

4-2-3 小児思春期発育研究部（成長障害研究室、小児代謝病態研究室）

1. 概要

当研究部の目標は、胎児期から生殖年齢期までの内分泌疾患（特に性分化異常・生殖機能障害、成長障害）および先天奇形症候群を主たる対象として、単一遺伝子疾患、インプリンティング疾患、および、多因子疾患の観点から分子遺伝学的解析および機能解析を行い、その成果を医療や社会に還元することである。単一遺伝子疾患およびインプリンティング疾患の観点では、新規原因遺伝子の発見、疾患成立機序の解明、遺伝子型-表現型解析による臨床像や予後の解明および現行治療効果の判定、迅速かつ正確な診断法の確立、新規原因療法の開発を目指す。多因子疾患の観点では、疾患感受性遺伝子多型、環境反応性遺伝子多型、薬剤応答性遺伝子多型の同定と、それに基づく疾患発症機序の解明、社会環境の評価（内分泌攪乱物質など）、対症療法の適正化と重篤な副作用の回避を目指す。さらに、ヒト（患者）の解析から得られた情報に基づいて、正確な疾患成立機序の解明や新規治療法の実現する上で有用な情報を提供するマウスの解析も実施する。

さらに、上記内容に関連して、以下の3課題を当研究部の中核課題として進めている。第一は、遺伝子医療システムの整備である。このために、効率的遺伝子解析法の確立を進めると共に、全国の臨床医（臨床遺伝医、小児内分泌医、小児泌尿器科医）と遺伝子診断施設従事者（研究者、倫理専門家、カウンセラー）から構成される医療連携体制をインターネット上に構築し、さらに、継続可能な経済基盤確立のためにNPO法人オーファンネットジャパンとの提携を開始している。第二は、生殖補助医療出生児における遺伝的安全性の検討と長期フォローアップ体制の確立である。近年生殖補助医療がインプリンティング疾患の発症率を高めることが危惧されており、種々の手技で出生した小児の検討により、安全な生殖補助医療手技の確立に貢献することを目指す。第三は、内分泌攪乱化学物質のゲノム疫学研究である。化学物質の暴露量と個体感受性の解析を進め、脆弱な個体を保護しうる化学物質暴露量を明らかとし、社会に提言したい。

以上、当研究部の研究内容は、まさに成育医療が担うべき胎児期から生殖年齢におよぶライフサイクルを対象とするものであり、直接的にヒト（患者）を主たる対象とすることから、成育疾患を対象とする臨床研究・展開研究に大きく貢献するものである。ここに、当研究部の存在意義がある。

2. 研究活動

2-1. [単一遺伝子疾患]

2-1-1. 新規性分化異常症責任遺伝子 CXorf6 の発見と機能解析

X染色体長腕遠位部の微小欠失患者の遺伝子型-表現型解析に基づいて、CXorf6 が性分化異常症責任遺伝子候補であることを見だし、男児外陰部異常症 117 例（性腺異形成患

者 19 例、尿道下裂患者 56 例、停留精巣患者 40 例、原因不明の性分化異常症患者 2 例) において変異解析を行なった。その結果、3 家系 4 例の尿道下裂患者においてナンセンス変異を同定した。さらにマウス相同遺伝子が、雄では胎児期の性分化臨界期においてに精巣セルトリ細胞とライディッヒ細胞で一過性に発現し生後では発現しないこと、雌では胎児期から妊孕性獲得年齢までは卵巣でほとんど発現していないが成獣期の卵胞顆粒膜細胞で強く発現していることを見いだした。したがって、尿道下裂は、胎児期の性分化臨界期における一過性男性ホルモン産生低下に起因すると判明した。また、男性患者では、早期治療により妊孕性確保の可能性があること、女性では、成人の卵巣機能不全に関与すると推測される。この成果は、Nature Genetics (38:1369- 1371, 2006) に掲載され、また、日経新聞朝刊など多くのメディアに取り上げられた。

