

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591536

研究課題名(和文) 男子先天性中枢性性腺機能低下症患者の新しい診断法の開発と治療ガイドラインの作成

研究課題名(英文) Establishment of new diagnostic methods and therapeutic guidelines for congenital male hypogonadotropic hypogonadism.

研究代表者

佐藤 直子 (SATO, NAOKO)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：10383069

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)：先天性男性中枢性性腺機能低下症(CMHH)は約7割が原因不明な不妊の原因疾患で、治療指針は確立されていない。我々は、CMHHの新規診断法の確立と治療指針作成を目指し、臨床情報が得られたCMHH41例にNGSによる変異解析と臨床解析を行った。この結果、10例に変異同定し、FGF-FGFR関連遺伝子変異の一部が神経発達障害を生じる可能性を見いだした。さらに、治療予後不良と予測される症例に、ゴナドトロピン療法(GT)とrFSH先行療法を併用し、精子形成が認められた。この結果は、CMHHにおいてNGSが効率的な診断法であり、GT-rFSH併用療法が妊孕性獲得に有効な新規治療指針になり得ることを示す。

研究成果の概要(英文)：Congenital Male Hypogonadotropic Hypogonadism (CMHH) is a causative disorder of infertility, 70% of the cause of which however is unknown yet. The therapeutic guidelines in consideration of prospective fertilities have not been established. To establish new diagnostic methods and therapeutic guidelines for CMHH, we analyzed mutational genes along with clinical data, applying next-generation sequencer to 41 CMHH patients. As a result, we identified ten mutations, and simultaneously found that one of the FGF-network-associated-gene's variations may cause nerve developmental disabilities and that a preemptive rFSH therapy provided prior to a gonadotropin therapy (GT) improves spermatogenesis and symptom of prognosis after the therapy.

The outcome above suggests that NGS is an efficient method to diagnose CMHH with genetic heterogeneity and that the new protocol giving preemptive rFSH therapy prior to GT is effective to obtain favorable fertility.

研究分野：生殖内分泌

 キーワード：妊孕性獲得 遺伝子解析 ゴナドトロピン療法 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 rFSH先行療法  
治療ガイドライン

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 先天性中枢性性腺機能異常症の分子遺伝学的研究

先天性中枢性性腺機能異常症では、様々な責任遺伝子群が同定されているが、その遺伝子変異は当疾患の約 30%を説明するに過ぎない<sup>1)</sup>。さらに、当疾患は発症・重症度、複雑な表現型に複数の遺伝子異常が関与する「oligogenic disorder」である可能性がみだされている<sup>2)</sup>。しかしながら、oligogenic disorder の疾患成立機序や多様な表現型のメカニズムを明確に示した報告はない。

### (2) 先天性中枢性性腺機能異常症の臨床医学研究

当疾患の治療では、性ホルモン補充療法(二次性徴導入)とゴナドトロピン治療(妊孕性獲得)が用いられているが、小児期の明確な治療基準は定められていない。申請者は、KAL1 変異陽性例の小児期～成人期の治療法を報告し<sup>3)</sup>、さらに、大山らにより<sup>4)</sup> 生理的な思春期進行を考慮した治療法が報告されているが、将来の妊孕性を考慮した小児期から成人への長期的な治療経過を、大規模集団で検討した報告は無い。さらに、遺伝子変異が治療効果に与える影響を縦断的に検討した報告は国内外でも申請者の報告のみである<sup>5)</sup>。われわれは、当疾患患者で以下の解析を行い、世界で報告のない、新しい知見をみだしている。

**変異解析：**当疾患の責任遺伝子群変異解析で、約 20%に変異を同定し、遺伝学的多様性をみだした<sup>6)</sup>。さらに、2 家系例に、複合遺伝子変異を同定し、oligogenicity が関与する可能性をみだした(申請者未発表データ)。

**変異機能解析：**同定した変異の機能解析を行い、無眼球症の責任遺伝子である SOX2 がゴナドトロピン分泌調節遺伝子であり<sup>7)</sup>、GNRH 発現下で、OTX2 と協調作用をすることを示した。

**臨床解析：**Kallmann 症候群において、KAL1 変異例では既報にない嗅覚正常例の存在を世界で初めて報告し<sup>6)</sup>、臨床症状の多様性を明らかにした。

**治療効果の評価と判定：**FGFR1 変異陽性 3 家系例の家系解析で、生殖補助療法は妊孕性獲得に有効であるが、次世代への変異伝達リスクを有することを、世界で初めて分子レベルで実証した<sup>5)</sup>。

**小児期の治療導入：**低身長を示す KAL1 変異陽性例の二次性徴導入に DHT 軟膏を用い、生理的に近い性成熟の進行を促すことに成功した。簡便で、より自然な二次性徴導入に有効な治療法を世界で初めて開発し<sup>3)</sup>、この分野では臨床医学においても先駆的役割を果たしている。

