

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07871

研究課題名(和文) フォスフォジエステラーゼ3A遺伝子は小児期の成長と思春期発来に関与する遺伝子か？

研究課題名(英文) Is the phosphodiesterase 3A gene involved in childhood growth and the onset of puberty?

研究代表者

佐藤 直子 (NAOKO, SATO)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：10383069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：先天性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症(HH)は、二次性徴の遅延・不妊の原因であり、成長ホルモン分泌不全を伴わない低身長症(non-GHD SS)の合併は稀である。PDE3Aは、高血圧-短指症候群(HTNB)のみならず、HHの新たな原因と推測されている。本研究ではPDE3A・PDE関連遺伝子の成長・思春期発来への関与を明確にするため、non-GHD SS、HH、両疾患合併例の遺伝子解析を行った。20例に5つのPDE3Aバリエーションを同定し、3例に蛋白機能変化が予測された。この2例の臨床解析では、低身長・HHを有しており、PDE3Aバリエーションは成長・思春期発来に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HHは、時に思春期の成長促進欠如による低身長症(SS)を合併するが、適切な性ホルモン補充により成人身長は健常人と同等となる。HHではGHDを伴わないSSの合併は稀だが、治療にも関わらず、身長予後不良例が存在する。PDE3A変異はHTNBの病因であり、新たなHHの原因である可能性が報告されている。本研究では、HHと低身長の表現型をもつ2例にPDE3A遺伝子変異解析により、バリエーションを同定した。これにより、PDE3A遺伝子は成長と思春期発達、性腺機能に関与する可能性が示唆され、新たな疾患概念を提案する。また、社会的な意義として、SSの症例においても将来的な性腺機能を注視すべきであると提言する。

研究成果の概要(英文)：Congenital hypogonadotropic hypogonadism (HH) is a cause of delayed puberty and infertility, with the combination with short stature without growth hormone deficiency (non-GHD SS) being rare. PDE3A is speculated to be a new cause of HH, not only in hypertension with brachydactyly syndrome (HTNB). This study aimed to clarify the involvement of PDE3A and PDE-related genes in growth and puberty onset through genetic analysis of non-GHD SS, HH, and combined cases. Five PDE3A variants were identified in 20 cases, with predicted protein function changes in two cases. Clinical analysis of these two cases, presenting short stature and HH, suggests involvement of PDE3A variants in growth and puberty onset.

研究分野：生殖内分泌

キーワード：低身長症 思春期遅発症

## 1. 研究開始当初の背景

先天性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 (HH) において、約 50 種類もの責任遺伝子が同定されているが (研究開始当初は約 25 種類)、これは病因の約半数を説明するに過ぎない (Nat Rev Endocrinol. 2015)。近年、新たにフォスフォジエステラーゼ 3A (PDE3A) を含む HH の新規責任遺伝子群が報告されたが、その疾患成立機序は不明である (Mol Cell Endocrinol. 2016)。さらに、PDE3A バリエントは高血圧-短指症候群 (HTNB) の病因であり、バリエント陽性例に低身長症合併の報告がある (Nat Genet. 2015)。PDE3A は、マウスの軟骨形成期に四肢に発現し、PDE3A 変異は、cAMP 加水分解活性を高め、PTH1H 発現低下させ、短指症をきたすと推測される (J Clin Invest. 2012)。しかしながら、PDE3A の成長への関与を研究した報告は世界的にもない。以上のことから、PDE3A が低身長と HH の両者の発症に関わる遺伝子である可能性が示唆されたが、PDE3A の成長・思春期発来へ関わる機序は明らかにされていない。申請者・分担者は、これまでに本研究の基礎研究として、次のような結果を得ている。

(1) 日本人 KS を含む HH 約 200 例における遺伝子 - 表現型解析 (佐藤): 既知遺伝子バリエント同定 (約 4 割が陽性) と、新規責任遺伝子 *Fezf1* 同定に寄与した (J Comp Neurol. 2009)。更に KS の特徴的な表現型と多様性を明らかにした (J Clin Endocrinol Metab. 2004, 他)。

(2) 小児期 HH の性ホルモン治療と成長への影響 (佐藤): HH の思春期の成長促進欠如による低身長は、適切な性ホルモン補充により改善し、健常人と同等な成人身長が得られることを世界で初めて報告した (Clin Pediatr Endocrinol. 2015)。

