぼ同等の結果が得られた理由としては、NBS 陽性例に限定し、除外基準を明確にするなど対象の選択基準による違いが影響していると考えられる。

表 19 NGS を用いた CH の網羅的遺伝子解析

	Löf 2016 フィンランド	Nicholas 2016 米国	de Filippis 2017 イタリア	Long 2018 中国	Sun 2018 中国	Makretskaya 2018 ロシア	**本研究 2019 日本**
対象(数)	26	49	177	106	110	243	**168**
対象（基準)	NBS 陰性例も含む	NBS 陰性例も含む	NBS 陽性	NBS 陽性	NBS 陽性 永続性	NBS 陽性 重症 CH	**NBS 陽性 L-T4 治療歴あり**
解析遺伝子数	13	8	11	13	21	12	**24**
解析遺伝子	*PAX8* *NKX2-5* *DUOX2* *TG* *TPO* *TRHR* *TSHR* *TRH* *TSHB* *IYD* *SLC5A* *SLC26A4* *DUOX1*	*DUOX2* *DUOXA2* *TG* *TPO* *TSHR* *IYD* *SLC5A5* *SLC26A4*	*PAX8* *NKX2-1* *FOXE1* *DUOX2* *DUOXA2* *TG* *TPO* *TSHR* *SLC26A4* *GLIS3* *JAG1*	*PAX8* *NKX2-1* *FOXE1* *NKX2-5* *DUOX2* *TG* *TPO* *TSHR* *GNAS THRA* *TSHB* *IYD* *SLC5A5*	*PAX8* *NKX2-1* *FOXE1* *NKX2-5* *DUOX2* *DUOXA2* *TG* *TPO* *TSHR* *GNAS* *HHEX* *THRA* *THRB* *IYD* *SLC5A5* *SLC26A4* *SLC16A2* *DIO1* *DIO2* *DUOX1*	*PAX8,* *NKX2-1* *FOXE1* *NKX2-5* *DUOX2* *DUOXA2* *TG* *TPO* *TSHR* *IYD* *SLC26A4* *SLC5A5*	***PAX8*** ***NKX2-1*** ***NKX2-5*** ***FOXE1*** ***DUOX2*** ***DUOXA2*** ***DUOX1*** ***DUOXA1*** ***TG*** ***TPO*** ***TSHR*** ***GNAS*** ***IYD*** ***SLC5A5*** ***SLC26A4*** ***SLC16A2*** ***SECISBP2*** ***HHEX*** ***GLIS3*** ***JAG1***

					DUOXA1		***DIO1***
							DIO2
							DIO3
							CDCA8
病原性の判断	SnpEff MAF<0.01 *in-silico*	MAF<0.02 *in-silico*	MAF<0.01 *in-silico* 疾患データベース	SnpEff *in-silico*	ACMG (P+LP+US+LB+B を抽出*)	ACMG (P+LP+US を抽出*)	**ACMG** (P+LP+US を抽出*)
同定率	27.0% (7/26)	81.6% (40/49)	58.2% (103/177)	65.1% (69/106)	80.9% (89/110)	37.9% (92/243)	**66.7% (112/168)**
バリアントが同定された遺伝子	PAX8	*DUOX2*	*PAX8*	*PAX8*	*PAX8*	*PAX8*	***DUOX2***
	TPO	*DUOXA2*	*NKX2-1*	*NKX2-5*	*NKX2-1*	*NKX2-1*	***TSHR***
	TG	*TG*	*FOXE1*	*DUOX2*	*FOXE1*	*NKX2-5*	***PAX8***
	TSHR	*TPO*	*DUOX2*	*TG*	*DUOX2*	*DUOX2*	***TG***
		TSHR	*DUOXA2*	*TPO*	*DUOXA2*	*TG*	***TPO***
		SLC26A4	*TG*	*TSHR*	*TG*	*TPO*	***DUOXA2***
			TPO	*GNAS*	*TPO*	*TSHR*	***JAG1***
			TSHR		*TSHR*	*IYD*	***GLIS3***
			SLC26A4		*GNAS*	*SLC26A4*	***DUOX1***
			GLIS3		*HHEX*	*SLC5A5*	***IYD***
			JAG1		*THRA*		***SLC26A4***
					IYD		***SLC5A5***
					SLC26A4		***DIO1***
					DUOX1		***DIO3***
					DUOXA1		***SECISBP2***

＊ P:pathogenic, LP:likely pathogenic, US:uncertain significance, LB:likely benign, B:benign

