

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591188

研究課題名（和文）先天性中枢性性腺機能異常症における標準的遺伝子診断法の開発と疾患成立機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenic mechanism for the hypogonadotropic hypogonadism and the development of the standard mutation analyses system in congenital hypogonadotropic hypogonadism.

研究代表者 佐藤直子（SATO NAOKO）

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・共同研究員

研究者番号：10383069

研究成果の概要（和文）：先天性中枢性性腺機能異常症は、不妊の代表疾患であるが、ゴナドトロピン療法による原因治療法が可能な疾患である。しかしながら、遺伝的異質性の高く、診断に標準的な遺伝子診断法の開発が必須である。本研究では、WAVE 法を用いた標準的遺伝子診断法を確立し、継続可能なシステムを作り、診断効率を高めた。また、新たに同定された変異において機能解析を行い、先天性中枢性性腺機能異常症において、様々なリガンド受容体が発症に関与することを明らかにし、疾患成立機序を解明する一助とした。

今後、変異および臨床解析結果のデータベース化を計り、臨床に直結するデータを患者へ還元していく。また、近年、先天性中枢性性腺機能異常症の病因・病態に oligogenicity の関与が推測されており、次世代シーケンサーとの併用を検討する予定である。

研究成果の概要（英文）：Congenital hypogonadotropic hypogonadism is a well-known representative disorder of infertility and gonadotropin therapy is effective for gain of fertility. The genetic heterogeneity of these disorders alludes to the possibility of diverse pathogenetic mechanisms underlying a complex genetic trait involving multiple genes (oligogenicity). Establishes a standard mutation analyses method by WAVE system improved the diagnostic efficiency. Also performs functional analysis in newly identified mutations revealed a part of the pathogenic mechanism that involved in various ligand-receptor systems of congenital hypogonadotropic hypogonadism.

In the future, we are planning to make database for the results of mutation analyses and clinical data. To elucidated pathophysiology and etiology of hypogonadotropic hypogonadism, next-generation sequencers will be useful for large-scale analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,120,000	4,550,000

研究分野：基盤研究（C）

科研費の分科・細目：小児科、小児内分泌

キーワード：成人不妊症、DHPLC 法、遺伝子診断システム、標準的遺伝子診断法、少子化対策、WAVE システム、遺伝的異質性

1. 研究開始当初の背景

先天性中枢性性腺機能異常症は、性腺刺激ホルモンと卵胞刺激ホルモン分泌低下で定義され、不妊原因の代表疾患であるのみならず、ゴナドトロピン治療という原因療法が可能な疾患であり、様々なパターンで発症する。われわれは、当疾患患者約 150 例の直接シーケンス法による既知・新規遺伝子解析および臨床解析で、約 30% に変異を同定し、変異陽性例に幅広い臨床スペクトラムをみだし、遺伝学的・臨床学的多様性を明らかにした。さらに、ゴナドトロピン治療で、変異陽性例の妊孕性獲得が可能であることを世界で初めて報告している。そこでわれわれは、遺伝的異質性の高い先天性中枢性性腺機能異常症における変異解析の効率化を行い、標準的な遺伝子診断システムを構築することは、先天性中枢性性腺機能異常症の疾患成立機序を解明することにつながると考えた。

2. 研究の目的

本研究目的は、(1) 遺伝的異質性の高い先天性中枢性性腺機能異常症における変異解析の効率化を目指し、熱変性高速液体クロマトグラフィーシステム WAVE 法（以下 DHPLC 法）を用いた変異スクリーニング法を開発し、安価で、包括的・継続的な遺伝子診断システムを構築すること、(2) 変異陽性例の臨床スペクトラムを決定すること、(3) *in vitro* 機能解析で先天性中枢性性腺機能異常症の疾患成立機序を解明すること、(3) 治療効果を分子の観点から評価し、治療法選択の基盤を作ることである。得られる知見は、先天性中枢性性腺機能異常症の診断の効率化と治療効果の向上により、少子化対策に貢献すると期待される。

