

# 研究年報

## Annual Research Reports

第48号 2024年度

No.48, 2024

公益財団法人 成長科学協会  
THE FOUNDATION FOR GROWTH SCIENCE

# 研究年報

第48号 2024年度

公益財団法人 成長科学協会

## 序 文

当財団は設立後48年を迎えますが、設立以来その年度に行った研究助成の成果を次の年度に研究年報として刊行し、全国の大学（医科大学・大学医学部）等の図書館及び関係者に配布してきました。

その第48号として、2024年度に行った自由課題研究（15件）、FGHR臨床研究（5件）及びノルディサイエンス研究（2件）の報告書をまとめて刊行する運びとなりました。これらの研究成果の中に、国際的に高く評価されるものが年々増加しつつあることは喜ばしい限りです。

本年報を通じて、2024年度の当財団の研究助成関係などの活動状況を見て頂きたいと思います。また、本年報は関係者の研究に寄与するものと考えており、その活用を強く願っております。

尚これらの研究助成費は、2024年度に当財団に御寄付下された各位の寄付金によるものです。ここにそれらの方々の御厚意に対し、衷心よりお礼申し上げます。

2025年12月

公益財団法人 成長科学協会理事長

田中 敏章

## 凡 例

1. 内容は、当財団が2024年度に助成した自由課題研究（15件）、FGHR臨床研究（5件）、ノルディサイエンス研究（2件）、計22件につき、それぞれ助成対象者より提出された報告書を収載した。
2. 報告書を収載するにあたっては、前記の3項目の記載順とした。各項目内における記載順は、報告者の氏名の五十音順である。
3. 助成対象者については、当財団において設定した「研究助成事業に関する実施要領」に基づき、それぞれ公募のうえ選考したものである。

# 目 次

## 自由課題研究報告

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| ターナー症候群と発達障害児の視機能と視覚認知を含む脳・認知機能の検討<br>－質問表による早期発見と訓練・継続的な教育・就労支援の検討－ | 1                           |
| 荒木 久美子   | 秋山成長クリニック                   |
| 稲田 勤   | 高知リハビリテーション学院言語療法学科         |
| 望月 貴博、西垣 五月  | 希望の森成長発達クリニック               |
| 荒木 まり子   | 高知大学医学部小児思春期医学              |
| 間部 裕代  | 間部病院小児科                     |
| 日本人小児の腰椎骨密度・骨質の基準値作成   | 17                          |
| 池側 研人  | 東京都立小児総合医療センター内分泌・代謝科       |
| SGA 性低身長症における出生時体格の層別化による成長ホルモン治療効果の解析                               | 21                          |
| 石井 智弘  | 慶應義塾大学医学部小児科                |
| ヨウ素摂取と甲状腺機能、成長発達との関連に関する研究<br>－小児のヨウ素摂取に寄与する学校給食と家庭からのヨウ素量（経過報告）－    | 25                          |
| 伊藤 善也  | 日本赤十字北海道看護大学臨床医学領域          |
| 小橋 友里江   | 福島県立医科大学国際交流センター            |
| 國井 葉   | 昭和大学横浜市北部病院甲状腺センター内科        |
| 山口 真由  | 鎌倉女子大学家政学部管理栄養学科            |
| 塚田 信   | 女子栄養大学栄養科学研究所               |
| 長崎 啓祐  | 新潟大学医学部小児科学教室               |
| 布施 養善  | Iodine Global Network (IGN) |
| 乳幼児健診で急激な肥満状態を認める児における抗 ZSCAN1 抗体解析                                  | 27                          |
| 宇都宮 朱里   | 広島市立北部医療センター安佐市民病院          |
| 妊娠授乳関連骨粗鬆症の出生児への影響－母児の情報を連結させたレセプトデータを用いた分析－                         | 29                          |
| 笠原 恭子  | 滋賀医科大学医学部産科学婦人科学講座          |
| アフリカチビネズミを用いた成長ホルモン（GH）／インスリン様成長因子（IGF-1）シグナル系の新たな機能の探索              | 47                          |
| 加納 聖   | 山口大学共同獣医学部                  |
| ヨウ素摂取と甲状腺機能、成長発達との関連に関する研究－乳児、幼児のヨウ素摂取量                              | 61                          |
| 國井 葉   | 昭和医科大学横浜市北部病院甲状腺センター内科      |

|  |   |
|--|---|
| 思春期遅発症における新規疾患成立機序の解明と責任遺伝子バリエーション陽性例の経時的な臨床評価 ..... | 63  |
| 佐藤 直子  | なみファミリークリニック                                    |
| 小笠原 敦子   | 茨城県立こども病院小児科                                    |
| 瀬尾 美鈴  | 京都産業大学工学部生物工学科                                  |
| 三井 純   | 東京大学ゲノム医学研究支援センター                               |
| 軟骨形成不全症の原因としてのグルクロン酸転移酵素遺伝子変異に関する解析 .....            | 67  |
| 辻 岳人   | 岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域                             |
| 細胞増殖を主軸とした PIT-1 遺伝子 $\beta$ -isoform の機能解明 .....    | 71  |
| 坂東 弘教  | 神戸大学医学部附属病院糖尿病・内分泌内科                            |
| 低ホスファターゼ症の病態形成におけるオステオポンチンの関与 .....                  | 73  |
| 道上 敏美  | 大阪母子医療センター研究所・骨発育疾患研究部門                         |
| 成長ホルモンの GATA を介した新規シグナル伝達機構の基盤解明と治療戦略への応用 .....      | 75  |
| 光谷 真奈  | 武庫川女子大学薬学部臨床病態解析学研究室                            |
| 田上 哲也  | 国立病院機構京都医療センター臨床研究センター<br>内分泌代謝高血圧研究部分子内分泌代謝研究室 |
| 包括的メチル化解析による SGA 児の生活習慣病発症のバイオマーカー探索とリスク層別化研究 .....  | 83  |
| 山澤 一樹  | 国立病院機構東京医療センター遺伝診療科／小児科                         |
| HMGA2-PLAG1-IGF2 経路の異常に起因するシルバーラッセル症候群の臨床像解明 .....   | 85  |
| 矢本 香織  | 浜松医科大学医化学講座                                     |

## FGHR 臨床研究報告

|  |                            |
|--|----------------------------|
| 抗原特異的抗下垂体抗体評価法の開発と免疫チェックポイント阻害薬関連下垂体障害のバイオマーカー確立に<br>関する研究 ..... | 89                         |
| 岩間 信太郎   | 名古屋大学医学部附属病院糖尿病・内分泌内科      |
| 日本人家族性アルドステロン症の臨床像の解明および新規責任遺伝子の検索 .....                         | 93                         |
| 内田 登   | 済生会中央病院小児科／慶應義塾大学医学部小児科学教室 |
| アミノ酸プロファイルがもたらす成長探索研究～出生時から小児期まで～ .....                          | 99                         |
| 鞆嶋 有紀  | 島根大学医学部小児科学教室              |
| カスタム遺伝子パネルを用いた小児頭蓋咽頭腫の分子プロファイル解析 .....                           | 101                        |
| 藤尾 信吾  | 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学     |

|   |                          |
|---|--------------------------|
| 本邦における単一遺伝子異常による小児肥満の成因、診断、治療に関する研究 ..... | 103                      |
| 森 潤                                       | 大阪市立総合医療センター小児代謝内分泌・腎臓内科 |

## ノルディサイエンス研究報告

---

|  |              |
|--|--------------|
| AYA 世代の成人成長ホルモン分泌不全症における weekly GH 製剤の至適投与量についての検討 ..... | 105          |
| 市橋 洋輔  | 慶應義塾大学医学部小児科 |

|   |                  |
|---|------------------|
| Sparsely granulated type の病理型を示す GH 産生下垂体腫瘍における $\beta$ カテニンの細胞内局在と新規治療法の開発 ..... | 107              |
| 亀田 啓  | 北海道大学病院糖尿病・内分泌内科 |

## 2023 年度分

## 指定課題研究報告

---

|                                |                         |
|--------------------------------|-------------------------|
| 成長ホルモン及び IGF- I 測定に関する研究 ..... | 111                     |
| 主任研究者 安藏 慎                     | 東京都立大塚病院（現：聖マリアンナ医科大学）  |
| 共同研究者 島津 章                     | 淡海医療センター／国立病院機構京都医療センター |
| 勝又 規行                          | 国立成育医療研究センター研究所         |
| 肥塚 直美                          | 東京女子医科大学                |
| 堀川 玲子                          | 国立成育医療研究センター            |
| 横谷 進                           | 福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター |
| 望月 貴博                          | 希望の森成長発達クリニック           |
| 金本 巨哲                          | 大阪市立総合医療センター            |
| 福田 いずみ                         | 日本医科大学大学院医学研究科          |

## FGHR 臨床研究報告

---

|                                       |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| 胎盤・臍帯血中の IGF signaling の調節機構の解明 ..... | 113               |
| 藤本 正伸                                 | 鳥取大学医学部周産期・小児医学分野 |

## ノルディサイエンス研究報告

---

|                                |                                |
|--------------------------------|--------------------------------|
| 小児腎不全者の成長ホルモン注射の使用実態と使用量 ..... | 115                            |
| 幡谷 浩史                          | 東京都立小児総合医療センター総合診療科腎臓・リウマチ膠原病科 |

# 自由課題研究報告

## ターナー症候群と発達障碍児の視機能と視覚認知を含む脳・認知機能の検討 －質問表による早期発見と訓練・継続的な教育・就労支援の検討－

荒木 久美子

秋山成長クリニック

稲田 勤

高知リハビリテーション専門職大学言語療法学科

望月 貴博、西垣 五月

希望の森成長発達クリニック

荒木 まり子

高知大学医学部小児思春期医学

間部 裕代

間部病院小児科

### 緒言

ターナー症候群は、知的発育は概ね正常とされるが、視覚認知障害や相貌認識障害などの非言語性学習障害があり、学習や社会適応など多岐にわたる社会心理学的な問題を持つことが多いとされる<sup>1)4)</sup>。一方、発達障碍のある小児では、視覚関連の機能低下があり、学習や運動などに問題をきたすことがあると報告されている<sup>5),6)</sup>。

私たちは、昨年度の本研究で、ターナー症候群の視覚認知障害や学習障害を早期に発見する目的で簡便な質問表を作成して障害の早期発見や訓練成果の評価に有用であることを報告した<sup>7)</sup>。今年度は、昨年度作成した質問表を利用して発達障碍児の評価を行い、その結果を神経心理学的検査と比較検討し、さらに昨年度報告のターナー症候群の結果<sup>7)</sup>とも比較検討したので報告する。

### 対象と方法

対象は、8歳から14歳の男女17人である(表1)。基礎疾患は思春期早発症、成長ホルモン分泌不全性低身長症、夜尿症などの内分泌関連疾患があり、起立性調節障害や自閉症スペクトラム障害(ASD)、注意欠陥多動性障害(ADHD)、境界域知的障害などを合併していた。症例1と症例13、症例16の3人を除いた14人が内分泌疾患の治療を受けており、症例9と症例12がADHDの治療を受けていたが、全例が学習や人間関係などに問題を抱えていた。思春期については、発来していないか、リュープリン治療で抑制されている状況であった。

母親が患者について、表2のターナー女性の視覚認知機能と目と手の協調性のチェックリスト(チェックリスト)を記入し、結果をスコアで評価した(スコアが高いほど能力が低い)。チェックリストの項目は、Q1-4が文字の視覚認知能力、Q5-7が書字能力、Q8-9が算数の視覚認知能力、Q10-11がプランニング能力、Q12-14が手指の器用さ、Q15-16が対人関係能力を示し、「全くない」をスコア0、「ごくまれにある」をスコア1、「ときどきある」をスコア2、「しばしばある」をスコア

ア3、「いつもある」をスコア4として評価した。

次に、神経心理学的検査として Wechsler Intelligence Scale for Children- Fourth Edition (WISC- IV)<sup>8)</sup>、あるいは Wechsler Intelligence Scale for Children-Fifth Edition (WISC- V)<sup>9)</sup> を実施して群指数と全検査IQを評価し、これらの検査結果をチェックリストの評価と比較検討した。なお、WISC- IVとWISC- Vは、心理検査の指標に多少の差があるため共通項目のみを記載した。視覚認知機能は群指数の知覚推理の合成得点および下位項目の積木模様と行列推理の評価点から評価した<sup>10)</sup>。

さらに、これらの結果を、昨年度報告<sup>7)</sup>したターナー症候群21人の結果と比較検討するとともに、ターナー症候群患者の健常な姉妹9人のデータを対照群として比較検討を行った。また、自宅で数年間の視覚認知機能訓練<sup>11)</sup>を行った症例1と症例9、症例10、症例16については、訓練開始前と終了後のチェックリストの評価と神経心理学的検査を行い、訓練効果を検討した。さらに、発達障害児とターナー症候群との訓練効果を比較検討するために、チェックリストのスコアや神経心理学的検査結果の訓練による変化量を検討した。

統計分析はT検定を行い、ピアソンの積率相関係数を算出した。

## 結果

### 1. チェックリストと神経心理学的検査の検討

患者のチェックリストの項目別スコアを表3に示した。患者群は文字の視覚認知スコアが他のすべてのスコアより有意に（それぞれ  $p<0.05$ 、 $p<0.001$ 、 $p<0.001$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.001$ ）に高かった。対照群との比較では、患者群の年齢は有意（ $p<0.001$ ）に低かったが、文字の視覚認知スコア、書字スコアと算数の視覚認知スコアおよび合計スコアが有意（それぞれ  $p<0.001$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ ）に高かった（表4）。

対照群の平均+2標準偏差（M+2SD）を超えるスコア高値の患者の出現率は、合計スコアが76%と最も高く、次いで文字の視覚認知スコアと書字スコアが65%と高く、算数の視覚認知スコア53%、プランニングスコア41%、手指の器用さスコアと対人関係スコアがそれぞれ24%であった（表5）。次に、患者の合計スコアが対照群のM+2SDである15で分けた2群の比較では、合計スコアが15未満の群4人（24%）は15以上の群13人（76%）より文字の視覚認知スコアと合計スコアが有意（それぞれ  $p<0.01$ 、 $p<0.05$ ）に低かった。また、合計スコアが15以上の群では文字の視覚認知スコアが他のすべてのスコアより有意に（それぞれ  $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.001$ ）に高かった（表6）。

表7に17人の神経心理学的検査結果を示した。症例13と症例14を除いた15人に視覚認知機能の低下が認められた。群指数や全検査IQは、症例3と症例11、症例15が全体としてやや低下していたが、他の14人はおおむね正常で、群指数の明らかな差は認められなかった。表8に患者の合計スコアが対照群のM+2SDである15で分けた2群の心理検査結果の比較を示した。合計スコアが15未満の群と15以上の群は、心理検査の群指数や全検査IQに有意な差は認められなかった。

17人のチェックリストの合計スコア、文字の視覚認知スコアと群指数および全検査IQとの相関係数を表9に示したが、強い相関は認められなかった。

## 2. 4人の視覚認知機能訓練によるチェックリストと神経心理学的検査の推移

自宅での数年間の訓練を行った4人の訓練前後のチェックリストの項目別スコアの推移を表10に示した。症例1のプランニングスコアと手先の器用さスコア、対人関係スコアと症例16の手先の器用さスコア、対人関係スコアを除いて、訓練前はほぼすべての項目のスコアが高く、合計スコアは4人とも15以上であった。また、文字の視覚認知スコアは他のすべての項目より有意に高値（それぞれ  $p<0.01$ 、 $p<0.001$ 、 $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ）であった。訓練によりほぼすべてのスコアが低下し、文字の視覚認知スコアと書字スコアおよび算数の視覚認知スコア、合計スコアについては有意（それぞれ  $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ ）に低下したが、合計スコアについては症例9が15以上であった。

表11に訓練による神経心理学的検査結果の推移を示した。訓練前は、ワーキングメモリーや全検査IQがやや低い傾向が認められた。訓練によりほぼすべての群指数と全検査IQが向上する傾向が認められたが、有意差は認められなかった。

表12に4人の訓練前後のチェックリストの合計スコアや文字の視覚認知スコアと群指数および全検査IQとの相関係数を示した。合計スコアと知覚推理や処理速度との相関係数は低かったが、言語理解やワーキングメモリー、全検査IQとの相関係数はやや高かった。また、文字の視覚認知スコアと処理速度との相関係数は低かったが、言語理解や知覚推理、ワーキングメモリー、全検査IQとの相関係数はやや高かった。

## 3. 発達障害児とターナー症候群の比較

表13に発達障害児とターナー症候群のチェックリストの項目の比較を示した。発達障害児はターナー症候群より年齢は有意（ $p<0.01$ ）に若く、文字の視覚認知スコアは有意（ $p<0.01$ ）に高かったが、神経心理学的検査結果には明らかな差は認められなかった（表14）。また、チェックリストの合計スコアと神経心理学的検査結果の群指数及び全検査IQとの相関係数の比較では、発達障害児の相関係数は弱かったが、ターナー症候群では言語理解を除いた他の群指数および全検査IQとの相関係数はやや強く、処理速度とは有意の相関（ $p<0.05$ ）が認められた（表15）。

表16と表17に視覚認知機能訓練による発達障害児とターナー症候群の訓練開始前後のチェックリストの各項目のスコアと神経心理学的検査結果を示した。発達障害児のチェックリストについては、訓練開始前は文字の視覚認知スコアが他のすべてのスコアより有意（それぞれ  $p<0.01$ 、 $p<0.001$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.01$ ）に高かったが、訓練により文字の視覚認知スコア、書字スコアと算数の視覚認知スコアおよび合計スコアが有意（それぞれ  $p<0.01$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ 、 $p<0.05$ ）に低下した。ターナー症候群は、訓練前は明らかな差はなかったが、訓練により対人関係スコアが有意（ $p<0.05$ ）に低下した。神経心理学的検査結果については、発達障害児は訓練前の群指数の明らかな差はなく、訓練により群指数は全体的に向上したが、有意差は認められなかった。ターナー症候群は、訓練前は言語理解が知覚推理や処理速度より有意（それぞれ  $p<0.05$ 、 $p<0.05$ ）に高く、訓練により知覚推理が有意（ $p<0.05$ ）に向上した。

発達障害児とターナー症候群の訓練開始前後のスコアの変化量（訓練開始時のスコアから終了時のスコアを引いた値）の比較では、チェックリストの各項目の変化量に明らかな差は認められなかつ

た（表 18）。神経心理学的検査の群指数と全検査 IQ の変化量（訓練終了時の合成得点から開始時時の合成得点を引いた値）については、発達障害児はターナー症候群より言語理解やワーキングメモリーが高い傾向を示したが、知覚推理は有意（ $p < 0.05$ ）に低かった（表 19）。表 20 に視覚認知機能訓練前後の発達障害児とターナー症候群のチェックリストの合計スコアと群指数および全検査 IQ との相関係数を示した。発達障害児はターナー症候群より言語理解やワーキングメモリーの相関がやや強い傾向を示したが、明らかな差は認められなかった。

## 考察

発達障害児は視覚関連の機能低下があり、学習や運動などに問題を示すことがあるとされる<sup>5), 6)</sup>。特に、学習障害や ADHD、高機能自閉症などの発達障害のある小児では、これらの問題の頻度が高いことが知られている<sup>5)</sup>。視覚認知機能は外界の視覚情報を取り入れて弁別し、それらの情報を過去の経験に照らして解釈して運動機能へと伝える力<sup>12)</sup>とされており、この障害は見間違いや細部の見落とし、近くのものを見る作業で目が疲れやすいなどのさまざまな症状<sup>5)</sup>の要因の一つとされる。小児の視覚認知機能の評価には学童期用視覚関連症状チェックリスト<sup>5)</sup>や WAVES<sup>13)</sup>、Test of Visual Perceptual Skills 検査（TVPS 検査）<sup>14)</sup>などが使用されている。しかし、費用が高く、実施できる機関が限られていることから、実際には、検査を受けることができるのは限られた人のみである。

私たちは、昨年度の本研究で、ターナー症候群の視覚認知障害や学習障害を早期に発見する目的で簡便なチェックリストを作成して、視覚認知障害の早期発見や訓練成果の評価に有用であることを報告した<sup>7)</sup>。今年度は、昨年度作成したチェックリストを利用して発達障害児の評価を行い、その結果を神経心理学的検査と比較検討した。さらにターナー症候群や健常者であるその姉妹の対照群の結果とも比較検討し、その中の 4 人に視覚認知機能訓練を行い、訓練効果を評価した。

本研究の発達障害児のチェックリストの検討では、患者群では文字の視覚認知スコアが他のスコアより明らかに高いことが特徴であった。また、すべての項目で対照群よりスコアが高い傾向を示し、特に文字の視覚認知スコアや書字スコア、算数の視覚認知スコアが明らかに高値であった。また、合計スコアの検討では対照群の  $M + 2SD$  を超える群が超えない群より明らかに多く（約 76%）、超えない群では対照群との差が認められなかったが、超える群では文字の視覚認知スコアが明らかに高かった。このことから、発達障害児は視覚認知障害が多く、特に文字の視覚認知機能が低下していることが推測された。

神経心理学的検査については、発達障害児は視覚認知機能の低下が多いが、群指数の明らかな差は認められなかった。また、チェックリストの合計スコアが 15 以上の症例は、15 未満の症例よりワーキングメモリーがやや低い傾向が認められた。しかし、合計スコアや文字の視覚認知スコアは群指数との相関が認められなかった。この結果から、神経心理学的検査においても、発達障害児は視覚認知機能の低下が多いことが推測された。

次に、視覚認知機能訓練を行った 4 人の検討では、症例 1 と症例 9 の訓練期間は 1 年間で、比較的集中して実施できたが、症例 10 と症例 16 については数年間と長く、この間の訓練は不規則で、最終の 1 年間のみ比較的集中して実施できていた。チェックリストでは訓練により各項目のスコア

が低下し、文字の視覚認知スコアや書字スコア、算数の視覚認知スコアが著明に低下した。また、訓練開始前に認められた文字の視覚認知スコアの明らかな高値が訓練により低下し、他のスコアとの差がみられなくなった。神経心理学的検査では、訓練により群指数や全検査IQが高くなったが、有意差は認められなかった。4人の訓練前後のチェックリストの合計スコアや文字の視覚認知スコアは、言語理解や全検査IQとの相関がやや強かった。この検討では4人の訓練前後の合計8回の評価である点が上記の17人の検討とはやや異なるが、訓練効果を評価していく上では、チェックリストは言語理解を反映している可能性が考えられた。

以上の結果から、発達障害児では文字の視覚認知機能が明らかに低下しており、視覚認知機能の低下も認められたが、チェックリストのスコアと神経心理学的検査結果の相関は認められなかった。しかし、視覚認知機能訓練を行った4例では、チェックリストで低下していた文字の視覚認知機能などが明らかに向上し、神経心理学的検査でもすべての項目で改善が認められ、チェックリストと群指数との相関も訓練前より強かった。このことから、発達障害児では、学習、特に文字に関する視覚認知機能が低下しているが、訓練により改善が認められること、またチェックリストにより文字の視覚認知機能の低下を見出すことはできるが神経心理学的検査との明らかな相関はなく、訓練効果を判定することについてのみ利用できると考えられた。

次に、発達障害児とターナー症候群の比較では、発達障害児で文字の視覚認知機能が明らかに低下していること、しかし、神経心理学的検査の群指数では差が認められないこと、ターナー症候群ではチェックリストと処理速度が有意に相関するが、発達障害児では認められないことが判明した。しかし、視覚認知機能訓練は双方に一定の効果があり、知覚推理についてはターナー症候群が発達障害児より訓練の効果があること、双方とも訓練によりチェックリストのスコアと群指数との相関が訓練前より強くなることが判明した。この結果から、発達障害児は特に文字の視覚認知機能が低下しており、訓練で向上すること、また、チェックリストは訓練効果の判定に有用であることが推察された。一方、ターナー症候群は視覚認知機能が低下しているが、視覚認知機能訓練で著しく向上し、チェックリストは訓練効果の判定に有用であることが推察された。

これらの結果から、このチェックリストはターナー症候群だけではなく、発達障害児にも有用で、特に視覚認知機能訓練の成果を評価するのに適していることや、訓練は双方に一定の効果があることが判明したと考えられた。しかしながらターナー症候群とは異なり、発達障害児は精神的に不安定なことが多いので、訓練を開始できないことや、開始できても継続することが困難なことも多いのが実情である。家族や学校の協力を得ながら、その小児に適した訓練メニューを選択することが重要なことは明らかであるが、訓練を継続している努力を誉めて、字がきれいに書けたり、数字のミスが減るなど、実際の訓練効果を患者自身やご家族に確かめてもらうことも必要と思われた。

このチェックリストの問題点として、信頼性や妥当性についての十分な検証ができていないこと、実施人数が少ないこと、母親による主体的な評価のため客観性に欠ける点があること、学業に関する質問が多いため低年齢の小児では使いにくいことが考えられた。

今回の検討から、発達障害児が学習などで困った際には心理社会的な検査を受けることが重要であるが、チェックリストは視覚認知機能の評価や訓練効果の判定に有用である可能性が考えられた。

しかし、チェックリストの使用には一定の制限があり、今後は信頼性・妥当性の検証を行うとともに、市販のゲームやアプリも使用して、自宅で簡単にできる効果的な訓練方法に模索していく予定である。

## 文献

1. Bondy CA. Care of girls and women with Turner Syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *J Clin Endocrinol Metab* 92:10-25, 2007.
2. Davenport ML. Approach to the patient with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 1487-1495, 2010.
3. Gravholt CH, Anderson NH, Conway GS, et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol* 177:G1-G70, 2017.
4. Gravholt CH, Anderson NH, Christin-Maitre S, et al. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: Proceedings from the 2023 Aarhus International Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol* 190:G53-G151, 2024.
5. 奥村智人, 三浦朋子, 中西誠, 他.: 学童期用視覚関連症状チェックリストの作成. *脳と発達* 45: 360-365, 2013.
6. 特異的発達障害の臨床診断と治療指針作成に関する研究チーム編集. 稲垣真澄編集代表. 特異的発達障害 診断・治療のための実践ガイドライン－わかりやすい診断手順と支援の実際. 東京: 診断と治療社. 2010.
7. 荒木久美子, 他.: ターナー症候群の視機能と視覚認知を含む脳・認知機能の検討－早期発見のための質問表や訓練作成と継続的な教育・就労支援の検討－. 成長科学協会研究年報 2024. 掲載予定.
8. Wechsler, D. 日本版 WISC -IV 知能検査. 東京: 日本文化科学社. 2010.
9. Wechsler, D. 日本版 WISC -V 知能検査. 東京: 日本文化科学社. 2022.
10. 荒木久美子.: ターナー症候群 4 例の空間認知障害と言語聴覚療法の検討. *ホルモンと臨床* 55: 1197-1203, 2007.
11. 荒木久美子, 稲田勤.: ターナー症候群のお子様のためのトレーニングキット (基礎編). 株式会社 メディカルトリビューン. 東京, 2012.
12. 川端秀仁.: 視覚の発達について. *OCULISTA* 7: 9-18, 2016.
13. 竹田契一.: 見る力を育てるビジョン・アセスメント W A V E S . 東京: 株式会社 学研教育みらい. 2014.
14. 永松裕希, 松川南海子, 大井真美子.: 学校の中の発達性協調運動障害について－視覚効率から見た読みの問題－. *The Annual Report of Educational Psychology in Japan* 43:166-175, 2004.

