

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：2019 B-4

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 (所属施設) 国立成育医療研究センター

(所属・職名 氏名) 分子内分泌研究部臨床内分泌研究室 室長 鏡雅代

(研究成果の要約) 昨年度の対象患者基準設定に基づき症例の集積を開始した。これまでに56名の思春期早発症症例が集積された。インプリンティング異常症である Temple 症候群が3名で同定された。39名で *KISS1*, *KISS1R*, *NROB1*, *PROKR2* の変異解析を次世代シーケンサーパネルを用いて行ったが病的バリエーションは同定されていない。以上の結果は、症候群として認識されない中枢性思春期早発症症例にインプリンティング異常症が一定の割合で含まれていることを示唆する結果である。

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、最終獲得身長を減少を意味し、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。

研究初年度の昨年は、患者のリクルートの基準を決定した。基準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

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、陰嚢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。

集積された症例に対しては、①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。②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。③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。これらの症例で遺伝学的原因が同定された場合、主治医と連絡をとり追加の臨床情報を収集する。

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

2021年5月までに56名の思春期早発症症例を同定した。3名において14番染色体インプリンティング異常症であるTemple症候群を同定した。3例ともSGAで出生し、SGA性低身長としてフォローされていたが、Temple症候群に特徴的な新生児期、乳児期の筋緊張低下や哺乳不良が軽度で、Temple症候群は疑われていなかった。Temple症候群は、SGA性低身長、筋緊張低下、小さな手、哺乳不良、思春期早発症を特徴とするが、疾患特異的な臨床像ではないことから、原因不明思春期早発症症例に一定数含まれていることが明らかとなった。原因不明中枢性思春期早発症、特にSGA性低身長を伴う症例ではTemple症候群を鑑別診断に挙げる必要があると考えられた。

既知思春期早発症原因遺伝子である *KISS1*, *KISS1R*, *NROB1*, *PROKR2* の変異解析はかずさ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39名にて施行した。全例において病的バリエントは同定されておらず、これらの遺伝子変異を原因とする中枢性思春期早発症は非常に少ないと予想される。

DLK1, *MKRN3* の変異解析はNGSを用いて行うこととし、NEBNextを用いて、変異解析を行うべく、プライマーなどの準備は終了した。プライマーは *DLK1*, *MKRN3* のプロモーター領域を含むように設計しており、微小欠失なども構造異常も同定できる。2021年度に60検体以上集積した時点で試行予定である。*DLK1*, *MKRN3* のプロモーター領域のメチル化解析は半数以上で終了しているが、*DLK1* のプロモーター領域の異常低メチル化症例を同定しており、さらなる原因探索を進めている。

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・遺伝子解析研究に関する倫理指針（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