(3) 軟骨の分化誘導と増殖抑制に関する機能実験 (瀬尾): *FGFR3* の活性型は軟骨細胞の分化を誘導し、増殖を抑制することを明らかにした (J Biol Chem. 2011, BBRC. 2002)。以上のように、申請者はヒトの性腺機能および成長についての分子遺伝学的解析と臨床解析に対する研究に 20 年以上携わっており、更に分担者は分子のレベルでの骨に対する研究を施行しており、両者の研究分野で研究を協力し合うことにより、低身長及び性腺機能への新たな疾患成立機序が明らかにされる可能性がある。

## 2. 研究の目的

HH は、思春期年齢の成長促進欠如により、思春期が発来する年齢以降に成長率が低下することによる低身長症を合併するが、適切な性ホルモン補充により成人身長は最終的に健常人と同等となり、HH では成長ホルモン分泌不全 (GHD) を伴わない低身長症の合併は稀である (申請者: Clin Pediatr Endocrinol. 2015)。しかしながら、適切な性ホルモン補充療法がおこなわれたにも関わらず、日本人平均身長よりも顕著に身長予後不良な成長ホルモン分泌不全を伴わない (non-GHD) 低身長症を合併する HH の症例が存在することを、申請者は日常診療の中で経験している。

HH の候補責任遺伝子として、2016 年に *PDE3A* 遺伝子が HH の新規の病因となる可能性が報告され (Mol Cell Endocrinol. 2016)、更に *PDE3A* 遺伝子のバリエントは HTNB の病因で、低身長症を伴うことが報告されている (Nat Genet. 2015, J Hum Genet. 2016)。これらの報告をまとめると、*PDE3A* 遺伝子は成長と思春期発来・性腺機能の両者に関与する可能性が見いだされ、新しい疾患概念が提言される可能性が示唆されている。

本研究の目的は、non-GHD SS, HH, 両疾患合併例の分子遺伝学的解析を行い、*PDE3A* 遺伝子が成長・思春期発来に関わるか否か、疾患成立機序を解明することである。

## 3. 研究の方法

研究は以下の体制で行った。

研究代表者: 佐藤直子 研究の遂行 (臨床・変異・機能解析) と総括・臨床検体・データ収集

成育医療研究センター 客員研究員 田中敏章（連携研究者）、東京大学、准教授 北中幸子、（連携研究者）、国際医療福祉大学 教授、門脇弘子（連携研究者） 他 共同研究協力施設：臨床検体、・臨床データ収集  
京都産業大学 教授、瀬尾美鈴（研究分担者）：機能実験の施行

（１）検体の収集：東大小児科および共同研究施設の協力のもとに、non-GHD SS、HH、non-GHD および HH の両疾患を合併する 50 例を集積した。書面で同意が得られた患者の末梢血を採取し、白血球よりゲノム DNA を抽出する。対象とする患者群において、骨形成異常の有無・成長・性腺機能の評価を行い、適切な患者集団から 20 例を抽出した。

（２）遺伝子解析：PDE3A 遺伝子を主な変異解析の対象とする。HH では、複数の遺伝子変異が発症に関与する oligogenicity の可能性もあり、次世代シーケンサーによるエクソーム変異解析を行い、他の HH 既知・候補遺伝子群である約 90 遺伝子の解析を併せて行った。同定されたバリエーションの信頼性が高いと判断された場合、PDE3A の変異解析を、直接シーケンス法で確認した。PDE ファミリー遺伝子に変異が同定され、本研究に関わる可能性がある場合（肢端異骨症の責任遺伝子 PDE4D など）、併せ解析を行った。

（３）in silico 解析：同定されたバリエーションに Polyphen-2、SIFT、LRT、Mutation Tester などの複数の in silico 解析を用いて、同定されたバリエーションの機能変化予測を行った。蛋白機能低下をきたす PDE3A 遺伝子異常と HH・低身長症（骨形成との関連）発症への関わりを検討し、蛋白機能に変化をきたす可能性があるバリエーションについて、機能解析を検討する。

（４）臨床解析：性腺機能および下垂体性機能低下症の評価：Tanner stage の評価、下垂体機能検査、性ホルモン、性腺刺激ホルモン値の測定、精液検査、治療効果の評価、血圧測定を聴取した。低身長の評価：骨年齢、身長、成長率、成長曲線、短指症を含む骨形成異常の評価を行った。