当該年度の研究成果：

以下の大きな進展が見られた。第 1 に、機能解析により、CXorf6 が Notch シグナル伝達に関与する Mastermind like 2 との相同性を有すること、非古典的 Notch 標的遺伝子である Hes3 の転写活性化因子として作用することを見いだした。また、siRNA 実験により、CXorf6 がテストステロン産生に関与すること、および、CXorf6 の発現が、性分化遺伝子発現のマスター遺伝子である SF1/AD4BP により制御されていることを見いだした (J Biol Chem, in press)。この成果に基づき、HUGO Gene Nomenclature Committee と協議し、この遺伝子を MALD1 (mastermind-like domain containing gene 1) と命名することとなった。

第 2 に、卵巣機能不全患者約 60 例の解析により、ミスセンス変異および 1 アミノ酸挿入変異を見いだした。これは、CXorf6 が、卵巣機能に関与することを示唆するデータであり、機能解析を実施中である。第 3 に、ノックアウトマウス作製を行なっている時点で、既に雄のキメラマウスが精子形成障害を有することが見いだされた。これは、胎児期の異常が妊孕性に悪影響を及ぼすことを示唆するデータであり、現在、この所見に基づいて精子形成障害患者において変異解析を開始している。

2-1-2. SHOX 遺伝子診断法の開発と SHOX 遺伝子導入マウスを用いた新規治療法の開発

これまでの研究成果：

擬常染色体領域の成長遺伝子 SHOX を発見し (Nature Genetics 1997)、その後、SHOX 半量不全が、性腺エストロゲンの骨成熟作用および拡張リンパ管の骨圧迫作用のもとで、低身長のみならずターナー骨格徴候全般を招くこと、また、性腺抑制療法が疾患修飾因子に対する治療法となることを多数の論文で報告してきた。さらに、SHOX 過剰と性腺機能不全の組み合わせが高身長を招くことを多数の論文で報告し、SHOX 遺伝子導入が全ての成長障害患者の治療法になりうることをみいだした。さらに、SHOX 発現調節領域を SHOX 遺伝子から 3' 方向へ約 150 kb 離れた 39 kb 領域に局限し、異種動物間ホモロジーサーチとルシフェラーゼを用いた機能解析により、SHOX 発現調節領域を約 800 bp 領域に局限した (Am J

Hum Genet 78: 167- 170, 2006)。

当該年度の研究成果：

SHOX 半量不全は、その大多数が微小欠失により発症する。そして、MLPA (multiple ligation probe amplification)が、コード領域や発現調節領域の他に、従来の方法では同定しえなかった遺伝子内微小欠失まで、多岐にわたる微小欠失を一度に検出できる方法であることを見だし、これにより高速変異スクリーニングを可能とした。さらに遺伝子内微小欠失患者 3 例において切断点を同定し、微小欠失が、従来から想定されていた Alu repeat のような繰り返し配列を介する非相同組み換えのみならず、繰り返し配列を介さない non-homologous end-joining によっても発症することを明確とした (Human Genetics 投稿中)。これは、われわれが提唱する性腺抑制療法を思春期早期の適切な時期に実施する上で、有効な診断方法となる。

2-1-3. POR (P450 oxidoreductase)欠損症における遺伝子型-表現型解析

これまでの研究成果：

男女共通の外陰部異常症、副腎機能不全、骨系統疾患などを特徴とする POR 遺伝子異常症という新規単一遺伝子疾患を多数の患者で同定し、この疾患がペルオキシゾーム内の P450 酵素群に關与する電子伝達系異常により引き起こされることを明確にした。また、詳細な遺伝子型-表現型解析を行い、妊娠中のコレステロール摂取が骨形成障害を緩和すること、マスキングにおいて検出された患者においても本疾患が存在すること、少量のステロイド補充が臨床的に有用であることを複数の論文 (J Clin Endocrinol Metab 90:414, 2005 など)に報告してきた。さらに、外陰部異常症 (時に女兒外陰部の男性化) 発症には、胎児期・乳児期特異的男性ホルモン産生経路が決定的な役割を果たしていることを患者の尿ステロイドプロフィール解析により世界で初めて見いだした (Pediatr Res 59: 276- 280, 2006; J Clin Endocrinol Metab 91: 2643- 2649, 2006)。そして、この胎児期・乳児期特異的男性ホルモン産生経路は、生後数カ月で消退する胎児副腎の CYP17A1 酵素活性により惹起されていることを提唱した。

