

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591520

研究課題名(和文) 思春期発来に関与する遺伝子の網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive next-generation sequencing analyses of the regulation of onset of puberty

研究代表者

水野 晴夫 (MIZUNO, HARUO)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70363942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：日本人男性・女性の二次性徴発来の平均年齢から3年以上早くあるいは遅く発来した51名の児に対し、二次性徴発来に関連する49遺伝子を網羅的に解析した。思春期早発症児10名では、検索した49遺伝子の中で異常をみつけることができなかった。思春期遅発症の41名の中では、臨床的に低ゴナドトロピン性性腺機能低下症と診断された児が22名で網羅的解析を行い、そのうち1/3程度でKAL1、FGFR1、CHD7、TACR3などの原因遺伝子を同定した。残りの2/3に関しては、既報の遺伝子に異常は認めなかった。ごく軽い早発・遅発の患者の解析までには至らず、体質性低身長診療の際の思春期発来予測にはまでは言及できなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated comprehensive 49 genes analyses for fifty-one patients with precocious and delayed puberty using Ion Torrent next generation sequencing. In ten patients with idiopathic precocious puberty, we could not find any mutations in these genes. Abnormal delay of secondary sexual characteristics or bilateral cryptorchidism and micropenis without olfactory blub was noted in the forty-one patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism, including patients with Kallmann syndrome and CHARGE syndrome. We discovered KAL1, FGFR1, CHD7 and TACR3 mutations during our study. As we could not get the sample of patients with mild precocious and delayed puberty, we could not lead a useful projection of onset of puberty during an observation of short stature children.

研究分野：小児科

キーワード：小児内分泌学 思春期

1. 研究開始当初の背景

(1) 思春期の発来は生物学的に重要なイベントである。男子では精巣容積 4 ml となったとき (平均年齢 11 歳 6 ヶ月)、女子では乳房が Tanner2 度となったとき (平均年齢 9 歳 9 ヶ月) と定義されている。男児では testosterone、女児では estrogen が上昇することにより、それぞれ体に男性化、女性化を引き起こすだけでなく、性ホルモンが GH/IGF-1 系の分泌を増加させることによって身長促進作用をもたらす。ただし、さらに二次性徴が進行し、成長スパートが終わる頃には、骨端線が閉鎖し身長の伸びがとまることになる。エストロゲン受容体異常症、アロマターゼ欠損症の男児では骨端線が閉鎖せず高身長となることから、男児も女児も骨端線を閉鎖させるのはエストロゲンであることは明らかになっており、二次性徴がいつ、何センチで発来して性ホルモンの分泌上昇が始まるかが、成人身長を大きく左右することになる。

(2) 中枢性思春期早発症、体質性思春期遅発症とも、両親や同胞に同様の思春期遅発傾向を認めることが多く、遺伝因子の関与が示唆されていた。すでに、病態が存在する低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の原因となる遺伝子は、Kallmann 症候群の原因遺伝子を中心に複数の遺伝子が同定され (Legouis et al., *Cell*. 67:423-35, 1991, Dodé et al., *Nat Genet*. 33:463-5, 2003, Dodé et al., *PLoS Genet*. 2:1646-52, 2006) 患者での解析も行われている。2003 年に特発性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症で、KISS1R 遺伝子の欠失、機能喪失型変異を認めることが明らかになった (de Roux et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10972-6, 2003, Seminara et al., *N Engl J Med*. 349:1614-27, 2003)。2008 年に、Teles らが特発性中枢性思春期早発症児で GRR54/KISS1R の機能獲得型変異を同定した (Teles et al., *N Engl J Med*. 358:709-15, 2008)。ただし、最近の報告では、特発性中枢性思春期早発症児における KISS1、KISS1R に異常を持つ頻度は極めて低いことが示唆されている (Tommiska et al., *BMC Res Notes*. 4:363, 2011)。また、末梢の性ホルモンが上昇することが病態の中心である LH-RH 非依存性の思春期早発でも LH-RH 依存性の二次性徴に移行していくことから、testosterone や estrogen が上昇する病態の原因遺伝子の変異も軽度の早発の原因になっている可能性がある。さらに、以前より GH/IGF-1 系を制御する遺伝子多型が、性成熟に影響することが報告されていたが (Zhao et al., *Hum Reprod*. 22:1789-94, 2007)、最近、多型と考えられてきた成長ホルモン受容体エクソン 3 の欠失をホモ接合体で持つ男児で、思春期早発傾向を認めることが報告された (Sorensen et al., *J Clin Endocrinol*