表1 患者の臨床像

| 項目   | 症例1                                | 症例2                       | 症例3                       | 症例4            | 症例5                       | 症例6                            | 症例7                               | 症例8          | 症例9                     | 症例10                             | 症例11            | 症例12                    | 症例13                            | 症例14             | 症例15                             | 症例16                     | 症例17           |              |              |
|------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|---------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------|---------------------------------|------------------|----------------------------------|--------------------------|----------------|--------------|--------------|
|      | 男<br>6歳                            | 男<br>10歳                  | 男<br>11歳                  | 男<br>11歳       | 男<br>12歳                  | 男<br>12歳                       | 男<br>12歳                          | 男<br>13歳     | 男<br>13歳                | 男<br>14歳                         | 女<br>8歳         | 女<br>9歳                 | 女<br>9歳                         | 女<br>9歳          | 女<br>9歳                          | 女<br>11歳                 | 女<br>11歳       |              |              |
| 病名   | 低身長、<br>夜尿症                        | 夜尿症/<br>OD、不安<br>症        | 思春期早発<br>症/ASD、境<br>界域的障害 | 思春期早発<br>症/ASD | 思春期早発<br>症/ASD、境<br>界域的障害 | 思春期早発<br>症、引退<br>/ADHD、<br>ASD | GHD/OD、<br>不登校・暴<br>力・被害<br>妄想    | GHD<br>/ADHD | 思春期早発<br>症、肥満症<br>/ADHD | 思春期早発<br>症/OD、<br>ASD、境界<br>域的障害 | 思春期早発<br>症/字詞障害 | 思春期早発<br>症/ADHD、<br>ASD | 低身長<br>/ADHD、<br>ASD、境界<br>域的障害 | GHD<br>/ADHD     | 思春期早発<br>症/OD、<br>ASD、境界<br>域的障害 | 高身長、肥<br>満症/OD、<br>不登校   | 夜尿症<br>/過広障害   |              |              |
| 治療   | なし                                 | ニリソール/<br>メトラン            | リコーリン                     | リコーリン          | リコーリン                     | リコーリン                          | GH/メトラン                           | GH/メトラン      | リコーリン/<br>メトラン          | リコーリン/<br>メトラン                   | リコーリン           | リコーリン/<br>メトラン          | なし                              | GH               | リコーリン/<br>メトラン                   | なし (小2-4<br>年生でメト<br>ラン) | ニリソール/<br>メトラン |              |              |
| 学業   | ふつ                                 | 不登校                       | 支援級                       | 支援級            | 支援級                       | 小5不登校                          | 不登校                               | 支援級          | 支援級                     | 通級                               | 通級予定            | ふつ                      | 人間関係で<br>トラブルが多い                | 人間関係で<br>トラブルが多い | 支援級                              | やや悪い                     | 不登校            |              |              |
| 検査手帳 | B2                                 |                           | B2                        |                | B2                        | B2                             |                                   |              | B2                      | B2                               |                 | B2                      |                                 |                  | B2                               |                          |                |              |              |
| 特徴   | 食事のこぼ<br>りが強い、漢<br>字や文章、小<br>数点が苦手 | 書き取りはで<br>きる、算数が<br>わからない | 文字は読ま<br>れるが、読み<br>方が遅い   | 国語・英語が<br>苦手   | パソコン障害                    | 小児精神科<br>で薬物治療<br>効果なし         | ごまめが強く<br>勉強がでさな<br>い、薬物治療<br>は拒否 | 板書・漢字が<br>苦手 | 漢字・算数が<br>苦手            | 鉛筆・漢字が<br>苦手                     | 漢字・算数が<br>苦手    | 鉛筆・漢字が<br>苦手            | 漢字・算数が<br>苦手                    | 漢字・算数が<br>苦手     | 漢字・算数が<br>苦手                     | 漢字・算数が<br>苦手             | 漢字・算数が<br>苦手   | 漢字・算数が<br>苦手 | 漢字・算数が<br>苦手 |

GHD: 成長ホルモン分泌不全性低身長症 GH: 成長ホルモン OD: 起立性調節障害 ASD: 自閉症スペクトラム障害 ADHD: 注意欠陥多動性障害

表2 ターナー女性の視覚認知機能と目と手の協調性のチェックリスト

|                       | 全くない                     | ごくまれにある                  | ときどきある                   | しばしばある                   | いつもある                    |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Q1 漢字が覚えられない          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q2 漢字の小さい点や線をまちがえる    | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q3 文章の句読点をまちがえる       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q4 文章の読みまちがえや読みとばしが多い | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q5 字を書くのに時間がかかる       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q6 字をきれいに書けない         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q7 黒板の書き写しに時間がかかる     | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q8 小数点や桁をまちがえる        | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q9 図表をまちがえる           | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q10 片付けや整理に時間がかかる     | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q11 料理の手順がわからない       | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q12 タオルをたたむとき端がそろわない  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q13 ひもを結ぶのが苦手         | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q14 裁縫や手芸が苦手          | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q15 人の行動を見て真似ることが苦手   | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Q16 人の話を聞いて理解することが苦手  | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Q1-4: 文字の視覚認知能力 Q5-7: 書字能力 Q8-9: 算数の視覚認知能力 Q10-11: プランニング能力 Q12-14: 手指の器用さ Q15-16: 対人関係能力 全くない: スコア0 ごくまれにある: スコア1 ときどきある: スコア2 しばしばある: スコア3 いつもある: スコア4

表3 患者のチェックリストの項目別スコア

| 項目          | 症例1     | 症例2      | 症例3      | 症例4      | 症例5      | 症例6      | 症例7      | 症例8      | 症例9      | 症例10     | 症例11    | 症例12    | 症例13    | 症例14    | 症例15    | 症例16     | 症例17     | M±SD      |
|-------------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|-----------|
|             | 男<br>8歳 | 男<br>10歳 | 男<br>11歳 | 男<br>11歳 | 男<br>12歳 | 男<br>12歳 | 男<br>12歳 | 男<br>13歳 | 男<br>13歳 | 男<br>14歳 | 女<br>8歳 | 女<br>9歳 | 女<br>9歳 | 女<br>9歳 | 女<br>9歳 | 女<br>11歳 | 女<br>11歳 |           |
| 文字の視知覚認知スコア | 10      | 2        | 2        | 11       | 9        | 12       | 3        | 13       | 13       | 1        | 15      | 7       | 7       | 10      | 11      | 1        | 1        | 10.7±1.8  |
| 書字スコア       | 5       | 0        | 1        | 3        | 4        | 12       | 2        | 5        | 8        | 3        | 5       | 3       | 5       | 1       | 8       | 1        | 1        | 3.9±3.2   |
| 算数の視知覚認知スコア | 4       | 4        | 3        | 0        | 3        | 8        | 0        | 2        | 5        | 2        | 3       | 1       | 3       | 4       | 1       | 1        | 2        | 2.7±2.0   |
| プランニングスコア   | 2       | 4        | 1        | 0        | 4        | 4        | 4        | 1        | 8        | 2        | 4       | 3       | 3       | 0       | 1       | 1        | 4        | 2.7±2.0   |
| 手先の器用さスコア   | 3       | 7        | 1        | 0        | 7        | 11       | 0        | 2        | 8        | 1        | 3       | 0       | 1       | 3       | 2       | 0        | 4        | 3.1±3.3   |
| 対人関係スコア     | 2       | 0        | 3        | 5        | 4        | 4        | 1        | 0        | 6        | 1        | 2       | 3       | 0       | 2       | 1       | 1        | 3        | 2.2±1.8   |
| 合計スコア       | 26      | 17       | 11       | 19       | 31       | 51       | 10       | 23       | 48       | 10       | 32      | 17      | 19      | 20      | 24      | 5        | 15       | 22.2±12.6 |

表4 患者群と対照群のチェックリストの項目別スコアの比較

| 項目          | 患者群       | 対照群      | 有意差     |
|-------------|-----------|----------|---------|
| 年齢（歳）       | 10.7±1.8  | 15.2±4.1 | p<0.001 |
| 文字の視知覚認知スコア | 7.5±4.9   | 1.0±1.2  | p<0.001 |
| 書字スコア       | 3.9±3.2   | 0.6±0.9  | p<0.01  |
| 算数の視知覚認知スコア | 2.7±2.0   | 0.4±0.9  | p<0.01  |
| プランニングスコア   | 2.7±2.0   | 1.3±1.3  | NS      |
| 手指の器用さスコア   | 3.1±3.3   | 1.1±1.9  | NS      |
| 対人関係スコア     | 2.2±1.8   | 0.9±1.5  | NS      |
| 合計スコア       | 22.2±12.6 | 5.3±4.8  | p<0.001 |

\* : P<0.05 \*\* : P<0.01 \*\*\* : P<0.001 NS:Not Significant

表5 対照群の2SDを超えるスコア高値の患者の検討

| チェックリストの項目  | 対照群のM+2SD | 対照群のM+2SDを超える患者数 |
|-------------|-----------|------------------|
| 文字の視知覚認知スコア | 3.4       | 11人 (65%)        |
| 書字スコア       | 2.4       | 11人 (65%)        |
| 算数の視知覚認知スコア | 2.2       | 9人 (53%)         |
| プランニングスコア   | 3.9       | 7人 (41%)         |
| 手指の器用さスコア   | 4.9       | 4人 (24%)         |
| 対人関係スコア     | 3.9       | 4人 (24%)         |
| 合計スコア       | 14.9      | 13人 (76%)        |

M+2SD: 平均 +2 標準偏差

表6 チェックリストの合計スコアによる患者の比較

| 合計スコア       | <15 (n=4) | ≤15 (n=13) | 有意差    |
|-------------|-----------|------------|--------|
| 年齢 (歳)      | 12.0±1.4  | 10.3±1.8   | NS     |
| 文字の視知覚認知スコア | 1.8±1.0   | 9.3±4.2    | p<0.01 |
| 書字スコア       | 1.8±1.0   | 4.6±3.3    |        |
| 算数の視知覚認知スコア | 1.5±1.3   | 3.1±2.1    | NS     |
| プランニングスコア   | 2.0±1.4   | 2.9±2.2    |        |
| 手先の器用さスコア   | 0.5±0.6   | 3.9±3.4    | NS     |
| 対人関係スコア     | 1.5±1.0   | 2.5±1.9    |        |
| 合計スコア       | 9.0±2.7   | 26.3±11.5  | P<0.05 |

\* : P<0.01 \*\* : P<0.001 NS:Not Significant

表7 神経心理学的検査結果

| 症例           | 症例1<br>男<br>8歳                 | 症例2<br>男<br>10歳 | 症例3<br>男<br>11歳 | 症例4<br>男<br>11歳 | 症例5<br>男<br>12歳 | 症例6<br>男<br>12歳 | 症例7<br>男<br>12歳 | 症例8<br>男<br>13歳 | 症例9<br>男<br>13歳 | 症例10<br>男<br>14歳 | 症例11<br>女<br>8歳 | 症例12<br>女<br>9歳 | 症例13<br>女<br>9歳 | 症例14<br>女<br>9歳 | 症例15<br>女<br>9歳 | 症例16<br>女<br>11歳 | 症例17<br>女<br>11歳 | M±SD<br>10.7±1.8 |  |
|--------------|--------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|--|
| 心理検査         | WISC-IV                        |                 |                 |                 |                 |                 |                 | WISC-V          | WISC-IV         |                  |                 |                 |                 |                 |                 | WISC-V           |                  |                  |  |
| 言語理解         | 類似<br>単語<br>理解<br>(知識)         | 12              | 13              | 9               | 7               | 9               | 11              | 14              | 11              | 11               | 13              | 5*              | 7               | 9               | 14              | 8                | 9                | 11               |  |
|              | 理解<br>(語の推理)                   | 11              | 15              | 6*              | 5*              | 7               | 13              | 12              | 11              | 10               | 5*              | 7               | 10              | 6*              | 12              | 10               | 7                | 14               |  |
|              |                                | 8               | 11              | 7               | 7               | 10              | 13              | 16              |                 | 9                | 18              | 8               | 6*              | 7               | 16              | 9                | 10               |                  |  |
|              |                                |                 |                 | 5*              |                 |                 |                 |                 |                 |                  |                 |                 | 11              |                 |                 |                  |                  | 10               |  |
| 知覚推理         | 積木模様<br>絵の概念<br>行列推理<br>(絵の完成) | 11              | 13              | 9               | 7               | 6*              | 10              | 8               | 8               | 10               | 7               | 8               | 12              | 10              | 12              | 7                | 6*               | 7                |  |
|              |                                | 6*              | 7               | 5*              | 11              | 6*              | 14              | 12              | 6*              | 13               | 12              | 9               | 7               | 11              | 13              | 6*               | 10               | 7                |  |
|              |                                | 7               | 11              | 4*              | 5*              | 11              | 9               | 18              | 9               | 8                | 14              | 7               | 10              | 7               | 10              | 4*               | 13               |                  |  |
| ワーキング<br>メモリ | 数唱<br>語音整理<br>(算数)             | 12              | 8               | 5*              | 10              | 9               | 8               | 5*              | 7               | 8                | 8               | 7               | 8               | 14              | 9               | 9                | 7                | 8                |  |
|              |                                | 8               | 7               | 4*              | 8               | 8               | 7               | 13              | 5*              | 10               | 16              | 4*              | 11              | 10              | 9               | 6*               | 4*               |                  |  |
| 処理速度         | 符号<br>記号探し<br>(絵の抹消)           | 14              | 8               | 7               | 8               | 6*              | 5*              | 10              | 5*              | 12               | 8               | 12              | 13              | 10              | 10              | 2*               | 12               | 8                |  |
|              |                                | 9               | 8               | 11              | 7               | 6*              | 7               | 6*              | 7               | 10               | 8               | 4*              | 12              | 9               | 9               | 7                | 8                | 6*               |  |
|              |                                | 7               |                 | 7               |                 |                 |                 |                 |                 |                  |                 |                 | 15              |                 |                 |                  |                  | 2*               |  |
| 言語理解         | 101                            | 117             | 84*             | 80*             | 91              | 113             | 123             | 106             | 99              | 111              | 80*             | 86              | 84*             | 123             | 93              | 91               | 114              | 99.8±15.0        |  |
| 知覚推理         | 87                             | 102             | 74*             | 85              | 85              | 106             | 118             | 83*             | 102             | 106              | 87              | 98              | 95              | 111             | 72*             | 98               | 86               | 93.8±12.9        |  |
| ワーキングメモリ     | 100                            | 85              | 68*             | 94              | 91              | 85              | 94              | 97              | 94              | 112              | 73*             | 97              | 112             | 94              | 85              | 73*              | 91               | 90.9±12.1        |  |
| 処理速度         | 107                            | 88              | 94              | 86              | 78*             | 78*             | 88              | 78*             | 104             | 88               | 88              | 113             | 96              | 96              | 70*             | 99               | 83*              | 90.2±11.4        |  |
| 全検査IQ        | 98                             | 100             | 76*             | 82*             | 83*             | 97              | 111             | 83*             | 100             | 107              | 78*             | 97              | 94              | 111             | 76*             | 89               | 98               | 92.9±11.6        |  |

\*: 低値を示す

表8 チェックリストの合計スコアによる患者の心理検査結果の比較

| 合計スコア    | <15 (n=4)  | ≥15 (n=13)  |
|----------|------------|-------------|
| 言語理解     | 99.0±14.7  | 102.3 ±18.0 |
| 知覚推理     | 92.2 ±11.1 | 99.0 ±18.6  |
| ワーキングメモリ | 92.2 ±9.3  | 86.8 ±20.3  |
| 処理速度     | 89.6 ±12.9 | 92.3±5.3    |
| 全検査IQ    | 92.1 ±10.5 | 95.8±16.3   |

表9 チェックリストの合計スコア、文字の視知覚認知スコアと群指数および全検査IQとの相関係数

| 項目       | 相関係数   |             |
|----------|--------|-------------|
|          | 合計スコア  | 文字の視知覚認知スコア |
| 言語理解     | -0.021 | -0.264      |
| 知覚推理     | 0.011  | -0.207      |
| ワーキングメモリ | -0.021 | 0.021       |
| 処理速度     | -0.139 | -0.133      |
| 全検査IQ    | -0.08  | -0.321      |

表10 視覚認知機能訓練による4人のチェックリストの項目別スコアの推移

| 項目          | 症例1 |     | 症例9 |     | 症例10 |     | 症例16 |     | 訓練前         | 訓練後         | 有意差      |
|-------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-------------|-------------|----------|
|             | 男   |     | 男   |     | 男    |     | 女    |     |             |             |          |
|             | 訓練前 | 訓練後 | 訓練前 | 訓練後 | 訓練前  | 訓練後 | 訓練前  | 訓練後 | M±SD        |             |          |
|             | 8歳  | 9歳  | 13歳 | 14歳 | 7歳   | 14歳 | 7歳   | 11歳 | 8.8 ± 2.9   | 12.0 ± 2.4  | NS       |
| 文字の視知覚認知スコア | 10  | 5   | 13  | 9   | 16   | 1   | 15   | 1   | 13.5 ± 2.6  | 4.0 ± 3.8   | p < 0.01 |
| 書字スコア       | 5   | 0   | 8   | 6   | 8    | 3   | 8    | 1   | 7.3 ± 1.5   | 2.5 ± 2.6   | p < 0.05 |
| 算数の視知覚認知スコア | 4   | 2   | 5   | 4   | 6    | 2   | 5    | 1   | 5.0 ± 0.8   | 2.3 ± 1.3   | p < 0.05 |
| プランニングスコア   | 2   | 2   | 8   | 6   | 8    | 2   | 5    | 1   | 5.8 ± 2.9   | 2.8 ± 2.2   | NS       |
| 手先の器用さスコア   | 3   | 3   | 8   | 5   | 12   | 1   | 0    | 0   | 5.8 ± 5.3   | 2.3 ± 2.2   | NS       |
| 対人関係スコア     | 2   | 1   | 6   | 4   | 8    | 1   | 1    | 1   | 4.3 ± 3.3   | 1.8 ± 1.5   | NS       |
| 合計スコア       | 26  | 13  | 48  | 34  | 58   | 10  | 34   | 5   | 41.5 ± 14.3 | 15.5 ± 12.8 | p < 0.05 |

\* : P<0.05 \*\* : P<0.01 \*\*\* : P<0.001 NS:Not Significant

表 11 視覚認知機能訓練による 4 人の心理検査結果の推移

| 項目       |                | 症例1 |     | 症例9 |     | 症例10 |     | 症例16 |     | 訓練前         | 訓練後          |
|----------|----------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-------------|--------------|
|          |                | 男   |     | 男   |     | 男    |     | 女    |     | M±SD        |              |
|          |                | 8歳  | 9歳  | 11歳 | 13歳 | 7歳   | 14歳 | 7歳   | 11歳 | 8.3±1.9     | 11.8±2.2     |
| 言語理解     | 類似             | 12  | 10  | 8   | 11  | 7    | 13  | 7    | 9   |             |              |
|          | 単語             | 11  | 10  | 8   | 10  | 9    | 5*  | 6*   | 7   |             |              |
|          | 理解             | 8   | 10  | 6*  | 9   | 8    | 18  | 8    | 10  |             |              |
|          | (知識)<br>(語の推理) |     |     |     |     |      |     | 6*   |     |             |              |
| 知覚推理     | 積木模様           | 11  | 12  | 5*  | 10  | 13   | 7   | 6*   | 6*  |             |              |
|          | 絵の概念           | 6*  | 10  | 15  | 13  | 11   | 12  | 9    | 10  |             |              |
|          | 行列推理           | 7   | 9   | 6*  | 8   | 9    | 14  | 8    | 13  |             |              |
|          | (絵の完成)         |     |     | 13  |     |      |     |      |     |             |              |
| ワーキングメモリ | 数唱             | 12  | 10  | 5*  | 8   | 7    | 8   | 6*   | 7   |             |              |
|          | 語音整列           | 8   | 9   | 7   | 10  |      | 16  |      | 4*  |             |              |
|          | (算数)           |     | 12  |     |     | 6*   |     | 6*   |     |             |              |
| 処理速度     | 符号             | 14  | 16  | 11  | 12  | 5*   | 8   | 9    | 12  |             |              |
|          | 記号探し           | 9   | 12  | 15  | 10  |      | 8   | 8    | 8   |             |              |
|          | (絵の抹消)         | 7   | 8   |     |     | 6*   |     |      |     |             |              |
| 言語理解     |                | 101 | 99  | 84  | 99  | 88   | 111 | 82   | 91  | 90.3 ± 9.7  | 100.0 ± 8.2  |
| 知覚推理     |                | 87  | 102 | 91  | 102 | 106  | 106 | 85   | 98  | 92.7 ± 11.6 | 102.0 ± 3.3  |
| ワーキングメモリ |                | 100 | 97  | 76* | 94  | 79*  | 112 | 76   | 73* | 85.0 ± 13.1 | 94.0 ± 16.1  |
| 処理速度     |                | 107 | 121 | 115 | 104 | 76*  | 88  | 91   | 99  | 91.3 ± 15.5 | 103.0 ± 13.7 |
| 全検査      |                | 98  | 106 | 89  | 100 | 85   | 107 | 80   | 89  | 87.7 ± 9.3  | 100.5 ± 8.3  |

\* : 低値を示す

表 12 視覚認知機能訓練前後の 4 人のチェックリストの合計スコア、文字の視覚認知スコアと群指数および全検査 IQ との相関

| 項目       | 相関係数   |            |
|----------|--------|------------|
|          | 合計スコア  | 文字の視覚認知スコア |
| 言語理解     | -0.582 | -0.683     |
| 知覚推理     | -0.121 | -0.410     |
| ワーキングメモリ | -0.424 | -0.470     |
| 処理速度     | -0.279 | -0.220     |
| 全検査IQ    | -0.558 | -0.666     |

表 13 発達障害の小児とターナー症候群のチェックリストの項目の比較

| 項目          | 発達障害(n=17) | ターナー症候群 (n=21) | 有意差    |
|-------------|------------|----------------|--------|
|             | 10.7±1.8歳  | 13.8 ± 4.4歳    | p<0.01 |
| 文字の視知覚認知スコア | 7.5±4.9    | 3.5 ± 3.3      | p<0.01 |
| 書字スコア       | 3.9±3.2    | 3.0 ± 3.7      | NS     |
| 算数の視知覚認知スコア | 2.7±2.0    | 3.0 ± 2.7      | NS     |
| プランニングスコア   | 2.7±2.0    | 3.1 ± 2.4      | NS     |
| 手先の器用さスコア   | 3.1±3.3    | 4.0 ± 4.0      | NS     |
| 対人関係スコア     | 2.2±1.8    | 2.4 ± 2.8      | NS     |
| 合計スコア       | 22.2±12.6  | 19.1 ± 16.2    | NS     |

NS:Not Significant

表 14 発達障害の小児とターナー症候群の神経心理学的検査の比較

| 項目       | 発達障害(n=17) | ターナー症候群 (n=9) | 有意差    |
|----------|------------|---------------|--------|
|          | 10.7±1.8歳  | 14.7 ± 5.6歳   | p<0.05 |
| 言語理解     | 99.8 ±15.0 | 100.8 ± 18.4  | NS     |
| 知覚推理     | 93.8 ±12.9 | 94.3 ± 17.5   | NS     |
| ワーキングメモリ | 90.9 ±12.1 | 95.4 ± 16.0   | NS     |
| 処理速度     | 90.2 ±11.4 | 93.9 ± 12.6   | NS     |
| 全検査      | 92.9 ±11.6 | 95.8 ± 16.6   | NS     |

NS:Not Significant

表 15 発達障害の小児とターナー症候群のチェックリストの合計スコアと群指数および全検査IQとの相関係数の比較

| 項目       | 発達障害(n=17) | ターナー症候群 (n=9) |
|----------|------------|---------------|
|          | 10.7±1.8歳  | 14.7 ± 5.6歳   |
| 言語理解     | -0.021     | -0.039        |
| 知覚推理     | 0.011      | -0.552        |
| ワーキングメモリ | -0.021     | -0.567        |
| 処理速度     | -0.139     | -0.777 *      |
| 全検査IQ    | -0.08      | -0.508        |

\* : P<0.05

表 16 視覚認知機能訓練開始前後の発達障害の小児とターナー症候群のチェックリストのスコア

| 項目         | 発達障害児 4人          |                    |           | ターナー症候群 3人         |                    |           |
|------------|-------------------|--------------------|-----------|--------------------|--------------------|-----------|
|            | 訓練前<br>8.8 ± 2.9歳 | 訓練後<br>12.0 ± 2.4歳 | 有意差<br>NS | 訓練前<br>14.7 ± 6.4歳 | 訓練後<br>17.0 ± 7.2歳 | 有意差<br>NS |
| 文字の視覚認知スコア | 13.5 ± 2.6        | 4.0 ± 3.8          | p < 0.01  | 11.3 ± 4.6         | 4.7 ± 0.6          | NS        |
| 書字スコア      | 7.3 ± 1.5         | 2.5 ± 2.6          | p < 0.05  | 10.3 ± 2.9         | 2.0 ± 3.5          | NS        |
| 算数の視覚認知スコア | 5.0 ± 0.8         | 2.3 ± 1.3          | p < 0.05  | 7.3 ± 0.6          | 3.3 ± 2.3          | NS        |
| プランニングスコア  | 5.8 ± 2.9         | 2.8 ± 2.2          | NS        | 7.3 ± 1.2          | 2.3 ± 2.3          | NS        |
| 手先の器用さスコア  | 5.8 ± 5.3         | 2.3 ± 2.2          | NS        | 8.7 ± 5.8          | 3.3 ± 2.9          | NS        |
| 対人関係スコア    | 4.3 ± 3.3         | 1.8 ± 1.5          | NS        | 7.3 ± 1.2          | 4.0 ± 0.0          | p < 0.05  |
| 合計スコア      | 41.5 ± 14.3       | 15.5 ± 12.8        | p < 0.05  | 52.3 ± 15.0        | 19.7 ± 4.6         | NS        |

\* : P<0.05 \*\* : P<0.01 \*\*\* : P<0.001 NS:Not Significant

表 17 視覚認知機能訓練開始前後の発達障害の小児とターナー症候群の神経心理学的検査結果

| 項目       | 発達障害児 4人    |              |     | ターナー症候群 3人   |              |          |
|----------|-------------|--------------|-----|--------------|--------------|----------|
|          | 訓練前         | 訓練後          | 有意差 | 訓練前          | 訓練後          | 有意差      |
|          | 8.3 ± 1.9   | 11.8 ± 2.2   | NS  | 14.7 ± 6.4   | 17.0 ± 7.2   | NS       |
| 言語理解     | 90.3 ± 9.7  | 100.0 ± 8.2  | NS  | 104.7 ± 11.2 | 106.0 ± 13.5 | NS       |
| 知覚推理     | 92.7 ± 11.6 | 102.0 ± 3.3  | NS  | 78.3 ± 8.1   | 103.7 ± 12.9 | p < 0.05 |
| ワーキングメモリ | 85.0 ± 13.1 | 94.0 ± 16.1  | NS  | 90.0 ± 11.4  | 92.0 ± 8.7   | NS       |
| 処理速度     | 91.3 ± 15.5 | 103.0 ± 13.7 | NS  | 75.3 ± 2.5   | 89.3 ± 9.1   | NS       |
| 全検査      | 87.7 ± 9.3  | 100.5 ± 8.3  | NS  | 86.3 ± 2.9   | 98.3 ± 8.5   | NS       |

\* : P<0.05 NS:Not Significant

表 18 視覚認知機能訓練による発達障害の小児とターナー症候群のチェックリストの各項目の変化量の比較

| 項目          | 発達障害 (n=4)  | ターナー症候群 (n=3) |
|-------------|-------------|---------------|
| 訓練終了時の年齢    | 11.8 ± 2.2  | 17.3 ± 6.8    |
| 文字の視知覚認知スコア | 9.5 ± 5.8   | 6.7 ± 4.0     |
| 書字スコア       | 4.8 ± 2.1   | 6.7 ± 5.5     |
| 算数の視知覚認知スコア | 2.8 ± 1.5   | 3.3 ± 1.5     |
| プランニングスコア   | 3.0 ± 2.6   | 4.7 ± 3.2     |
| 手先の器用さスコア   | 3.5 ± 5.2   | 5.3 ± 2.9     |
| 対人関係スコア     | 2.5 ± 3.1   | 4.0 ± 2.0     |
| 合計スコア       | 26.0 ± 16.4 | 30.7 ± 18.1   |

表 19 視覚認知機能訓練による発達障害の小児とターナー症候群の神経心理学的検査結果の変化量の比較

| 項目       | 発達障害 (n=4)  | ターナー症候群 (n=3) | 有意差      |
|----------|-------------|---------------|----------|
| 訓練終了時の年齢 | 11.8 ± 2.2  | 17.3 ± 6.8    | NS       |
| 言語理解     | 11.3 ± 10.5 | 2.7 ± 6.4     | NS       |
| 知覚推理     | 9.8 ± 6.7   | 27.3 ± 4.2    | p < 0.05 |
| ワーキングメモリ | 11.3 ± 17.6 | 4.0 ± 9.6     | NS       |
| 処理速度     | 5.8 ± 11.4  | 13.0 ± 9.8    | NS       |
| 全検査IQ    | 12.5 ± 6.5  | 13.7 ± 5.7    | NS       |

NS:Not Significant

表 20 視覚認知機能訓練前後の発達障害の小児とターナー症候群のチェックリストの合計スコアと群指数および全検査IQとの相関係数の比較

| 項目       | 発達障害 (n=4) | ターナー症候群 (n=3) |
|----------|------------|---------------|
| 言語理解     | -0.582     | -0.065        |
| 知覚推理     | -0.121     | -0.806        |
| ワーキングメモリ | -0.424     | 0.161         |
| 処理速度     | -0.279     | -0.639        |
| 全検査IQ    | -0.558     | -0.639        |

## 日本人小児の腰椎骨密度・骨質の基準値作成

池側 研人

東京都立小児総合医療センター内分泌・代謝科

### 背景

骨粗鬆症は、骨強度の低下を特徴とし、骨強度は骨密度と骨質という2つの要素から成る<sup>1)</sup>。骨密度は、骨に含まれるミネラル量を反映しており、主にDXA法で測定される<sup>1)</sup>。測定の際の被ばく量は胸部X線以下である<sup>2)</sup>。骨質は、海綿骨の微細構造を反映する指標であり<sup>1)</sup>、評価法としてはTBS (Trabecular bone score) が、近年注目されている<sup>3)</sup>。TBSは骨密度と独立した骨折の予後予測因子であること<sup>4)</sup>、骨質が低いために易骨折性を有する症例が稀ではないことから、骨密度のみならずTBSも評価することが必要であると考えられており<sup>4)</sup>、国内外の臨床現場で広く普及している。

骨密度、骨質の評価が重要であると考えられる一方で、日本人小児腰椎骨密度及びTBSの基準値は限られている<sup>5)</sup>。骨密度に関しては、6歳未満のデータが存在せず、その他の年齢に関しても症例数が少ない<sup>5)</sup>。TBSに関しては、日本人小児の報告はない。骨密度、TBSには人種差があることが知られており、日本人の基準値を作成することが必要である<sup>6)</sup>。

### 目的

日本人小児腰椎骨密度及びTBSの性別・年齢別基準値を作成し、骨密度・骨質の正確な評価を可能にする。

### 方法

本研究は、0歳から18歳までの小児を対象とした。症例は、無症候性血尿、縫合を要する外傷（抜糸時）、尿路感染症、停留精巣のために当院を受診した小児や院内職員の子供のうち研究参加に同意が得られたものを対象とした。被験者の来院等の負担軽減のため、負担軽減費（2,000円）を提供した。骨密度・骨質（TBS）の測定には、国内の多くの施設で用いられているHOLOGIC社のHorizonを用いた。本機器では、臥位にて2-3分で測定可能であり、放射線被ばくも最小限であった。

### 結果

2025年1月27日から2025年4月18日までの間に、小児48名（男児33名、女児15名）の骨密度・骨質検査を実施した。男女ともに年齢が上がるにつれて骨密度が上昇傾向であった。また、思春期年齢以降では、骨密度の上昇が顕著であった。骨質（TBS）についても年齢が上がるにつれて上昇傾向であった。

図1 日本人健常小児の骨密度

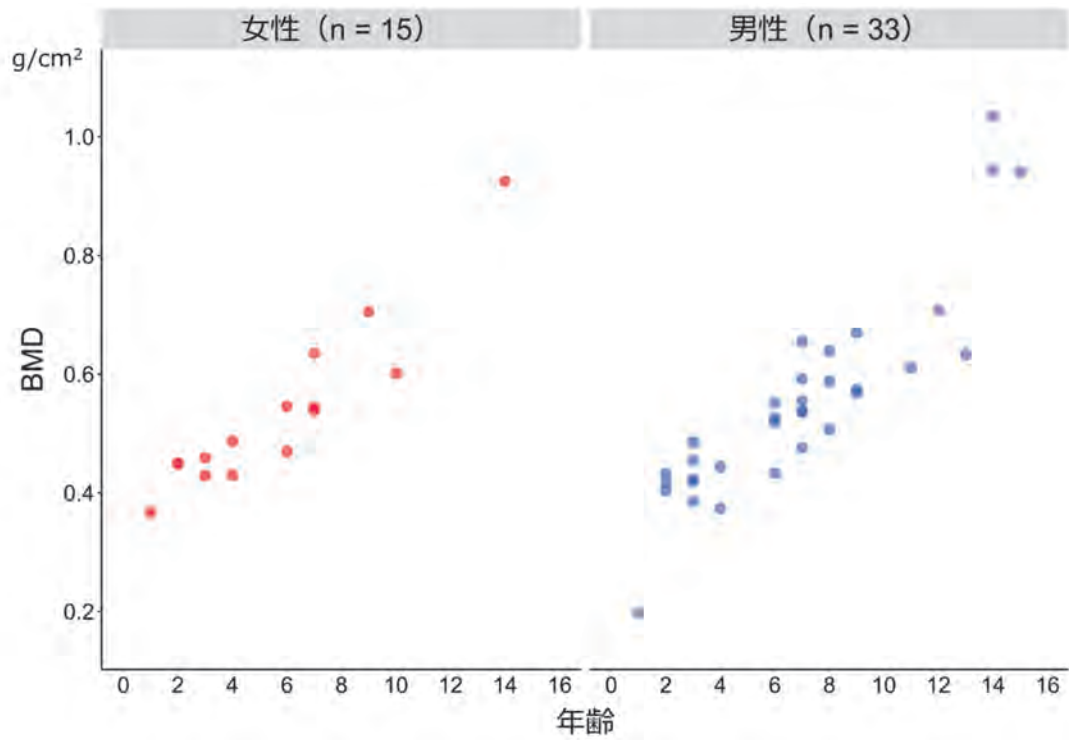
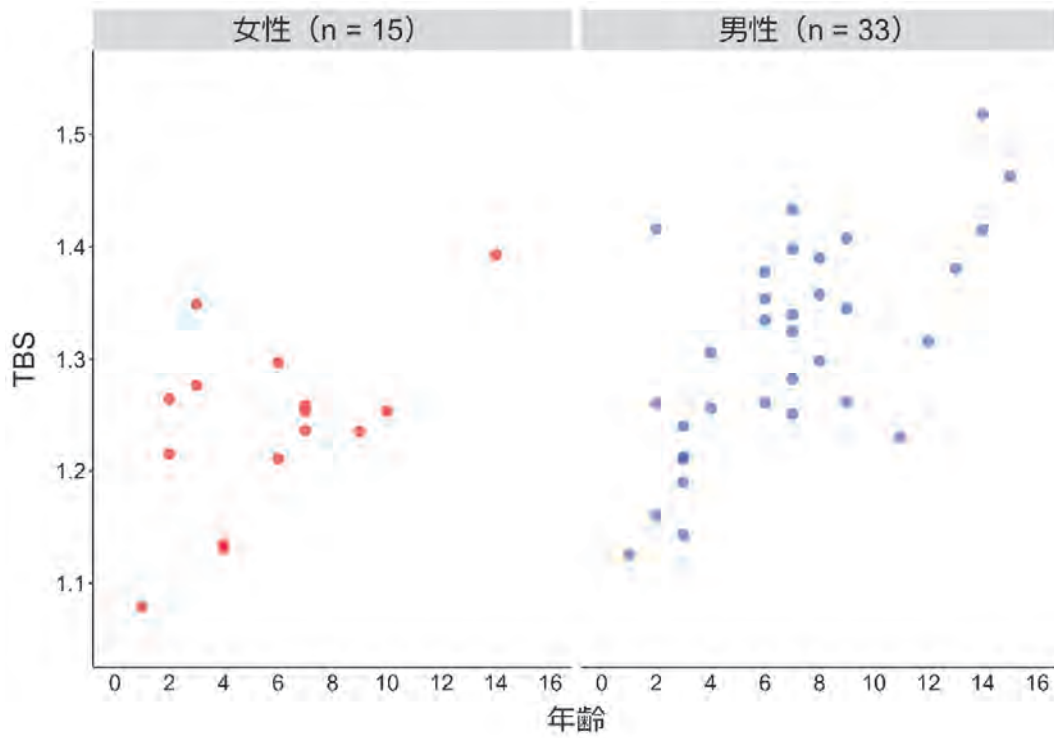


図2 日本人健常小児のTBS



## 考察

現時点での結果において、日本人小児の骨密度は、国内の既報や海外の既報と同様の傾向を示した<sup>5),7)</sup>。また、骨質（TBS）についても、海外と同様の傾向を示した。今後、目標症例数である760名を目指して症例数を増やし、精度の高い基準値作成を行う予定である。

## 参考文献

1. 日本骨代謝学会編集. 骨ペディア. 羊土社.
2. 福永仁夫. 図説 DXA 法による骨量測定. ライフサイエンス出版.
3. Leslie WD, et al. TBS (trabecular bone score) and diabetes-related fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Feb;98(2):602-9.
4. Kalkwarf HJ, et al. Trabecular Bone Score Reference Values for Children and Adolescents According to Age, Sex, and Ancestry. *J Bone Miner Res.* 2022 Apr;37(4):776-785.
5. Nishiyama S, et al. Bone Mineral Density in Japanese Children and Adolescents. *Clin Pediatr Endocrinol* 2001;10(2):133-120.
6. Kindler JM, et al. Lumbar Spine Bone Mineral Apparent Density in Children: Results From the Bone Mineral Density in Childhood Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 Apr 1;104(4):1283-1292.
7. Kalkwarf HJ, et al. Trabecular Bone Score Reference Values for Children and Adolescents According to Age, Sex and Ancestry. *J Bone Miner Res.* 2022;37(4):776-785.

## SGA 性低身長症における出生時体格の層別化による成長ホルモン治療効果の解析

石井 智弘

慶應義塾大学医学部小児科

### 背景

SGA 出生児の 10-20% は出生後にキャッチアップせず、SGA 性低身長症に至る<sup>1),2)</sup>。SGA 性低身長では、成長ホルモン (GH) 治療が成人身長を改善する<sup>2)</sup>。この治療効果は多様で、治療開始時に予測することは困難である。SGA は出生時の体格パターンにより、体長と体重の双方が小さい群 (SGA-LW)、体長のみが小さい群 (SGA-L)、体重のみが小さい群 (SGA-W) の 3 つに層別化される。過去の研究では、SGA-L 群の成人身長が SGA-W 群に比べて有意に低くなることが報告されているが<sup>3)</sup>、SGA 性低身長症の GH 治療効果と出生時の体格パターンとの関連を直接解析した報告は今までにはない。

### 目的

本研究では、SGA-LW 群、SGA-L 群、SGA-W 群の三群間で GH の治療効果を比較することを目的とする。

### 方法

2012 年から 2024 年までに慶應義塾大学病院に通院歴のある SGA 性低身長症患者、ないしは公益財団法人・成長科学協会の成長ホルモン剤適正使用指導事業でデータを学問的に用いることに同意が得られた SGA 性低身長症患者のうち、少なくとも 1 年以上 GH 治療を受け、治療前後の身長が記録されている者を対象として、後方視的に解析した。染色体異常を同定された症例は除外した。

それぞれの解析対象について、以下の診療情報を後方視的に収集した。1) 在胎週数、2) 出生時の体長・体重、3) 初経・経産の区別、4) 両親の身長、5) 治療開始時の歴年齢・骨年齢、6) 二次性徴の有無、7) 遺伝学的検査結果、8) 背景疾患・合併症、9) 治療前後の身長・体重の推移。

出生時の体格パターンで層別化した SGA-LW 群、SGA-L 群、SGA-W 群の間で GH 治療効果を評価した。主要評価項目は GH 治療前の成長率 SD 値と治療後 1 年間の成長率 SD 値との差 (以下、成長率 SD 値改善度) とし、Kruskal-Wallis 法で比較した。副次評価項目は GH 治療効果の予測因子の同定とし、重回帰分析で検討した。P < 0.05 の場合、統計学的に有意差ありと判断した。

### 結果 (表 1)

対象症例は 563 例で、SGA-LW 群 310 例、SGA-L 群 126 例、SGA-W 群 127 例であった。治療前の成長率 SD 値には三群間で有意差は認められなかったが、治療後 1 年間の成長率 SD 値、成長率 SD 値改善度では、SGA-LW 群が他の二群に比して有意に小さかった。GH 治療効果の予測因子を同定するため、説明変数として性別、在胎週数、出生時体長 SD 値、TH SD 値、治療開始時暦年齢、治療開始時身長 SD 値、治療前成長率 SD 値、および SGA パターンを設定し、目的変数として成長

率 SD 値改善度を採用し、重回帰分析で有意な回帰式が得られた（決定係数  $[R^2]$  0.29、 $P < 0.01$ ）。成長率 SD 値改善度との有意な相関が認められた因子は、GH 治療前成長率 SD 値（非標準化係数 -0.95、95% 信頼区間 [-1.1, -0.83]）、TH SD 値（0.33 [0.05, 0.61]）、および治療開始時暦年齢（-0.11 [-0.18, -0.03]）であった。一方、出生時体格パターン（0.26 [-0.10, 0.62]）との間には有意な相関は検出されなかった。

## 考察

本研究は、SGA 性低身長症における GH 治療効果が出生時の体格パターンにより異なることを初めて示した。特に出生時の体長・体重がともに小さい SGA-LW 群では、他の群と比較して、1 年目の GH 治療反応性が有意に低いことが明らかになった。SGA-LW 群で GH 治療反応性が低い理由としては、この群に成長障害を惹起する単一遺伝子疾患（SHORT 症候群、IGF1 異常症、IGF1 受容体異常症など）や染色体微細欠失（22q11.2 欠失症候群など）が未診断のまま含まれている可能性が考えられる。先行研究においても、特定の遺伝性疾患を有する SGA 性低身長症患者では GH 治療効果が減弱することが報告されており<sup>4), 5)</sup>、これらの知見は本研究結果と整合性を示す。SGA-LW 群では、他の群に比べて、初期の GH 治療効果をより慎重に評価する必要性を示唆している。

重回帰分析の結果、GH 治療効果の有意な予測因子として、GH 治療前成長率 SD 値（負の相関）、TH SD 値（正の相関）、および治療開始時の暦年齢（負の相関）が同定された。TH SD 値との正の相関は、遺伝的素因が GH 治療反応性に重要な影響を与えることを示唆する。一方、出生時体格パターンは有意な独立予測因子としては抽出されなかった。この結果は、SGA-LW 群の GH 治療反応性低下が、遺伝的素因などの他の臨床要因との交絡によって部分的に説明される可能性を示唆している。

本研究の限界としては、後方視的研究であること、分子遺伝学的検査が全例で実施されていないこと、成人身長で GH 治療効果を評価できていないこと、GH 投与量の経過を収集できていないことなどが挙げられる。今後、網羅的遺伝子解析による病因の層別化、成人身長のデータ収集、GH 治療の長期経過と治療アドヒアランスの影響を評価する前方視的研究が必要である。

## 結論

SGA 性低身長症における初期の GH 治療効果は出生時の体格パターンにより異なる。

## 文献

1. Hokken-Koelega ACS, van der Steen M, Boguszewski MCS, Cianfarani S, Dahlgren J, Horikawa R, et al. International Consensus Guideline on Small for Gestational Age: Etiology and Management From Infancy to Early Adulthood. *Endocr Rev.* 2023;44:539-565.
2. Horikawa R, Tanaka T, Nishinaga H, Nishiba Y, Yokoya S. The long-term safety and effectiveness of growth hormone treatment in Japanese children with short stature born small for gestational age. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2020;29:159-171.

3. Karlberg J, Albertsson-Wikland K. Growth in full-term small-for-gestational-age infants: from birth to final height. *Pediatr Res.* 1995;38:733-739.
4. Masunaga Y, Fujisawa Y, Muramatsu M, Ono H, Inoue T, Fukami M, et al. Insulin resistant diabetes mellitus in SHORT syndrome: case report and literature review. *Endocr J.* 2021;68: 111-117.
5. Walenkamp MJE, Robers JML, Wit JM, Zandwijken GRJ, van Duyvenvoorde HA, Oostdijk W, et al. Phenotypic features and response to GH treatment of patients with a molecular defect of the IGF-1 receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104:3157-3171.

表1 GH治療を受けたSGA低身長症症例の臨床データ

| 症例数     | 在胎週数(週) | 出生時体長SD値             | 出生時体重SD値                | TH SD値                  | GH治療開始時の<br>の歴年齢(歳)     | GH治療開始時<br>の骨年齢(歳) | GH治療開始前の身<br>長SD値 | GH治療開始前の体<br>重SD値      | 治療開始前の成長<br>率SD値        | 治療開始1年間の<br>成長率SD値   | 治療開始1年と<br>治療開始前の成<br>長率SD値の差 |                     |
|---------|---------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------|
| 全体      | 563     | 37.9 (35.0, 39.6)    | -2.32 (-2.86, -2.03)    | -2.47 (-2.95, -2.05)    | -0.75 (-1.28, -0.23)    | 4.4 (3.4, 7.5)     | 3.3 (2.5, 5.8)    | -2.95 (-3.32, -2.73)   | -2.72 (-3.42, -2.07)    | -1.93 (-2.82, -1.16) | 2.49 (1.20, 3.76)             | 4.53 (3.05, 5.97)   |
| SGA-LW群 | 310     | 37.0 (32.0, 39.3)*   | -2.70 (-3.17, -2.33)*#  | -2.81 (-3.35, -2.37)*#  | -0.68 (-1.20, -0.23)*   | 4.3 (3.3, 6.7)*    | 3.2 (2.5, 5.5)*   | -3.04 (-3.45, -2.77)*# | -2.92 (-3.70, -2.26)*#  | -1.93 (-2.80, -1.05) | 2.26 (1.04, 3.42)*#           | 4.19 (2.87, 5.56)*# |
| SGA-L群  | 126     | 38.9 (37.4, 40.0)*\$ | -2.23 (-2.47, -2.11)*\$ | -1.64 (-1.83, -1.44)*\$ | -0.90 (-1.49, -0.37)*\$ | 5.3 (3.8, 8.5)*\$  | 3.6 (2.8, 7.0)*\$ | -2.87 (-3.27, -2.70)*  | -2.31 (-2.90, -1.73)*\$ | -1.96 (-2.97, -1.30) | 2.64 (1.59, 4.03)*            | 4.90 (3.59, 6.48)*  |
| SGA-W群  | 127     | 37.9 (36.1, 39.4)\$  | -1.69 (-1.86, -1.49)#\$ | -2.47 (-2.74, -2.21)#\$ | -0.66 (-1.18, -0.06)\$  | 4.2 (3.3, 7.6)\$   | 3.2 (2.3, 5.4)\$  | -2.83 (-3.14, -2.68)#  | -2.56 (-3.34, -2.03)#\$ | -1.93 (-2.93, -1.10) | 2.74 (1.43, 3.99)#            | 4.62 (3.26, 6.34)#  |

中央値 (第1四分位, 第3四分位)

SGA-LW群: 出生時体長も体重もともに -2.0 SD 未満

SGA-L群: 出生時体長のみ -2.0 SD 未満

SGA-LW群: 出生時体重のみ -2.0 SD 未満

\*: SGA-LW群とSGA-L群で有意差あり、#: SGA-LW群とSGA-W群で有意差あり、\$: SGA-L群とSGA-W群で有意差あり

## ヨウ素摂取と甲状腺機能、成長発達との関連に関する研究－ 小児のヨウ素摂取に寄与する学校給食と家庭からのヨウ素量（経過報告）

伊藤 善也

日本赤十字北海道看護大学臨床医学領域

小橋 友里江

福島県立医科大学国際交流センター

國井 葉

昭和大学横浜市北部病院甲状腺センター内科

山口 真由

鎌倉女子大学家政学部管理栄養学科

塚田 信

女子栄養大学栄養科学研究所

長崎 啓祐

新潟大学医学部小児科学教室

布施 養善

Iodine Global Network (IGN)

### 研究の背景

ヨウ素は甲状腺ホルモンの合成に必須の微量栄養素であり、小児においてもヨウ素欠乏は発育・発達に大きな影響を与える。申請者らは全国調査により児童のヨウ素栄養状態を評価し、日本人のヨウ素摂取量が国際基準で適量であることを報告した。児童では家庭での食事と学校給食がヨウ素も含めた栄養素摂取に大きく寄与しているが、摂取源となる食品の種類、寄与の割合など詳細は不明である。さらに児童のヨウ素摂取量には大きな地域差があり、欠乏に近い量から過剰とされる量まで様々であり、その原因は不明である。

### 研究の目的

児童の給食および家庭でのヨウ素摂取源と摂取量について明らかにし、それらの関連を調べる。

### 研究の方法

児童のヨウ素摂取量を学校給食のヨウ素量、児童の尿中ヨウ素濃度、保護者の食事調査によるヨウ素摂取量の3方向から分析、評価する。

- (1) これらのデータが揃っている児童とその保護者のペアを対象とする。
- (2) 児童の保護者（女性と男性の両者）の児童調査日を含む過去1か月間の1日ヨウ素摂取量と摂取源を食品摂取頻度表（FFQ）を用いて計算し、家庭内で家族が日常的に摂取するヨウ素量とする。

- (3) 調査を行った小学校の調査日前後の給食献立からヨウ素量を算出する。
- (4) 学校給食のヨウ素量は「日本食品標準成分表 2020」を用いて算出する。
- (5) 児童のヨウ素摂取量に、給食と家庭での食事がどの程度寄与しているかを検討する。

#### 研究の進捗状況

- (1) 学校給食からのヨウ素摂取量を推測するために、47 都道府県の小学校の学校給食の献立を入手し、ヨウ素含有量を測定した（文献 5）。
- (2) 2014 - 2019 年の全国学童調査（文献 2）の際におこなった保護者への栄養調査（FFQ）の結果を集計している。
- (3) FFQ は 39,834 名の保護者男女から得られ、これらのうち児童の尿中ヨウ素測定結果があるのが 24,659 名（61.9%）であった。
- (4) ヨウ素摂取量の親子での関連を分析しているところである。

#### 文献

1. Zimmermann MB, Boelaert K. Iodine deficiency and thyroid disorders. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015 Apr;3(4):286-95. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70225-6.
2. Fuse Y, Ito Y, Shishiba Y, Irie M. Current iodine status in Japan: A cross-sectional nationwide survey of schoolchildren, 2014-2019. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 Apr 19;107(5):e2065-e2079. doi: 10.1210/clinem/dgab919.
3. Fuse Y, Ogawa H, Tsukahara Y, Fuse Y, Ito Y, Shishiba Y, Irie M. Iodine Metabolism and Thyroid Function During the Perinatal Period: Maternal-Neonatal Correlation and Effects of Topical Povidone-Iodine Skin Disinfectants. *Biol Trace Elem Res.* 2022 Aug 6. doi:10.1007/s12011-022-03363-8.
4. 厚生労働省. : 「日本人の食事摂取基準（2020 年版）策定検討会報告書：「日本人の食事摂取基準 2020 年版」. 東京：第一出版；2021
5. 塚田信, 他. : 小児のヨウ素摂取と甲状腺機能, 発育・発達との関連についての研究 - ヨウ素摂取状況への学校給食の関与についての全国調査 -. 成長科学協会 2020 年度研究年報 44 : 75-84,2020.

## 乳幼児健診で急激な肥満状態を認める児における抗 ZSCAN1 抗体解析

宇都宮 朱里

広島市立北部医療センター安佐市民病院

### 背景

ROHHAD-NET 症候群とは、Rapid-onset Obesity with Hypothalamic dysfunction Hypoventilation and Autonomic Dysregulation with の臨床症状から診断される希少難治性疾患で、典型的には 2 歳から 3 歳で急激な肥満を発症し、進行性に視床下部・下垂体機能障害（成長ホルモン分泌不全症を含む）を呈し、重症例では突然死や中枢性呼吸不全に至ることが報告されている<sup>1)</sup>。我々は 2024 年度から本症候群の全国調査を行ったところ、急激な肥満を主訴に診断された症例は約 75% を占めていた。このことから、乳幼児健診等で急激な肥満を呈した症例に対して ROHHAD 症候群関連自己抗体解析を早期に施行し、陽性症例については早期管理を行うことで適切な管理ができるものと考えられる。

### 対象

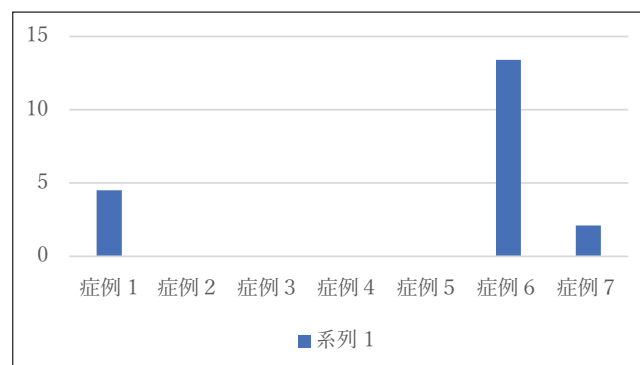
国内医療機関で、肥満を主訴として受診された患者で ROHHAD 症候群が疑われた小児患者 5 例。また肥満を認めないものの原因不明の高ナトリウム血症を認めた 2 例を対象とした。

図 1 対象者一覧

|   | 年齢 | 性別 | 肥満 | Na 異常 | 他症状        |
|---|----|----|----|-------|------------|
| 1 | 19 | 女  | あり | なし    | 精神症状       |
| 2 | 6  | 男  | あり | なし    | ACTH 分泌低下  |
| 3 | 6  | 男  | あり | あり    | 発達障害       |
| 4 | 3  | 女  | あり | なし    | 発達障害 多飲多尿  |
| 5 | 0  | 女  | あり | なし    | 高プロラクチン血症  |
| 6 | 2  | 男  | なし | あり    | 先天性横隔膜ヘルニア |
| 7 | 10 | 男  | なし | あり    | マイコプラズマ感染  |

### 結果

受託解析での ZSCAN1 抗体陽性カットオフは 15 以上。症例 6 のみ±の判定を得た。



## 考察

今回、肥満やNa値異常を契機とした症例において、明らかなROHHAD症候群の症状を認めない患者でZSCAN1抗体解析を施行した。1例で±の結果を得たが、他の症例はいずれも陰性であった。症例6については一過性のNa値異常を認めており、今後のROHHAD症候群で認める中枢性低換気症状や複数の視床下部下垂体症状の出現に注意しながらフォロー予定である。

他の肥満症を認める患者でいずれも陰性であったことから、抗体解析が望ましい対象となる患者の臨床的特徴を明らかとすることが課題と考える。先行して行ったROHHAD関連自己抗体解析では急激な肥満、成長ホルモン分泌不全性低身長症、GHD以外の2つ以上の下垂体機能障害（高プロラクチン血症も含む）、神経節腫瘍の合併、自律神経症状（多量発汗、体温調節障害、四肢末梢冷感）、中枢性低換気症状：他症状（目の異常（斜視・眼振））、精神発達障害を1点加点、一方ROHHAD症候群で認められていない症状を-1としてスコアリングした際に3点以上で抗体陽性となる傾向が学会発表されており、今後はそのスコアリングをもとに肥満健診での抗体解析を検討することが望ましいと考える。

今後も症例数を増やした知見の蓄積が望まれる。

## 妊娠授乳関連骨粗鬆症の出生児への影響 — 母児の情報を連結させたレセプトデータを用いた分析 —

笠原 恭子

滋賀医科大学医学部産科学婦人科学講座

### 背景

妊娠授乳関連骨粗鬆症 (pregnancy and lactation-associated osteoporosis, PLO) は妊娠・授乳期の女性が発症する脆弱性骨折で、脊椎に好発する。発症頻度が低く、症状が非特異的なので見落とされる例も多い。そのため研究は容易ではなく、病態生理には不明な点が多いが、遺伝的素因も含む多因子性の疾患と考えられている<sup>1)~3)</sup>。近年は遺伝子の病的バリエーションについて解明されつつある一方<sup>4)</sup>、PLOの母体から出生した児の健康や疾患については明らかでない。

母体には、妊娠中には経胎盤的、授乳中には母乳を介して児に十分なカルシウム (Ca) を供給できるような生理的メカニズムが存在する<sup>5)</sup>。すなわち、妊娠中には腸からのCa吸収が増加するが、Ca摂取が少なければ自らの骨吸収によって胎児にCaを供給する。授乳中には母体のCa摂取量の多寡に関わらず骨吸収亢進によって母乳中にCaを供給しており、健康妊婦ではCa摂取が少なくても母乳の組成は影響を受けない<sup>6)</sup>。

PLOは、妊娠前の低骨密度や遺伝的素因など、何らかの発症因子を持つ女性の妊娠・授乳期に発生すると考えられてきた。一方、正常妊娠・授乳期の母体の骨代謝はhigh turn over状態 (骨吸収も骨形成も亢進) であるが、近年の研究では、PLO症例における骨代謝はlow turn over状態であると報告されており<sup>4), 7)</sup>、本疾患の病態生理の一つとして骨・Ca代謝の異常が注目されている。一般的には母体の栄養状態に関わらず、児はCaを十分受け取れると考えられているが<sup>5), 6)</sup>、PLOの場合も同様であるかは不明である。やせ妊婦や妊娠中の体重増加不良が低出生体重につながることを考えれば<sup>8)</sup>、PLO母体からの出生児も、母体の骨・Ca代謝の異常から何らかの影響を受けている可能性が否定できない。

母体の疾患と児の疾患との関係を長期にわたって調査する場合、母児は一般に別の診療科を受診するだけでなく、1人が複数の医療機関を受診することも多いことから、診療録ベースの研究は有用とはいえない。そこで我々は、健康保険組合より収集されたレセプトデータから、母児の情報を連結させたデータを抽出し、研究に用いることにした。

### 目的

- ① PLO母体から出生した児において、何らかの疾患の発症頻度が高いという仮説を立て、検証する。
- ② PLOが児に及ぼす影響に関連する可能性のある疫学的特徴を調査する。

### 対象と方法

#### <研究デザイン>

本研究は、2021年に株式会社日本医療データセンター; Japan Medical Data Center Co., Ltd.

(JMDC) より購入し、研究者が所属する滋賀医科大学医学部産科学婦人科学講座が既に保有している、匿名化された既存のレセプトデータを用いる後ろ向きコホート研究である。JMDC のデータベースには、JMDC が契約している健康保険組合より収集された患者の生年月、病名、医薬品使用、健康診断結果等の匿名化データが含まれる。病名、検査・治療行為、医薬品は、各々 ICD-10 コード、診療行為コード、ATC コードで表されており（表 1）、入院・外来の区別もある。同じ家族内のメンバーは、家族コードで連結されている。

購入したレセプトデータには、2005 年 1 月から 2021 年 12 月までの 172,730 人の母と 210,124 人の児のデータが含まれている。母児は以下の条件を満たしている。

- 1) 児は 2006 年 1 月から 2020 年 12 月までに出生している。出生と保険加入の日付が一致している。同じ家族内に母が存在する。
- 2) 母は児の出生した時点で、保険加入者本人または配偶者として児と同じ家族内にいる。産科的疾患の ICD-10 コード (O00-O99) を 1 個以上持つ。児の出生より 1 年以上前に観察期間が始まっている。

このレセプトデータから、一度も保険からの脱退がなく、児の出生後 1 年以上データがある母と、その児を抽出して研究コホートとした。児の生年月は母の分娩年月に一致する。1 人の母に連結する複数の児が同時に出生していれば、多胎と考えられる。この研究コホートから PLO 群とコントロール群を作成した。

本研究は「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」に準拠し、滋賀医科大学の倫理審査で認可済みである（研究番号：R2024-027）。匿名化されたレセプトデータを用いるので、対象者の同意取得は必要としない。

#### < PLO 群の作成 >

我々の先行研究<sup>9)</sup>にもとづき、分娩した月の 5 か月前から 12 か月後までの間に脊椎、大腿骨近位部、恥骨、恥骨以外の骨盤に発症した脆弱性骨折を、PLO 骨折と定義した。まず研究コホートから、この定義を満たす骨折のある症例（母）を抽出した。そこから、複数の部位に起きた多発骨折、脱臼骨折、脊椎横突起骨折や同時に重篤な外傷を示す病名がある場合は、高エネルギー外傷による骨折として除外した。先天性骨形成不全症や悪性腫瘍の骨転移、および 17 歳以下・48 歳以上の骨折も思春期・閉経後の骨折として除外した。骨折を診断された月に画像診断も治療（コルセット作成または鎮痛薬処方）もない場合は、何らかの理由で便宜的につけられた診断名と判断して除外した。これらの条件を満たした PLO 骨折の症例（母）と、その骨折に関連した分娩で生まれた児を PLO 群とし、単胎分娩と多胎分娩に分類した。

#### < コントロール群の作成 >

高齢者の脆弱性骨折として多い脊椎、大腿骨近位部、恥骨、恥骨以外の骨盤、仙骨、上腕骨近位端、橈骨遠位端の骨折を主な脆弱性骨折と考え<sup>9)</sup>、研究コホートからこれらの骨折を発症したことがない母と、その児を抽出し、単胎分娩と多胎分娩に分類した。さらに、単胎については PLO 群の母 1 人に対し分娩時年齢および児の性別でマッチさせた母 216 人をランダムに選択し、コントロール群とした。多胎については、PLO 群の母 1 人に対し同様のマッチングで 18 人の母を選択し、コントロー

ル群とした。PLO 群の兄の観察期間の最短のものより短い観察期間の兄とその母は、コントロール群として選択しなかった。観察期間の長い兄の方がより選択されやすい傾向にした。

### <観察項目>

- ・ 治療を必要とする筋骨格系疾患

PLO 群の母において、骨折の診断より以前に発症した、治療（コルセット作成または鎮痛剤処方）を必要とする骨折以外の筋骨格系疾患を調査した。そのような疾患が起きたときが真の骨折発症である。つまり、診断の遅延を表している可能性がある。

- ・ Body mass index (BMI)

妊娠期間を分娩した月の8か月前から分娩した月までとし、その前後の36か月ずつを妊娠前期間、妊娠後期間とした。健康診断データ内の、妊娠前期間の中で最も遅い時のBMI値を採用し、妊娠前期間にBMI値が無ければ妊娠後期間の中で最も早い時のBMI値を採用した。

- ・ 骨折リスクに関連する薬剤と疾患

薬剤：未分画ヘパリン、ワーファリン、糖質コルチコイド、抗けいれん薬（フェノバルビタール、プリミドン、フェニトイン、カルバマゼピン、バルプロ酸ナトリウム）。

疾患：特発性血小板減少症、甲状腺疾患、糖尿病、摂食障害、てんかん、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、排卵障害（無月経、過少月経及び希発月経+排卵障害に関連する不妊症）、排卵障害以外の原因による不妊症、さらに、糖質コルチコイドで治療される呼吸器系疾患と皮膚疾患。

- ・ 兄の疾患

新生児期の疾患：早産児、低出生体重、新生児仮死、新生児低体温、新生児低血糖、新生児呼吸障害、新生児黄疸。出生した月またはその翌月に入院患者としてICD-10コードがあった場合、その疾患があったと考えた。

小児期までに起きた疾患：栄養失調、ビタミンD欠乏症（くる病）、肥満、心理的発達障害、身体的発育遅延、骨折、入院を必要とする感染症。時期を限定しない。

### <統計学的手法>

PLOの発症頻度についてはポアソン回帰分析を行った。多胎、分娩時年齢とPLOの発症頻度の関係についてもポアソン回帰分析を用いた。BMI、低体重（BMI<18.5 kg/m<sup>2</sup>）のPLO群とコントロール群の比較では、連続変数にはMann-WhitneyのU検定、名義変数にはFisherの正確検定を用いた。母の骨折リスクに関連する薬剤と疾患の2群の比較には、オッズ比による評価とFisherの正確検定を用いた。新生児期の疾患の2群の比較には、リスク比による評価とFisherの正確検定を用いた。小児期までに起きた疾患の2群比較には、Cox回帰によるハザード比の推定とログランク検定を用いた。

全ての統計解析はSAS 9.4（SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いて行った。全ての検定の有意水準は両側5%とした。

## 結果

### < PLO 群の作成 >

JMDC から購入したレセプトデータから、一度も保険からの脱退がなく、児の出生後 1 年以上データがある母 132,464 人と児 15,9742 人が研究コホートとして抽出された (図 1)。その中で 91 人に PLO 骨折の定義を満たす骨折があった。高エネルギー外傷 23 人、先天性骨形成不全症 2 人、骨折時 61 歳の 1 人は除外された。骨折を診断された月に画像診断も治療 (コルセット作成または鎮痛薬処方) もなかった 6 例も除外された。悪性腫瘍骨転移、17 歳以下の骨折症例は無かった。2 回以上 PLO 骨折を経験した母はいなかった。計 32 人の母が除外された結果、PLO 群として母 59 人、児 65 人が抽出され、単胎分娩 53 組と双胎分娩 6 組に分類された。三胎分娩例はなかった。

### < PLO 群の母の特徴 >

59 人の PLO 群の母の分娩時年齢の中央値は単胎 35 歳、双胎 31 歳、最も多かったのは脊椎骨折であった (表 2)。PLO 骨折が最も多く診断されたのは分娩した月の 2 か月後で、その後 12 か月目まで、頻度は緩徐に減少していった (図 2A)。48 人 (81.4%) の PLO 骨折は分娩の月より後に診断されていた。

59 人の PLO 群の母のうち、27 人 (45.8%) が骨折の診断以前に「治療を必要とする筋骨格系疾患」を発症していた。これらを除いた 32 人の骨折の診断が最も多かったのは分娩した月であった (図 2B)。一方、骨折の診断以前に「治療を必要とする筋骨格系疾患」を発症していた 27 人は、骨折の診断より 1 か月から 8 か月前に、それを発症していた (表 3)。そのうち 13 人 (48.1%) は分娩した月の発症であった。

### < PLO の発症頻度 >

研究コホートは母 132,464 人と児 159,742 人からなり、内訳は単胎分娩 155,927、多胎分娩 1,896 (双胎 1,873 と三胎 23) で分娩総数は 157,823 であった。これらより、PLO の発症頻度は 374/100 万分娩と推定された (表 4)。さらに単胎分娩と多胎分娩で、PLO の発症頻度は 340/100 万分娩、3165/100 万分娩と推定され、多胎では単胎より発症リスクが有意に高いことが示された (RR = 9.3, 95% CI: 4.0, 21.7,  $P < 0.001$ )。

PLO は典型的には妊娠第三半期から分娩直後までに発症すると言われているため<sup>1), 3), 10), 11)</sup>、PLO を「分娩した月より 3 か月前から 2 か月後までに起きた脆弱性骨折」とした場合の発症頻度を推定したところ、177/100 万分娩となった。また、多胎の発症リスクはさらに高くなった (RR = 22.4, 95% CI: 9.1, 55.3,  $P < 0.001$ ) (表 5)。

分娩時年齢と PLO の発症頻度の関係を表 6 に示す。単胎分娩・40 歳以上では 30 歳未満に比べ、有意に発症頻度が高いことが示された (RR = 3.1, 95% CI: 1.3, 7.4;  $P = 0.010$ )。多胎分娩では分娩時年齢と PLO 発症リスクの関連は見られなかった。

### < PLO 群の母とコントロール群の母の比較 >

研究コホートから、主な脆弱性骨折を発症したことがない 131,172 人の母とその児 158,163 人が、コントロール群として抽出された (図 1)。PLO 群の児の最短の観察期間が 15 か月であったため、観察期間が 15 か月未満の児とその母は、ここから除外された。その後、母体の分娩時年齢と児の性

別によるケース・コントロール・マッチングを行い、単胎分娩の母児 11,448 組、双胎分娩の母児 108 組をコントロール群として抽出した。単胎では分娩前の観察期間は 2 群で有意差はなかったが、分娩後の観察期間はコントロール群の方が有意に長かった (表 7)。双胎ではコントロール群の方が、分娩前後ともに観察期間が長い傾向にあったが、有意差はなかった。

2 群間の BMI の比較を表 8 に示す。PLO 群のうち 31 人 (52.5%)、コントロール群のうち 5,304 人 (45.9%) が、妊娠期間前の 36 か月間または妊娠期間後の 36 か月間のいずれかの健診データに BMI 値があった。単胎では PLO 群で BMI 値が有意に低かったが ( $P = 0.024$ )、WHO の診断基準で低体重を示す  $BMI < 18.5 \text{ kg/m}^2$  の頻度は、PLO 群で低い傾向があったが有意差はなかった。双胎ではいずれの項目にも有意差はなかった。

骨折リスクに関連する薬剤と疾患の、2 群間の比較を表 9 に示す。単胎分娩では、未分画ヘパリン、排卵障害、関節リウマチが PLO 群で有意に多かった。他の薬剤、疾患では有意差はなかった。双胎ではいずれの薬剤、疾患でも有意差はなかった。

#### < PLO 群の児とコントロール群の児の比較 >

2 群の観察期間は、単胎ではコントロール群の方が有意に長かった (表 10)。双胎では、コントロール群の方が観察期間は長い傾向があったが有意差はなかった。

新生児期の疾患の比較を表 11 に示す。単胎の新生児仮死、双胎の低出生体重が、PLO 群の方が多傾向があったが有意差はなく、それ以外の疾患も 2 群で差はなかった。

小児期までの疾患の比較を表 12 に示す。単胎の肥満、栄養失調で、PLO 群の方が有意に多かった。それ以外の疾患では 2 群に差はなかった。

#### 考察

これは、我々の知る限りでは PLO が出生児に及ぼす影響に関する初めての研究である。我々は、PLO 母体は胎盤や母乳を介して児が必要とする量の Ca を供給できないため、児は何らかの疾患の発症頻度が高いという仮説を立てて研究したが、母体の PLO が児の健康に悪影響を及ぼすという結果は得られなかった (表 11、12)。既知のとおり、最も多い PLO 骨折は脊椎骨折で (表 2)、かなりの数の PLO 骨折の診断は遅延している可能性が示唆された (表 3)。また、PLO の発症頻度は 100 万分娩当たり 374 人で (表 4)、多胎 (表 4)、40 歳以上の分娩時年齢 (表 6)、低 BMI (表 8)、未分画ヘパリンによる治療歴、排卵障害の既往 (表 9) があると PLO は発症しやすくなるという結果が得られた。

今回得られた 100 万分娩当たり 374 人という PLO の発症頻度は (表 4)、我々の以前の報告 (100 万分娩当たり 460 人<sup>9)</sup>) より低い。前回とは別のデータセットを使用したことと、今回は PLO の要件を前回より厳しくしている。つまり骨折と同月に画像診断も治療もない症例は除外していることも関係していると考えられる。しかし、これまでの他の研究者の報告 (4-8/100 万妊娠<sup>12)</sup>、6.8/10 万妊娠<sup>2)</sup>) に比べるとかなり高く、PLO 発症の期間を分娩した月より 3 か月前から 2 か月後までに絞っても、やはり高い (表 5)。

発症頻度の推定は、その疾患の発症時期に関する診断基準に左右される。しかし、PLO の診断基

準は定まっていないので、PLOの発症時期に関する定義は研究によって異なる。さらに、「発症時期」の定義には二つあって、一つ目は何をもちいてPLO骨折が起きたとするかという定義、二つ目は骨折と分娩や授乳期間との時間的關係における定義である。

一つ目の定義について：データベース研究<sup>9)</sup>では診断コード（ICD-10コード）が付いた日付で骨折が起きたと考えるが、多くの後方視的な臨床研究<sup>3)</sup>やオンライン調査研究<sup>1)</sup>では疼痛の始まった時に骨折が起きたと考える。ケースシリーズでは骨折の診断時期は必ず記載され、先行する疼痛があればそれも記載される<sup>2), 10)</sup>。骨折診断時期と疼痛開始から診断までにかかった時間の両方を述べたオンライン調査研究もある<sup>11)</sup>。これらから、PLOでは診断の遅れは珍しくないことがわかる。患者の症状は、診療録や<sup>2), 3), 10)</sup>オンラインの質問票に基づいた研究では調査可能だが<sup>1), 11)</sup>、データベース研究では難しい。

二つ目の定義について：過去の研究では、PLOは妊娠第三半期から分娩直後までに起きる脆弱性骨折とされてきた<sup>1), 3), 10), 11)</sup>。しかし、これらの研究で得られた所見は、医師の認知度、研究者の意図、患者の自覚などに依存している。また、過去の研究における骨折と分娩や授乳期間との時間的關係は、妊娠中から分娩後6か月以内<sup>3)</sup>、妊娠中から分娩後早期<sup>10)</sup>、妊娠中から分娩後12か月以内または授乳中から授乳終了後6か月以内<sup>1)</sup>など一定ではない。

これらの問題を考えると、レセプトデータは人的要因に左右されずにPLOという頻度の低い、見落とされがちな疾患を研究するのに有用である。臨床的な情報は不十分であるが、本研究では「治療を必要とした筋骨格系疾患」の診断コードの調査によって、PLO症例の半数近くは骨折の診断以前に治療を要する疼痛を感じていたことが示された（表3）。それらのうち少なくとも一部は、真の骨折発症であった可能性がある。

また、われわれの、PLOは分娩した月より5か月前から12か月後までにおきた脆弱性骨折であるという定義は、診断の遅れた症例も見落とさないという意味で妥当であると考えられる。したがって本研究で得られたPLOの発症頻度は、診療録に基づく他の研究<sup>2), 12)</sup>よりも信頼できると考えられる。DPCデータベースを用いた国内の研究でもPLOの発症頻度は報じられているが、若年者の低外傷性の脊椎骨折のほとんどが入院対象ではないことから信頼性には乏しい<sup>13)</sup>。

一方、本研究では、PLOの素因に関する新しい知見がいくつか得られた。我々の知る限りでは、これは多胎妊娠がPLO発症のリスクを高めることを初めて示した臨床研究である（表4、5）。胎児のCa需要、母体の体重増加や腹部を支えるための過剰な湾曲による脊椎への負荷、分娩後に児を抱くこと、このような母体の負担は単胎より多胎で大きくなると容易に想像される。そのため、多胎でPLOが発症しやすくなるのは不思議ではなく、過去に報告されていないのは頻度が低いと思われる。今回母児のデータをリンクさせた大規模データセットを用いることによって、多胎では単胎の9倍以上PLOの発症リスクが高く、分娩に近い6か月間に限って言えば22倍の差があることが示された。多胎妊娠において、胎児のCa需要や母体の脊椎への負荷は妊娠終盤の時期に急激に増加するため、多胎を素因とするPLO骨折は比較的早期に起こるのではないかと考えられる。

また単胎において、PLO群の方がコントロール群よりも有意にBMI値が低かったが、低体重（BMI<18.5kg/m<sup>2</sup>）の頻度では差が出なかった（表8）。これは過去のケースシリーズと逆の結果で<sup>12)</sup>、

BMIとPLOの発症リスクを関連づけた報告としては、本研究は2報目である。本研究ではコントロール群のBMIが比較的low（中央値：約20kg/m<sup>2</sup>）、一般の若年女性の体重が低い傾向にあることを示唆している。また、PLOの素因として低体重は最も重要ではないのかもしれない。

さらに、PLOの素因として、単に分娩時年齢が高いということではなく<sup>2),9)</sup>、リスクが高い年齢層（40歳以上）を示すことができた。これは閉経前骨粗鬆症の疫学的知見（生殖年齢の中央を超える頃から徐々に骨量が減少し、骨折の頻度が上がる）<sup>14)</sup>に一致する。

未分画ヘパリンと（低エストロゲンに関連する）排卵障害がPLOの素因となることも、予測可能な結果である。未分画ヘパリンは、低分子ヘパリンより骨粗鬆症のリスクが高いことが分かっている。しかし、日本では低分子ヘパリンの自己注射は保険適応でないので、塞栓症の既往や抗リン脂質抗体を保有する挙児希望の女性は、分娩直前まで未分画ヘパリンの自己注射を行うことになるのが問題である。関節リウマチでは、炎症性サイトカインや自己抗体によって骨形成が障害されるとともに、一般的には糖質コルチコイドによる治療が骨粗鬆症と関連すると考えられている。本研究では糖質コルチコイドとPLO発症リスクの関連は示されなかったが、生殖年齢の経産婦という研究コホートでは重症な内科的疾患の患者はほとんどいなかったのかもしれない。

PLOの素因に関するこれらの研究結果は、近年の生殖医療の発展に対する警鐘かもしれない。排卵誘発を伴う生殖補助医療技術やヘパリンによる習慣流産の治療は、多くの現代女性に恩恵をもたらしている。しかし、医師は挙児希望の女性を前にしたとき、PLOの素因がないか家族歴も含めてよく情報収集し、多胎妊娠の原因になる排卵誘発を行う前に必要な情報を提供しなければならない。

一方、母体のPLOが新生児の健康状態に悪影響を及ぼすという所見は示されなかった（表11）。小児期までの疾患では、単胎児の肥満と栄養失調で、PLO群の方がコントロールよりも頻度が高いという結果になった（表12）。

これらの結果は妊娠・授乳期の母体のCa・骨代謝における生理的変化が<sup>5),15)</sup>、PLOのように骨のホメオスタシスが障害された状態（母体では骨粗鬆症が著しく進行している）であっても、児が問題なく発育できるように働いているということを示しているのかもしれない。また、PLO群で肥満と栄養失調の頻度がコントロールよりも高かったのは、PLOの母に摂食障害のICD-10コードを持つ者はいなかったものの、食行動の異常を示しているのかもしれない。

他方で、低BMIや妊娠中の体重増加不良は早産や低出生体重の危険因子になる<sup>8),16)</sup>。本研究ではPLO母体の方がコントロールよりもBMIが有意に低かったにも関わらず、2群間に早産、低出生体重の頻度に差はなかった。児の未熟性や生下時体重が児の成長や発達、有病率や死亡率に関連することを考えれば<sup>16)</sup>、2群で早産児や低出生体重で差が出なかったことが、その他の疾患、特にこれらの二つの指標の影響を受けやすい新生児期の疾患であまり差が出なかったことと関連するかもしれない。しかし、母体の低BMIが早産や低出生体重に関連することを示した過去の研究では、19.8kg/m<sup>2</sup>以下を低BMIとし、正常BMI（>19.8、<26kg/m<sup>2</sup>）と比較していた<sup>8)</sup>。本研究で、PLO群とコントロール群で早産、低出生体重の頻度に差が出なかったことには、コントロール群のBMIが比較的lowかった（中央値：約20kg/m<sup>2</sup>）ことが関係するかもしれない。

この研究の強みは母児のデータをリンクさせた大規模なレセプトデータを使用したことである。

それによって、PLOが出生児の健康に悪影響を及ぼすという結果はほとんど得られなかった一方で、この稀で不明な点の多い疾患についての疫学的な所見をいくつか得ることができた。しかしながらいくつかの限界もある。まず、データベース研究では妊娠中の体重増加、授乳期間、骨塩量、骨粗鬆症の家族歴などの重要な臨床情報が得られない。また、この研究ではBMIデータが無い対象者が多く、分娩前も後もBMI値が分かる者でその差がなかったため、BMIを2群で比較する際に分娩後のBMIの値も用いている。さらに、PLOの頻度は国によって異なり、時代とともに増加する可能性がある。

## 結論

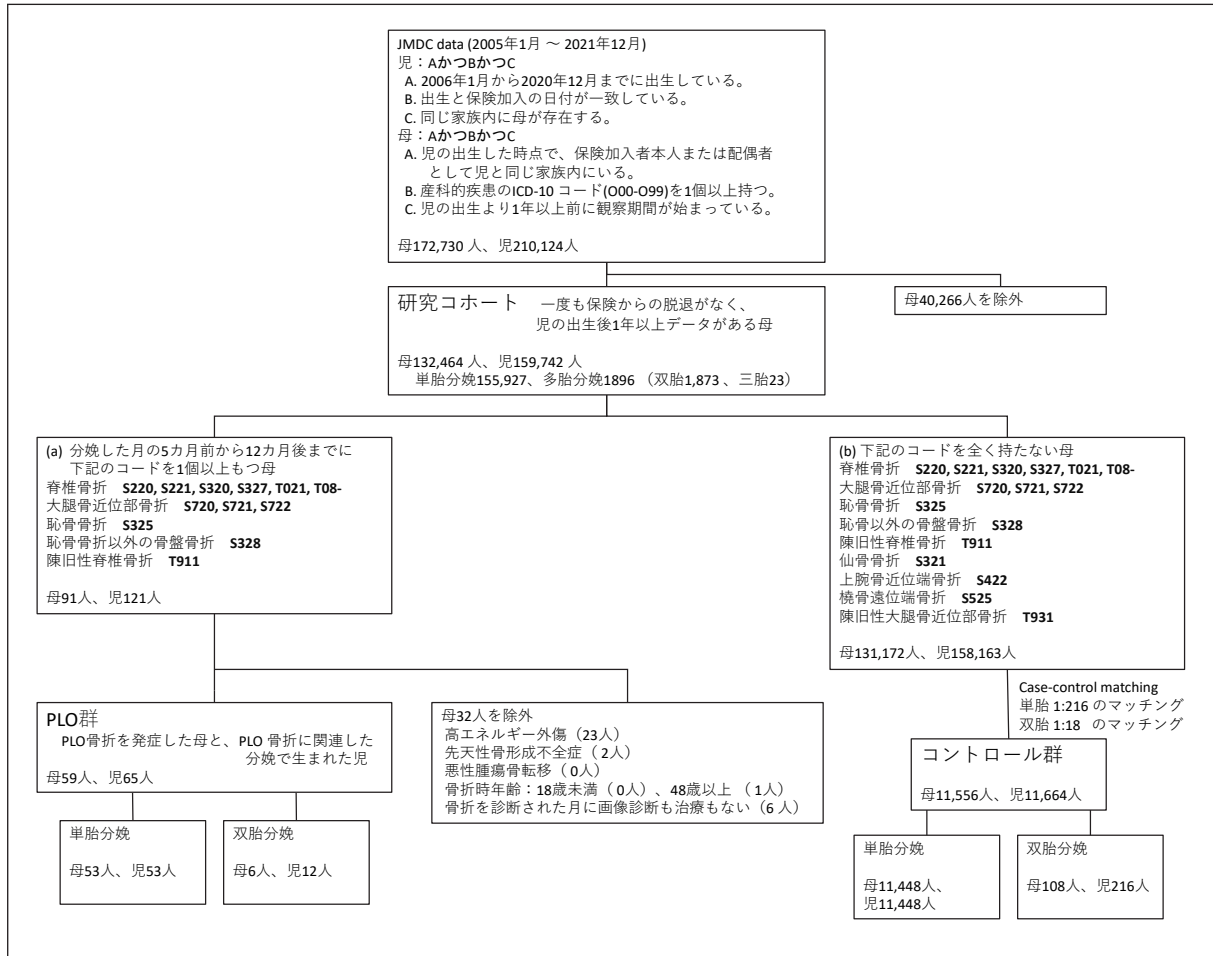
母体のPLOは出生児の健康に悪影響を及ぼすという十分な証拠は得られなかった。妊娠・授乳期の母体のCa・骨代謝における生理的变化は複雑であるが、PLOのように骨のホメオスタシスが障害された状態であっても、児の成長に十分なCaを供給できている可能性が高い。また、この研究によって、PLOの発症頻度は100万分娩当たり374人、発症に関する素因として多胎、40歳以上の分娩時年齢、低BMI、未分画ヘパリン、排卵障害が示された。医師は拳児希望の女性の診察において、既往歴や家族歴を十分聞き取り、PLOの素因があれば不妊治療を行う前に必要な情報を提供しなければならない。妊娠中、授乳中、授乳終了後数か月は、PLO骨折を見落とさないよう疼痛発症に注意する必要がある。

## 参考文献

1. Kondapalli AV, Kamanda-Kosseh M, Williams JM, Shiau S, Bucovsky M, Colon I, et al. Clinical characteristics of pregnancy and lactation associated osteoporosis: An online survey study. *Osteoporos Int.* Aug 2023;34(8):1477-89. Epub 20230519.
2. Orhadje E, Berg K, Hauser B, Ralston SH. Clinical Features, Incidence and Treatment Outcome in Pregnancy-Associated Osteoporosis: A Single-Centre Experience over Two Decades. *Calcif Tissue Int.* Dec 2023;113(6):591-6. Epub 20231011.
3. Laroche M, Talibart M, Cormier C, Roux C, Guggenbuhl P, Degboe Y. Pregnancy-related fractures: a retrospective study of a French cohort of 52 patients and review of the literature. *Osteoporos Int.* Nov 2017;28(11):3135-42. Epub 20170906.
4. Butscheidt S, Tsourdi E, Rolvien T, Delsmann A, Stürznickel J, Barvencik F, et al. Relevant genetic variants are common in women with pregnancy and lactation-associated osteoporosis (PLO) and predispose to more severe clinical manifestations. *Bone.* Jun 2021;147:115911. Epub 20210312.
5. Kovacs CS, Ralston SH. Presentation and management of osteoporosis presenting in association with pregnancy or lactation. *Osteoporos Int.* Sep 2015;26(9):2223-41. Epub 2015/05/06.