当該年度の研究成果：

計 30 例の患者において詳細な遺伝子型-表現型解析を行ない、以下のことを世界で初めて明確にした。(1) 常染色体劣性疾患であるにもかかわらずヘテロ変異しか見いだされなかった患者において、一見正常のアリルは、転写されていない。(2) 患者は、2 つのアリル共に残存活性陽性のグループ 1 と 1 つのアリルのみ残存活性陽性のグループ 2 に大別される (両アリル共に残存活性がない時には出生しえない)。(3) 骨系統疾患の重症度は、コレステロール代謝が一方向性であることに一致して、残存活性に依存する。(4) 副腎病変の重症度は、ステロイド代謝の複雑性を反映して、残存活性にほとんど依存しない。(5) 性分化異常症の重症度は、残存活性にほとんど依存せず、性腺における性ステロイド産生障害、胎児期・乳児期特異的男性ホルモン産生、胎盤における男性ホルモン蓄積、POR の

基質親和性など、多数の因子に影響される。(6) POR 異常症患者が、しばしば、腎、会陰、直腸形成を呈し、これは POR 依存性酵素である CYP26A1, CYP26B1 活性低下によるビタミン A 代謝産物である ATRA の蓄積による。この成果は、現在執筆中である (PLoS Genetics 投稿予定)。さらに、胎児期・乳児期特異的男性ホルモン産生経路については、未熟児や新生児の解析から、正常状態でも作動していることが確認されつつあり、さらに、21 水酸化酵素欠損症女児の男性化も、主にこの経路を介するジヒドロテストステロンによることが判明しつつある。

2-1-4. ゴナドトロピン分泌不全患者における包括的変異解析

これまでの研究成果：

低ゴナドトロピン性性腺機能不全と嗅覚障害を伴う Kallmann 症候群 45 例において、X 染色体劣性型の KAL1 遺伝子変異が約 30%、常染色体優性型の KAL2 (FGFR1) 遺伝子変異が約 10%を占めることを見だし、また、KAL1 遺伝子変異が腎構造異常を高率に合併すること、KAL2 遺伝子変異が骨の異常をしばしば伴うことを明らかとした (J Clin Endocrinol Metab 2004;89: 1079- 1088; Hum Reprod 2005;20: 2173- 2178)。また、KAL2 遺伝子の体細胞変異 (J Clin Endocrinol Metab 2006;91:1415- 1418) や CHARGE 症候群患者が Kallmann 症候群表現型を有することを見出し、変異解析により CHARGE 症候群責任遺伝子 CHD7 のナンセンス変異を同定した (Endocr J 53: 4791- 493, 2006)。

当該年度の研究成果：

本年度では、82 例のゴナドトロピン分泌障害を有する患者において、既知および候補遺伝子解析を網羅的に進めている。現在までの成果は以下の通りである。(1) 眼球無形成と低ゴナドトロピン性性腺機能障害を有する患者において、SOX2 遺伝子変異を同定し、ルシフェラーゼ機能解析により、この変異が機能喪失型であることを確認した (Eur J Endocrinol 2007;156:167 - 171)。(2) KAL2 (FGFR1) 遺伝子に存在する 6 個のアスパラギン酸が 7 つに進展する変異を同定し、機能解析を行なっている。(3) KAL1 遺伝子および KAL2 (FGFR1) 遺伝子変異陰性例において PROK2 および PROKR2 変異解析を行ない、2 例において変異を同定した。(3) 同対象において FEZ2 変異解析を行なっている。PROK2 および PROKR2 変異は、現在執筆中である。

2-1-5. 汎下垂体機能不全患者における包括的遺伝子変異解析

これまでの研究成果：

主に成長ホルモン分泌不全を対象として遺伝子解析を行ない、常染色体劣性のみならず、常染色体優性の遺伝子変異を同定した。さらに、低身長罹患同胞対 52 組中 3 組においてヘテロの成長ホルモン遺伝子変異を同定し、一見劣性遺伝形式を示す疾患において、ヘテロの保因者が低い浸透率で病的表現型を有することを明らかとした。また、血清成長ホルモン測定に用いられる免疫活性を喪失している新規ミスセンス変異を同定し、生理的には成長ホルモン欠損ではなくとも、生化学的には完全な成長ホルモン欠損症と診断される症