## 2. 研究の目的

先天性中枢性性腺機能低下症は不妊原因の代表疾患であり、ゴナドトロピン療法による原因療法が可能な疾患である。しかしながら、その約 7 割の原因は不明であり、二次性徴を導入する小児期の治療法と妊孕性獲得および男性機能を維持する成人期の治療法は確立されていない。

本研究の目的は男子先天性中枢性性腺機能低下症において、迅速かつ効率的な分子遺伝学的診断法を開発すること、患者の長期治療経過(小児期～成人期)を集積し、小児期～成人期までの適切な治療法を確立すること、遺伝子異常が治療効果に与える影響を明確にし、小児期・成人期における男子先天性中枢性性腺機能低下症の治療ガイドラインを作成することを目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) 先天性中枢性性腺機能低下症の患者の検体収集を行う。
- (2) 先天性中枢性性腺機能異常症患者の遺伝子変異スクリーニング(既知・新規責任遺伝子を含む)を、主に次世代シーケンサーと直接シーケンス法で行う。
- (3) 同定した変異に対する変異機能解析を行う。
- (4) 患者の長期治療経過(小児期～成人期)を集積し、二次性徴導入開始年齢および導入方法、治療中の成長・性成熟度の進行、ゴナドトロピン治療移行時期と方法、精子形成の有無を検討する。既に治療をしている群では、治療経過を計画図に従いまとめる。新規に治療開始する群では、rFSH 単独療法を先行して行い、その後の治療経過を記録し、追跡する。
- (5) 変異陽性者の臨床経過と変異機能解析結果を比較し、変異が治療効果に与える影響を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 変異解析結果

収集した検体の中で、臨床情報を有する約 41 例中 10 例の患者に既知遺伝子を同定した。今回、当疾患の既知遺伝子変異の約 30%を占める FGF-FGFR ネットワーク関連遺伝子群 KAL1、FGFR1、FGF8、HS6ST1 等を A 群とし、非 FGF-FGFR ネットワーク関連遺伝子群：CHD7、PROKR2、PROK2、WDR11、NELF、GnRHR、GnRH1、KISS1R、TACR3、TAC3 等を B 群と分類した。A 群遺伝子変異は 4 例、B 群の変異は 6 例に認められた。

### (2) 変異機能解析結果

同定された A 群遺伝子変異について、変異機能解析を行い、一部の遺伝子変異が神経発達を障害する可能性を見いだし

た。また、B 群遺伝子変異では転写活性の低下および蛋白発現の低下が認められている。また、同定された B 群遺伝子のミスセンス変異において、in silico 解析 (Polyphen-2) による機能変化予測を行い、機能低下変異であると予測され、現在機能解析を検討している。

### (3) 臨床解析結果

ゴナドトロピン療法が行われた CMHH において、治療開始時年齢、治療開始時身長、成人身長到達時年齢、成人身長、治療経過を追跡し、妊孕性獲得の有無、結婚の有無についても、検討を行っている。最終身長：性腺補充療法を行い、成人身長にほぼ到達した経過観察中の症例では、治療開始年齢が通常の思春期開始年齢と同時期に開始された症例においても、最終身長がほぼ正常化していた。また、遺伝子変異の種類は最終成人身長に影響しないことが認められた。

妊孕性獲得：ゴナドトロピン療法により精子形成が認められた症例が存在する一方で、蛋白機能喪失が推測される変異陽性例では、ゴナドトロピン療法への反応が不良で、精子形成が認められない症例も存在した。これにより遺伝子異常が妊孕性獲得に影響する可能性が示された。精子形成能を改善する治療法の提案と使用例：われわれは、将来の妊孕性獲得を目指し、精巣容量が 2mL 未満で、精子形成能の不良と予測される症例に対し、rFSH 先行療法を通常のゴナドトロピン治療前に用いる新しい治療法を導入した。その結果、精子形成が認められ、rFSH 先行療法と通常のゴナドトロピン療法の併用が妊孕性獲得能を改善する有効な治療法である可能性が示唆された。

以上の研究から、われわれは、遺伝的異質性の高い CMHH に対する診断法として、次世代シーケンサーによる変異解析法を確立し、将来の妊孕性を考慮した、小児期における CMHH の新しい治療指針を論文報告し、CMHH の将来の QOL 改善する治療法を見いだした。

### <引用文献>

- (1) Martin et al. Endocrine reviews 32: 225-246, 2011
- (2) Sykiotis et al. PNAS 107:15140-4, 2010
- (3) 田中敏章ら、日本生殖内分泌学会雑誌 11: 11-16, 2006
- (4) 大山建司ら、日本小児科学会雑誌、112:1667-1673, 2008
- (5) Sato N et al. Hum Reprod 20: 2173-8, 2005
- (6) Sato N et al. J Clin Endocrinol Metab 89: 1079-88, 2004
- (7) Sato N et al. Eur J Endocrinol 156: 167-171, 2007