3. 研究の方法

(1) 検体収集と変異標準診断法の開発

既に診断済みの患者 200 例に加え、先天性中枢性性腺機能異常症の患者の臨床診断を行い、さらに約 100 例の患者検体を収集する。また、先天性中枢性性腺機能異常症の責任遺伝子変異スクリーニング法として、WAVE システムの導入し、WAVE システムの最適化の評価を行い、DHPLC 法の使用条件を確立する。

(2) 予定検体数の解析が終了した時期に、

進行している変異解析を一旦終了させ、変異頻度を明確にする。この解析終了後も継続可能な遺伝子解析システムを完成させるため、PCR 条件、PCR 産物の調整を随時確認し、解析条件の改善を行う。

(3) 既知・新規同定遺伝子変異の機能解析
新規に同定された遺伝子の変異機能解析をルシフェラーゼ法などを用いて、順次進めていく。

(4) 先天性中枢性性腺機能異常症患者における臨床解析を行う。

- 変異陽性例の臨床スペクトラムを決定し、これをデータベース化する。
- 変異陽性・陰性患者間の臨床像の差異、および変異特有な臨床像の有無を検討する。変異陽性者の遺伝子型—表現型解析を行い、症状を修飾する因子を明らかにする
- 変異陽性患者におけるゴナドトロピン治療の効果・反応性を評価し、その結果をデータベース化し、その治療効果と変異遺伝子、変異の種類、変異機能解析の結果を照合し、ゴナドトロピン治療選択の確立化を図る。

(5) 標準的遺伝子診断法の継続可能なシステム作りを目指す。新たに同定された変異の機能解析を行い、先天性中枢性性腺機能異常症の疾患成立機序を明らかにする。さらに変異および臨床解析結果をデータベース化し、臨床に直結するデータを患者へ還元し、不妊治療の選択基準の確立化を目指す。

4. 研究成果

平成22年度では、平成21年度に先天性中枢性性腺機能異常症の責任遺伝子変異スクリーニング法として使用条件を確立した DHPLC法および直接シーケンス解析を用いて、収集した患者検体の変異解析を行い、新たに変異陽性患者を5例(KAL1変異1例、FGFR1変異2例、PROKR2変異2例)を同定した。平成23年度では、標準的遺伝子診断法確立のため、継続可能なシステム作りを目指し、さらに解析条件を改善し、診断効率を高めた。また、先天性中枢性性腺機能異常症の疾患成立機序を明らかにするため、新たに同定された変異において、機能解析を現在行っている。今後は、変異および臨床

解析結果をデータベース化し、臨床に直結するデータを患者へ還元し、不妊治療の選択基準の確立化を目指していく。近年、先天性中枢性性腺機能異常症の病因・病態に oligogenicity の関与が推測されており、次世代シーケンサーとの併用を検討し、複雑な疾患成立機序を明らかにしていく予定である。

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 10 件)

1. Naoko Sato. Genetics of male hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatric Endocrinology Reviews*. 2012 (in press). (査読あり)
2. 佐藤直子 Kallmann 症候群の病因・病態 日本生殖内分泌学会雑誌 研究フロンティア. 第 17 号 (査読あり) 2012 (in press).
3. 佐藤直子. 中枢性性腺機能低下症. ホルモンと臨床 別冊第 58 巻:551-558, 2011.
4. Sato N (他 11 名). Heterozygous OTX2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 756-764, 2010. (査読あり)
5. Sato N (他 4 名). Hypothalamic dysfunction in a female with isolated hypogonadotropic hypogonadism and compound heterozygous TACR3 mutations and clinical manifestation in her heterozygous mother. *Horm Res Peediatr* 773: 477-481, 2010. (査読あり)
6. 佐藤直子, 緒方勤 Prokineticin signaling pathway と Kallmann 症候群. 医のあゆみ 233 (9) (第 5 土曜特集: G 蛋白質共役受容体研究—疾患解明とシグナル制御の新時代), 2010 (総説)
7. 佐藤直子 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の分子遺伝学的メカニズムと治療 *Life-Cycle Care*, Vol. 7. No.1 2010 (総説)
8. Sato N, (他 11 名) Fezf1 is required for penetration of the basal lamina by olfactory axons to promote olfactory development. *J Comp Neurol*. 515: 565-84, 2009. (査読あり)
9. Sato N, (他 11 名) CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome - the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 75: 65-71, 2009. (査読あり)
10. 佐藤直子, 緒方勤 中枢性性腺機能不全: Kallmann 症候群を主として. *ゲノ*

ム医学 9 (2): 67-70, 2009 (総説).