例が存在することを見いだした。

当該年度の研究成果：

対象を汎下垂体機能不全を有する患者約 100 例とし、既知および候補遺伝子の網羅的解析を開始した。現在までの成果は以下の通りである。(1)下垂体機能不全陽性および陰性の無眼球患者において、世界で初めて OTX2 変異を同定し、機能解析を進めている。(2) LHX4 変異を 2 例で認め、機能解析を進めている。(3) PROP1 変異を同胞例で見いだした。

2-1-6. Noonan 症候群および類縁疾患患者の遺伝子解析

これまでの研究成果：

ヌーナン症候群患者 60 例以上の解析から、PTPN11 遺伝子変異が約 40%を占めること、変異陽性例と陰性例の症状が異なること、変異陽性患者の若年性白血病が通常自然寛解することを見だし、治療法選択や予後判定における遺伝子診断の重要性を多数の論文として報告した。また、Noonan 症候群類縁疾患である LEOPARD 症候群においても変異を同定した。これらの成果は、J Clin Endocrinol Metab 89:3359, 2004 など、複数の雑誌に掲載された。

当該年度の研究成果：

下記の進展が見られた。(1) 全ての既知および候補遺伝子を同時に変異解析できる遺伝子診断チップを作製した。(2) 肝芽腫合併 Noonan 症候群患者において、世界で初めて PTPN11 遺伝子変異を見出した (Pediatr Blood cancer, in press)。これにより、Noonan 症候群が血液腫瘍のみならず固形腫瘍の発症リスクとなることを見出した。(3) メラノーマ合併 LEOPARD 症候群患者において、初めて PTPN11 遺伝子変異を同定した (Br J Dermatol 2007;157:1297-9)。これは、上記同様、PTPN11 変異の易腫瘍発症性を示唆する。(4) PTPN11 遺伝子変異陰性 Noonan 症候群において KRAS 変異解析をおこなった (Clin Pediatr Endocrinol 2007;16:99-101)。

2-2. インプリンティング異常症

2-2-1. 第 14 染色体父親性および母親性ダイソミーの表現型を招く遺伝的機序の解明

これまでの研究成果：

特徴的な症状を伴う疾患単位である父親性ダイソミー14 患者 3 例を同定し、部分ダイソミー症例から、責任領域を 14q23.3 より遠位部にマップし、また、乳児期以降の自然予後が良好であることを明らかとした (Am J Med Genet 138A:127, 2004)。

当該年度の研究成果：

ダイソミーを有さないが、父親性ダイソミー14 の表現型を有する患者 8 例と母親性ダイソミー14 の表現型を有する患者 3 例において詳細な欠失解析、メチル化解析、発現解析を行い、家族性の 4 例において約 108 kb の微小欠失、別の家族性症例において約 411 kb の微小欠失、孤発性の 1 例において約 475 kb の微小欠失、孤発性の 1 例において約 6.5 Mb の欠失、3 例においてエピ変異を見いだした。そして、遺伝子型-表現型解析により、以

下のことを世界で初めて報告した。(1) ヒト染色体 14q32.2 に存在するインプリンティング遺伝子群が intergenic differentially methylated region (IG-DMR) により調節されている (すなわち、母親由来の染色体に生じた IG-DMR を含む欠失あるいは IG-DMR の過剰メチル化はインプリンティング領域の発現パターンを全て父親由来にそれに交換し、父親由来の染色体に生じた IG-DMR を含む欠失は発現パターンを変化させず、父親由来の染色体に生じた IG-DMR に生じた低メチル化はインプリンティング領域の発現パターンを全て母親由来にそれに交換させる)。(2) 父親性ダイソミー (upd(14)pat) の表現型が主に父親性発現遺伝子 RTL1 の過剰発現に起因する。(3) 母親性ダイソミー (upd(14)mat) の表現型が主に父親性発現遺伝子 RTL1 と DLK1 の発現消失により生じる。(4) 母親性発現遺伝子 RTL1 antisense が RTL1 の発現抑制因子として作用する。(5) 胎盤におけるインプリンティング制御が個体と異なる。これらは、siRNA としての RTL1 antisense による upd(14)pat の治療法開発の可能性、RTL1 と DLK1 が新規成長遺伝子である可能性を示唆するものである。これは、インプリンティング疾患の研究に大きく貢献する世界初のデータであり、Nature Genetics に受理され(in press)、メディアにも大きくアピールされた。

2-2-2. Silver-Russell 症候群の発症機序の解明とエピ遺伝子型一表現型解析

これまでの研究成果：

第 7 染色体母親性ダイソミー解析および H19-DMR のエピ変異解析を開始した。

当該年度の研究成果：

Silver-Russell 症候群患者 63 例中、3 例において第 7 染色体母親性ダイソミーを同定し、全ての患者が胎盤低形成を有することを見いだした (Am J Med Genet, in press)。さらに、H19-DMR のエピ変異を 20 例で同定し、COBRA による簡便な診断法を開発するとともに、H19-DMR のエピ変異陽性群と陰性群の比較から、以下の世界初となる所見を見いだした。(1) 左右非対称などの身体所見は変異陽性群において有意に高頻度に認められる。(2) 生下時身長・体重は変異陽性群において有意に小さく、頭囲は変異陽性群において有意に大きい。これらの差異は生後認められなくなる (また、正常身長を示す例外的症例も存在する)。(4) 成長障害の原因とみなされる血清 IFG2 値は、出生後では正常範囲である (これは、妊娠後期から血清 IGF2 の産生源である肝臓において、IFG2 発現がインプリンティングされないプロモーターに依存するためと考えられる)。(5) 胎盤サイズは全例で小さいが、変異陽性群において有意に小さい。(6) 変異陽性群では出生体重と胎盤サイズが密接に相関する。(7) 胎盤における IGF2 発現量は、変異陽性群において明らかに低い。(8) IGF2 は、短版において正常者と患者共に父親性発現を示し (血液では発現していない)、H19 は正常者では胎盤と末梢血共に母親性発現を示すが、患者では胎盤では母親性発現を末梢血では両親性発現を示す。(9) H19-DMR は、末梢血と胎盤データ共にメチル化可変領域として振る舞う (したがって、胎盤におけるインプリンティング制御機構は、末梢血のそれと異なる)。このデータは、今後の患者解析において重要な基礎データとなるもので

あり、現在執筆中である (Hum Mol Genet 投稿予定)。

2-2-3. 生殖補助医療とメチル化異常の関連性の検討

これまでの研究成果：

Kallmann 症候群におけるゴナドトロピン療法が妊孕性獲得に奏功するものの、変異遺伝子および疾患表現型を次世代に伝達するリスクがあることを明らかとした。

当該年度の研究成果

生殖補助医療で出生した Silver-Russell 症候群患者の 1 例において第 7 染色体の父親性発現遺伝子 PEG1/MEST-DMR の過剰メチル化を、別の 1 例において H19-メチル化 DMR の低メチル化を見いだした。この成績は、生殖補助医療において高頻度に発症するとされている低出生体重児とインプリンティング異常の関連性を示唆する点で、極めて重要な結果である (J Assist Reprod Genet 2007;24: 131- 136)。また、Silver-Russell 症候群患者においてエピ変異陽性例の生殖補助医療出生児、Prader-Willi 症候群患者において 6 例の生殖補助医療出生児を同定し、解析を進めている。

2-3. 多因子疾患

2-3-1. 成長障害 (特発性低身長)

これまでの研究成果：

カナダのグループと共同研究として、成長ホルモン受容体遺伝子のプロモーター多型を対象として、関連解析と機能解析を開始した。

当該年度の研究成果

本邦成人、および、高身長と低位身長のモンゴル人を対象とする関連解析を進めている。

2-3-2. 内分泌攪乱化学物質感受性多型の同定

これまでの研究成果：

内分泌攪乱物質のエストロゲン様作用を介在するとされているエストロゲン受容体 α 遺伝子 (ESR1) のハプロタイプ解析を 15 個の SNPs を対象として行い、リガンド依存性転写活性化ドメインに約 50 kb の連鎖不平衡領域が存在し、このハプロタイプ頻度が停留精巣発症に密接に相関することを世界で初めて明らかとした。その他に、ダイオキシン受容体抑制因子遺伝子の P185A 多型と性分化・生殖機能障害の関連を報告してきた。

当該年度の研究成果：

上記 ESR1 のハプロタイプブロック内の AGATA ハプロタイプのホモ接合体頻度が、停留精巣 ($P=0.0040$ 、オッズ比 7.6) のみならず、尿道下裂 ($P=0.0000033$ 、オッズ比 11.26) やミクロペニス ($P=0.034$ 、オッズ比 3.64) と相関することを見出した。これはエストロゲン様内分泌攪乱物質にたいする感受性の存在を確信させるデータであり (Hum Reprod 2007;22:1279-84)、読売新聞朝刊や日経新聞朝刊の特別記事として掲載された。さらに、同じハプロタイプが、イタリア人外陰部異常症男児においても感受性因子として作用すること (執筆中)、また、外因性エストロゲン様物質としての内分泌攪乱化学物質のみなら

ず、内因性エストロゲンにたいしても同様に感受性因子として作用することを、成人身長
の相関解析で明らかにしつつある。

2-3-2. その他

アンドロゲン受容体遺伝子の CAG リピート数多型が早発性卵巣機能不全の感受性因子で
あるというデータを得た (Fertil Steril, in press)。

3. 研修

3.1 大学院生および大学生研修

1. 慶應大学医学部小児科、慶應大学医学部産婦人科、聖マリアンナ医大小児科、長崎大
学医学部、東京医科歯科大学大学院、学習院大学

4. 社会的活動

4.1. 緒方勤

1. 東京医科歯科大学大学院生命情報科学教育部 発生・生殖学分野客員教授
2. 東京農業大学客員教授
3. 慶應義塾大学医学部小児科学非常勤講師
4. 東海大学医学部小児科学非常勤講師
5. 東京歯科大学市川総合病院小児科学客員教授
6. 東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学講座 (特別講義)
7. 日本小児内分泌学会専門医セミナー講義「成長障害」
8. 日本小児内分泌学会雑誌 (Clinical Pediatric Endocrinology) 副編集委員長
9. 日本内分泌学会雑誌 (Endocrine Journal) 小児内分泌分野編集委員
10. 日本人類遺伝学会雑誌 (Journal of Human Genetics) 編集委員
11. Sex Development (International Journal) Editorial Board
12. 日本医学会医学用語委員会委員
13. 成長・発達編集委員
14. 日本小児内分泌学会理事、あり方委員会委員、性分化委員会委員長
15. 日本生殖内分泌学会理事
16. 日本人類遺伝学会評議員
17. (独)国立環境研究所、小児の環境保健に関する健康リスク評価分科会委員

4.2. 勝又規行

1. 帝京大学医学部非常勤講師

4-3. メディア発信 (Press Release)] (緒方勤)

1. 共同記者会見 (於、東京医科歯科大学) 2007 年 1 月 4 日、ヒト第 14 染色体インプリ
ンティング疾患 (Nature Genetics 掲載時) 石野史敏教授と共同

2. 読売新聞、朝日新聞朝刊、2007年1月7日（第14染色体インプリンティング異常症に関して）石野史敏教授と共同
3. 日経新聞予定（性分化異常症の管理指針）、予定

4-4. 受賞

鏡雅代

1. 第41回日本小児内分泌学会優秀演題賞「14番染色体父親性ダイソミーおよび母親性ダイソミーの表現型を招く遺伝的機序の解明」

山澤一樹、鏡雅代、和田友香

1. 第43回日本周産期・新生児医学会会長賞「シルバーラッセル症候群およびIUGRにおける第7、11番染色体のメチル化解析」

深見真紀

1. 第12回浜松医科大学同窓会学術奨励賞「新規性分化異常症責任遺伝子の同定」