

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開発を実現する上で有用な情報を提供するマウスを使った基礎的解析も実施する。

また、遺伝子診断システムの整備も当研究部の重要な目標である。このために、遺伝子診断チップの開発、高速変異スクリーニング法の整備、エピジェネティクス診断プライマーの作製、遺伝子診断プローブの作製など、効率的遺伝子解析法の確立を進めるとともに、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、最新の医療成果を全国に波及できる基盤整備を開始している。さらに、このシステムには、遺伝子診断のみならず、医療上のコンサルタントシステムも構築し、より現実的に医療貢献ができる基盤を整備している。

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、病院と共同で実施する臨床研究・展開研究において大きく貢献するものである。さらに、全国規模となる遺伝子診断システムおよび医療連携システムの構築は、他施設では実現不可能なプロジェクトであり、全国の患者に等しく有益な情報を還元する基盤となる。

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

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）を解析し、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巣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しうると推測される。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。

その後、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。さらに、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（PNAS 投稿予定）。現在、Hes3 の精巣内発現パターン解析と卵巣機能不全患者における変異解析を行っている。さらに、CXorf6 ノックアウトマウス作製を開始し、既にクローンを獲得している。

2-1-2. 9p 上の性分化・精子形成障害責任遺伝子のマッピング

9p 構造異常と精子形成障害を有する男性の解析から、精子形成障害遺伝子を 9p 末端の約 250 kb 領域に限局した。そして、この領域に、精巣で発現している 4 個の遺伝子が存在することを見だし、精子形成障害患者を対象として変異解析を開始した。また、未分化性腺形成遺伝子と精子形成障害遺伝子が同一である可能性があることから、XY 女性において微小欠失解析を開始した。

2-1-3. 新規骨系統疾患責任遺伝子のマッピング

椎骨の早期融合を伴う Klippel-Feil 症候群と相互転座 t(5;8)(q35;p21) を呈する 3 家系 5 例をみ

いだし (Am J Med Genet A 140: 1013 1015, 2006) 正確な転座切断点を FISH 解析により決定し、オーストラリアのグループと共に責任遺伝子クローニングを開始した。

2-1-4. 性分化異常症責任遺伝子および先天奇形症候群責任遺伝子のゲノムワイド解析および候補遺伝子解析

ゲノムワイドに微小欠失をスクリーニングする手法を用いて、新規遺伝子同定に着手すると共に、位置的候補遺伝子アプローチ、ノックアウトマウス表現型解析に基づくアプローチにより、広範な候補遺伝子解析を開始した。

2-1-5. SHOX 遺伝子の発現調節領域の決定と SHOX 遺伝子導入マウスを用いた新規治療法の開発

SHOX 遺伝子コード領域に異常がなく、SHOX 異常症に特有の骨形成障害を有する患者の解析から、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 領域に限局し、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 領域に限局した (Am J Hum Genet 78: 167 170, 2006) これは、ヒトにおける発現調節異常症の存在を示すものである。

さらに、SHOX cDNA を合成し、SHOX 遺伝子導入マウスを作製した。このマウスの成長パターン解析を性腺エストロゲン過剰投与や性腺抑制療法の状態で検討し、遺伝子治療の基礎を作ると共に、SHOX 関連遺伝子の発現パターンを解析し、SHOX 異常症の分子メカニズムを解明してゆく予定である

2-1-7. 胎児期・乳児期特異的男性ホルモン産生経路の同定

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 25 例の患者で同定し、この疾患がペルオキシゾーム内の P450 酵素群に関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しうること、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。そして、残存活性は骨疾患や副腎病変の重症度に密接に関与するが、外陰部異常症 (時に女児外陰部の男性化) の重症度には関与しないことを明確とした。そして、この外陰部異常症発症には、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。この発症機序は、現在 21 水酸化酵素欠損症で試みられている胎児治療が応用できるものであり、今後の展開が期待される。

2-1-8. Kallmann 症候群における体細胞変異の同定

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、本年度では、2 つの大きな進展が見られた。第 1 は、KAL2 変異に特異的な歯牙欠損と正常妊孕性の母親から出生した典型的 Kallmann 症候群患者において KAL2 の生殖細胞変異を同定し、さらに、母親において変異アリルのみを増幅させる方法により、末梢血ではなく爪ゲノムにおいてのみ変異が確認されたことである。この成績は、体細胞変異が母親に生じたことで説明可能であり、典型的症状を伴う変異陰性例の発症機序および遺伝子変異発症機序における体細胞変異の役割を示唆するものである (J Clin Endocrinol Metab 91: 1415 1418, 2006) 第 2 は、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ことである。これは、嗅脳で発現する CHD7 がゴナドトロピン分泌に関与することを世界で初めて明確とするものである (Endocr J 53: 4791 493, 2006)。