（５）研究の総括：変異陽性者の臨床所見と変異機能解析の結果を比較・総括し、遺伝子変異の低身長・HH 発症（二次性徴の遅延・欠如、不妊）への関与を検討する。

#### 4 . 研究成果

遺伝子解析と臨床解析の結果を以下の表に示す。

遺伝子解析を終了している 20 例中 5 例に PDE3A 遺伝子バリエーションを同定し、いずれもミスセンスバリエーションであった。他の HH の既知遺伝子を有し、oligogenicity を示した。ケース 3 以外は低身長を合併し、特にケース 1, 2 では短指症を合併していた。PDE3A バリエーションのアレル頻度が低く、蛋白機能予測において、機能低下を示したケース 1-3 は低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を示し、機能低下を示さなかった症例は思春期遅発症の表現型を示した。ケース 3 以外は低身長症を合併していた。嗅覚異常の程度は正常から無嗅覚までさまざまであり、ケース 1, 2 は兄弟例で同様なバリエーションを有しているにも関わらず、嗅覚機能に差を認めた。さらに、低身長症の合併の有無が症例により異なることから、バリエーションの機能解析を行う予定である。コロナ渦の時期に、研究室閉鎖・患者の医療機関受診控え・研究者のコロナ罹患による体調不良により、検体・臨床情報の収集および機能解析が計画よりも遅延していたバリエーションに対する機能解析を今後再開し、臨床症状とバリエーションとの関連を解析していく予定である。特に、低身長症の発症機序を変異型 PDE3A による軟骨細胞の分化誘導・増殖抑制の解析で、HH の発症機序を視床下部・下垂体の Pde3a 発現と変異型 PDE3A における神経軸索伸長反応で検討する予定である。機能解析の結果と臨床症状を照らし合わせ、遺伝子変異型・変異機能と表現型との相関を検討し、PDE3A 遺伝子バリエーションによる HH と低身長症を合併する、疾患成立機序について解明していく予定である。

## PDE3A 遺伝子バリエントを有する症例のバリエントと臨床像

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5
Sex	Male	Male	Male	Male	Male
Age	26	13	36	12.5	13
Present Height (cm)	150	137	171	145	139.6
BW (kg)	48		112	36	36.1
Pubic hair	PH2	PH1	PH1	PH1	PH2
Testicular volume	2mL	1mL	3mL	1-2mL	10
LH (mIU/mL)	<0.1	<0.1	<0.1	1.1	0.93
FSH (mIU/mL)	<0.2	<0.2	<0.2	2.97	2.1
Testosterone (ng/mL)	0.22	0.1	0.55	0.2	0.3
PDE3A Variat	PDEA3 missense variant	PDEA3 missense variant	PDEA3 missense variant	PDEA3 missense variant	PDEA3 missense variant
Other gene variant	FGFR1, PROKR2 missense variant	FGFR1, PROKR2 missense variant	PROKR2 missense variant	HS6ST1 missense variants	HS6ST1 missense variants
PDE3A variant allele frequency	Novel mutation	Novel mutation	0.000998403	0.33	0.333666
in silico analysis	polyphen2: damaged	polyphen2: damaged	SIFT, Mutation tester:damaged	polyphen2: tolerance	SIFT, Mutation tester: tolerance
Olfaction	normosmic HH	hyposmic HH	Anosmic HH	hyposmic delayed puberty	normosmic delayed puberty
Phenotype	cryptorchidism, micropenis	cryptorchidism, micropenis	cryptorchidism, micropenis	delayed puberty	delayed puberty
	short stature, brachydactyly	short stature, brachydactyly	obesity, no short stature	short stature	short stature
Treatment	HCG, rFSH	....	HCG, rFSH	Testosterone	Anabolic steroid

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Naoko Sato et al. (5番目)	4. 巻 8
2. 論文標題 Defective jagged-1 signaling affects GnRH development and contributes to congenital hypogonadotropic hypogonadism.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Masahiro Noda, Toshiaki Tanaka, Shun Soneda, Naoko Sato et al.	4. 巻 28 巻
2. 論文標題 The proportion of birth month of the outpatient clinic visits of children with short stature.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本成長科学協会雑誌	6. 最初と最後の頁 43-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka T. Soneda S. and Sato N et al.	4. 巻 94
2. 論文標題 The Boy:Girl Ratio of Children Diagnosed with Growth Hormone Deficiency-Induced Short Stature Is Associated with the Boy:Girl Ratio of Children Visiting Short Stature Clinics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Horm Res Paediatr	6. 最初と最後の頁 211-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000518995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naoko Sato, Akiko Hosokawa, Atsuko Ogasawara, Sachiko Kitanaka, Hiroshi Okada and Toshiaki Tanaka.	4. 巻 9.7
2. 論文標題 rFSH Pretreatment Followed by rFSH-hCG in Three Males with Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism Diagnosed during Childhood due to Extremely Small Testes, Micropenis and/or Bilateral Cryptorchidism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 EC Paediatrics	6. 最初と最後の頁 35-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsushima S, Shimizu A, Kondo M, Asano H, Ueno N, Nakayama H, Sato N, Komeno M, Ogita H, Kurokawa-Seo M	4. 巻 10
2. 論文標題 Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 57040-57043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-57040-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 佐藤直子	4. 巻 Vol.10, No.2
2. 論文標題 小児期の男性性腺機能低下症の治療	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 成長 代謝	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐藤直子	4. 巻 111
2. 論文標題 Kallmann症候群	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本臨牀 別冊 内分泌症候群 (第3版)	6. 最初と最後の頁 10-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 田中敏章, 佐藤直子 他	4. 巻 第24巻第1号
2. 論文標題 Near Adult heightで受診した男子の臨床的特徴と蛋白同課ホルモン治療の効果	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本成長学会雑誌	6. 最初と最後の頁 p28-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤 直子、曾根田 瞬、岸 健太郎、野田 雅裕、門脇 弘子、北中 幸子、小笠原 敦子、田中 敏章
2. 発表標題 部分型ゴナドトロピン分泌障害を示す性腺機能低下症患者の治療経過
3. 学会等名 第95回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 敏章、曾根田 瞬、佐藤 直子、岸 健太郎、野田 雅裕
2. 発表標題 SGA 性低身長症と成長ホルモン分泌不全性低身長症の思春期開始時までのGH 治療効果と予 測成人身長と比較
3. 学会等名 第55回小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 直子、小笠原 敦子、曾根田 瞬、佐藤 詩子、岸 健太郎、野田 雅裕、門脇 弘子、田中 裕之、北中 幸子、田中 敏章
2. 発表標題 FGFR1 遺伝子変異陽性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症における臨床所見の評価第55回小児内分泌学会学術集会
3. 学会等名 第55回小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 直子、小笠原 敦子、曾根田 瞬、佐藤 詩子、岸 健太郎、野田 雅裕、門脇 弘子、田中 裕之、北中 幸子、田中 敏章
2. 発表標題 FGFR1 遺伝子変異陽性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症における臨床所見の評価第55回小児内分泌学会学術集会
3. 学会等名 日本人類学術学会第67回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤直子 門脇弘子 北中幸子 田中敏章
2. 発表標題 部分型ゴナドトロピン分泌障害を示す性腺機能低下症患者の治療経過
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会・第28回日本遺伝子診療学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤直子 北中幸子 門脇弘子 小笠原敦子 曾根田瞬 田中敏章
2. 発表標題 FGFR1変異陽性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の家系解析：生殖能力獲得と変異 伝達リスク
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤直子、小笠原敦子、北中幸子、曾根田瞬、岸健太郎、野田雅裕、門脇弘子、田中敏章
2. 発表標題 FGFR1変異陽性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の家系解析：生殖能力獲得と変異伝達リスク
3. 学会等名 第54回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中敏章、曾根田 瞬、佐藤直子 他
2. 発表標題 成長ホルモン分泌不全性低身長症の男女比は、低身長外来受診の男女比に規定される
3. 学会等名 第54回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 望月貴博、田中敏章、曾根田 瞬、佐藤直子 他
2. 発表標題 低身長小児の背景因子と初診時の臨床因子の検討
3. 学会等名 第54回日本小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤直子、北中幸子、門脇弘子、田中敏章
2. 発表標題 FGFR1変異陽性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の家系解析：生殖能力獲得と変異伝達リスク
3. 学会等名 第65回日本人類遺伝学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤直子、野田雅裕、岸健太郎、曾根田瞬、田中敏章
2. 発表標題 高身長女子2例に対する サンドスタチンLARとカウフマン療法による成長抑制の効果
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤直子
2. 発表標題 先天性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症に対するhCG-rFSH療法の治療効果
3. 学会等名 第64回日本人類遺伝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤直子
2. 発表標題 先天性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症に対するhCG-rFSH療法の治療効果
3. 学会等名 第53小児内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤直子
2. 発表標題 重症な表現型を有する成人先天性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症に対するhCG-rFSH療法の治療効果
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤直子
2. 発表標題 男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症における小児期の治療
3. 学会等名 第28回臨床内分泌update (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 佐藤直子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 11
3. 書名 小児内科53巻増刊号 IV. 内分泌疾患-8	

1. 著者名 佐藤直子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 8
3. 書名 小児科診療 小児遺伝子疾患辞典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	瀬尾 美鈴  (Seo Misuzu)  (60211223)	京都産業大学・生命科学部・教授    (34304)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------