Metab. 95:2819-26, 2010)。思春期発来に係している可能性のある遺伝子の報告はあるものの、特発性思春期早発症、Kallmann 症候群などの基礎疾患が存在しない特発性体質性思春期遅発症、さらにこれらの診断基準を満たすことがない臨床的には正常バリエーションとも判断されうる器質的な異常を伴わない 2-3 年程度の早発、遅発については、検索の対象とされていないことも多く、実際にどの遺伝子が、どの程度二次性徴発来に関与しているかは、まだ十分に解明されていない。

2. 研究の目的

(1) 成人身長を大きく左右するに極めて重要な思春期発来の遺伝的要因の関与を明らかにし、低身長児の診察時に役立てることが本研究の目的である。具体的には、思春期早発・遅発の児を現在までに報告されている複数の候補遺伝子を次世代シーケンシング技術を用いて網羅的に解析し、もし特定の遺伝子に異常が見つかった場合、その異常がどの程度二次性徴の発来に関与するかを検討し、思春期発来時期の予想につなげることにある。

(2) 申請者らは、長年にわたり低身長の診療を行っており、日本人平均思春期発来年齢より 2 年前後以上はずれて思春期が発来した児をすでに 100 名程度集積している。思春期の発来が成人身長を大きく左右することから、もし、前思春期に遺伝子解析の結果、思春期が遅れて発来する可能性があがるとなれば、成長ホルモン治療の効果が不確定である軽症成長ホルモン分泌不全性低身長症などに関しては積極的に治療を行わず無治療での経過観察を勧めやすくなる。

3. 研究の方法

特発性思春期早発症、特発性体質性思春期遅発症の定義を満たすほどの早発・遅発ではないが、日本人平均思春期発来年齢 (男児 11 歳 6 ヶ月、女児 9 歳 9 ヶ月) より、2 年以上前後している児を対象として、次世代シーケンサー技術を用いて候補遺伝子の網羅的解析を行う。

原因遺伝子新規変異が同定された場合には、各遺伝子ですでに報告されている方法に準じて、機能解析を行う。

また、変異遺伝子保有者の臨床経過を分析し、その変異がどの程度表現型に影響を与えるかを分析し、二次性徴開始時期の予測につなげていく。

4. 研究成果

日本人男性・女性の二次性徴発来の平均年齢から 3 年以上早くあるいは遅く発来した 51 名の児に対し、二次性徴発来に関連する 49 遺伝子を網羅的に解析した。思春期早発症児 10 名では、検索した 49 遺伝子の中で異常をみつけることができなかった。思春期遅発

症の 41 名の中では、臨床的に低ゴナドトロピン性性腺機能低下症と診断された児が 22 名で網羅的解析を行い、そのうち 1/3 程度で KAL1、FGFR1、CHD7、TACR3 などの原因遺伝子を同定した。残りの 2/3 に関しては、既報の遺伝子に異常をみつけることはできなかった。

また、網羅的遺伝子解析を行った中で FGFR1 遺伝子異常を同定した Kallmann 症候群 17 歳男性に対して、rhFSH75 単位を単独で毎日 2 ヶ月間投与し、血中 FSH を十分に上昇させた後、hCG1000 単位+rhFSH75 単位隔日投与を行った。精巣容積は徐々に増大し、血清テストステロン値は 5.47 ng/mL へ上昇、精巣容積も 10 mL に達した。従来汎用されている方法では精巣の発育さえも得られなかった症例でこのような結果であったことは臨床的に重要と考えている。