2-1-9. 新規ゴナドトロピン分泌調節因子 SOX2 の同定と機能解析

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 遺伝子変異を世界で初めて同定し、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ことである。この成績は、SOX2 が視床下部で発現しているという文献データと合わせて、SOX2 がゴナドトロピン分泌に関与することを明確にするものである (Eur J Endocrinol, in press)。

2-1-10. 成長ホルモン遺伝子の変異および機能解析

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た。これは、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するものである。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 (manuscript in preparation) 第 3 に、常染色体劣性および常染色体優性の患者を、さらに多く同定した。

2-1-11. Noonan 症候群および類縁疾患患者の遺伝子解析

当該年度では下記の3つの進展が見られた。第1に、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。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。第2に、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。これは、上記同様、PTPN11 変異の易腫瘍発症性を示唆する。第3に、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。変異は同定されず、こゝでは、KRAS 変異が Noonan 症候群の2%を占めるに過ぎないというデータに一致する。

2-1-12. 副腎機能不全患者における変異遺伝子の同定と機能解析

副腎病変のない XY 女性患者2例で見いだした新規の変異 SF-1/Ad4BP 蛋白の機能を解析し、これら変異 SF-1/Ad4BP 蛋白が転写活性化機能を喪失していること、野生型 SF-1/Ad4BP 蛋白に対して dominant negative 効果を及ぼさないことから、SF-1/Ad4BP の半量不全が性分化異常症の病因であることを明らかにした。また、STAR 蛋白の203位のアラニンをアスパラギン酸に置換すると、STAR 蛋白のステロイド産生増強作用が著しく障害されることから、203位のアラニンは STAR 蛋白の機能に重要なアミノ酸残基であり、203位がアスパラギン酸の STAR は多型ではないことを報告した (Endocr J 53:427-431, 2006)。さらに副腎不全と性の逆転を呈した46,XY 女性で CYP11A1 遺伝子の新規のミスセンス変異を同定し、変異酵素蛋白の活性が野生型酵素蛋白の約10%に低下していることから、この患者が世界で第3家系目の常染色体劣性遺伝形式のコレステロール側鎖切断酵素欠損症であることを報告した。これまでの報告例とあわせて、コレステロール側鎖切断酵素欠損症の臨床像を明らかにした (J Clin Endocrinol Metab 91:2821-2826, 2006)。

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

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)。そして、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7例と母親性ダイソミー14の表現型を有する患者2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、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例においてエピソード変異を見いだした。そして、遺伝子型表現型解析により、われわれが同定した DLK1-GTL2 間のメチル化可変領域 (DMR) がインプリンティングセンターとして作用すること、RTL1 過剰が父親性ダイソミー14表現型の発症に重要な役割を果たし、DLK1 欠失が同胞例において、世界で初めてインプリンティング調節領域の微小欠失を同定し、この欠失が母親性ダイソミー14表現型の発症に重要な役割を果たすことを見いだした。これは、まさしく世界初のデータであり、インプリンティング疾患の研究に大きく貢献する。

2-2-2. 子宮内発育遅延症における第7染色体母親性ダイソミー同定

子宮内発育不全症患者約3例において第7染色体母親性ダイソミーを同定し、これらの患者の成長障害が胎盤形成不全に起因することを見いだした (manuscript, in press)。

2-2-3. Silver-Russell 症候群における H19-メチル化可変領域 (DMR) の低メチル化の同定

Silver-Russell 症候群患者約70例において H19-DMR を解析し、12例において低メチル化を同定した。そして、これらの患者の遺伝子型表現型解析から、胎児期の IGF2 産生低下による胎盤形成不全と羊水過少が胎児期およびそれに引き続く成長障害の主因であること、生後の血清 IGF2 値が診断的価値を持たないことを見いだした (manuscript, in preparation)。

2-2-4. Beckwith-Wiederman 症候群における H19-メチル化可変領域 (DMR) の高メチル化の同定

Beckwith-Wiederman 症候群2例において H19-DMR を含む部分父親性ダイソミーを同定した。そして、これらの患者の遺伝子型表現型解析から、胎児期の IGF2 産生過剰による胎盤過形成が胎児期およびそれに引き続く過成長の主因であること、生後の血清 IGF2 値が診断的価値を持たないことを見いだした (manuscript, in preparation)。