[学会発表] (計 16 件)

1. 佐藤直子, 勝又規行, 緒方勤 Kallmann 症候群の病因・病態に oligogenicity が関与する. 第 45 回日本内分泌学会名古屋, 2012
2. 佐藤直子 男児性腺補充療法. 三重県小児内分泌代謝研究会, 三重, 2011 (招待講演)
3. 佐藤直子, 勝又規行, 緒方勤 Kallmann 症候群の病因・病態に oligogenicity が関与する. 第 45 回小児内分泌学会 東京, 2011
4. 佐藤直子, 堀川玲子, 内木康博, 田中敏章. ゴナドトロピン補充療法に対する中枢性男性性腺機能低下症患者の長期治療経過. 第 45 回小児内分泌学会 東京, 2011
5. 佐藤直子, 勝又規行, 緒方勤 Kallmann 症候群の病因・病態に oligogenicity が関与する. 第 56 回人類遺伝学会 千葉, 2011
6. 佐藤直子, 勝又規行, 緒方勤 Kallmann 症候群の病因・病態に oligogenicity が関与する. 第 16 回日本生殖内分泌学会, 東京, 2011
7. Naoko Sato. Molecular genetics of hypogonadotropic hypogonadism. The Fourteenth Lilly International Symposium. Growth and Sexual Development Part II. Tokyo, 2011. (招待講演)
8. Naoko Sato. Recent progress in hypogonadotropic hypogonadism. The 14th International Congress of Endocrinology. Kyoto, 2010. (招待講演)
9. Naoko Sato. Kallmann syndrome: a one amino-acid insertion mutation of the fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) acid box may affect neuronal extension in an FGF-dependent manner. In: Normal and Abnormal Pubertal Development. The 14th International Congress of Endocrinology. Tokyo, 2010.
10. 佐藤直子, 瀬尾美鈴. Kallmann 症候群患者における FGFR1 acid box 一アミノ酸挿入変異は FGF 依存性に神経線維伸展を障害する. 第 83 回日本内分泌学会. 京都, 2010.
11. 佐藤直子. Kallmann 症候群 115 例における分子遺伝学および臨床学的解析. 第 113 回日本小児科学会. 岩手, 2010.
12. 深見真紀, 佐藤直子. 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症女性における TACR3 変異の同定と臨床像の解析.
13. 佐藤直子, 田中敏章. Kallmann 症候群

兄弟例における成長促進療法と性腺補充療法. 第44回日本小児内分泌学会. 大阪, 2010.

14. 佐藤直子, 瀬尾美鈴, 寺田基剛, 上牧務, 緒方勤. Kallmann 症候群患者における FGFR1 acid box 変異は, 神経繊維伸展を障害する. 第43回日本小児内分泌学会, 2009.
15. 佐藤直子, 瀬尾美鈴, 寺田基剛, 上牧務, 緒方勤. Kallmann 症候群 (KS) FGFR1 acid box 変異は, 神経繊維伸展を障害する. 第54回日本人類遺伝学会, 2009.
16. 佐藤直子, 瀬尾美鈴, 寺田基剛, 上牧務, 緒方勤. Kallmann 症候群患者における FGFR1 acid box 変異は, 神経繊維伸展を障害する. 第43回日本内分泌学会, 2010, March 26. 第83回日本内分泌学会学術総会.
[図書] (計 2件)
 1. 佐藤直子 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 小児内分泌学テキスト 第1版・283-29. 日本小児内分泌学会編 診断と治療社, 2010
 2. 佐藤直子 今日の小児治療指針 第15版 Kallmann 症候群 医学書院 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0◇件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤直子 (SATO NAOKO)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・共同研究員

研究者番号: 10383069

(2) 研究分担者

伊達木澄人 (DATEKI SUMITO)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・共同研究員

研究者番号: 70462801

(留学のため、平成23年度より分担研究者から降りた)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: