

性分化・性成熟疾患群における診療ガイドラインの作成と普及

研究代表者 緒方勤 浜松医科大学小児科 教授

本研究は、小児慢性特定疾病対象とされた性分化・性成熟関連疾患の診療ガイドライン作成と普及を目的として行われた。また、診断法の向上や患者登録・検体保存も併せて実施した。主たる成果は以下のとおりである。

- 1) 診療ガイドライン作成と普及：ターナー症候群、マッキューン・オルブライト症候群、精巣形成不全、卵巣形成不全、卵精巣性性分化疾患、混合性性腺異形成症、 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素欠損症、 5α -還元酵素欠損症、アンドロゲン不応症、アロマターゼ過剰症（エストロゲン過剰症）、アロマターゼ欠損症（アンドロゲン過剰症）、46,XX 精巣性性分化疾患の診断基準および重症度分類を、内科的および外科的見地から作成した。さらに、ターナー症候群における成人期の病態に関するデータを収集し、まとめると共に、プラダーウイリ症候群における成長ホルモン使用による体組成改善効果のシステマチックレビューを行った。また、総排泄腔遺残、総排泄腔外反についてもガイドライン作成を行い、その普及と啓発のため、日本小児外科学会と Minds へのホームページ掲載を申請し、承認をうけ掲載された。
- 2) 尿ステロイド解析の有用性：遺伝子解析で確認された疾患患者の尿ステロイドプロファイル解析を行い、これが簡便かつ信頼性の高い診断法であることを確認した。また、バイオマーカーとしてのステロイドパターンの有用性を確認した。
- 3) 遺伝子診断法の検討：遺伝的異質性に富む性分化疾患に正確かつ迅速な診断法を樹立する目的で、かずさ研究所と合同で、網羅的パネル診断法を構築し、その有用性とコストについて検討し、これが廉価かつ親愛度高い検査補であることを確認した。
- 4) 症例情報登録および検体保存：国立成育医療研究センター分子内分泌研究部に構築済みの成育希少疾患症例レジストリシステムを活用し、性分化・性成熟疾患患者の臨床情報と遺伝学的データの登録を行った。

共同研究者

堀川玲子（国立成育医療研究センター）

位田忍（大阪母子医療センター）

長谷川奉延（慶応義塾大学）

鹿島田健一（東京医科歯科大学）

中井秀郎（自治医科大学）

深見真紀（国立成育医療研究センター）

性腺異形成症、 17β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素欠損症、 5α -還元酵素欠損症、アンドロゲン不応症、アロマターゼ過剰症（エストロゲン過剰症）、アロマターゼ欠損症（アンドロゲン過剰症）、46,XX 精巣性性分化疾患の概要、診断基準、重症度分類を共同で作成した。

A. 研究目的

本研究の目的は、小児慢性特定疾病対象とされた性分化・性成熟関連疾患の診療ガイドライン作成である。また、正確かつ迅速な診断法の樹立、症例登録・検体保存も重要な課題として実施した。

尿ステロイドプロファイル解析の有用

性：遺伝子解析により確定された 17α 水酸化酵素欠損症 7 例、P450 酸化還元酵素欠損症 34 例から尿を採取し、ガスクロマトグラフ質量分析法を用いた尿ステロイドプロファイルにより尿中ステロイド代謝物を一斉解析を行った。

B. 研究方法

性分化疾患の概要、診断基準、重症度分類

類：まず、全ての性分化疾患に共通する概要、診断基準、重症度分類の基本的考えをまとめた。次に、ターナー症候群、マッキューン・オルブライト症候群、精巣形成不全、卵巣形成不全、卵精巣性性分化疾患、混合性

遺伝子診断法の検討：初年度に構築した効率的遺伝子診断システムを活用し、次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンシングとターゲットエンリッチメント、MLPA、アレイ CGH などを用いた疾患関連遺伝子解析を行

い、500例以上の遺伝子診断を終了した。さらに、日本人患者の解析データを集積し、結果の再現性の確認、精度の向上、解析手技簡略化、解析コスト削減などについて検討した。

外科的治療法の検討：乳児期に膣形成術を受けた女児のうち、思春期年齢に達した症例の現状を検討した。

症例情報登録および検体保存：国立成育医療研究センター分子内分泌研究部に構築済みの成育希少疾患症例レジストリシステムを活用し、性分化・性成熟疾患患者の臨床情報と遺伝学的データの登録を行った。さらに、6ナショナルセンターバイオバンク事業と連携し、臨床サンプルのバンキングを行った。

(倫理面への配慮)

尿ステロイドプロファイル解析は、慶應義塾大学医学部および慶應義塾大学病院 IRB の承認のもとに行った。またヘルシンキ宣言、ヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠した。遺伝子診断研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 25 年 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)を遵守して施行した。本研究課題に関して、国立成育医療研究センター倫理委員会において、下記の課題が承認されている。

すべての検体は、本人もしくは両親のインフォームドコンセントを得たのち集積された。

- 性分化疾患・性成熟疾患における遺伝的原因の探索 (浜松医科大学第 23-110 号、平成 23 年 12 月 12 日;国立成育医療研究センター受付番号 512、平成 23 年 12 月 1 日)
- 先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索 (浜松医科大学第 23-112 号、平成 23 年 12 月 12 日;国立成育医療研究センター受付番号 518、平成 23 年 12 月 1 日)
- 卵巣機能不全の分子基盤の探索(国立成育医療研究センター課題番号 646)

C. 研究結果

性分化疾患の概要、診断基準、重症度分類

の作成：全ての性分化疾患に共通する概要、診断基準、重症度分類の基本的考えをまとめ、これに基づき、ターナー症候群、マッキューン・オルブライト症候群、精巣形成不全、卵巣形成不全、卵精巣性性分化疾患、混合性性腺異形成症、17β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素欠損症、5α-還元酵素欠損症、アンドロゲン不応症、アロマターゼ過剰症(エストロゲン過剰症)、アロマターゼ欠損症(アンドロゲン過剰症)、46,XX 精巣性性分化疾患の概要、診断基準、重症度分類を共同で作成した。そして、この内容を、日本小児内分泌学会の承認を得た後、日本内分泌学会の基本的承認のもと、厚生労働省が推進する「小児慢性特定疾病と指定難病制度」との参考資料として提出した。さらに、ターナー症候群における成人期の病態に関するデータベースを収集し、まとめた。また、プラダーウイリ症候群における成長ホルモン使用による体組成改善効果のシステムチェックレビューを行った。これにより、成長ホルモンは、低身長より、むしろ体組成改善を目的として行われるべきであることが判明した。

なお、総排泄腔遺残、総排泄腔外反についてもガイドライン作成を行い、その普及と啓発のため、日本小児外科学会と Minds へのホームページ掲載を申請し、承認をうけ掲載された。

尿ステロイドプロファイル解析の有用

性:17α 水酸化酵素欠損症 (17OHD) と P450 酸化還元酵素欠損症 (PORD) は臨床症状および生化学的所見が類似する。遺伝学的に確定した 17OHD6 例、PORD34 例を対象とし、尿ステロイドプロファイルを用いて検討した、ここで、過去の報告を参考に、以下に注目した。

- 4 種のコルチコステロン代謝物
 - 5α-tetrahydrocorticosterone
 - 5β-tetrahydrocorticosterone
 - 5α-tetrahydro11-dehydrocorticosterone
 - 5β-tetrahydro11-dehydrocorticosterone
- 4 種のコルチゾール代謝物
 - 5α-tetrahydrocortisol
 - 5β-tetrahydrocortisol
 - 5α-tetrahydrocortisone
 - 5β-tetrahydrocortisone)
- 21-deoxycortisone 代謝物

Pregnanetriolone

その結果、両者の生化学的鑑別が可能であった。第1にコルチコステロン (B) /コルチゾール (F) 代謝物比 >1.0 の17OHD全例およびPORDの一部を抽出した。なおB/F代謝物比 <1.0 は全例PORDである。第2に、B/F代謝物比 >1.0 の例に対して、21-deoxycortisone 代謝物であるpregnanetriolone <0.3 未満は全例17OHD、 >0.3 は全例PORDであった。これにより、副腎疾患の簡便かつ高感度の診断基準が作成された。

バイオマーカーとしてのステロイドの有 用性の検討

正常月経女性および多嚢胞性卵巣症候群女性の血中ステロイド解析を行った。これにより、健常女性において複数の男性ホルモン産生経路が機能していること、PCOS患者では古典的および非古典的経路の両方で男性ホルモンが産生されていることを明確とした。さらに11 oxygenated C19ステロイドが、PCOS女性における男性化の指標となる可能性を見出した。

遺伝子診断法の検討：

(1) 遺伝子診断：46,XY性分化疾患患者ではAR, NR5A1, SRD5A2変異およびSOX9上流欠失、性成熟疾患患者ではFGFR1、KAL1、CHD7変異を含む多くの疾患関連遺伝子異常を同定した。変異同定率は中枢性思春期遅発症で約25%、中枢性性早熟症で約20%、非症候性尿道下裂症で約10%であった。特記すべき成果として、日本で初めて思春期早発症患者でMKRN3機能喪失変異を同定し、本症の症状の改善にGnRHアナログ投与が有効であることを明らかとしたこと、PROKR2フレームシフト変異およびMKRN3機能喪失変異が中枢性思春期早発症を招くことを明らかとしたこと、SOX2半量不全が合併奇形を伴わない性成熟疾患の原因となることをはじめ明らかとしたこと、精子形成障害の原因となるSTX2遺伝子変異を同定したことが挙げられる。個々の患者の遺伝子解析結果は主治医に報告し、患者の治療指針決定や遺伝カウンセリングに利用した。また、日本人患者の変異パターンや遺伝子型-表現型関

連について検討し、データベースに登録した。

(2) 新規発症機序の解明：既知遺伝子変異陰性患者を対象として、エクソーム解析や全ゲノムシーケンス解析を含む網羅的遺伝子解析を行った。その結果、性分化疾患の新たな発症機序を解明した。特に重要な成果として、性分化疾患を含む先天奇形症候群患者においてSAMD9変異を同定し、「MIRAGE症候群」という新たな疾患概念を確立した。また、46,XX精巢性/卵精巢性性分化疾患患者においてNR5A1ミスセンス変異を同定し、NR5A1遺伝子機能異常が未分化46,XX性腺の精巢化を生じingことを初めてあきらかとした。また、NR0B1機能喪失変異が副腎機能不全を伴わない性早熟を招くことを見出した。

(3) 臨床遺伝子診断システムの開発と試験運用：かずさDNA研究所と連携し、multiplex PCR法およびを利用した効率的既知疾患責任遺伝子変異スクリーニングシステムを開発した。これまでに集積した日本人患者の変異情報をもとに解析すべき遺伝子を選択し、46,XY性分化疾患および性成熟疾患の次世代シーケンサーパネルを作成した。さらに、継続して遺伝子解析技術を提供するため、倫理基盤、技術基盤、経済基盤の整備を行った。パイロットスタディとして、上記の2パネルを対象としてNPO法人オーファンネットジャパンを介した遺伝子診断受託の運営を開始した。

さらに、解析コストおよび精度について検討し、ライブラリ作成法をmultiplex PCR法からハイブリキャプチャー法へと変更した。今後、継続して遺伝子診断技術の提供をすることを考え、解析施設をオーファンネットジャパンからかずさ衛生検査所に移管した。

外科的治療法の検討：

期間内に当科を受診したDSD女性症例は30例で、8例が対象となった。原疾患は先天性副腎皮質過形成(以下CAH)4例、完全型アンドロゲン不応症(以下CAIS)2例、部分型アンドロゲン不応症(以下PAIS)・ターナー症候群が1例ずつであった。CAH症例中3例で外陰陰形成術の既往があった。このうち1例で膣口拡大術を15歳時に施行した。別の1例で16歳時に大陰唇再形成

術を施行、この症例と他の1例に膣自己拡張を18歳、20歳で指導した。手術歴のないCAHの1例とPAIS症例に11歳、12歳で陰核形成術を施行した。CAISの2例、PAIS・ターナー症候群の各例に、28歳・20歳、12歳、17歳で性腺摘除術を施行した。CAIS症例では家族の同意獲得困難のため、婦人科初診から性腺摘除術施行まで5年以上を要した。造膣術後10年の女性の膣口狭窄に対する口腔粘膜利用狭窄修復術が1例に行われた。狭窄は改善したが、性交には未だ成功していない。

症例情報登録および検体保存：約250の臨床検体が得られた。先行研究で集積された検体と合わせて800以上が集積された。これらの症例の情報は、成育希少疾患症例レジストリシステムに登録した。

D. 考察

性分化疾患の概要、診断基準、重症度分類：この基本的考えの提唱は、今回作成した疾患の概要、診断基準、重症度分類に使用されており、「小児慢性特定疾病と指定難病制度」の推進に大きく貢献すると期待される。また、ターナー症候群、マッキューン・オルブライト症候群、精巣形成不全、卵巣形成不全、卵精巣性性分化疾患、混合性性腺異形成症、17β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素欠損症、5α-還元酵素欠損症、アンドロゲン不応症、アロマターゼ過剰症（エストロゲン過剰症）、アロマターゼ欠損症（アンドロゲン過剰症）、46,XX 精巣性性分化疾患の概要、診断基準、重症度分類の作成は、厚生労働省が推進する小児慢性特定疾病ならびに指定難病事業に大きく貢献すると期待される。さらに、ターナー症候群における成人期の状態の整理は、ターナー症候群が指定難病に相応しいか否かを判断する根拠を与える。また、プラダーウィリ症候群における成長ホルモン使用による体組成改善効果のシステムチックレビューは、成長ホルモンが低身長より、むしろ体組成改善を目的として行われるべきであることを示唆する。なお、総排泄腔遺残、総排泄腔外反ガ

イドラインが、日本小児外科学会とMindsへのホームページ掲載の承認をうけ掲載されたことは、本疾患の医療向上に大きく貢献すると期待される。

尿ステロイドプロファイル解析の有用

性：17α水酸化酵素欠損症とP450酸化還元酵素欠損症をもっとも感度・特異度高く鑑別可能な指標が決定されると期待される。尿ステロイドプロファイル解析は、他の先天性副腎疾患の診断においても高度な有用性が示されつつあり、副腎・性分化疾患の診断法としての価値を確立している。

遺伝子診断法の検討：性分化・性成熟疾患の診療では、個々の患者の発症機序に基づいた治療法の選択が必須である。本研究では、網羅的遺伝子解析を行い、日本人患者における既知遺伝子変異の頻度を明らかとした。これらをもとに次世代遺伝子診断パネルを開発した。また、継続して遺伝子解析技術を提供するため、技術的および経済的基盤整備を行った。さらに、PCOSのバイオマーカーとなるステロイドを見出した。これらの知見は、性分化・性成熟疾患の診療ガイドライン策定に役立つ。また、本研究によって集積された検体と臨床情報は、今後の性分化・性成熟疾患研究の基盤となる。

外科的治療法の検討：思春期以後に性分化疾患の女性患者が必要とする医療は、追加外陰部手術・在宅指導・性腺摘除術など様々である。思春期もしくは若年成人女性という未成熟なことが多い対象なので、全人医療的な細やかな対応が必要である。

症例情報登録および検体保存：本研究では、性分化疾患と性成熟疾患の臨床検体と情報の集積を行った。これらの症例を追跡調査をすることによって、より良いガイドラインの策定が可能となる。また、バンキングされた検体は、将来の我が国における性分化疾患と性成熟疾患研究に活用可能である。

E. 結論

全ての性分化疾患に共通する概要、診断基準、重症度分類の基本的考えをまとめ、これに基づき、ターナー症候群、マッキューン・オルブライト症候群、精巣形成不全、卵巣形成不全、卵精巣性性分化疾患、混合性性腺異形成症、17 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素欠損症、5 α -還元酵素欠損症、アンドロゲン不応症、アロマターゼ過剰症（エストロゲン過剰症）、アロマターゼ欠損症（アンドロゲン過剰症）、46,XX 精巣性性分化疾患の概要、診断基準、重症度分類を作成した。また、遺伝的異質性に富む性分化疾患に正確かつ迅速な診断法を樹立する上で、遺伝子診断ならびに尿ステロイド解析の有用性を確認した。さらに、外科的治療法の検討、検体集積体制の整備を行った。これらの成果は、本研究の目的達成に大きく貢献すると期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

学術雑誌等での発表

添付資料参照