2-2-5. 生殖補助医療とメチル化異常の関連性の検討

生殖補助医療で出生した Silver-Russell 症候群患者の解析から、1例において第7染色体の父親性発現遺伝子 PEG1/MEST 遺伝子の DMR に過剰メチル化を、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, in press)。

2-3. 多因子疾患

2-3-1. 成長障害 (特発性低身長)

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。

2-3-2. 性分化・生殖機能障害

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 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、すなわち、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) やマイクロペニス ($P=0.034$, オッズ比 3.64) と相関することを見出した。これは内分泌攪乱物質感受性の存在を確信させるデータである (Hum Reprod, in press)。また、SF1/AD4BP の G146A 多型および INSL3 の A59T 多型と停留精巣の関連を見出した (Fertil Steril 85:787-790, 2006; Horm Res 67:73-76, 2006)。現在、精子形成障害と卵巣機能障害を主に多型解析を進めている。これは、読売新聞朝刊に特集として取り上げられた。

2-4. 遺伝子診断システムおよび医療連携システムの整備

2-4-1. 効率的遺伝子解析法の確立

遺伝的異質性に富み網羅的遺伝子解析を要する疾患を対象とする遺伝子診断チップの作製、特定の巨大遺伝子を対象とする高速変異スクリーニング法の開発、インプリンティング異常症診断法の確立、FISH 解析プローブの作製を行なった。

2-4-2. 医療連携システムの整備

臨床診断困難症例や養育上の性決定困難症例などのカンファレンスサイトや小児泌尿器専門医リストなどをインターネット上に設計することで、関連学会と協議し、成育医療センターを中心として連携体制を整備することで合意した。現在、その実施方法とインターネットセキュリティについて検討を開始した。そして、遺伝子診断が重要な役割を果たす疾患について、遺伝子解析が可能となる倫理的基盤の整備も開始した。これは、遺伝子診断研究の成果を、確実に医療に還元すると共に、将来にわたって医療上必要とされる遺伝子診断の継続的実施を可能とするために必須である。さらに、NPO など継続可能なシステムの整備を目指す。

3. 研修

3.1 大学院生および大学生研修

3.1.1. 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

3.2 実験技師研修

4. 社会的活動

4.1. 緒方 勤：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；東京大学大学院医学系研究科人類遺伝学講座非常勤講師；慶應義塾大学医学部小児科学非常勤講師；東海大学医学部小児科学非常勤講師；東京歯科大学市川総合病院小児科客員教授；福井大学大学院医学研究科生命情報医科学講座分子生体情報学非常勤講師；日本小児内分泌学会雑誌 (Clinical Pediatric Endocrinology) 副編集委員長；日本内分泌学会雑誌 (Endocrine Journal) 小児内分泌分野編集委員；日本人類遺伝学会雑誌 (Journal of Human Genetics) 編集委員；Sex Development (International Journal) Editorial Board；日本医学会医学用語委員会委員；成長・発達編集委員；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；日本生殖内分泌学会理事；日本人類遺伝学会評議員；(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：帝京大学医学部非常勤講師

4.3. 職務発明 (緒方勤)

尿道下裂および他のストロゲン依存性疾患発症のリスクとエストロゲン製剤効果の評価法としてのエストロゲン受容体 遺伝子の SNP 解析法の開発 (2006 年 4 月 7 日、国立成育医療センター職務発明認定) 新規性分化異常症責任遺伝子 MHX (Cxorf6) による Notch リポーター遺伝子転写活性化の同定 (2006 年 4 月 7 日、国立成育医療センター職務発明認定)

4-4. メディア発信 (Press Release)] (緒方勤)

4-4-1. 日経新聞、日経産業新聞 (新規性分化異常症責任遺伝子 Cxorf6 の同定について) 2006 年 11 月 6 日

4-4-2. 日経新聞 (尿道下裂の治療について) 2006 年 11 月 6 日

- 4-4-3. 読売新聞（内分泌攪乱物質感受性について）2007年2月18日読売新聞朝刊
- 4-4-4. 日経産業新聞日経産業新聞朝刊（内分泌攪乱物質感受性ハプロタイプの同定について）2007年1月29日
- 4-4-5. 科学雑誌 Newton（X, Y染色体）2006年2月号および別冊号（性を決めるXとY）2006年11月
- 4-4-6. 共同通信 Medical News（ターナー症候群）
- 4-5. **受賞**
- 4-5-1. 曽根田舜；平成18年度 Endocrine Journal 若手優秀論文賞
- 4-5-2. 和田友香；第3回日本 米国小児科学会交流事業、日本代表