ごく軽い早発・遅発の患者からの同意がなかなか難しかったこと、実際、あきらかな病態が存在するであろう児においても既報の遺伝子の解析では、異常がみつからなかったこともあり、研究期間内に、遺伝子の解析結果で、病的とは言い難いいわゆる体質性低身長児の思春期発来を予測して診療に役立てるまでには至らなかった。

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 0 件)

[学会発表](計 8 件)

Mizuno H, Aoyama K, Saitoh S. Successful treatment of male congenital hypogonadotropic hypogonadism with rFSH pretreatment followed by GnRH. the 53th The European Society of Pediatric Endocrinology meeting, September 18-20, 2014 Dublin, (Ireland)

水野晴夫, 田中達之, 青山幸平. McCune-Albright 症候群における内分泌機能長期追跡の重要性. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会. 2014 年 9 月 25 日-27 日, (静岡・浜松)

青山幸平, 水野晴夫, 田中達之, 齋藤伸治. 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 10 例に対する Ion PGM を用いた網羅的遺伝子解析. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会. 2014 年 9 月 25 日-27 日, (静岡・浜松)

田中達之, 青山幸平, 水野晴夫, 林 祐太郎. 混合型性腺異形成男児の臨床的問題点. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会. 2014 年 9 月 25 日-27 日, (静岡・浜松)

Mizuno H, Sugiyama Y, Aoyama K,

Saitoh S. Longitudinal evaluation of patients with autonomous ovarian follicular cysts.

ESPE/PES/APEG/APPE/JESP/SLE PLEPES 9th Joint Meeting Global Care in Pediatric Endocrinology,

September 19-22, 2013 Milan, (Italy)

水野 晴夫, 杉山 由賀里, 林 祐太郎, 水野 健太郎, 齋藤 伸治. CHARGE 症候群の思春期年齢以降での精巣機能の検討. 第 86 回日本内分泌学会学術集会. 2013 年 4 月 25 日-27 日, (宮城・仙台)

水野晴夫, 岩山秀之, 杉山由賀里, 水野健太郎, 林 祐太郎. 両側非触知精巣の診断過程における hCG 負荷試験の重要性. 第 46 回日本小児内分泌学会学術集会. 2012 年 9 月 27 日-29 日, (大阪・大阪)

水野晴夫, 岩山秀之, 石田敦士, 杉山由賀里, 齋藤伸治, 林 祐太郎. ゴナドトロピン単独欠損症男児における精巣機能の検討. 第 85 回日本内分泌学会.

2012 年 4 月 19 日-21 日, (愛知・名古屋)

[図書](計 6 件)

青山幸平, 水野晴夫. 【日常診療における性分化の診かた】46, XY 性分化疾患. 小児内科. 46: 2014, 921-926. 東京医学社.

水野晴夫. 男性成人性腺機能低下症への対処を教えてください. 鈴木敦詞, 和田誠基編. 内分泌診療のファーストタッチ. 2013, pp317-23 文光堂.

水野晴夫. 【ワンランク上の小児の内分泌疾患 Q&A もうこわくない! 苦手意識を克服!】日常診療の質を高めるために"うまく使いこなしたい"ツール 思春期の評価. 小児科学レクチャー 3: 2013, 1172-1177. 総合医学社.

水野晴夫. 【クローズアップ 負荷試験の実際 2013】性腺系機能検査 LH-RH 負荷試験. 小児内科. 45: 2013, 821-823. 東京医学社.

水野晴夫. 【小児疾患の診断治療基準(第 4 版)】(第 2 部)疾患 内分泌疾患 思春期遅発症(解説/特集) 小児内科 44: 2012, 198-199. 東京医学社.

水野晴夫. 【クローズアップ内分泌疾患】<性腺異常> 性成熟不全症の診断と治療(解説/特集) 小児内科 44: 2012, 606-611. 東京医学社.

[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

水野 晴夫 (MIZUNO HARUO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70363942

(2)研究分担者

齋藤 伸治 (SAITOH SHINJI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00281824