・ Oligogenic の関与

CH は、単一遺伝子疾患として発症する例もあるが、近年では数個の遺伝子の組み合わせで発症する oligogenic model も提唱されている（Sriphrapradang C et al., 2011; de Filippis T et al., 2017; Makretskaya N et al., 2018)。CH 症例はコントロールと比較し、複数の疾患責任遺伝子に複数個の病的バリアントを有意に多く保因することが示されている。本研究においても、31 名の Oligogenic 群が存在し、様々な遺伝子の組み合わせでバリアントが同定された。

さらに Oligogenic 群と Monogenic 群の比較において、Oligogenic 群は Monogenic 群よりも重症である傾向がみられた。*TSHR* 異常症や、*DUOX2* 異常症においては、バリアントを 1 つ保因する群よりも、2 つ保因する群のほうが重症の傾向にあるとする報告があるが（Moreno JC et al., 2002; Abe K et al., 2018)、 Oligogenic と Monogenic の重症度を比較した報告はない。本研究で初めて、Oligogenic におけるバリアント保因数と重症度に相関がある可能性が示唆された。ただし症例数が少なく、今後の検討課題である。

・ Monogenic の疾患原因に関して

Monogenic、すなわち常染色体劣性遺伝形式の疾患責任遺伝子において片アリル性にバリアントを保因することが、疾患原因となるのかという問題がある。

まず、Sanger 法や本研究で行った NGS 解析では、エクソン 1 つ以上の欠失などの、大きな欠失・挿入は検出されない可能性がある。つまり、常染色体劣性遺伝形式の遺伝子に、片アリル性に一塩基置換などが同定された場合、もう片アリルに大きな欠失や挿入を見逃している可能性は否定できない。Makretskaya らは、MLPA で欠失挿入の確認を行っている（Makretskaya N et al., 2018）。NGS で *PAX8* に欠失が疑われた 24 名、*TPO*, *TSHR* ヘテロの 23 名に MLPA を行い、結果は 1 名のみに *PAX8* に 60Kb の欠失を認めた。更に、本研究ではイントロン-エクソンの境界領域 10bp しか検索を行っておらず、近年、全ゲノムシークエンス解析などで注目されている深部イントロンに存在するバリアントによるスプライシング異常(Vaz-Drago R et al., 2017)などを見逃している可能性も否定できない。

また、Abe らは *TSHR* に関して、バリアントのアリル頻度を疫学的に CH 群とコントロール群で比較し、オッズ比で monogenic が CH 発症への影響力があることを示している。

Monogenic で全て説明できないケースは存在するが、疾患原因に関与することは少しずつ証明されつつある。

・ **家族例の検討**

今回の解析における兄弟例 11 名、5 家系の解析では、バリアントの同定率は 72.7% (8 名/11 名)であったが、メンデル遺伝形式のバリアントが同定されたのは 1 家系のみであった。家族例でも候補遺伝子の解析でバリアントが同定されないことがあることは知られているが、特に家系 2 は家族歴が濃厚であり、両親を含めたエクソーム解析等を検討している。

CH の候補遺伝子に *CDCA8* が追加された経緯と同様に、CH の病因解明には、家族例の検討による候補遺伝子の探索は引き続き必要である。

・多因子遺伝と GWAS 解析

多因子遺伝は、環境要因、偶発要因、遺伝子要因の 3 つの組み合わせで発症し、遺伝子要因は、数多くの遺伝子が関与している可能性がある。こうしたいわゆる感受性遺伝子を検索する方法として、網羅的に遺伝子多型（Single Nucleotide Polymorphism: SNP)を解析する、Genome Wide Association Study (GWAS)解析が近年盛んに行われている。CH は遺伝性の観点からはメンデル遺伝と common disease の中間型と考えられる（図 7)。

CH に対する GWAS を行った報告はなく、今後検討すべきと考える。

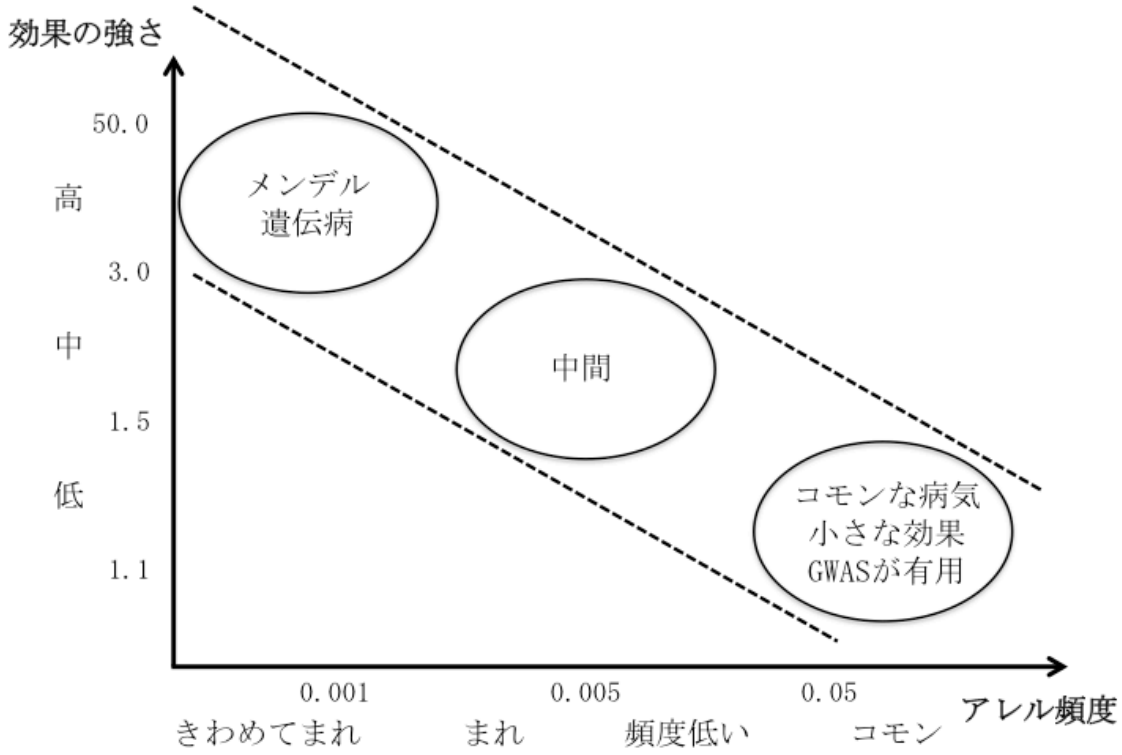


図 7　リスクアレルの頻度と効果の強さ

きわめてまれな SNP で引き起こされる疾患はメンデル遺伝を呈し、比較的頻度の多い SNP で起こる疾患は遺伝性がはっきり証明できない common disease と考えられる。その場合は SNP によって疾患になりやすくなるオッズ比は低い。

(Manolio TA et al., 2009 より引用改変)

総括および結論

・ **本研究で得られた新たな知見**

① 新生児マス・スクリーニング陽性、日本人 CH における候補遺伝子の病的バリアント同定率は 66.7%（112 名/168 名）で、メンデル遺伝は 14.9%（25/168：*DUOX2* 13 名、*TSHR* 4 名，*PAX8* 3 名、*TG* 2 名、*TPO* 2 名、*TSHR+PAX8* 1 名）だった。

② バリアントを複数の疾患責任遺伝子に複数保因する症例は、1 つ保因する症例に比較し、より重症となる可能性が示された。

・ **本研究で得られた知見の意義**

・ **本研究の課題と展望**

① 本研究では近年発見された新規候補遺伝子も解析に加えたが、日本人 CH においても約 33%の症例は候補遺伝子にバリアントが同定されなかった。また、メンデル遺伝様式にバリアントが同定されたのは約 15%程度にすぎなかった。CH の遺伝学的病因の解明には、近年発見された *JAG1, CDCA8* など新規候補遺伝子のように、エクソーム解析や全ゲノムシークエンスを用いた、さらなる候補遺伝子の検索が必要である。

② メンデル遺伝形質、いわゆる単一遺伝子疾患としてのみならず、候補遺伝子の oligogenic model、monogenic として非メンデル遺伝形式、あるいは多因子遺伝として発症する機序が想定される。多因子遺伝における遺伝子要因は、いわゆる感受性遺伝子を網羅的に検索する方法である GWAS 解析があるが、CH に対する GWAS を行った報告はなく、今後検討すべきだと考える。

③ CH における重症度に関しても不明な点が多いが、本研究で初めて Oligogenic の重症度への関与が示された。ただし症例数が少なく、バリ

アント保因数や保因するバリアントの遺伝子の組み合わせなど、今後症例数を増やし検討する必要がある。

謝辞

学位研究を行うにあたり、検体の提供にご協力いただいた患者様、ご家族に深謝いたします。

本研究の機会を与えていただき、ご指導を賜りました北海道大学大学院　生殖・発達医学講座　小児科学分野　真部淳　教授、有賀正　前教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究にあたり様々なご助言と多大なご指導を賜りました、自治医科大学とちぎこども医療センター小児科教授　田島敏広先生に心より暑く御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

引用文献

Nagasaki K, Minamitani K, Anzo M, Adachi M, Ishii T, Onigata K, Kusuda S, Harada S, Horikawa R, Minagawa M, et al. (2015). Guidelines for Mass Screening of Congenital Hypothyroidism (2014 revision). Clin. Pediatr. Endocrinol. *24(3)*,107-133

Gaudino R, Garel C, Czernichow P, Leger J. (2005). Proportion of various types of thyroid disorders among newborns with congenital hypothyroidism and normally located gland: a regional cohort study. Clin. Endocrinol. (Oxf). *62*, 444-448.

Parazzini C, Baldoli C, Scotti G, Triulzi F.(2002). Terminal zones of myelination: MR evaluation of children aged 20-40 months. AJNR Am J Neuroradiol. *23*, 1669-1673.

Kobayashi H, Tashita H, Hara H, Hasegawa Y.(2005). Utility of computed tomography in identifying an ectopic thyroid in infants and pre-school children. Endocr. J. *52*, 189-192.

Jones JH, Attaie M, Maroo S, Neumann D, Perry R, Donaldson MD.(2010). Heterogeneous tissue in the thyroid fossa on ultrasound in infants with proven thyroid ectopia on isotope scan--a diagnostic trap. Pediatr. Radiol. *40*, 725-731.

Panoutsopoulos G, Mengreli C, Ilias I, Batsakis C, Christakopoulou I.(2001). Scintigraphic evaluation of primary congenital hypothyroidism: results of the Greek screening program. Eur. J. Nucl. Med. *28*, 529-533.

Schoen EJ, Clapp W, To TT, Fireman BH.(2004). The key role of newborn thyroid scintigraphy with isotopic iodide (123I) in defining and managing congenital hypothyroidism. Pediatrics. *114*, e683-688.

Clerc J, Monpeyssen H, Chevalier A, Amegassi F, Rodrigue D, Leger FA, Richard B. (2008). Scintigraphic imaging of paediatric thyroid dysfunction. Horm. Res. *70*, 1-13.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, et al.(2015). Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet. Med. *17(5)*, 405-424.

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

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

Narumi S, Muroya K, Asakura Y, Adachi M, Hasegawa T. (2011). Molecular basis of thyroid dyshormonogenesis: genetic screening in population-based Japanese patients. J. Clin. Endocrinol Metab. *96(11),* E1838-1842

Al Taji E, Biebermann H, Limanova Z, Hnikova O, Zikmund J, Dame C, Gruters A, Lebi J, Krude H. (2007). Screening for mutations in transcription factors in a Czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel PAX8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. Eur. J. Endocrinol. *156,* 521-529.

Löf C, Patyra K, Kuulasmaa T, Vangipurapu J, Undeutsch H, Jaeschke H, Pajunen T, Kero A, Krude H, Biebermann H, et al. (2016). Detection of Novel Gene Variants Associated with Congenital Hypothyroidism in a Finnish Patient Cohort. Thyroid. *26(9),* 1215-1224.

de Filippis T, Gelmini G, Paraboschi E, Vigone MC, Di Frenna M, Marelli F, Bonomi M, Cassio A, Larizza D, Moro M, et al. (2017). A frequent oligogenic involvement in congenital hypothyroidism. Hum. Mol. Genet. *26(13),* 2507-2514.

Nicholas AK, Serra EG, Cangul H, Alyaarubi S, Ullah I, Schoenmakers E, Deeb A, Habeb AM, Almaghamsi M, Peters C, et al. (2016). Comprehensive Screening of Eight Known Causative Genes in Congenital Hypothyroidism With Gland-in-Situ. J. Clin. Endocrinol. Metab. *101(12)*, 4521-4531.

Long W, Lu G, Zhou W, Yang Y, Zhang B, Zhou H, Jiang L, Yu B. (2018). Targeted next-generation sequencing of thirteen causative genes in Chinese patients with congenital hypothyroidism. Endocr. J.*29;65(10)*, 1019-1028.

Sun F, Zhang JX, Yang CY, Gao GQ, Zhu WB, Han B, Zhang LL, Wan YY, Ye XP, Ma YR, et al. (2018). The genetic characteristics of congenital hypothyroidism in China by comprehensive screening of 21 candidate genes. Eur. J. Endocrinol. *178(6)*, 623-633.

Makretskaya N, Bezlepkina O, Kolodkina A, Kiyaev A, Vasilyev EV, Petrov V, Kalinenkova S, Malievsky O, Dedov II, Tiulpakov A. (2018). High frequency of mutations in 'dyshormonogenesis genes' in severe congenital hypothyroidism. PLoS. One. *21*, 13(9)

Fugazzola L. Cerutti N. Mannavola D. Vannucchi G. Fallini C. Persani L. Beck-Peccoz P. (2003). Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidese allele causing total iodine organification defect. J. Clin. Endocrinol. Metab. *88(7)*, 3254-71

Kotani T, Umeki K, Yamamoto I, Ohtaki S, Aadachi M, Tachibana K. (2001). Iodide organification defects resulting from cosegregation of mutated and nullthyroid peroxidase alleles.Mol. Cell. Endocrinol. *182(1)*, 61-8

Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, van Trotsenburg AS, Baas F, de Vijlder JJ,Vulsma T, Ris-Stalpers C. (2002). Inactivating mutations in the gene

for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism. N. Engl. J. Med. *347*, 95-102.

Maruo Y, Takahashi H, Soeda I, Nishikura N, Matsui K, Ota Y, Mimura Y, Mori A, Sato H, Takeuchi Y. (2008). Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program. J. Clin. Endocrinol. Metab. *93*, 4261-4267.

Tsunekawa K, Onigata K, Morimura T, Kasahara T, Nishiyama S, Kamoda T, Mori M, Morikawa A, Murakami M. (2006). Identification and functional analysis of novel inactivating thyrotropin receptor mutations in patients with thyrotropin resistance. Thyroid. *16(5),* 471-479.

Park SM, Clifton-Bligh RJ, Betts P, Chatterjee VK. (2004). Congenital hypothyroidism and apparent athyreosis with compound heterozygosity or compensated hypothyroidism with probable hemizygosity for inactivating mutations of the TSH receptor. Clin. Endocrinol. (Oxf). *60(2)*, 220-227.

Carvalho A, Hermanns P, Rodrigues AL, Sousa I, Anselmo J, Bikker H, Cabral R, Pereira-Duarte C, Mota-Vieira L, Pohlenz J. (2013). A new PAX8 mutation causing congenital hypothyroidism in three generations of a family is associated with abnormalities in the urogenital tract. Thyroid. *23(9)*, 1074-1078.

Targovnik HM, Citterio CE, Rivolta CM. (2011). Thyroglobulin gene mutateons in congenitall hypothyroidism. Horm. Res. Paediatr. *75(5),* 311-321.

Clerc J, Monpeyssen H, Chevalier A, Amegassi F, Rodrigue D, Leger FA, Richard B. (2008). Scintigraphic imaging of paediatric thyroid dysfunction. Horm. Res. *70(1)*, 1-13.

Szczepanek-Parulska E, Zybek-Kocik A, Wartofsky L, Ruchala M. (2017). Thyroid Hemiagenesis: Incidence, Clinical Significance, and Genetic Background. J. Clin. Endocrinol. Metab. *102(9)*, 3124-3137.

Budny B, Szczepanek-Parulska E, Zemojtel T, Szaflarski W, Rydzanicz M, Wesoly J, Handschuh L, Wolinski K, Piatek K, Niedziela M, et al. (2017). Mutations in proteasome-related genes are associated with thyroid hemiagenesis. Endocrine. *56(2)*, 279-285.

Sriphrapradang C, Tenenbaum-Rakover Y, Weiss M, Barkoff MS, Admoni O, Kawthar D, Caltabiano G, Pardo L, Dumitrescu AM, Refetoff S. (2011). The Coexistence of a Novel Inactivating Mutant Thyrotropin Receptor Allele with Two Thyroid Peroxidase Mutations: A Genotype-Phenotype Correlation. J. Clin. Endocrinol. Metab. *96(6)*, E1001-1006.

Abe K, Narumi S, Suwanai AS, Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Nagasaki K, Abe T, Hasegawa T. (2018). Association between monoallelic TSHR mutations and congenital hypothyroidism: a statistical approach. Eur. J. Endocrinol. *178(2)*, 137-144.

Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. (2017). Deep intronic mutations and human disease. Hum Genet. 136(9), 1093-1111.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ, McCarthy MI, Ramos EM, Cardon LR, Chakravarti A, et al. (2009). Finding the missing heritability of complex diseases. Nature. *461(7265)*, 747-53.