

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：2019-B4

課題名：低身長を伴った思春期早発症症例における遺伝学的原因および臨床像の検討

主任研究者 国立成育医療研究センター

分子内分泌研究部臨床内分泌研究室 鏡 雅代

本年度は対象患者の基準設定を行った。基準は、思春期早発症の基準を満たした症例および思春期早発症の年齢基準を1歳高くした条件で、その確実例の基準に該当する症例で、LH基礎値0.5以上または、LHRH負荷試験でLH頂値5.0 IU/L以上の症例(E2, テストステロン値は問わない)。低身長の有無、治療の有無は問わないとした。この基準に基づき22名を本研究にリクルートした。低身長や思春期早発症をきたすインプリンティング異常症のスクリーニング、思春期早発症原因遺伝子の変異検索を進めているがまだ陽性例は認めず、さらなる症例の集積が必要である。

### 1. 研究目的

本研究は、低身長に合併した思春期早発症の遺伝学的原因の解明および、原因別の臨床像・内分泌学的特徴などを明確にすることを目的とする。低身長児において、思春期早発は、最終獲得身長の減少を意味し、遺伝学的原因別臨床像の解明は、効果的な治療法の確立に結びつくエビデンスとなる。また、中枢性思春期早発症(CPP)症例を集積している施設は本邦において当研究室以外では知る限りなく、本邦における研究拠点とし探索的研究の基盤をつくるという特色もある。CPPの多くは原因不明である。近年、インプリンティング遺伝子*MKRN3*、*DLK1*がCPPの原因遺伝子として報告された。我々の低身長を呈するインプリンティング異常症(IDs)についての先行研究において、*DLK1*の発現が消失しているTemple症候群患者がSGA性低身長、CPPを呈することを見出した。また、Silver-Russell症候群患者やSGA出生児でも思春期が早い傾向をもつとの報告もあるが、低身長を伴ったCPP症例に対する包括的な解析はなされておらず、低身長を伴う思春期早発症に対する研究を着想した。

研究初年度の本年の目標は①低身長

を伴った思春期早発症症例の集積。②インプリンティング異常症スクリーニング：先行研究にて、パイロシーケンス法による既知8インプリンティング異常症の責任メチル化可変領域に対するメチル化解析法によるスクリーニング系は確立している。これにより、低身長思春期早発症を呈するインプリンティング異常症であるTemple症候群、Silver-Russell症候群を同定できる。③思春期早発症原因遺伝子変異解析：CPPの原因遺伝子として報告されている*KISS1*、*KISS1R*、*NROB1*、*PROKR2*の変異解析は当研究室が作成した次世代シーケンサー(NGS)パネルの委託先であるかずさDNA研究所にて施行する。*DLK1*、*MKRN3*についてはサンガー法もしくはNGSパネルを作成して変異解析を施行する。原因不明の家系例については新規原因遺伝子同定を目的にエクソーム解析(外注)にて変異解析を進める。④関連遺伝子プロモーター領域のメチル化解析：*DLK1*、*MKRN3*などの既知思春期早発症関連遺伝子のプロモーター領域にメチル化解析用のプライマーセットを設計し、メチル化状態を正常コントロールと患者群で比較する。

## 2. 研究組織

鏡 雅代 (国立成育医療研究センター)  
堀川 玲子 (国立成育医療研究センター)  
内木 康博 (国立成育医療研究センター)  
緒方 勤 (浜松医科大学)  
室谷 浩二 (神奈川県立こども医療センター)  
長崎 啓祐 (新潟大学医歯学総合病院)  
伊達木 澄人 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)  
中村 明枝 (北海道大学)

## 3. 研究成果

本年度は目標①の検体集積に特に重点を置いている。低身長を伴う思春期早発症症例は決して多くはないこと、思春期早発症により成長の加速が生じる（最終身長は低くなる）ことで低身長がマスクされてしまうことから、低身長の有無を問わず、思春期早発症を持つ症例を幅広く集積することとした。集積対象患者は以下の通りである。思春期早発症の基準を満たした症例および以下の 1) の年齢基準を 1 歳高くした条件で、その確実例の基準に該当する症例で、LH 基礎値 0.5 以上または、LHRH 負荷試験で LH 頂値 5.0 IU/L 以上の症例 (E2, テストステロン値は問わない)。低身長の有無、治療の有無は問わない。男児 1) 9 歳未満で精巣、陰茎、陰囊などの明らかな発育が起こる、2) 10 歳未満で陰毛の発生をみる、3) 11 歳未満で腋毛、ひげの発生、声変わりをみる、女児 1) 7 歳 6 か月未満で乳房発育が起こる、2) 8 歳未満で陰毛の発生、または小陰唇色素沈着などの外陰部成熟、あるいは陰毛の発生をみる、3) 10 歳 6 か月未満で初経をみる。これまでに約 20 症例を集積し、さらに約 80 症例程集積対象となる症例があり、外来受診時にリクルートを進めていく。

②の思春期早発症を呈するインプリンティング異常症の検索は集積済みの 22 症

例について試行したが、インプリンティング異常症は同定できていない。

③の変異解析は集積済み検体で *KISS1*, *KISS1R*, *NROB1*, *PROKR2* の変異解析をかずさ DNA 研究所に委託した遺伝子解析パネルを用いた変異解析を 11 名にて施行した。1 例において、*KISS1R* 遺伝子において p.Pro110Thr のヘテロ rare variant を認めた。ホモ変異で congenital hypogonadotropic hypogonadism の原因となることが報告されているが、ヘテロ変異であり、表現型とも合わないことから病態との関連性がないと判断した。

検体集積が遅れ気味であることから、前方視的症例集積に加え、我々がこれまでに集積し成長障害の遺伝学的原因を検索済み（インプリンティング異常症、染色体構造異常、関連遺伝子変異解析を施行済みで約 1/3 で原因判明済み）の SGA 性低身長患者約 300 症例について、思春期発来時期の調査を開始した。これにより、SGA-SS 症例における思春期発来の時期とその遺伝学的原因との関係を明らかにできる。これらのうち、暦年齢で 11 歳以上となる原因不明の男児 54 名、*H19*-DMR 低値 (*H19LOM*) が判明している 11 歳以上の男児 24 名、7 番染色体母性片親性ダイソミー (UPD(7)mat) の 11 歳以上の男児 4 名の主治医に対し、成長曲線もしくは生データをいただく依頼の連絡を行い、データ得られた eye-fit 法による解析を行った。原因不明 SGA 性低身長児 10 名、*H19LOM*、6 名成長曲線が得られたが、思春期早発症であった症例はなかった。UPD(7)mat は 1 例評価し、こちらも思春期早発はなかった。ただ、これらの患者は GH 治療や場合によっては LH-RH アナログによる治療をうけていることから、eye-fit 法による思春期開始年齢の推定が難しい症例が散見された。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

ヒト遺伝子解析研究：ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針（平成 29 年 2 月 28 日一部改正）を遵守して実施する。同意は全て書面で取得され、同意書および患者と匿名化番号の対応表は、個人情報管理者により厳重に保管されている。国立成育

医療研究センターの倫理委員会において、先天奇形症候群における遺伝的原因の探索（国立成育医療研究センター-受付番号 518）、成長障害における遺伝的要因の探索（同 519）、性分化疾患・性成熟疾患・生殖機能障害における遺伝的原因の探索（同 512）の研究課題が承認されている