### 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 8 件)

1. Sato N (1 番目)(他 10 名) Treatment situation of male hypogonadotropic hypogonadism in pediatrics and proposal of testosterone and gonadotropins replacement therapy protocols. Clin Pediatr Endocrinol 24(2) 2015, 37-49. (査読あり)
2. 佐藤直子、北中幸子、田中敏章 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 成人と小児で成因・診断・治療・予後は同じか ホルモンと臨床社 2015 2 月, 375-385.
3. Sato N (10 番目)(他 16 名) Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. Fertil Steril. 102(4) 2014, 1130-1136. (査読あり)
4. 佐藤直子 Kallmann 症候群 神経疾患 IV 日本臨床社, 2014, 577-587.
5. 佐藤直子 FGF 受容体異常症 ホルモンと臨床 医学の世界社 7 月号 60 (7) 2014, 19-32.
6. Sato N (3 番目)(他 8 名) Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormonedeficiency. Endocrine J 60: 2013, 1013-20. (査読あり)
7. Sato N Genetics of male hypogonadotropic hypogonadism. Pediatric Endocrinology Reviews. 1, 2012, 110-25. (査読あり)
8. 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 2012, 43-48 (査読あり)

[学会発表](計 14 件)

1. 佐藤直子 先天性男性中枢性性腺機能低下症:rFSH 先行療法の試み 第 25 回臨床内分泌 update 学会学術集会 東京都千代田区 2015 年 11 月 27 日
2. 佐藤直子 rFSH 先行療法の治療経験：先天性男性中枢性性腺機能低下症の妊孕性獲得に対する新しい治療法の試み 第 49 回日本小児内分泌学会学術集会 東京都江戸川区 2015 年 10 月 8 日
3. 佐藤直子 低身長思春期発来 of GHD 小児における GH と GnRH アナログ併用療法の成人身長に対する治療効果 第 118 回小児科学会学術集会 大阪府 大阪市 2015 年 4 月 18 日
4. 佐藤直子 小児期早期に診断された男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の治療指針の提案 日本人類遺伝学会第 59 回大会 東京都 江戸川区 2014 年 11 月 19 日 ~ 22 日
5. 佐藤直子 小児期早期に診断された男性

低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の  
治療指針の提案 第48回日本小児内分泌  
学会学術集会 静岡県 浜松 2014年 9月  
25日~27日

6. 佐藤直子 自然に性腺機能低下症が回復  
した複合型下垂体機能低下症の2例 第  
48回日本小児内分泌学会学術集会 静岡  
県 浜松 2014年 9月 25日~27日
7. 佐藤直子 ゴナドトロピン補充療法に対  
する先天性中枢性男性性腺機能低下症  
患者の長期治療成績と治療効果 第87回  
日本内分泌学会総会 福岡県 福岡 2014  
年 4月 24日~26日
8. 佐藤直子 次世代遺伝子解析技術を用い  
た性成熟異常症 60例の病因解析「低ゴ  
ナドトロピン性性腺機能低下症を中心  
に」第87回日本内分泌学会総会 福岡県  
福岡 2014年 4月 24日~26日
9. 佐藤直子 ゴナドトロピン補充療法に対  
する先天性中枢性男性性腺機能低下症  
患者の長期治療成績と治療効果 第18回  
日本生殖内分泌学会学術集会 東京都  
千代田区 2013年 12月 7日
10. 佐藤直子 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86回日本内分泌学会  
総会 2013年 04月 25日~27日 宮城県  
仙台
11. Sato N Hypogonadotropic hypogonadism  
and the gene for fibroblast growth factor  
receptor 1-- successful pregnancy through  
gonadotropin therapy and intracytoplasmic  
sperm injection-- 9th Joint Meeting of  
Pediatric Endocrinology September  
19-22, 2013 イタリア ミラノ
12. 佐藤直子 第47回日本小児内分泌学会  
学術集会 男性低ゴナドトロピン性性  
腺機能低下症の成人身長と精液検査に  
関するアンケート調査 東京都 台東  
区 2013年 10月 10日~12日
13. 佐藤直子 次世代遺伝子解析技術を用い  
た性成熟異常症 60例の病因解析 日本  
人類遺伝学会第58回大会 宮城県 仙台  
2013年 11月 22~23日
14. 佐藤直子 Kallmann 症候群の病因・病態  
に oligogenicity が関与する。第85回日  
本内分泌学会 愛知県 名古屋 2012年 4  
月 19日~21日

〔図書〕(計 1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2版  
日本小児内分泌学会編 診断と治療社,  
(印刷中)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐藤 直子 (SATO, Naoko)  
東京大学医学部附属病院 登録研究員

研究者番号：10383069

### (2)研究分担者

瀬尾 美鈴 (SEO, Misuzu)  
京都産業大学 総合生命科学部 教授  
研究者番号：60211223

北中 幸子 (KITANAKA, Sachiko)  
東京大学医学部附属病院 准教授  
研究者番号：30431638

### (3)研究協力者

田中敏章 (TANAKA, Toshiaki)  
たなか成長クリニック