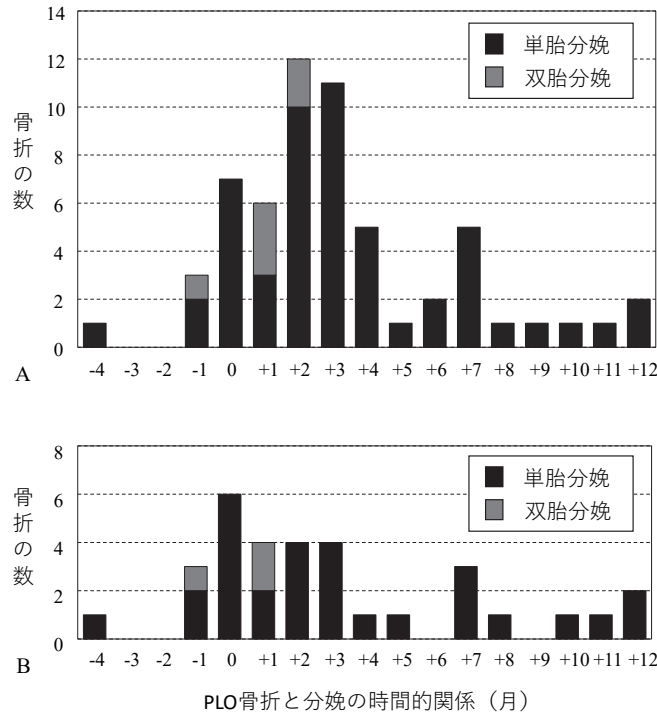
6. Prentice A. Calcium in pregnancy and lactation. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:249-72. Epub 2000/08/15.
7. Cohen A, Kamanda-Kosseh M, Dempster DW, Zhou H, Müller R, Goff E, et al. Women With Pregnancy and Lactation-Associated Osteoporosis (PLO) Have Low Bone Remodeling Rates at the Tissue Level. *J Bone Miner Res.* Sep 2019;34(9):1552-61. Epub 20190726.
8. Ehrenberg HM, Dierker L, Milluzzi C, Mercer BM. Low maternal weight, failure to thrive in pregnancy, and adverse pregnancy outcomes. *Am J Obstet Gynecol.* Dec 2003;189(6):1726-30. Epub 2004/01/08.
9. Kasahara K, Tanaka-Mizuno S, Tsuji S, Ohashi M, Kasahara M, Kawasaki T, et al. Pregnancy and lactation-associated osteoporosis as a major type of premenopausal osteoporosis: a retrospective cohort study based on real-world data. *BMC Pregnancy Childbirth.* Apr 22 2024;24(1):301. Epub 20240422.
10. Hardcastle SA, Yahya F, Bhalla AK. Pregnancy-associated osteoporosis: a UK case series and literature review. *Osteoporos Int.* May 2019;30(5):939-48. Epub 20190123.
11. Peltz-Sinvani N, Raz HM, Klein P, Ish-Shalom S, Vered I, Tripto-Shkolnik L. Pregnancy- and lactation-induced osteoporosis: a social-media-based survey. *BMC Pregnancy Childbirth.* May 2 2023;23(1):311. Epub 20230502.
12. Hadji P, Boekhoff J, Hahn M, Hellmeyer L, Hars O, Kyvernitakis I. Pregnancy-associated osteoporosis: a case-control study. *Osteoporos Int.* Apr 2017;28(4):1393-9. Epub 2017/01/12.
13. Toba M, Terauchi M, Moriwaki M, Obayashi S, Miyasaka N, Fushimi K. Fractures within 2 years of an obstetric hospitalization: analysis of nationwide administrative data in Japan. *J Bone Miner Metab.* Sep 2022;40(5):748-54. Epub 20220612.
14. Harvey N, Dennison E, Cooper C. Osteoporosis: a lifecourse approach. *J Bone Miner Res.* Sep 2014;29(9):1917-25. Epub 2014/05/28.
15. Prentice A, Jarjou LM, Cole TJ, Stirling DM, Dibba B, Fairweather-Tait S. Calcium requirements of lactating Gambian mothers: effects of a calcium supplement on breast-milk calcium concentration, maternal bone mineral content, and urinary calcium excretion. *Am J Clin Nutr.* Jul 1995;62(1):58-67.
16. Stang J, Huffman LG. Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Obesity, Reproduction, and Pregnancy Outcomes. *J Acad Nutr Diet.* Apr 2016;116(4):677-91.

図1 PLO 群、コントロール群作成のフローチャート



JMDC, Japan Medical Data Center Co., Ltd.; PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

図2 PLO 群における骨折の時間的分布



横軸は、分娩した月を0として、PLO骨折が診断された月を分娩との時間的關係で示している。

- A. 全 PLO 骨折 59 例
- B. PLO 骨折例のうち、骨折の診断以前に「治療を必要とする筋骨格系疾患」を発症していた 27 例を除いた 32 例

表1 調査したコード

| 項目                           | コードの種類     | コード              | 期間                       | 備考 |
|------------------------------|------------|------------------|--------------------------|----|
| <b>&lt;母&gt;脆弱性骨折</b>        |            |                  |                          |    |
| 脊椎骨折                         |            |                  |                          |    |
| 胸椎骨折                         | ICD-10 コード | S220, S221       | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| 腰椎骨折                         | ICD-10 コード | S320, S327       | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| その他の脊椎骨折                     | ICD-10 コード | T021, T08-       | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| 恥骨骨折                         | ICD-10 コード | S325             | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| 恥骨以外の骨盤骨折                    | ICD-10 コード | S328             | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| 大腿骨近位部骨折                     | ICD-10 コード | S422             | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| 橈骨遠位端骨折                      | ICD-10 コード | S525             | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| 上腕骨近位端骨折                     | ICD-10 コード | S720, S721, S722 | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| 骨折の後遺症                       |            |                  |                          |    |
| 陳旧性脊椎骨折                      | ICD-10 コード | T911             | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| 陳旧性大腿骨近位部骨折                  | ICD-10 コード | T931             | -5M to +12M <sup>a</sup> |    |
| <b>&lt;母&gt;骨折リスクに関連する疾患</b> |            |                  |                          |    |
| 悪性腫瘍の骨転移                     | ICD-10 コード | C795             | <-5M <sup>b</sup>        |    |
| 特発性血小板減少症                    | ICD-10 コード | D693             | <-5M <sup>b</sup>        |    |
| 甲状腺疾患                        | ICD-10 コード | E00-E07          | <-5M <sup>b</sup>        |    |
| 糖尿病                          | ICD-10 コード | E10-E14          | <-5M <sup>b</sup>        |    |
| 摂食障害                         | ICD-10 コード | F50              | <-5M <sup>b</sup>        |    |
| てんかん                         | ICD-10 コード | G40, G41         | <-5M <sup>b</sup>        |    |
| 糖質コルチコイドで治療される呼吸器疾患          |            |                  |                          |    |
| 急性閉塞性喉頭炎（クループ）及び急性喉頭蓋炎       | ICD-10 コード | J05              | <-5M <sup>b</sup>        |    |
| 慢性副鼻腔炎                       | ICD-10 コード | J32              | <-5M <sup>b</sup>        |    |
| 喘息                           | ICD-10 コード | J45, J46         | <-5M <sup>b</sup>        |    |

|                                   |            |   |                          |                       |
|-----------------------------------|------------|---|--------------------------|-----------------------|
| 糖質コルチコイドで治療される皮膚疾患                |            |   |                          |                       |
| 皮膚炎及び湿疹                           | ICD-10 コード | L20-L30                                     | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 蕁麻疹及び紅斑                           | ICD-10 コード | L50-L54                                     | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 関節リウマチ                            | ICD-10 コード | M053, M059, M060, M068, M069                | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 全身性エリテマトーデス                       | ICD-10 コード | M32   | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 皮膚筋炎                              | ICD-10 コード | M33   | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 無月経, 過少月経及び希発月経                   | ICD-10 コード | N91   | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 無排卵に関連する女性不妊症                     | ICD-10 コード | N970  | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 卵管に原因する女性不妊症                      | ICD-10 コード | N971  | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 子宮に原因する女性不妊症                      | ICD-10 コード | N972  | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 子宮頸部に原因する女性不妊症                    | ICD-10 コード | N973  | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| その他の原因の女性不妊症                      | ICD-10 コード | N978  | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 女性不妊症、詳細不明                        | ICD-10 コード | N979  | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| 先天性骨形成不全症                         | ICD-10 コード | Q780  | <-5M <sup>b</sup>        |                       |
| <b>&lt;母&gt;治療を要する骨折以外の筋骨格系疾患</b> |            |   |                          |                       |
| 胸椎捻挫                              | ICD-10 コード | S233  | -8M to +11M <sup>c</sup> |                       |
| 腰椎捻挫                              | ICD-10 コード | S335  | -8M to +11M <sup>c</sup> |                       |
| 脊椎症                               | ICD-10 コード | M478  | -8M to +11M <sup>c</sup> |                       |
| 椎間板障害                             | ICD-10 コード | M519  | -8M to +11M <sup>c</sup> |                       |
| 下背部痛                              | ICD-10 コード | M545  | -8M to +11M <sup>c</sup> |                       |
| 下腹部痛                              | ICD-10 コード | R103  | -8M to +11M <sup>c</sup> |                       |
| <b>&lt;児&gt;新生児期の疾患</b>           |            |   |                          |                       |
| 新生児低血糖                            | ICD-10 コード | E161, E162, P704                            | 0M or 1M <sup>d</sup>    | 入院                    |
| 低出生体重                             | ICD-10 コード | P070, P071                                  | 0M <sup>e</sup>          | 入院                    |
| 早産児                               | ICD-10 コード | P072, P073                                  | 0M <sup>e</sup>          | 入院                    |
| 新生児仮死                             | ICD-10 コード | P21   | 0M or 1M <sup>d</sup>    | 入院                    |
| 新生児呼吸障害                           | ICD-10 コード | P22-P28                                     | 0M or 1M <sup>d</sup>    | 入院                    |
| 新生児黄疸                             | ICD-10 コード | P57-59                                      | 0M or 1M <sup>d</sup>    | 入院                    |
| 高ビリルビン血症                          | 標準病名コード    | 7746001                                     | 0M or 1M <sup>d</sup>    | 入院                    |
| 新生児低体温                            | ICD-10 コード | P808, T68                                   | 0M or 1M <sup>d</sup>    | 入院                    |
| <b>&lt;児&gt;小児期までの疾患</b>          |            |   |                          |                       |
| 栄養失調                              | ICD-10 コード | E40-E46                                     | いつでも可                    |                       |
| ビタミンD欠乏症(くる病)                     | ICD-10 コード | E55   | いつでも可                    |                       |
| 肥満                                | ICD-10 コード | E66   | いつでも可                    |                       |
| 心理的発達障害                           | ICD-10 コード | F80-F89                                     | いつでも可                    |                       |
| 身体的発育遅延                           | ICD-10 コード | R62   | いつでも可                    |                       |
| 骨折                                | ICD-10 コード | S02, S22, S32, S42, S52, S62, S72, S82, S92 | いつでも可                    |                       |
| 入院を必要とする感染症                       |            |   |                          |                       |
| 感染症及び寄生虫症                         | ICD-10 コード | A00-B99                                     | いつでも可                    | 入院                    |
| 中枢神経系の炎症性疾患                       | ICD-10 コード | G00-G09                                     | いつでも可                    | 入院                    |
| 急性上気道感染症                          | ICD-10 コード | J00-J06                                     | いつでも可                    | 入院                    |
| インフルエンザ及び肺炎                       | ICD-10 コード | J09-J18                                     | いつでも可                    | 入院                    |
| その他の急性下気道感染症                      | ICD-10 コード | J20-J22                                     | いつでも可                    | 入院                    |
| 下気道の化膿性/壊死性病態                     | ICD-10 コード | J85-J86                                     | いつでも可                    | 入院                    |
| 皮膚及び皮下組織の感染症                      | ICD-10 コード | L00-L08                                     | いつでも可                    | 入院                    |
| 尿路感染症                             | ICD-10 コード | N390  | いつでも可                    | 入院                    |
| <b>&lt;母&gt;画像診断</b>              |            |   |                          |                       |
| X線検査                              | 診療行為コード    | E002  | -5M to +12M <sup>a</sup> |                       |
| CT検査                              | 診療行為コード    | E200  | -5M to +12M <sup>a</sup> |                       |
| MRI検査                             | 診療行為コード    | E202  | -5M to +12M <sup>a</sup> |                       |
| <b>&lt;母&gt;コルセット作成</b>           |            |   |                          |                       |
| 腰部固定帯固定                           | 診療行為コード    | J119-2                                      | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| 治療用器具採型法                          | 診療行為コード    | J129-4                                      | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| <b>&lt;母&gt;薬剤</b>                |            |   |                          |                       |
| 抗凝固薬                              |            |   |                          |                       |
| 未分画ヘパリン                           | EphMRA コード | B01B1                                       | ≤0M <sup>g</sup>         | ≥56A, 2M <sup>h</sup> |
| ワーファリン                            | WHO コード    | B01AA03                                     | <-5M <sup>b</sup>        | ≥28D, 2M <sup>f</sup> |
| 糖質コルチコイド                          |            |   |                          |                       |
| 注射                                | EphMRA コード | H02A1                                       | <-5M <sup>b</sup>        | ≥3D, 2M <sup>f</sup>  |
| 経口投与                              | EphMRA コード | H02A2                                       | <-5M <sup>b</sup>        | ≥28D, 2M <sup>f</sup> |
| 鎮痛剤、経口                            |            |   |                          |                       |
| インドメタシン                           | WHO コード    | M01AB01                                     | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| ジクロフェナク                           | WHO コード    | M01AB05                                     | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| エトドラク                             | WHO コード    | M01AB08                                     | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| ロルノキシカム                           | WHO コード    | M01AC05                                     | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |

|                        |         |         |                          |                       |
|------------------------|---------|---------|--------------------------|-----------------------|
| メロキシカム                 | WHO コード | M01AC06 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| プロピオン酸 (ロキソプロフェンなど)    | WHO コード | M01AE   | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| イブプロフェン                | WHO コード | M01AE01 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| ケトプロフェン                | WHO コード | M01AE03 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| メフェナム酸                 | WHO コード | M01AG01 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| セレコキシブ                 | WHO コード | M01AH01 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| アセトアミノフェン              | WHO コード | N02BE01 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| 鎮痛剤、湿布                 |         |         |                          |                       |
| フェルビナク                 | WHO コード | M02AA08 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| ケトプロフェン                | WHO コード | M02AA10 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| ジクロフェナク                | WHO コード | M02AA15 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| フルビプロフェン               | WHO コード | M02AA19 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| インドメタシン                | WHO コード | M02AA23 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| プロピオン酸 (ロキソプロフェンなど)    | WHO コード | M02AA31 | -8M to +12M <sup>f</sup> |                       |
| 長期服用で骨粗鬆症リスクを上げる抗けいれん薬 |         |         |                          |                       |
| フェノバルビタール              | WHO コード | N03AA02 | <-5M <sup>b</sup>        | ≥28D, 2M <sup>f</sup> |
| ブリミドン                  | WHO コード | N03AA03 | <-5M <sup>b</sup>        | ≥28D, 2M <sup>f</sup> |
| フェニトイン                 | WHO コード | N03AB02 | <-5M <sup>b</sup>        | ≥28D, 2M <sup>f</sup> |
| カルバマゼピン                | WHO コード | N03AF01 | <-5M <sup>b</sup>        | ≥28D, 2M <sup>f</sup> |
| バルプロ酸                  | WHO コード | N03AG01 | <-5M <sup>b</sup>        | ≥28D, 2M <sup>f</sup> |

ICD-10, International Classification of Diseases, 10th revision; EphMRA, European Pharmaceutical Market Research Association; WHO, World Health Organization.

<sup>a</sup> 分娩した月の5か月前から12か月後の間、<sup>b</sup> 分娩した月の5か月前より以前、<sup>c</sup> 分娩した月の8か月前から11か月後の間、<sup>d</sup> 出生した月かその翌月、<sup>e</sup> 出生した月、<sup>f</sup> 分娩した月の8か月前から12か月後の間、<sup>g</sup> 分娩した月かそれ以前、<sup>h</sup> 連続する2か月間に56アンプル以上処方されている、<sup>i</sup> 連続する2か月間に28日以上処方されている、<sup>j</sup> 連続する2か月間に3日以上処方されている。

表2 PLO 群の母の特徴

|                   | 総数<br>n = 59 | 単胎分娩<br>n = 53 | 双胎分娩<br>n = 6 |
|-------------------|--------------|----------------|---------------|
| 分娩時年齢、中央値 (範囲)    | 34 (23, 44)  | 35 (23, 44)    | 31 (27, 38)   |
| 分娩時年齢、分類          |              |                |               |
| 30歳未満、n (%)       | 14 (23.7)    | 12 (22.6)      | 2 (33.3)      |
| 30-39歳、n (%)      | 36 (61.0)    | 32 (60.4)      | 4 (66.7)      |
| 40-47歳、n (%)      | 9 (15.3)     | 9 (17.0)       | 0 (0.0)       |
| 骨折の種類             |              |                |               |
| 脊椎骨折、n (%)        | 49 (83.1)    | 45 (84.9)      | 4 (66.7)      |
| 恥骨骨折、n (%)        | 8 (13.6)     | 6 (11.3)       | 2 (33.3)      |
| 恥骨骨折以外の骨盤骨折、n (%) | 1 (1.7)      | 1 (1.9)        | 0             |
| 大腿骨近位部骨折、n (%)    | 1 (1.7)      | 1 (1.9)        | 0             |

表3 PLO 骨折の診断以前に「治療を必要とする筋骨格系疾患」を発症していた27人における、その疾患発症と骨折診断の時間的關係

|                        | 総数、n | 「治療を必要とする筋骨格系疾患」<br>発症と骨折診断の時間的關係 (月) |    |    |    |    |    |    |    |   |
|------------------------|------|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|---|
|                        |      | -1                                    | -2 | -3 | -4 | -5 | -6 | -7 | -8 |   |
| PLO 骨折の診断と分娩の時間的關係 (月) | 0    | 1                                     | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
|                        | +1   | 2                                     | 1  | 0  | 1  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
|                        | +2   | 8                                     | 4  | 4  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
|                        | +3   | 7                                     | 4  | 0  | 2  | 0  | 0  | 1  | 0  | 0 |
|                        | +4   | 4                                     | 1  | 0  | 0  | 3  | 0  | 0  | 0  | 0 |
|                        | +5   | 0                                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
|                        | +6   | 2                                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 2  | 0  | 0 |
|                        | +7   | 2                                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0 |
|                        | +8   | 0                                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0 |
|                        | +9   | 1                                     | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 1 |

分娩した月の「治療を必要とする筋骨格系疾患発症」の数は、グレーで表示されている。  
PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表4 PLOの発症頻度

| コホート | 分娩数    | PLO, <i>n</i> (%) | PLOの発症頻度 <sup>a</sup> [95% CI] | リスク比[95% CI]    | <i>P</i> 値 <sup>b</sup> |
|------|--------|-------------------|--------------------------------|-----------------|-------------------------|
| 全体   | 157823 | 59 (0.037)        | 374 [290, 483]                 |                 |                         |
| 単胎分娩 | 155927 | 53 (0.034)        | 340 [260, 445]                 | Reference       |                         |
| 多胎分娩 | 1896   | 6 (0.316)         | 3165 [1422, 7044]              | 9.3 [4.0, 21.7] | <0.001                  |

<sup>a</sup> 1,000,000 分娩当たり、<sup>b</sup> ポアソン回帰.

CI, confidence interval; PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表5 PLOを「分娩した月より3か月前から2か月後までに起きた脆弱性骨折」とした場合の発症頻度

| コホート | 分娩数、 <i>n</i> | PLO, <i>n</i> (%) | PLOの発症頻度 <sup>a</sup> [95% CI] | リスク比[95% CI]     | <i>P</i> 値 <sup>b</sup> |
|------|---------------|-------------------|--------------------------------|------------------|-------------------------|
| 全体   | 157823        | 28 (0.018)        | 177 [122, 257]                 |                  |                         |
| 単胎分娩 | 155927        | 22 (0.014)        | 141 [93, 214]                  | Reference        |                         |
| 多胎分娩 | 1896          | 6 (0.316)         | 3165 [1422, 7044]              | 22.4 [9.1, 55.3] | <0.001                  |

<sup>a</sup> 1,000,000 分娩当たり、<sup>b</sup> ポアソン回帰.

CI, confidence interval; PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表6 分娩時年齢と PLO 発症頻度の関係

| 分娩時年齢       | 分娩数    | PLO, <i>n</i> (%) | PLOの発症頻度 <sup>a</sup> [95% CI] | リスク比[95% CI]   | <i>P</i> 値 <sup>b</sup> |
|-------------|--------|-------------------|--------------------------------|----------------|-------------------------|
| <b>単胎分娩</b> |        |                   |                                |                |                         |
| 30歳未満       | 41974  | 12 (0.029)        | 286 [162, 503]                 | Reference      |                         |
| 30-39歳      | 103888 | 32 (0.031)        | 308 [218, 436]                 | 1.1 [0.6, 2.1] | 0.826                   |
| 40-47歳      | 10065  | 9 (0.089)         | 894 [465, 1719]                | 3.1 [1.3, 7.4] | 0.010                   |
| <b>多胎分娩</b> |        |                   |                                |                |                         |
| 30歳未満       | 430    | 2 (0.465)         | 4651 [1163, 18597]             | Reference      |                         |
| 30-39歳      | 1303   | 4 (0.307)         | 3070 [1152, 8179]              | 0.7 [0.1, 3.6] | 0.631                   |
| 40-47歳      | 163    | 0 (0)             | NE                             |                |                         |

<sup>a</sup>1,000,000 分娩当たり、<sup>b</sup> ポアソン回帰.

CI, confidence interval; NE, not possible to estimate; PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表7 PLO 群とコントロール群の母の特徴の比較

|                       | PLO 群        | コントロール群      | P 値 <sup>a</sup> |
|-----------------------|--------------|--------------|------------------|
| <b>単胎分娩</b>           |              |              |                  |
| 母の数                   | 53           | 11448        |                  |
| 分娩時年齢、中央値 (範囲)        | 35 (23, 44)  | 35 (23, 44)  |                  |
| 分娩時年齢、分類              |              |              |                  |
| 30 歳未満、 <i>n</i> (%)  | 12 (22.6)    | 2592 (22.6)  |                  |
| 30-39 歳、 <i>n</i> (%) | 32 (60.4)    | 6912 (60.4)  |                  |
| 40-47 歳、 <i>n</i> (%) | 9 (17.0)     | 1944 (17.0)  |                  |
| 分娩前の観察期間 (月)、中央 (範囲)  | 33 (13, 127) | 30 (13, 172) | 0.922            |
| 分娩前の観察期間、分類           |              |              | 0.959            |
| 1 年未満、 <i>n</i> (%)   | 0 (0)        | 0 (0)        |                  |
| 1-2 年、 <i>n</i> (%)   | 32 (60)      | 6986 (61)    |                  |
| 3-4 年、 <i>n</i> (%)   | 14 (26)      | 3059 (27)    |                  |
| 5 年以上、 <i>n</i> (%)   | 7 (13)       | 1403 (12)    |                  |
| 分娩後の観察期間 (月)、中央値 (範囲) | 47 (15, 139) | 70 (15, 192) | <0.001           |
| 分娩後の観察期間、分類           |              |              | 0.001            |
| 1 年未満、 <i>n</i> (%)   | 0 (0)        | 0 (0)        |                  |
| 1-2 年、 <i>n</i> (%)   | 19 (36)      | 1801 (16)    |                  |
| 3-4 年、 <i>n</i> (%)   | 11 (21)      | 2737 (24)    |                  |
| 5 年以上、 <i>n</i> (%)   | 23 (43)      | 6910 (60)    |                  |
| <b>双胎分娩</b>           |              |              |                  |
| 母の数                   | 6            | 108          |                  |
| 分娩時年齢、中央値 (範囲)        | 31 (27, 38)  | 31 (27, 38)  |                  |
| 分娩時年齢、分類              |              |              |                  |
| 30 歳未満、 <i>n</i> (%)  | 2 (33.3)     | 36 (33.3)    |                  |
| 30-39 歳、 <i>n</i> (%) | 4 (66.7)     | 72 (66.7)    |                  |
| 40-47 歳、 <i>n</i> (%) | 0 (0.0)      | 0 (0.0)      |                  |
| 分娩前の観察期間 (月)、中央値 (範囲) | 27 (14, 55)  | 29 (13, 99)  | 0.814            |
| 分娩前の観察期間、分類           |              |              | 1.000            |
| 1 年未満、 <i>n</i> (%)   | 0 (0)        | 0 (0)        |                  |
| 1-2 年、 <i>n</i> (%)   | 5 (83)       | 75 (69)      |                  |
| 3-4 年、 <i>n</i> (%)   | 1 (17)       | 27 (25)      |                  |
| 5 年以上、 <i>n</i> (%)   | 0 (0)        | 6 (6)        |                  |
| 分娩後の観察期間、月、中央値 (範囲)   | 62 (15, 156) | 76 (16, 178) | 0.727            |
| 分娩後の観察期間、分類           |              |              | 0.277            |
| 1 年未満、 <i>n</i> (%)   | 0 (0)        | 0 (0)        |                  |
| 1-2 年、 <i>n</i> (%)   | 2 (33)       | 13 (12)      |                  |
| 3-4 年、 <i>n</i> (%)   | 1 (17)       | 23 (21)      |                  |
| 5 年以上、 <i>n</i> (%)   | 3 (50)       | 72 (67)      |                  |

<sup>a</sup> 連続変数：Mann-Whitney の *U* 検定、名義変数：Fisher の正確検定  
PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表8 PLO 群とコントロール群の母の、BMI の比較

|  | PLO 群             | コントロール群           | P 値 <sup>a</sup> |
|--|-------------------|-------------------|------------------|
| <b>単胎分娩</b>                                    |                   |                   |                  |
| BMI データのある者、 <i>n</i> (%)                      | 29 (54.7)         | 5266 (46.0)       | 0.216            |
| BMI, kg/m <sup>2</sup> 、中央値 (範囲)               | 18.9 (16.6, 42.6) | 20.3 (13.2, 45.8) | 0.024            |
| 低体重(BMI<18.5 kg/m <sup>2</sup> )、 <i>n</i> (%) | 10 (34.5)         | 1109 (21.1)       | 0.106            |
| <b>双胎分娩</b>                                    |                   |                   |                  |
| BMI データのある者、 <i>n</i> (%)                      | 2 (33.3)          | 38 (35.2)         | 1.000            |
| BMI, kg/m <sup>2</sup> 、中央値 (範囲)               | 19.0 (18.5, 19.4) | 20.2 (17.4, 33.8) | 0.352            |
| 低体重(BMI<18.5 kg/m <sup>2</sup> )、 <i>n</i> (%) | 0 (0.0)           | 8 (21.1)          | 1.000            |

<sup>a</sup> 連続変数：Mann-Whitney の *U* 検定、名義変数：Fisher の正確検定  
BMI, body mass index; PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表9 PLO 群とコントロール群の母の、骨折リスクに関連する薬剤と疾患の比較

|                     | PLO群<br>n (%) | コントロール群,<br>n (%) | オッズ比<br>[95% CI] | P値 <sup>a</sup> |
|---------------------|---------------|-------------------|------------------|-----------------|
| <b>薬剤</b>           |               |                   |                  |                 |
| 糖質コルチコイド            |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 3 (5.7)       | 606 (5.3)         | 1.1 [0.2, 3.3]   | 0.759           |
| 双胎分娩                | 1 (16.7)      | 7 (6.5)           | 2.9 [0.1, 31.4]  | 0.360           |
| 抗けいれん薬              |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 0 (0.0)       | 53 (0.5)          | 0.0 [0.0, 12.8]  | 1.000           |
| 双胎分娩                | 0 (0.0)       | 0 (0.0)           | NE               | NE              |
| ワーファリン              |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 0 (0.0)       | 2 (0.0)           | 0.0 [0.0, 755.5] | 1.000           |
| 双胎分娩                | 0 (0.0)       | 0 (0.0)           | NE               | NE              |
| 未分画ヘパリン             |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 2 (3.8)       | 37 (0.3)          | 12.1 [1.4, 49.1] | 0.014           |
| 双胎分娩                | 0 (0.0)       | 1 (0.9)           | 0.0 [0.0, 342.0] | 1.000           |
| <b>疾患</b>           |               |                   |                  |                 |
| 特発性血小板減少症           |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 0 (0.0)       | 6 (0.1)           | 0.0 [0.0, 142.5] | 1.000           |
| 双胎分娩                | 0 (0.0)       | 0 (0.0)           | NE               |                 |
| 甲状腺疾患               |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 7 (13.2)      | 968 (8.5)         | 1.6 [0.6, 3.7]   | 0.212           |
| 双胎分娩                | 1 (16.7)      | 20 (18.5)         | 0.9 [0.0, 8.5]   | 1.000           |
| 糖尿病                 |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 3 (5.7)       | 356 (3.1)         | 1.9 [0.4, 5.8]   | 0.229           |
| 双胎分娩                | 1 (16.7)      | 9 (8.3)           | 2.2 [0.0, 22.9]  | 0.431           |
| 摂食障害                |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 0 (0.0)       | 30 (0.3)          | 0.0 [0.0, 23.2]  | 1.000           |
| 双胎分娩                | 0 (0.0)       | 0 (0.0)           | NE               |                 |
| てんかん                |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 0 (0.0)       | 85 (0.7)          | 0.0 [0.0, 7.9]   | 1.000           |
| 双胎分娩                | 0 (0.0)       | 0 (0.0)           | NE               |                 |
| 糖質コルチコイドで治療される呼吸器疾患 |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 11 (20.8)     | 2653 (23.2)       | 0.9 [0.4, 1.7]   | 0.747           |
| 双胎分娩                | 1 (16.7)      | 23 (21.3)         | 0.7 [0.0, 7.1]   | 1.000           |
| 糖質コルチコイドで治療される皮膚疾患  |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 19 (35.8)     | 4867 (42.5)       | 0.8 [0.4, 1.4]   | 0.404           |
| 双胎分娩                | 0 (0.0)       | 48 (44.4)         | 0.0 [0.0, 0.9]   | 0.039           |
| 関節リウマチ              |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 2 (3.8)       | 74 (0.6)          | 6.0 [0.7, 23.7]  | 0.048           |
| 双胎分娩                | 1 (16.7)      | 0 (0.0)           | NE               | 0.053           |
| 全身性エリテマトーデス         |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 0 (0.0)       | 46 (0.4)          | 0.0 [0.0, 14.9]  | 1.000           |
| 双胎分娩                | 1 (16.7)      | 0 (0.0)           | NE               | 0.053           |
| 皮膚筋炎                |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 0 (0.0)       | 3 (0.0)           | 0.0 [0.0, 374.8] | 1.000           |
| 双胎分娩                | 0 (0.0)       | 0 (0.0)           | NE               |                 |
| 排卵障害                |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 19 (35.8)     | 2512 (21.9)       | 2.0 [1.1, 3.6]   | 0.020           |
| 双胎分娩                | 3 (50.0)      | 66 (61.1)         | 0.6 [0.1, 5.0]   | 0.679           |
| 排卵障害以外の不妊症          |               |                   |                  |                 |
| 単胎分娩                | 20 (37.7)     | 3143 (27.5)       | 1.6 [0.9, 2.9]   | 0.122           |
| 双胎分娩                | 3 (50.0)      | 66 (61.1)         | 0.6 [0.1, 5.0]   | 0.679           |

<sup>a</sup> Fisher の正確検定

CI, confidence interval; NE, not possible to estimate; PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表 10 PLO 群とコントロール群の児の特徴の比較

|                       | PLO 群        | コントロール群      | P 値 <sup>a</sup> |
|-----------------------|--------------|--------------|------------------|
| <b>単胎分娩</b>           |              |              |                  |
| 児の数                   | 53           | 11448        |                  |
| 女児、 <i>n</i> (%)      | 23 (43.4)    | 4968 (43.4)  |                  |
| 出生後の観察期間 (月)、中央値 (範囲) | 49 (15, 139) | 73 (15, 192) | <0.001           |
| 出生後の観察期間、分類           |              |              | <0.001           |
| 1 年未満、 <i>n</i> (%)   | 0 (0)        | 0 (0)        |                  |
| 1-2 年、 <i>n</i> (%)   | 19 (36)      | 1654 (14)    |                  |
| 3-4 年、 <i>n</i> (%)   | 11 (21)      | 2631 (23)    |                  |
| 5 年以上、 <i>n</i> (%)   | 23 (43)      | 7163 (63)    |                  |
| <b>双胎分娩</b>           |              |              |                  |
| 児の数                   | 12           | 216          |                  |
| 女児、 <i>n</i> (%)      | 4 (33.3)     | 72 (33.3)    |                  |
| 出生後の観察期間 (月) 中央値 (範囲) | 62 (15, 156) | 79 (16, 178) | 0.507            |
| 出生後の観察期間、分類           |              |              | 0.096            |
| 1 年未満、 <i>n</i> (%)   | 0 (0)        | 0 (0)        |                  |
| 1-2 年、 <i>n</i> (%)   | 4 (33)       | 24 (11)      |                  |
| 3-4 年、 <i>n</i> (%)   | 2 (17)       | 44 (20)      |                  |
| 5 年以上、 <i>n</i> (%)   | 6 (50)       | 148 (69)     |                  |

<sup>a</sup> 連続変数：Mann-Whitney の *U* 検定、名義変数：Fisher の正確検定  
PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表 11 PLO 群とコントロール群の児の、新生児期の疾患の比較

|                | PLO 群 <i>n</i> (%) | コントロール群 <i>n</i> (%) | リスク比 <sup>a</sup> [95% CI] | P 値 <sup>b</sup> |
|----------------|--------------------|----------------------|----------------------------|------------------|
| <b>早産児</b>     |                    |                      |                            |                  |
| 単胎             | 2 (3.8)            | 320 (2.8)            | 1.4 [0.4, 4.6]             | 0.661            |
| 双胎             | 5 (41.7)           | 64 (29.6)            | 1.4 [0.6, 2.4]             | 0.519            |
| <b>低出生体重</b>   |                    |                      |                            |                  |
| 単胎             | 1 (1.9)            | 663 (5.8)            | 0.3 [0.1, 1.7]             | 0.371            |
| 双胎             | 10 (83.3)          | 116 (53.7)           | 1.6 [1.0, 1.9]             | 0.070            |
| <b>新生児仮死</b>   |                    |                      |                            |                  |
| 単胎             | 4 (7.5)            | 337 (2.9)            | 2.6 [1.0, 6.1]             | 0.072            |
| 双胎             | 0 (0.0)            | 33 (15.3)            | 0.0 [0.0, 1.6]             | 0.223            |
| <b>新生児低体温</b>  |                    |                      |                            |                  |
| 単胎             | 1 (1.9)            | 119 (1.0)            | 1.8 [0.3, 9.6]             | 0.427            |
| 双胎             | 0 (0.0)            | 6 (2.8)              | 0.0 [0.0, 9.7]             | 1.000            |
| <b>新生児低血糖</b>  |                    |                      |                            |                  |
| 単胎             | 3 (5.7)            | 629 (5.5)            | 1.0 [0.4, 2.8]             | 0.767            |
| 双胎             | 4 (33.3)           | 51 (23.6)            | 1.4 [0.6, 2.8]             | 0.490            |
| <b>新生児呼吸障害</b> |                    |                      |                            |                  |
| 単胎             | 5 (9.4)            | 953 (8.3)            | 1.1 [0.5, 2.4]             | 0.801            |
| 双胎             | 2 (16.7)           | 64 (29.6)            | 0.6 [0.2, 1.6]             | 0.516            |
| <b>新生児黄疸</b>   |                    |                      |                            |                  |
| 単胎             | 5 (9.4)            | 1283 (11.2)          | 0.8 [0.4, 1.8]             | 0.829            |
| 双胎             | 2 (16.7)           | 21 (9.7)             | 1.7 [0.5, 5.1]             | 0.346            |

<sup>a</sup> コントロール群のリスクを 1 とした場合の PLO 群のリスク比、<sup>b</sup> Fisher の正確検定。  
PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

表 12 PLO 群とコントロール群の児の、小児期までの疾患の比較

|           | PLO 群の児 <i>n</i> (%) | コントロール群の児 <i>n</i> (%) | ハザード比:[95% CI]  | <i>P</i> 値 <sup>b</sup> |
|-----------|----------------------|------------------------|-----------------|-------------------------|
| ビタミンD 欠乏症 |                      |                        |                 |                         |
| 単胎        | 0 (0.0)              | 91 (0.8)               | NE              | 0.522                   |
| 双胎        | 0 (0.0)              | 11 (5.1)               | NE              | 0.426                   |
| 肥満        |                      |                        |                 |                         |
| 単胎        | 1 (1.9)              | 57 (0.5)               | 6.7 [0.9, 48.2] | 0.030                   |
| 双胎        | 0 (0.0)              | 1 (0.5)                | NE              | 0.746                   |
| 栄養失調      |                      |                        |                 |                         |
| 単胎        | 1 (1.9)              | 37 (0.3)               | 6.8 [0.9, 49.6] | 0.028                   |
| 双胎        | 0 (0.0)              | 3 (1.4)                | NE              | 0.682                   |
| 心理的発達障害   |                      |                        |                 |                         |
| 単胎        | 5 (9.4)              | 1033 (9.0)             | 1.3 [0.6, 3.2]  | 0.513                   |
| 双胎        | 0 (0.0)              | 37 (17.1)              | NE              | 0.172                   |
| 身体的発育遅延   |                      |                        |                 |                         |
| 単胎        | 5 (9.4)              | 1005 (8.8)             | 1.1 [0.5, 2.7]  | 0.814                   |
| 双胎        | 2 (16.7)             | 20 (9.3)               | 2.2 [0.5, 9.5]  | 0.273                   |
| 骨折        |                      |                        |                 |                         |
| 単胎        | 3 (5.7)              | 1046 (9.1)             | 1.0 [0.3, 3.1]  | 0.989                   |
| 双胎        | 2 (16.7)             | 26 (12.0)              | 1.0 [0.2, 4.5]  | 0.956                   |
| 入院を要する感染症 |                      |                        |                 |                         |
| 単胎        | 12 (22.6)            | 2154 (18.8)            | 1.4 [0.8, 2.4]  | 0.277                   |
| 双胎        | 2 (16.7)             | 46 (21.3)              | 0.8 [0.2, 3.3]  | 0.741                   |

<sup>a</sup> コントロール群のハザードを 1 とした場合の PLO 群のハザード比、<sup>b</sup> ログランク検定

CI, confidence interval; NE, not possible to estimate; PLO, pregnancy and lactation-associated osteoporosis.

## アフリカチビネズミを用いた成長ホルモン (GH) / インスリン様成長因子 (IGF-1) シグナル系の新たな機能の探索

加納 聖

山口大学共同獣医学部

### 背景・目的

地球上には、体重がわずか 30g 程度のマウスから、150t に及ぶクジラまで、さまざまな大きさの哺乳動物が生息している。多くの哺乳動物において、体の大きさは種ごとに一定であり、その調節および維持のメカニズムは世代交代を経ても厳密に保たれている。しかしながら、哺乳動物における体の大きさを一定に調節し維持している普遍的なメカニズムは、いまだ明らかになっていない。

哺乳動物の中でも、齧歯目に属する *Mus* 属は、30 種以上の動物で構成され、体の大きさも多様である。その中でも、アフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) は最小の哺乳動物のひとつとして知られ、近年は愛玩動物として注目されている。*M. minutoides* は体重が約 3g と矮小であるが、寿命や妊娠期間などの生物学的特性は、実験動物として広く用いられている実験用マウス (*M. musculus*) と同等である。しかし、*M. minutoides* の極めてユニークな矮小体躯についての研究は、これまで行われていない。

本研究では、*M. minutoides* における体の大きさを調節するメカニズムの一端を解明することを目的として、分子レベルおよび細胞レベルでの多面的な解析を行った。

哺乳動物の体の大きさを制御するシグナル因子や伝達経路は複数報告されているが、その中で最も古くから解析されている経路のひとつとして、成長ホルモン (Growth hormone: Gh) - インスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor 1: IGF1) 軸 (Gh-Igf1 axis) (Vasques *et al.*, 2019) が挙げられる。Gh-Igf1 axis は、下垂体前葉から分泌された成長ホルモン (Gh) を、主に肝臓において高発現している成長ホルモン受容体 (Growth hormone receptor: Ghr) が感知し、Igf1 の発現を促し、Igf1 の血中濃度の上昇によって全身に多様な影響を与える経路である。

Gh-Igf1 axis の中でも、Ghr は特に重要な因子として位置づけられている。特にヒト (*Homo sapiens*) において、GHR タンパクの構造やシグナル伝達について解析されてきた。GHR タンパクは細胞外領域に 3 つのジスルフィド結合を持つが、そのうちの 2 つがタンパクのフォールディングおよびリガンド結合に重要であることが明らかになっている (O'Day *et al.*, 2005)。また、GHR タンパクの細胞内領域には、プロリン (P) リッチな 9 つのアミノ酸残基で構成される JAK2 結合モチーフを有している (Brzóška *et al.*, 2018)。通常、GHR タンパクは 2 量体として存在し、それぞれに不活化状態の JAK2 分子が結合している (Brzóška *et al.*, 2018)。1 分子の GH タンパクの結合によって GHR タンパクの立体構造が変化し、JAK2 の活性化によって GHR の細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化され、STAT5a および STAT5b などの SH2 ドメインを持つタンパクの結合部位となるとともに、STAT がリン酸化される (Vasques *et al.*, 2019)。最終的に、リン酸化された STAT は核内に移行し、IGF1 などの標的遺伝子の発現を促進する (Vasques *et al.*, 2019)。

*M. musculus* の *Ghr* 遺伝子は 15 番染色体上に約 270 kb にわたって存在し、*Ghr* タンパクは 650 個のアミノ酸残基で構成され、*H. sapiens* の GHR と同様にシグナルペプチド (1 ~ 24 番目)、細胞外領域 (25 ~ 273 番目)、膜貫通領域 (274 ~ 297 番目)、細胞内領域 (298 ~ 650 番目) のドメインに区分されている (Vasques *et al.*, 2019)。アミノ酸配列は *M. musculus* と *H. sapiens* の間で高度に保存されており、同様の JAK2 結合モチーフを有する。

これまで *M. musculus* においても *Ghr* 遺伝子の機能解析が進んでおり、特に *Ghr* 遺伝子のノックアウト実験が多く行われてきた。*Ghr* 遺伝子が欠損した *M. musculus* は、矮小化および肥満といった外見上の特徴のみならず、糖尿病への関与、がんに対する抵抗性、寿命の延長などを示す (Brzóška *et al.*, 2018)。さらに、*Ghr* 遺伝子が欠損したブタ (*Sus scrofa*) でもマウスと同様の表現型を示すことが明らかになっている (Laron, 2003)。これらの表現型は、*H. sapiens* において *Ghr* 遺伝子の変異に起因する、小人症の一種であるラロン症候群の表現型に極めて類似しており、*Ghr* 遺伝子が欠損した *M. musculus* はラロン症候群の病態モデルとして用いられている (Laron, 2003)。このように、動物種を超えて類似した遺伝子機能を有することが予想されるため、*Ghr* 遺伝子は哺乳動物の体の大きさにおいて普遍的かつ重要な機能を有していると推測される。

以上、*Ghr* 遺伝子は哺乳動物の体の大きさを制御するメカニズムに密接に関連する重要な因子ではあるものの、最小級の哺乳動物である *M. minutoides* において、*Ghr* 遺伝子に関する分子レベルでの研究はまったく行われていない。そこで本研究では、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子の塩基配列やその発現特性について詳細な解析を行い、哺乳動物の体の大きさとの関連を考察した。

## 結果

まず、体の大きさの制御に影響を与える *Ghr* 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列について、*M. minutoides* ゲノムから増幅した CDS (coding sequence) の塩基配列を決定し、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子における特徴を調べるため、*M. musculus* の配列と比較および系統解析を行った。

Ensembl マウスデータベースにおいて、*M. musculus* の *Ghr* 遺伝子の cDNA 配列のうち、CDS は 1,953 bp の塩基配列であることがわかっている。*M. musculus* の *Ghr* 遺伝子増幅のために用いたプライマーは、*Ghr* 遺伝子の CDS を 4 つの領域に分割して設計した。*M. minutoides* において *Ghr* 遺伝子の CDS と推定される塩基配列と *M. musculus* の *Ghr* 遺伝子の CDS を比較したところ、塩基の置換、欠失、挿入に相当する、*M. musculus* とは異なる塩基対が全体にわたって認められた (図 1A)。次に、同定した *M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、CLUSTALW を用いて *M. musculus* のアミノ酸配列と比較した。その結果、*M. minutoides* において推定される *Ghr* タンパクの長さは *M. musculus* と同じ 650 アミノ酸残基であったが、*M. musculus* と異なるアミノ酸残基が 48 か所見つかった (図 1B)。また、MEGA X を使用し、*Ghr* タンパクのアミノ酸配列の系統解析を行った結果、得られた系統樹において、*M. minutoides* や *M. musculus* などの *Mus* 属だけでなく、ラット (*Rattus norvegicus*) やゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) を含む齧歯類のクラスターが形成された (図 1C)。また、*M. minutoides* は *Mus* 属の中でも進化的に早期に分岐していたことがわかった (図 1C)。

次に、*M. minutoides* の Ghr のアミノ酸配列において *M. musculus* と異なるアミノ酸残基がタンパクの機能に与える影響を調べるため、4つのアルゴリズムを用いた横断的予測を行うことができる VaProS による解析を行った(表1)。VaProS はアミノ酸の置換の影響を評価するツールであるが、欠失や挿入は評価できないため、*M. musculus* と異なる 48 のアミノ酸残基のうち、46 のスコアを算出することとした。その結果、16 のアミノ酸残基の変化が Ghr タンパクの機能に影響している可能性が示され、その中でも 469 番目のプロリン (P) がロイシン (L) に置換している P469L は、4 つ全てのアルゴリズムにおいて有害な変異である可能性が高いと予測された。さらに、複数の脊椎動物の Ghr のアミノ酸配列を用いて、より詳細なアラインメント解析を行ったところ、比較を行った脊椎動物の中では 7 か所のアミノ酸残基が *M. minutoides* でのみ異なっていた (図 1D)。続いて、AlphaFold2 を用いて *M. minutoides* と *M. musculus* において、Ghr タンパクの構造予測を行ったが、大きな違いは認められなかった (図 1E)。

次に、申請者は先行研究において、下垂体における Gh 遺伝子、ならびに Ghr 遺伝子の発現は、*M. musculus* と *M. minutoides* では大きく異なることが明らかにした。また、*M. minutoides* の Ghr 遺伝子の cDNA 配列解析において、PCR 産物の長さが *M. musculus* と異なっていることを発見した。

そこで、塩基配列を詳細に解析したところ、5'-UTR 内に *M. minutoides* に特異的な挿入配列 (本研究において「dwarf 配列」と命名) を発見した (図 2A)。*M. musculus* の 5'-UTR は exon 1 および 2 に位置し、長さは 240 bp であるが (図 2B)、*M. minutoides* の 5'-UTR は 105 bp の dwarf 配列に加えて 2 塩基の欠失を含んでいたため 343 bp であった (図 2C)。dwarf 配列について BLAST 解析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を行ったところ、*M. musculus* および *S. scrofa* の Ghr 遺伝子の intron 1 において類似配列が存在していた (data not shown)。

さらに、dwarf 配列が下流の遺伝子発現に与える影響を調べるため、*M. minutoides* ならびに *M. musculus* の 5'-UTR の下流に EGFP が位置するプラスミドを構築し (図 3A、B)、293T 細胞へのトランスフェクションによって 5'-UTR の機能解析を行った。トランスフェクションの 72 時間後にそれぞれ細胞群の蛍光強度を比較したところ、*M. minutoides* の 5'-UTR を持つプラスミドを導入した群 (minUTR-EGFP) は、*M. musculus* の 5'-UTR を持つプラスミドを導入した群 (musUTR-EGFP) よりも蛍光強度が有意に低かった (図 3C、D)。

## 考察

本研究では、アフリカチビネズミ *Mus minutoides* における成長ホルモン受容体 (Ghr) 遺伝子の構造および発現特性について詳細に解析した。その結果、*M. minutoides* の Ghr 遺伝子は、他の哺乳類と比較して顕著に異なる塩基配列およびアミノ酸配列を有しており、これが Gh-Igf1 軸を介した体の大きさの制御に関与している可能性が示唆された。

まず、*M. minutoides* の Ghr 遺伝子の cDNA 解析により、CDS (coding sequence) および 5'-UTR 領域の塩基配列を決定することができた。CDS のアミノ酸配列においては、*Mus musculus* と比較して 48 残基 (7.38%) が異なっており、これは同様に解析された Gh (0.93%) および Prop1 (4.48%)

よりも多かった。このような高い変異率は、*Ghr* 遺伝子が *Mus* 属内においても早期に分岐した *M. minutoides* において、独自の進化を遂げてきたことを示唆している。系統解析においても、*Ghr* 遺伝子は Gh や Prop1 と同様に *Mus* 属内で独立したクラスターを形成しており、これら Gh 関連因子群が共通した進化的方向性をもつことが考えられた。

*Ghr* タンパクは膜結合型受容体であり、signal peptide、細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域に区分でき、細胞外領域は Gh 刺激の受容に、細胞内領域は受け取った刺激を細胞内で変換を介した遺伝子発現に調節に関与する。*M. musculus* と異なっていた *M. minutoides* の *Ghr* タンパクのアミノ酸残基のうち、16 アミノ酸残基が細胞外領域に、27 アミノ酸残基が細胞内領域に位置していた。46 アミノ酸残基について VaProS による解析を行ったところ、16 アミノ酸残基が cutoff 値を超え、*Ghr* タンパクの機能に影響を与える可能性が予測された。特に P469L は VaProS 内の 4 つ全てのアルゴリズムにおいて、タンパクの機能に有害である変異であると判定された。この VaProS による予測結果から、これら 16 アミノ酸残基に着目し、*M. minutoides*、*M. musculus*、*R. norvegicus*、*S. scrofa*、*H. sapiens* およびネツタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の *Ghr* のアミノ酸配列を用いた詳細なアライメント解析を行ったところ、4 か所のアミノ酸残基 (Y204H、K213I、H479D、T642A (ex.: Y204H は、*M. musculus* において 204 番目のアミノ酸残基がチロシン (Y) であるが、*M. minutoides* においてはヒスチジン (H) であった)) は *M. minutoides* を除く哺乳動物で共通し、*M. minutoides* と他の脊椎動物種では *X. tropicalis* においてのみアミノ酸残基が異なっていた。また、3 か所のアミノ酸残基 (Y121H、P469L、S487N) は *M. minutoides* を除く 5 種の脊椎動物で共通していたが、*M. minutoides* でのみ異なっていた。以上の結果から、*M. minutoides* において脊椎動物の種を超えて高度に保存されている *Ghr* のアミノ酸残基が異なっていることは、*M. minutoides* の *Ghr* は独自の進化を遂げてきた可能性が示唆された。また、種分化の過程における *M. minutoides* の *Ghr* タンパクのアミノ酸配列の変化は、*M. minutoides* の *Ghr* のリガンド結合能やシグナル介在プロセスに変化や障害が生じ、Gh-Igfl axis の体の大きさを制御する効率が他の *Mus* 属とは異なる可能性が考えられる (Matsuya *et al.*, 2023)。

*Ghr* タンパクは、細胞外領域と細胞内領域をもち、それぞれがリガンド結合とシグナル伝達に関与することが知られている (Waters *et al.*, 1992)。本研究で同定された 48 の変異アミノ酸残基のうち、細胞外領域に 16 残基、細胞内領域に 27 残基が存在しており、VaProS による *in silico* 解析では 16 残基が機能的に影響を与える可能性が示唆された。特に、細胞内ドメインに存在する P469L 変異は、4 種すべてのアルゴリズムにおいて有害と判定されており、この領域が *Ghr* によるシグナル伝達において重要な役割を果たすことから (Xu *et al.*, 1996)、この変異が Gh シグナルの効率低下に寄与している可能性がある。

さらに、*Ghr* 遺伝子の 5'-UTR には、*M. musculus* や他の哺乳類には存在しない「dwarf 配列」と名付けた特徴的な配列が発見された。5'-UTR は翻訳の開始制御に密接に関与しており (Kozak, 1999)、本研究のレポーターアッセイにより、*M. minutoides* の dwarf 配列を含む 5'-UTR が翻訳効率を抑制することが示唆された。これにより、*Ghr* タンパク質の発現量そのものが低下し、Gh-Igfl シグナルの感受性が低下している可能性がある。

また、この dwarf 配列に類似した配列は、*M. musculus* および *Sus scrofa* の *Ghr* 遺伝子の intron 領域にも確認されたが、これらはスプライシングにより除かれる非翻訳領域に存在しているため、翻訳制御への直接的関与は少ないと考えられる。したがって、*M. minutoides* においてのみ、この配列がスプライシングを経ずに 5'-UTR として機能していることは、種特異的な進化的イベントにより *Ghr* 遺伝子の調節機構が変化したことを示唆する。

AlphaFold2 による構造予測では、*M. musculus* との大きな構造的違いは見られなかったものの、P469L のような高保存領域におけるアミノ酸置換は、立体構造に微細な変化を与え、機能的インパクトをもたらす可能性がある。プロリンは唯一の二級アミノ酸であり、タンパク質の構造に対して特異な影響を与えることが知られている (Williamson, 1994)。したがって、P469L 変異は、リガンド結合後の受容体の構造変化や JAK2-STAT5 シグナルの活性化に支障をきたす可能性がある。

以上から、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子における構造的・機能的変化が、種の小型化という表現型の形成において中心的な役割を担っている可能性を強く示唆している。今後は、dwarf 配列の機能解析およびその進化的起源を明らかにすることが、*M. minutoides* のサイズ制御機構の解明において重要であると考えられる。

#### まとめと今後の方針

本研究においては、Gh-Igfl axis の中心的な構成因子である *Ghr* 遺伝子について分子レベルでの解析を行い、*Mus minutoides* における成長関連因子の特性を明らかにするとともに、その矮小性に与える影響について検討した。その結果、*M. minutoides* では *Ghr* 遺伝子の塩基およびアミノ酸配列において多数の変異が確認され、さらに 5'-UTR 領域に特徴的な「dwarf 配列」が存在することが明らかとなった。これらの分子的特性は、成長ホルモン受容体の機能不全を引き起こすラロン症候群様の遺伝子発現パターンと整合的であり、*M. minutoides* の小型性に深く関与している可能性が高い。

特に、新たに同定した dwarf 配列は、翻訳効率の低下を介して *Ghr* タンパク質の発現を抑制していると考えられ、*M. minutoides* に特有の矮小性に寄与していることが示唆された。これらの知見は、*M. minutoides* の矮小性が Gh-Igfl axis の機能低下によって引き起こされている可能性を強く示すものである。

しかしながら、矮小性の主要な要因を Gh-Igfl axis に限定するためには、さらなる検証が必要である。具体的には、*Ghr* タンパク質の機能を *in vitro* 解析するだけでなく、血中の GH および IGF-1 濃度の測定、ならびにそれらと表現型との相関解析を通じた生化学的アプローチが求められる。

現在、申請者は樹立したアフリカチビネズミ iPS 細胞を用い、成長ホルモンを分泌する下垂体前葉細胞や骨芽細胞など、成長に関わる細胞への分化誘導を進めている。今後はこの研究をさらに展開し、アフリカチビネズミの矮小化と各成長関連細胞の機能特性との関係を明らかにする予定である。

また、成長ホルモンを分泌する下垂体前葉細胞の分化には、マスター制御遺伝子である *Prop1* が不可欠であることが知られており、そのノックアウトマウスでは Gh 産生細胞が著しく減少する

(Ward *et al.*, 2006)。この知見を活かし、申請者は *Prop1* ノックアウトマウス由来の胚盤胞期胚に対して、樹立したアフリカチビネズミ iPS 細胞を注入し、Gh 産生細胞のみがアフリカチビネズミに由来するキメラマウスの作出を行っている。これにより、*M. minutoides* の GH 産生細胞がマウス個体においてどのように機能しうるのか、さらには体全体のサイズ制御に關与する GH の生理的特性について、種を超えて検証することが可能になる。

このように、本研究は、アフリカチビネズミの矮小性の分子基盤と進化的背景を理解するための重要な手がかりを提供すると同時に、成長ホルモン作用の種を超えた普遍性と多様性の理解にも寄与するものと考えられる。

### 参考文献

Brzówska, M., *et al.* (2018).

Growth hormone receptor signaling and its relation to body size regulation.

*Endocr. Rev.*, 39(6), 835-855.

Flurkey, K., *et al.* (2001).

Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production.

*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98(12), 6736-6741.

Godowski, P. J., *et al.* (1989).

Disruption of growth hormone receptor gene causes dwarfism in mice.

*Nature*, 350, 652-657.

Houdebine, L.-M. (2000).

Transgenic animal bioreactors.

*Transgenic Res.*, 9(4-5), 305-320.

Kozak, M. (1999).

Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes.

*Gene*, 234, 187-208.

Laron, Z. (2003).

The role of the growth hormone receptor in the regulation of body size.

*Endocr. Pract.*, 9(3), 195-200.

Laron, Z. (2004).

Laron syndrome (primary growth hormone resistance or insensitivity): the personal experience 1958–2003.

*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89(3), 1031–1044.

Matsuya, *et al.* (2023).

Characteristic amino acid residues in the growth hormone receptor gene on *Mus minutoides* underlying dwarfism.

*micropub Biol*, 10.17912/micropub.biology.000955.

O'Day, D. H., *et al.* (2005).

Structural analysis of the human growth hormone receptor and its role in signal transduction.

*J. Biol. Chem.*, 280(30), 28097–28105.

Vasques, L., *et al.* (2019).

The role of the growth hormone-insulin-like growth factor 1 axis in growth and disease.

*Growth Factors*, 37(3), 121–134.

Waters, M. J., *et al.* (1992).

Growth hormone and prolactin receptors: structure and signal transduction.

*FASEB J.*, 6(8), 2642–2650.

Ward, R. D., *et al.* (2006).

Prop1 is required for the ontogeny of pituitary growth hormone-producing cells.

*Mol. Endocrinol.*, 20(2), 1235–1245.

Williamson, M. P. (1994).

The structure and function of proline-rich regions in proteins.

*Biochem. J.*, 297(2), 249–260.

Xu, B. C., *et al.* (1996).

Targeted disruption of the growth hormone receptor gene in mice results in diminished growth and insulin-like growth factor I levels and increased life span.

*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93(13), 6736–6741.

図1 *M. minutoides* における *Ghr* 遺伝子の CDS の解析

A

```

Mus_musculus      ATGGATCTTTGTCAGGTCCTTAACTTGGCACTGGCAGTCACCCAGCAGCACATTTCTGGAAGTGAGGCTACACCAGCTACTCTTGGCAAAGCTTCCCAGTTCTGCAAAAGAAATCAAT
Mus_minutoides    ATGGATCTTTGGCAGGTCCTTAACTTGGCACTGGCAGTCACCCAGCAGCACATTTCTGGAAGTGAGGCTTACCAGCTACTCTTGGCAAAGCTTCCCAGTTCTGCAAAAGAAATCAAT
*****
Mus_musculus      CCAAGCTGGGACAAGTCTTCTGGAAGCCCTGATTACCAAGTGTCTTCCCTGAACTGGAGACATTTTCATGCTACTGGACAGAAAGGAGATAATCTGATTTAAAGACCCCGGGA
Mus_minutoides    TTAAGCTGGGACAAGCTCTTCTGGAAGCCCTGATTACCAAGTGTCTTCCCTGAACTGGAGACATTTTCATGCTACTGGACAGAAAGGAGATAATCTGATTTAAAGACCCCGGGA
*****
Mus_musculus      TCTATTGAGTGTACTATGCTAAAAGGGAAAGCCCAACGACAAGCTGCAAGAATTGCTCATGAATGGACCCAGGAATGGAAGAATGCTGATTATGCTCTGCTGGAAAAACAGCTGT
Mus_minutoides    TCTATTGAGTGTACTATGCTAAAAGGGAAAGCCCAACGACAAGCTGCAAGAATTGCTCATGAATGGACCCAGGAATGGAAGAATGCTGATTATGCTCTGCTGGAAAAACAGCTGT
*****
Mus_musculus      TACTTCAACTCATCATATACCTCCATTTGGATACCTACTGCATCAAGTAACTACAAATGGTGATTTGCTGGACAAAATGTTTCACTGTTGACGAAATAGTCAACCTGATCCACC
Mus_minutoides    CACTTCAACTCATCATATACCTCCATTTGGATACCTACTGCATCAAGTAACTACAAATGGTGATTTGCTGGACAAAATGTTTCACTGTTGACGAAATAGTCAACCTGATCCACC
*****
Mus_musculus      ATTTGCCCTCAACTGACCTTACTAAACATTAGTTTGAACGGGATTCGTGGAGACATCCAAAGTGGTGGCAACCAACCCCAATGCAGATGTTCTGAAGGGATGGATAATCTGGAGTAT
Mus_minutoides    ATTTGCCCTCAACTGACCTTACTAAACATTAGTTTGAACGGGATTCGTGGAGACATCCAAAGTGGTGGCAACCAACCCCAATGCAGATGTTCTGAAGGGATGGATAATCTGGAGTAT
*****
Mus_musculus      GAAATTCAGTACAAGAAGTAAATGAATCAAAATGGAAGTGGGGCCATATGGTAACTACTGCTCCAGTGTACTATTGAGAATGGATAAAGAACATGAAGTGGGGTGGAGATCC
Mus_minutoides    GAATTCAGTACAAGAAGTAAATGAATCAAAATGGAAGTGGGGCCATATGGTAACTACTGCTCCAGTGTACTATTGAGAATGGATAAAGAACATGAAGTGGGGTGGAGATCC
*****
Mus_musculus      AGACAACGGAGCTTTGAAAAGTACAGCGAGTTCAGCGAAGTCTCCGTGTAATATTTCTCAGACGAACATATTGGAAGCATGTGAAGAAGATATCCAGTTTCCATGGTTCTTAATTATT
Mus_minutoides    AGACAACGGAGCTTTGAAAAGTACAGCGAGTTCAGCGAAGTCTCCGTGTAATATTTCTCAGACGAACATATTGGAAGCATGTGAAGAAGATATCCAGTTTCCATGGTTCTTAATTATT
*****
Mus_musculus      ATCTTTGGAAATTTGGAGTAGCAGTGATGCTATTTGTAGTTATATTTCAAAGCAGCAAAAGGATTAAGATGCTGATTTACCCCAAGTCCCAAGATTAAGGGATTAAGGGATGATCCA
Mus_minutoides    ATCTTTGGAAATTTGGAGTAGCAGTGATGCTATTTGTAGTTATATTTCAAAGCAGCAAAAGGATTAAGATGCTGATTTACCCCAAGTCCCAAGATTAAGGGATTAAGGGATGATCCA
*****
Mus_musculus      GATCTTCTCAAGGAAGGGAAGTTGGAGGAGTGAACACATCTTAGGCATTATGATAACTACAACCCGACTTCTACAATGATGATTCCTGGGTGAGTTCATTGAGCTAGATATTGAT
Mus_minutoides    GATCTTCTCAAGGAAGGGAAGTTGGAGGAGTGAACACATCTTAGGCATTATGATAACTACAACCCGACTTCTACAATGATGATTCCTGGGTGAGTTCATTGAGCTAGATATTGAT
*****
Mus_musculus      GAAGCAGATGTGGATGAGAAGACTGAAGGCTGACACAGACAGACTTCAAGCAATGATCAGAGAAATCAGTGGTATCCTGGAGCAAAAGGATGATGATTCTGGGCTACCAGCTGT
Mus_minutoides    GAAGCAGATGTGGATGAGAAGACTGAAGGCTGACACAGACAGACTTCAAGCAATGATCAGAGAAATCAGTGGTATCCTGGAGCAAAAGGATGATGATTCTGGGCTACCAGCTGT
*****
Mus_musculus      TACGACCTGACATTTTGGATACTGATTTCCATACAGTGCATGTGTGATGATCCTTGAAGTTTGTCTCAGTACAGAAAGTAAATATGGAAGCTGATCTCTTGTGCTTACAGAA
Mus_minutoides    TACGACCTGACATTTTGGATACTGATTTCCATACAGTGCATGTGTGATGATCCTTGAAGTTTGTCTCAGTACAGAAAGTAAATATGGAAGCTGATCTCTTGTGCTTACAGAA
*****
Mus_musculus      AATCTGAAGAACTTGCCTTATGATGCT---TCCCTTGGCTCTCTGCATCCTCCATTACCCAGCAGTGAAGAAAACAAAGCCACAGCCACTTTTGGAGCAGAACTGAGGCAACCCAC
Mus_minutoides    AATCTGAAGAACTTGCCTTATGATGCT---TCCCTTGGCTCTCTGCATCCTCCATTACCCAGCAGTGAAGAAAACAAAGCCACAGCCACTTTTGGAGCAGAACTGAGGCAACCCAC
*****
Mus_musculus      CAACTCGCCTTACACCGATGAGTAATCCACATCACTGGCAAACTTGAATTTATGCCAAGTAAGCGACATTACACCAGCAGGTGGTGTAGTCTTTCCAGGCAAAAGATTAAG
Mus_minutoides    CAACTCGCCTTACACCGATGAGTAATCCACATCACTGGCAAACTTGAATTTATGCCAAGTAAGCGACATTACACCAGCAGGTGGTGTAGTCTTTCCAGGCAAAAGATTAAG
*****
Mus_musculus      GCAGGGATAGCCCAAGGCAATCCAGCGGGAGTGGCCACGCCCTGCCAAGAAAATTACAGCATGAACAGTGCCTACTTTTGTGAGTCAGATGCCAAAATGATCGCTGTGGCCCT
Mus_minutoides    GCAGGGATAGCCCAAGGCAATCCAGCGGGAGTGGCCACGCCCTGCCAAGAAAATTACAGCATGAACAGTGCCTACTTTTGTGAGTCAGATGCCAAAATGATCGCTGTGGCCCT
*****
Mus_musculus      CGCATGGAAGCAGCTCTTGATAAAACCAAGCTTAAACCAAGAGGACATTTACATCACCACAGAAAGCCTTACCACTACTGCCAGATGTCTGAGACAGCAGATATTGCTCAGATGCT
Mus_minutoides    CGCATGGAAGCAGCTCTTGATAAAACCAAGCTTAAACCAAGAGGACATTTACATCACCACAGAAAGCCTTACCACTACTGCCAGATGTCTGAGACAGCAGATATTGCTCAGATGCT
*****
Mus_musculus      GAGATGCTGTCCAGACTACACCACGGTTACACCGTGCAGTCTCAAGGGCCCTTAACTCAACGCAACTGCTTGGCTTTGCTGACAAAAGAAATTTCCCTCCTGCTGGTTAT
Mus_minutoides    GAGATGCTGTCCAGACTACACCACGGTTACACCGTGCAGTCTCAAGGGCCCTTAACTCAACGCAACTGCTTGGCTTTGCTGACAAAAGAAATTTCCCTCCTGCTGGTTAT
*****
Mus_musculus      GTGAGCAGACCAACTGAACAAAATCATGCAGTAG
Mus_minutoides    GTGAGCAGACCAACTGAACAAAATCATGCAGTAG
*****

```

*Ghr* 遺伝子の cDNA のアラインメント解析。上段に *M. musculus*、下段に *M. minutoides* の CDS の塩基配列を示す。\*は塩基が一致している箇所を示す。

B

```

Mus_musculus      MDLQVFLTLALAVTSSTFSGSEATPATLGKASPVLRINPSLGTSSSGKPRFTKCRSPELETFSCYWTEGDNPDLPKTPGSIQLYYAKRESQRQAARIAHEWTQEWKECPDYVSAGKNSC
Mus_minutoides    MDLWQVFLTLALAVSSDTFSGTEASPATLGKASPVLRINLSLGTSSSGKPRFTKCRSPELETFSCYWTEGDNPDLPKTPGSIQLYYAKRENQRQAARNSHEWTQEWKECPDYVSAGKNSC
*** ***** * *** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus      YFNSSYTSIWIPYCIKLTNGDLDQKCFVDEIVQPPPIGLNWTLLNISLTGIRGDIQVSWQPPNADVLKGIILEYEQYKVESKWKVMGPIWLTYCPVYSLRMDKEHEVRVRS
Mus_minutoides    HFNSSYTSIWIPYCIKLTNGDLDQKCFVDEIVQPPPIGLNWTLLNISLTGIRGDIQVSWQPPNADVLKGIILEYELQKHEVNASKWIAMGPWTTSPVYSLRMDKEHEVRVRS
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus      RQRSFEKYSEFSEVLRVIFPQTNILEACEEIQFPWFIIIFGIFGVAVMLFVVVFSKQQRKMLILPPVPVKIKGIDPDLLEKGLKEEVNTILGIHDNYKPDFYNDSDWVEFIELDID
Mus_minutoides    RQRSFEKYSEFSEVLRVIFPQTNILEACEEIRFPWFIIIFGIFGVAVMLFVVVFSKQQRKMLILPPVPVKIKGIDPDLLEKGLKEEVNTILGIHDNYKPDFYNDSDWVEFIELDID
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus      EADVDEKTEGSDTRLLSNDHEKSAGILGAKDDSGRTSCYDPDILDTFHTSDMCDGLTLEFAQSQKLNMEADLLCLDQKLNKLPYDASL-GSLHPSITQTVEENKQPILLSSETEATH
Mus_minutoides    DADVDEKTEGSDTRLLSDDHEKSAGILGAKDDSGRTSCYDPDILDTFHTSDMCDGLTLEFAQSQKLNTEADLLCLDQKLNKNSPYDASSLGSHPISITLVE-DKPQLLSSETESTD
*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus      QLASTPMSNPTSLANIDFYAQVSDITPAGGVVLSPGQKIKAGIAQGTQREVATPCQENYSMNSAYFCESDAKCCIIVAPRMEATSCIKPSFNQEDIYITTESLTTAQMSETADIAPDA
Mus_minutoides    QLASTPLNNPTSLANIDFYAQVSDITPAGGVVLSPGQKIKAGIAQGTQREVATPCQENYSMNSAYFCESDAKCCISVAPRMEAASCVKPSFNQEDIYITTESLTTARMSETADATAPDA
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus      EMSVPDYTTVHTVQSPRGLILNATALPLDKKNFSPSSCGYVSTDLNKKIMQ
Mus_minutoides    EMPVPDYTTVHTVQSPRGLILNATALPLDKKKFLSSCGYVSDQLNKKIMQ
** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
    
```

Ghr タンパクのアラインメント解析。上段に *M. musculus*、下段に *M. minutoides* の推定アミノ酸配列を示す。\* はアミノ酸残基が一致している箇所を示す。

C



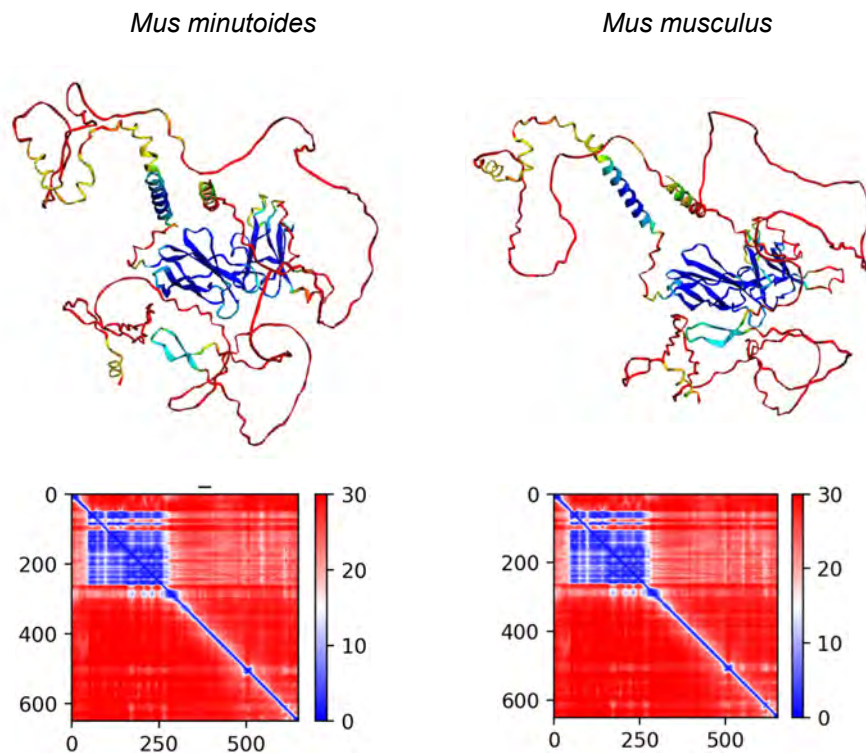
近隣結合法 (Neighbor joining method) によって作成した系統樹。各ノードにブートストラップ値を、左下に進化距離を示す。

D

|                    |     |             |            |     |             |             |     |
|--------------------|-----|-------------|------------|-----|-------------|-------------|-----|
|                    |     | 121         |            | 204 | 213         |             |     |
| Mus_minutoides     | 119 | SCHFNSSYTS  | 128        | 199 | EYELQHKVEVN | ASKWIDAMGPI | 218 |
| Mus_musculus       | 119 | SCYFNSSYTS  | 128        | 199 | EYEIQYKEVN  | ESKWKVMGPI  | 218 |
| Rattus_norvegicus  | 111 | SCYFNSSYTS  | 121        | 191 | EYEIQYKEVN  | ETKWKTMSPi  | 210 |
| Sus_scrofa         | 111 | SCYFNSSYTS  | 121        | 191 | EYELQYKEVN  | ETQWKMDPV   | 210 |
| Homo_sapiens       | 111 | SCYFNSSFTS  | 121        | 191 | EYELQYKEVN  | ETKWKMDPI   | 210 |
| Xenopus_tropicalis | 103 | SCYFSKYTS   | 113        | 183 | EYEVHMKEAN  | ESQWTVLDKV  | 202 |
|                    |     | 469         | 479        | 487 | 642         |             |     |
| Mus_minutoides     | 468 | QLLSSETES   | TDQLASTPLN | 487 | 638         | GYVSADQLNK  | 647 |
| Mus_musculus       | 468 | QPLLSSETEA  | THQLASTPMS | 487 | 638         | GYVSTDQLNK  | 647 |
| Rattus_norvegicus  | 457 | QPLLGSETES  | THQLPSTPMS | 476 | 626         | GYVSTDQLNK  | 635 |
| Sus_scrofa         | 457 | RPLIISGTDG  | THQTAHTQLS | 476 | 626         | GYVSTDQLNK  | 635 |
| Homo_sapiens       | 457 | QPLPTEGAES  | THQAAHIQLS | 476 | 626         | GYVSTDQLNK  | 635 |
| Xenopus_tropicalis | 446 | WPMVAVSENQP | TSLPVPITLS | 465 | 609         | GYMTDQVVK   | 618 |

複数の脊椎動物の Ghr タンパクの配列を用いたアラインメント解析。M. minutoides において特徴的なアミノ酸残基を赤で囲み、M. minutoides および M. musculus におけるアミノ酸番号を上部に示した。

E



AlphaFold2 による Ghr タンパクの構造予測。(上) 構造予測をもとに作成した 3D モデル。(下) 各アミノ酸残基の予測信頼度を示す PAE (Predicted aligned error)。左に M. minutoides、右に M. musculus の結果を示す。

図2 *Ghr* 遺伝子の cDNA における 5'-UTR の配列解析

A

```

Mus_musculus      GACAACCCACGAGCTGCCAAGCAGGGCGCAGCCATGGGAAGAGGAGGCGGTCTAGGGAGC
Mus_minutoides    GACAACCCACGAGCTGCCAAGCAGGGCGCAGCCATGGGAAGAGGAGGAGGTCTAGGGAGC
*****

Mus_musculus      GGCGGCACTGGCAGAGGCGGTGCTACAGCGGCGGTGGCGGCACGGCTGTTACTGAACC
Mus_minutoides    GGCGGCACTGGCAAAGGCGGTGCTACAGCGGCGGTGGCGGCACGGCTGTTGCTGAACC
*****

Mus_musculus      CCGGCAGCCGCGGGGATCCCGGGCTGGGTCCACGCGGGCCTGAGGCCTCGGCTCCAGCAG
Mus_minutoides    CCGGCAGTCGCGGGGACCCCGGGCTGGGGCCACGCCGGCCTGAGGCCTCGGCTCCAGCAG
*****

Mus_musculus      CCCCCAAGCGGACACGAACCCGCTTCTGTCTCCCGAGGCGAAACTCCGAG-----
Mus_minutoides    CCCCCAAGCGGACGCGAACCCGCG--CTGTCTCCCGAGGCGAAACTCCGAGGAGATGTCT
*****

Mus_musculus      -----
Mus_minutoides    GTCTGTCTATGATGAGAGACCCTCCCTAAGCAAGGGGATGCTTTCGAAAGTTAAGGGAT
-----

Mus_musculus      -----GTCTCAGGT
Mus_minutoides    GATTGAAAGTTGACCAGTGGATGGTATGGTTATGGTCTCAGGT
*****
    
```

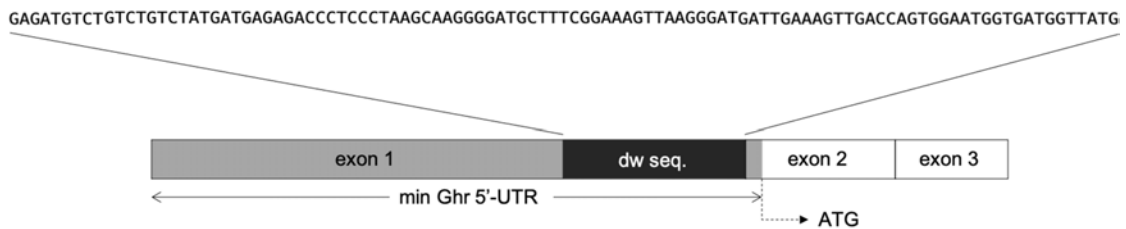
*Ghr* 遺伝子の 5'-UTR のアラインメント解析。上段に *M. musculus*、下段に *M. minutoides* の塩基配列を示す。\*は塩基が一致している箇所を示し、dwarf 配列を赤で示す。

B



*M. musculus* の 5' 末端の模式図。exon 1 および 2 にまたがる 5'-UTR を灰色で示す。

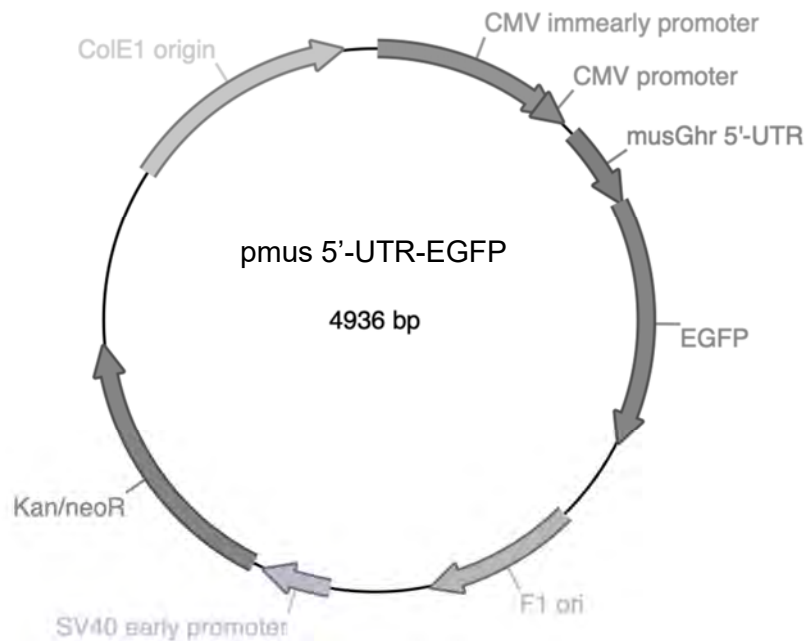
C



*M. minutoides* の 5' 末端の模式図。exon 1 および 2 にまたがる 5'-UTR を灰色で、dwarf 配列 (dw seq.) を黒で示す。

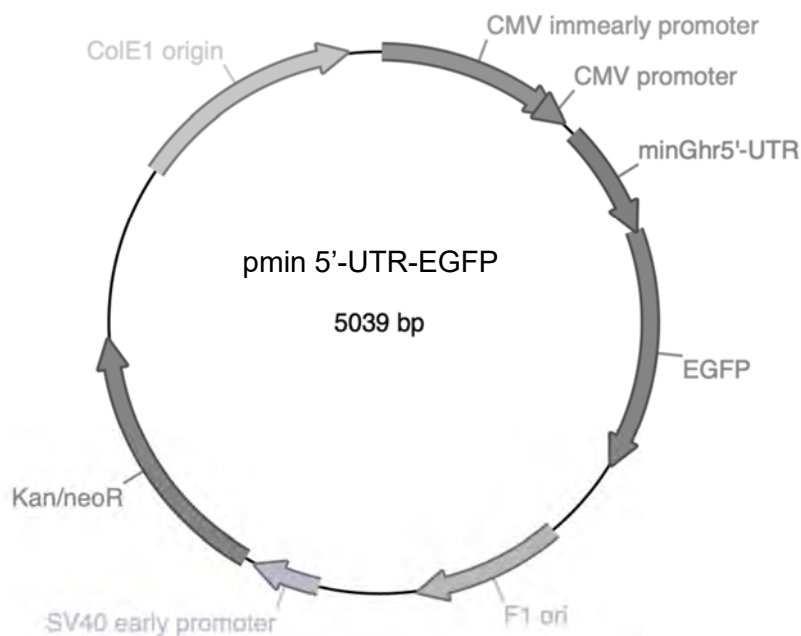
図3 *Ghr* 遺伝子における 5'-UTR のレポーター解析

A



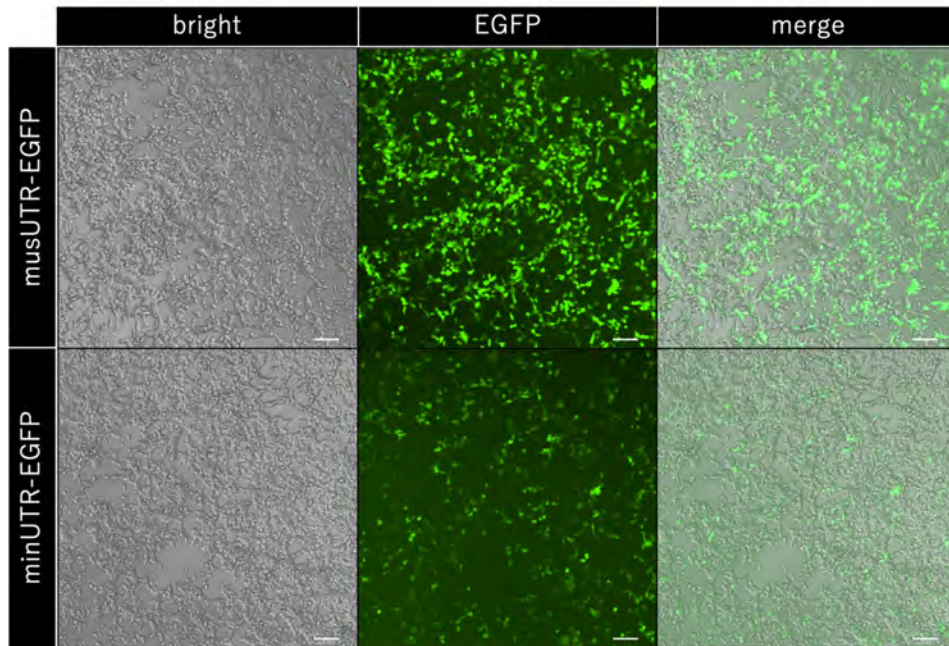
レポーター解析に使用したプラスミドの設計図。*M. musculus* の 5'-UTR の下流に EGFP が位置する。

B



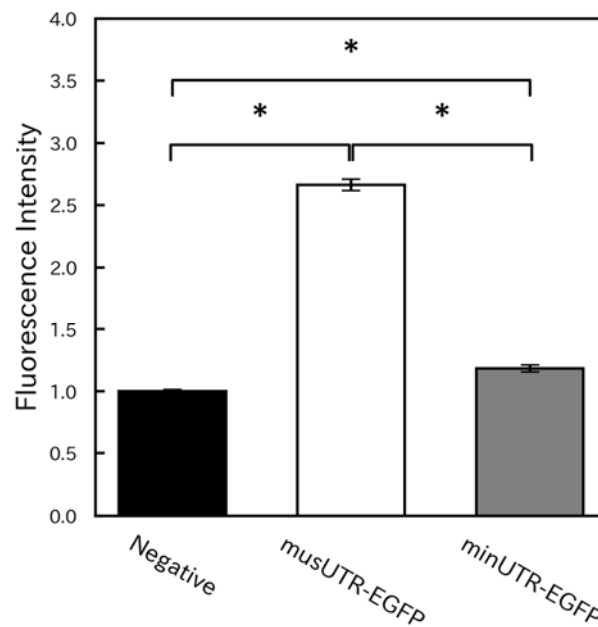
レポーター解析に使用したプラスミドの設計図。dwarf 配列を有する *M. minutoides* の 5'-UTR の下流に EGFP が位置する。

C



各プラスミドを導入した 293T 培養細胞の蛍光顕微鏡像。上段に *M. musculus* の 5'-UTR を含むプラスミドの導入群 (musUTR-EGFP)、下段に *M. minutoides* の 5'-UTR を含むプラスミドの導入群 (minUTR-EGFP) を示す。bar = 100  $\mu$  m

D



蛍光顕微鏡像の定量評価。Negative はプラスミドを導入していない群を示す。\* :  $p < 0.05$

表1 *Mus minutoides* の Ghr に認められたアミノ酸残基の変化と VaProS による予測結果

| cDNA                 | Amino acid    | Position within gene | Region within protein | Prediction (Score) *      |                    |                      |                        | DELETERIOUS ratio |
|----------------------|---------------|----------------------|-----------------------|---------------------------|--------------------|----------------------|------------------------|-------------------|
|                      |               |                      |                       | PolyPhen2                 | SIFT               | PROVEAN              | PANTHER                |                   |
| c.12T>G              | C4W           | exon 2               | signal peptide        | benign (0.074)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (0.946)      | NA NA                  | 0%                |
| c.43A>T              | T15S          | exon 2               | signal peptide        | benign (0.005)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (0.281)      | NA NA                  | 0%                |
| c.49_50delinsGA      | S17D          | exon 2               | signal peptide        | benign (0.005)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (0.404)      | NA NA                  | 0%                |
| c.65G>C              | S22T          | exon 2               | signal peptide        | benign (0.001)            | TOLERATED (0.09)   | neutral (-0.105)     | NA NA                  | 0%                |
| c.73A>T              | T25S          | exon 3               | extracellular         | benign (0.000)            | TOLERATED (0.14)   | neutral (0.017)      | NA NA                  | 0%                |
| c.121_122delinsTT    | P41L          | exon 3               | extracellular         | benign (0.001)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (-0.583)     | neutral (-2.33763)     | 0%                |
| c.272G>A             | S91N          | exon 4               | extracellular         | benign (0.002)            | TOLERATED (0.19)   | neutral (0.312)      | neutral (-0.70047)     | 0%                |
| c.293T>A             | I98N          | exon 5               | extracellular         | possibly damaging (0.900) | DELETERIOUS (0.00) | neutral (0.126)      | NA NA                  | 50%               |
| c.295G>T             | A99S          | exon 6               | extracellular         | possibly damaging (0.574) | TOLERATED (0.29)   | neutral (0.014)      | NA NA                  | 25%               |
| c.361T>C             | Y121H         | exon 6               | extracellular         | probably damaging (0.994) | TOLERATED (0.15)   | neutral (-2.335)     | Deleterious (-3.73982) | 50%               |
| c.449C>G             | T150S         | exon 6               | extracellular         | benign (0.051)            | TOLERATED (0.74)   | neutral (0.184)      | neutral (-1.26454)     | 0%                |
| c.604A>C             | I202L         | exon 7               | extracellular         | benign (0.000)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (0.245)      | neutral (-0.83150)     | 0%                |
| c.600T>C             | Y204H         | exon 7               | extracellular         | probably damaging (0.999) | DELETERIOUS (0.01) | neutral (-2.199)     | Deleterious (-3.31201) | 75%               |
| c.626A>C             | E209A         | exon 7               | extracellular         | possibly damaging (0.768) | TOLERATED (1.00)   | neutral (-1.669)     | Deleterious (-3.39612) | 50%               |
| c.638A>T             | K213I         | exon 7               | extracellular         | possibly damaging (0.922) | DELETERIOUS (0.01) | neutral (-2.141)     | Deleterious (-3.23951) | 75%               |
| c.641T>C             | V214A         | exon 7               | extracellular         | benign (0.000)            | TOLERATED (0.44)   | neutral (-0.137)     | neutral (-1.24653)     | 0%                |
| c.658_659delinsAC    | L220T         | exon 8               | extracellular         | benign (0.000)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (0.969)      | neutral (-0.57537)     | 0%                |
| c.665A>C             | Y222S         | exon 8               | extracellular         | benign (0.000)            | TOLERATED (0.74)   | neutral (-0.160)     | neutral (-0.74611)     | 0%                |
| c.668G>T             | C223F         | exon 8               | extracellular         | benign (0.001)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (0.150)      | neutral (-1.40872)     | 0%                |
| c.818A>G             | Q273R         | exon 9               | extracellular         | benign (0.000)            | TOLERATED (0.95)   | neutral (-0.501)     | NA NA                  | 0%                |
| c.883A>G             | I295V         | exon 9               | transmembrane         | benign (0.051)            | TOLERATED (0.69)   | neutral (-0.171)     | neutral (-0.79922)     | 0%                |
| c.1083A>G            | E361D         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.032)            | TOLERATED (0.07)   | neutral (0.892)      | neutral (-1.11631)     | 0%                |
| c.1095T>G            | D365E         | exon 11              | cytoplasmic           | possibly damaging (0.845) | TOLERATED (0.37)   | neutral (-1.394)     | NA NA                  | 25%               |
| c.1135A>G            | N379D         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.011)            | TOLERATED (0.75)   | neutral (-0.191)     | neutral (-0.78525)     | 0%                |
| c.1261A>G            | K421E         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.001)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (2.724)      | neutral (-1.27634)     | 0%                |
| c.1289T>C            | M430T         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.012)            | TOLERATED (0.48)   | neutral (0.701)      | neutral (-0.54320)     | 0%                |
| c.1234T>C            | L445S         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.015)            | TOLERATED (0.92)   | neutral (2.123)      | neutral (-1.51641)     | 0%                |
| c.1347_1348insTCC    | A449_S450insS | exon 11              | cytoplasmic           | -                         | -                  | -                    | -                      | -                 |
| c.1379A>T            | Q460L         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.001)            | TOLERATED (0.57)   | neutral (2.183)      | neutral (-0.69069)     | 0%                |
| c.1392A>C            | E464D         | exon 11              | cytoplasmic           | probably damaging (0.991) | TOLERATED (0.12)   | neutral (-0.217)     | neutral (-1.72721)     | 25%               |
| c.1393_1395del       | N465del       | exon 11              | cytoplasmic           | -                         | -                  | -                    | -                      | -                 |
| c.1406C>T            | P469L         | exon 11              | cytoplasmic           | probably damaging (0.995) | DELETERIOUS (0.00) | Deleterious (-4.098) | Deleterious (-4.35101) | 100%              |
| c.1429G>T            | A477S         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.004)            | TOLERATED (0.99)   | neutral (1.955)      | neutral (-1.23982)     | 0%                |
| c.1435C>G            | H479D         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.118)            | TOLERATED (0.29)   | Deleterious (-3.534) | neutral (-1.56375)     | 25%               |
| c.1456A>C            | M486L         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.006)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (0.627)      | neutral (-1.45825)     | 0%                |
| c.1460_1461delinsAC  | S487N         | exon 11              | cytoplasmic           | possibly damaging (0.755) | TOLERATED (0.20)   | neutral (-1.884)     | Deleterious (-3.52144) | 50%               |
| c.1578T>A            | N526K         | exon 11              | cytoplasmic           | possibly damaging (0.480) | TOLERATED (0.28)   | neutral (-1.240)     | neutral (-1.95521)     | 25%               |
| c.1586G>C            | R529P         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.001)            | TOLERATED (0.35)   | neutral (3.745)      | neutral (-0.73247)     | 0%                |
| c.1666G>T, c.1668C>T | A556S         | exon 11              | cytoplasmic           | possibly damaging (0.674) | TOLERATED (0.98)   | neutral (-1.012)     | neutral (-1.92520)     | 25%               |
| c.1690A>G, c.1692G>A | T564A         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.185)            | DELETERIOUS (0.04) | neutral (-0.530)     | neutral (-1.07201)     | 25%               |
| c.1699A>G            | I567V         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.002)            | TOLERATED (0.35)   | neutral (0.636)      | neutral (-0.52849)     | 0%                |
| c.1756A>T            | T586S         | exon 11              | cytoplasmic           | possibly damaging (0.807) | TOLERATED (0.73)   | neutral (-1.038)     | neutral (-1.98993)     | 25%               |
| c.1763A>G            | Q588R         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.001)            | TOLERATED (0.57)   | neutral (0.055)      | neutral (-0.71457)     | 0%                |
| c.1784T>C            | I595T         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.001)            | TOLERATED (0.61)   | neutral (0.638)      | neutral (-0.49611)     | 0%                |
| c.1804T>C            | S602P         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.002)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (4.671)      | neutral (-1.49515)     | 0%                |
| c.1896T>G            | N632K         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.000)            | TOLERATED (0.99)   | neutral (0.057)      | neutral (-0.61055)     | 0%                |
| c.1901T>C            | P634L         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.001)            | TOLERATED (1.00)   | neutral (0.958)      | neutral (-1.77265)     | 0%                |
| c.1924A>G            | T642A         | exon 11              | cytoplasmic           | benign (0.370)            | DELETERIOUS (0.00) | neutral (-0.855)     | neutral (-1.99391)     | 25%               |

\* The Prediction column shows the results of the prediction in the upper row and the score of each substitution in the lower row.

## ヨウ素摂取と甲状腺機能、成長発達との関連に関する研究 －乳児、幼児のヨウ素摂取量

國井 葉

昭和医科大学横浜市北部病院甲状腺センター内科

### 報告内容

妊産婦、授乳婦、新生児、乳児、幼児のヨウ素摂取状況と相互の関連について観察研究を行っている。

これまでのところ、日本臨床栄養学会雑誌 47(1):042-054, 2025 に乳幼児のヨウ素摂取量評価のために育児用ミルクと離乳食のヨウ素含有量を調査し、報告した。

表 1 乳児用ミルクのヨウ素含有量

| 対象年齢         | 商品名                       | 成分・用途                         | ヨウ素含有量<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | ヨウ素含有量の公表値<br>( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) | 製造者                    |
|--------------|---------------------------|-------------------------------|---|---|------------------------|
| 0 か月～<br>1 歳 | 森永E赤ちゃん                   |                               | 22.0                                    | 20  | 森永乳業株式会社               |
| 0 か月～<br>1 歳 | 明治ほほえみ                    |                               | 56.2                                    | 50  | 株式会社明治                 |
| 0 か月～        | アイクレオ<br>バランスミルク          |                               | 69.9                                    | 国際規格10～60 $\mu\text{g}$<br>/100Kcalに該当*     | アイクレオ株式会社、江<br>崎グリコ    |
| 0 か月～        | 和光堂レーベンミルク はいはい           | 乳児用<br>調整粉乳                   | 72.9                                    | 60  | 和光堂（アサヒグループ<br>食品株式会社） |
| 0 か月～<br>1 歳 | 森永はぐくみ                    |                               | 83.9                                    | 55  | 森永乳業株式会社               |
| 0 か月～<br>1 歳 | 雪印メグミルクびゅあ                |                               | 91.5                                    |   | 雪印メグミルク株式<br>会社        |
| 0 か月～<br>1 歳 | ビーンスタータすこやかMI             |                               | 98.2                                    | 18  | 雪印ビーンスターク<br>株式会社      |
| 0 か月～        | アイクレオ赤ちゃんミルク              |                               | 10.5                                    |   | アイクレオ株式会社、<br>江崎グリコ    |
| 0 か月～<br>1 歳 | 明治ほほえみらくらくミルク             | 乳児用<br>調節液体<br>ミルク            | 11.6                                    | 4   | 株式会社明治                 |
| 0 か月～<br>1 歳 | 森永はぐくみ液体ミルク               |                               | 14.5                                    | 7   | 森永乳業株式会社               |
| 0 か月～<br>1 歳 | ビーンスタータすこやかMI             |                               | 14.5                                    |   | 雪印ビーンスターク<br>株式会社      |
| 1～3 歳        | 明治いステップらくらくミルク<br>(液体ミルク) |                               | 11.6                                    | 10  | 株式会社明治                 |
| 1～3 歳        | 森永チルミル                    |                               | 46.4                                    | 35 (数年間平均値)                                 | 森永乳業株式会社               |
| 1～3 歳        | 明治ステップ                    |                               | 68.1                                    | 70  | 株式会社明治                 |
| 9 か月～        | 和光堂フォローアップミルク<br>ぐんぐん     | フォローアップ<br>ミルク                | 80.2                                    | 60  | 和光堂（アサヒグループ<br>食品株式会社） |
| 1～3 歳        | アイクレオグロアアップミルク            |                               | 80.6                                    | 国際規格10～60 $\mu\text{g}$<br>/100Kcalに該当*     | アイクレオ株式会社、<br>江崎グリコ    |
| 9 か月～<br>3 歳 | 雪印メグミルク たっち               |                               | 108.1                                   |   | 雪印メグミルク株式<br>会社        |
| 9 か月～<br>3 歳 | ビーンスタークつよいこ               |                               | 119.5                                   |   | 雪印ビーンスターク<br>株式会社      |
| 0 か月～<br>3 歳 | 森永ニューMA-1                 | アレルギー除去<br>食品                 | 4.9                                     | 検出感度10 $\mu\text{g}$ 未満                     | 森永乳業株式会社               |
| 0 か月～<br>3 歳 | 明治ミルフィーHP                 | 乳頭・大豆・小麦<br>・卵を含まない           | 9.1                                     | 0   | 株式会社明治                 |
|              | 森永 MA-mi                  | ミルクレキ-用<br>(乳たんぱく質<br>消化調節粉乳) | 11                                      |   | 森永乳業株式会社               |
| 0 か月～<br>3 歳 | 明治エレメンタルフォーミュラ            | アミノ酸ミルク                       | 16.2                                    |   | 株式会社明治                 |
|              | 森永ARミルク                   | 特殊ミルク (胃<br>食道逆流症用)           | 39.4                                    |   | 森永乳業株式会社               |
| 0 か月～<br>1 歳 | 森永ノンラクト                   | 乳頭・ガラクトース<br>摂取制限             | 50.4                                    | 60  | 森永乳業株式会社               |
| 0 か月～        | 和光堂ボンラクトi                 | 調整粉末大豆乳                       | 143.1                                   | 90**  | 和光堂（アサヒグルー<br>プ食品株式会社） |

\* バランスミルクの缶の成分表示は 80  $\mu\text{g}/100\text{g}$

\*\* 90  $\mu\text{g}$  のヨウ素が添加されている

## 報告内容

現在、以下のプロトコールで産婦人科医、小児科医の協力がどのように得られるか各方面に相談をし、当院の倫理委員会へ申請するところである。

### ヨウ素濃度の測定

1. 出生時の臍帯血
2. 生後1ヶ月 検体：尿
3. 生後3-4ヶ月 検体：尿
4. 生後7-9ヶ月 検体：尿
5. 1歳 検体：尿
6. 1歳6ヶ月 検体：尿
7. 2歳、3歳 検体：尿

上記の7点でヨウ素濃度検査ができることが望ましいが、大学付属病院であるため生後一か月までしかフォローアップがないため、その後をどうするか検討中である。謝礼を提供し、採取した尿を当院へ持参または郵送してもらう予定である。大学内での運用を相談中である。

## 思春期遅発症における新規疾患成立機序の解明と 責任遺伝子バリエント陽性例の経時的な臨床評価

佐藤 直子

なみファミリークリニック

小笠原 敦子

茨城県立こども病院小児科

瀬尾 美鈴

京都産業大学工学部生物工学科

三井 純

東京大学ゲノム医学研究支援センター

### 研究目的

本研究の目的は、初診時に思春期遅発症（DP）と診断された症例において、①体質性思春期遅発症（CDGP）・先天性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症（HH）/Kallmann 症候群（KS）・及び思春期発来に関与する遺伝子を対象に遺伝子変異解析を行い、同定された有意な変異には *in silico* 解析・変異機能解析を行い、DP の新規責任遺伝子を探索すること、②バリエント陽性例において、縦断的に成長・性成熟・内分泌学的所見を後方視的に集積し、変異型—表現型解析を行い、DP の新規疾患成立機序を明らかにすることである。

### 研究の概要

DP は思春期の成長促進欠如と性成熟の遅れを示す疾患である。HH・KS・CDGP（self-limited DP）に大別される。近年、希少疾患である HH/KS の約 5 割の原因遺伝子が明らかにされてきたが、CDGP は思春期年齢の約 2% にみられる一般的な疾患であるにもかかわらず、その約 9 割の病因が世界的にもいまだ不明である。われわれは、昨年の研究課題において、CDGP において HH の既知責任遺伝子に病原性バリエントを同定し、CDGP は HH の臨床スペクトラムの一部である可能性を見出した。しかしながら、通常 CDGP の大部分が無治療あるいは性ホルモンの少量投与で性成熟の進行が認められることから、CDGP の病因として単独の責任遺伝子が存在する可能性も推測される。我々は本研究において、以下の方法を用いて、DP の既知・新規責任遺伝子解析および表現型—遺伝子型解析を行い、CDGP を含む DP の新たな疾患成立機序の解明を目指すことを目的とした。

### 実施計画と研究方法

DP を主訴に医療機関を受診した 9 症例（男性 6 例、女性 3 例）を対象に、多施設共同研究で遺伝子変異解析および臨床解析を後方視的解析により行った。

- ①臨床解析：初診時（可能な症例は生下時）から現在まで経時的なデータ収集を行った。成長記録の収集、骨年齢、Tanner 段階、内分泌学的データ（LH、FSH、性ホルモン値、LHRH 負荷試験・男性患者の HCG 負荷試験）、頭部 MRI、家族歴、既往歴、合併症、治療経過、現在の月経周期など。

- ②変異解析：同意書が得られた対象患者において、CDGP・HH/KSの既知責任遺伝子群・思春期発来に関与する新規遺伝子群に対して、次世代シーケンサーによるエクソーム解析・直接シーケンス法による変異解析を行った。インシリコ解析を行い、有意な変異と判断された場合は変異機能解析を進める予定である。

## 結果

### 現在までの解析状況

今回の研究では、CDGP9例（実際収集した症例は20例である）に対して、遺伝子変異解析を行った。現在も患者の集積と遺伝子変異解析を継続中である。

#### 1. 遺伝子検査：

遺伝子解析において、7例に遺伝子変異を認めた。内訳として、CDGPの既知責任遺伝子であるIGSF10遺伝子に、ホモ変異1例・ヘテロ変異1例を認めたほか、新規候補遺伝子X、Y（未発表データ）に各々変異を認めた。特に新規候補遺伝子Xの遺伝子変異は5例に認められており、そのうち3例に同じ変異を見いだした。また、新規候補遺伝子Xには、上記の変異とは異なる位置に変異を1例に同定した。いずれもインシリコ解析において、蛋白機能低下変異であることが推測され、変異の有意性が高く、今後変異解析を進める予定である。更に兄弟例のCDGPに、新規候補遺伝子Yにアミノ酸挿入変異を同定した。インシリコ解析において蛋白の構造変化が認められた。本兄弟例では、新規候補遺伝子Xにもそれぞれ異なる変異を認めた。

#### 2. 臨床検査、臨床所見：

CDGPの臨床所見と検査結果を以下の表にまとめた。初診時年齢は13歳から14歳8か月であったが、CDDP思春期が16歳で自然発来した26歳の女性例も解析に参加した。身長は成人期に近い年齢でDPと診断された症例を除き、初診時身長は130cmから140cm台で、骨年齢も9.2歳から13歳台と多くが遅延していた。男性例の精巣容量は1mLから10mLまで様々であった。女性例は全例無治療で初経を認めた。そのうち、2例で初潮が16歳で認められ、1例は14歳6か月で初潮がみられ、初潮の平均年齢12歳から12歳半よりも遅れて初潮が自然に発来した。26歳の女性において、現在の月経周期は28日と正常であったが、生理期間は3日以内と短く、経血量も少ない傾向にあった。現時点では各症例において、精巣容量・乳房発育・LH・FSH・テストステロン/エストラゲンは自然に成人値に近い値まで緩徐な進行を認め、途中で進行が止まった症例はみられていない。

表 1 CDGP の解析例の表現型 – 臨床型解析結果

|                            | 1     | 2      | 3     | 4      | 5            | 6        | 7      | 8        | 9      |
|----------------------------|-------|--------|-------|--------|--------------|----------|--------|----------|--------|
| 性別                         | 男性    | 男性     | 男性    | 男性     | 男性           | 男性       | 女性     | 女性       | 女性     |
| 初診時                        |       |        |       |        | 兄弟例          |          |        |          |        |
| 年齢                         | 13.66 | 13.33  | 16.75 | 13     | 12.75        | 14.51    | 13.25  | 14.66    | 26     |
| 身長                         | 139.6 | 144.7  | 166.5 | 134.3  | 142.8        | 158.4    | 133.7  | 135      | 160    |
| 身長SD                       | -2.46 | -1.73  |       | -2.73  | -1.33        | -0.5     | -3.76  | -3.5     | …      |
| BA                         | 10.3  | 12.4   | 14    | 9.2    | 11.9         | 13.2     | 11     | 11       | 成人型    |
| 精巣容量                       | 10    | 1      | 10    | 4      | 3            | 4        | …      | …        | …      |
| LH基礎値                      | 0.93  | 0.1    | 2.19  | 0.1未満  | 1.9          | 2.6      | 0.1    | 1.1      | 2.0    |
| FSH基礎値                     | 2.1   | 0.81   | 2.84  | 2.7    | 3.6          | 2.6      | 2.5    | 4.6      | 4.0    |
| LH頂値                       | …     | …      | 12.27 | …      | 1.9          | …        | …      | …        | 13.0   |
| FSH頂値                      | …     | …      | 3.53  | …      | 3.6          | …        | …      | …        | 6.7    |
| T/E2値<br>(pg/dL,pg/<br>mL) | 0.3   | 0.06   | 1.44  | …      | 28.3         | 148.8    | 10未満   | …        | 48.7   |
| 家族歴                        | あり    | なし     | なし    | なし     | あり           | あり       | あり     | なし       | なし     |
| 遺伝子変異                      | なし    | IGSF10 | なし    | X      | X/Y          | X/Y      | なし     | IGSF10/X | X      |
| polyphen-2                 | …     | 蛋白機能低下 | …     | 蛋白機能低下 | X:スプライスサイト変異 | X:蛋白機能低下 | 蛋白機能低下 | 蛋白機能低下   | 蛋白機能低下 |

### 結果のまとめと今後の展望

本研究において、CDGP に 2 つの新規責任候補遺伝子を同定した。インシリコ解析では有意な変異と推測され、CDGP の病因と考えられるため、今後は変異機能解析を進めていく。その他、兄弟例、女性例 1 例において、複数の遺伝子変異が存在し、CDGP においても中枢性性腺機能低下症と同様に、複数の遺伝子が発症に関与している可能性が示唆された。また、兄弟例において、同じ遺伝子において兄弟間に異なる変異が同定されており、表現型に差が出てくる可能性があり、今後の臨床症状の経過観察が重要となる。また、精巣容量の発達は様々であり、初診時の精巣容量が小さい症例では今後の性腺機能を特に注意深く経過観察する必要があると思われる。2 年前に我々が行った解析では、CDGP の責任遺伝子として既知遺伝子である IGSF10 のみが同定されたが、本研究では新たな責任候補遺伝子が同定されたことから、今後も解析を継続することにより、CDGP の新規疾患成立機序が明らかにされることが期待される。26 歳で思春期遅発症の既往のある女性の臨床所見から、16 歳で初経が認められてから月経周期が正常であったものの、月経期間が短く、経血量も少ないことが明らかになった。今後の生殖機能について経過観察を行うことで、CDGP の長期予後を推測する手掛かりになりうると思われる。今後も研究対象の年齢を広げ、検討する患者検体数を増やし、新しい臨床・検査データ集積し、臨床解析および分子遺伝学的解析を進め、新しい CDGP の病因の同定と予後予測を目指していく。

## 軟骨形成不全症の原因としてのグルクロン酸転移酵素遺伝子変異に関する解析

辻 岳人

岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域

### はじめに

我々はこれまで、常染色体潜性の遺伝様式により軟骨組織の形成異常とそれに伴う矮小を特徴とし、ヒトの軟骨形成不全症の有用なモデルとなるミュータントマウス（図1）について、原因遺伝子の同定を試みてきた。本研究では、このミュータントマウスの全ゲノム配列データから予測されたグルクロン酸転移酵素遺伝子の突然変異に着目し、軟骨形成不全症の新たな遺伝的要因であることを明らかにすることを目的とした。

### 材料と方法

#### 1. ミュータントマウスの全ゲノム配列からの突然変異同定

ミュータントマウスのゲノム DNA から取得した全ゲノム配列データを、マウスゲノムデータベースの参照配列と比較し、突然変異の有無を解析した。各リードの分布は Integrative Genomics Viewer (IGV) を用いて確認した。検出された突然変異について、ミュータントマウス系統（発症個体および正常個体）および近交系マウスにおける変異の有無を明らかにするため、変異部位を含む領域を PCR で増幅し、ナノポアシーケンスによって塩基配列を解析した。

#### 2. グルクロン酸転移酵素遺伝子における変異の特定

挿入変異の実態を明らかにするため、挿入部位の上流および下流配列を基に設計したプライマーによる PCR を各マウスのゲノム DNA で実施し、さらにサンガー法によって塩基配列を解析した。また、この挿入変異がミュータントマウスに特異的に存在するかを確認するため、挿入領域を特異的に検出するプライマーを用いた PCR により、増幅の有無を検証した。

#### 3. グルクロン酸転移酵素遺伝子の異常転写産物の確認

挿入変異による遺伝子発現への影響を調べるため、ミュータントマウスおよび野生型マウスの脛骨成長板軟骨および腎臓から調製した cDNA を用い、全翻訳領域を標的とするプライマーおよび挿入変異領域を含むプライマーにより RT-PCR を実施し、正常および異常な転写産物の有無を解析した。

### 結果および考察

ミュータントマウスの全ゲノム配列データをマウスゲノムデータベースの参照配列と比較した結果、我々が以前に解析した原因遺伝子のマッピング領域内に存在するものは計 15 個検出された。これらはすべてイントロン領域または遺伝子間領域に位置し、翻訳領域に存在する変異は確認されなかった。14 個の変異は、1 塩基または比較的短い挿入または欠失であったが、ミュータントマウスおよび近交系マウスの両方で検出されたため、原因変異ではないと判断した。残る 1 つは、取得リー

ドの配置状況から、グルクロン酸転移酵素遺伝子のイントロン領域に大規模な挿入変異が存在することを示唆するものであった(図2)。そこで、挿入部位の上下流に設計したプライマーでPCRを行ったところ、ヘテロ型個体では正常配列に対応する309 bpおよび約5.5 kbの断片が、ミュータント型では5.5 kb断片のみが増幅された(図3)。この5.5 kb断片をクローニングし、塩基配列を解析した結果、LTR型レトロトランスポゾンであるIntracisternal A particle (IAP)の挿入であることが判明した(図3)。さらに、IAP挿入変異がミュータントマウスに特異的であることを示すため、IAP配列とその上流配列に設計したプライマーによるPCRを行った結果、増幅断片はミュータントマウス系統のみに検出され、近交系マウスでは検出されなかった。これらの結果は、IAP挿入がミュータントマウス特有の変異であり、原因変異である可能性が高いことを示唆している。

次に、IAP挿入変異による転写異常を解析した。脛骨成長板軟骨および腎臓において、正常な転写産物を検出するため全翻訳領域を標的としたRT-PCRを行ったところ、報告されている2種類の正常転写産物(Isoform1と2)は野生型およびミュータントマウスの両方で検出された。ただし、ミュータントマウスでは増幅量が低く、発現量の低下が示唆された(図4)。さらに、IAP配列がエクソンとして転写に取り込まれているかを確認するため、IAP配列と上流エクソン配列に設計したプライマーによるRT-PCRを行ったところ、ミュータントマウスでのみ2種類の増幅断片が検出された(図4)。これらの断片は、正常エクソンとIAPが連結したもの(Short)、およびイントロン配列の一部をさらに含むもの(Long)である可能性が考えられた。以上より、ミュータントマウスではグルクロン酸転移酵素遺伝子の正常な転写産物も生成されるが、その発現量は低下し、加えてIAP挿入配列を含む異常な転写産物も生成されていることが明らかになった。

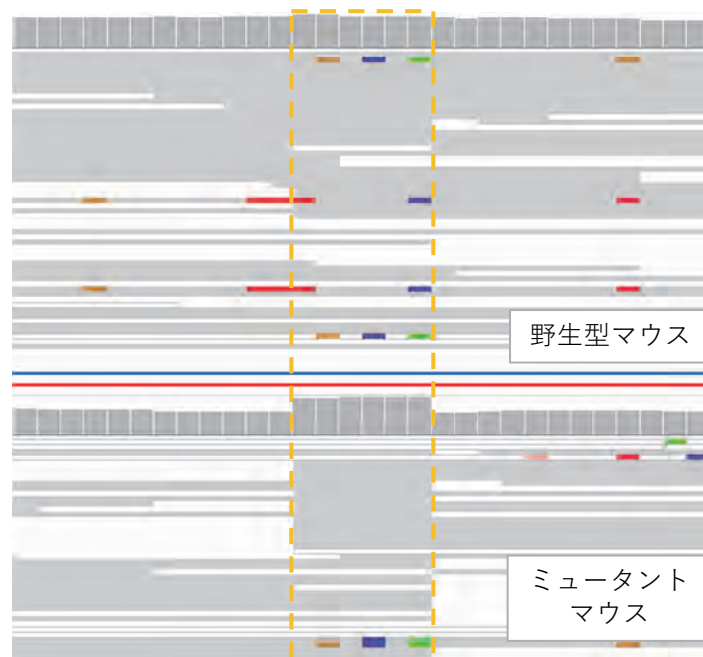
本研究の結果、我々が解析したミュータントマウスが示す潜性遺伝により軟骨形成不全症は、グルクロン酸転移酵素遺伝子のイントロン領域へのIAP挿入が原因であることが示唆された。また、ミュータントマウスはグルクロン酸転移酵素遺伝子の正常な転写産物発現を失っているわけではなく、その発現量は明らかに低下していることも重要な要因であることが予想された。さらに、ミュータントマウスではスプライシング異常によりIAP挿入領域が転写されており、このことが正常転写産物の減少要因であるかもしれない。本研究で用いたミュータントマウスはグルクロン酸転移酵素遺伝子の効果低減による軟骨形成不全症を発症することが示唆され、今後は骨の成長過程においてどのような変化がもたらされる明らかにすることにより、軟骨形成不全症の発症メカニズムの一端が新たに解明されることが期待される。

図1 本研究で使用したミュータントマウスの骨格標本



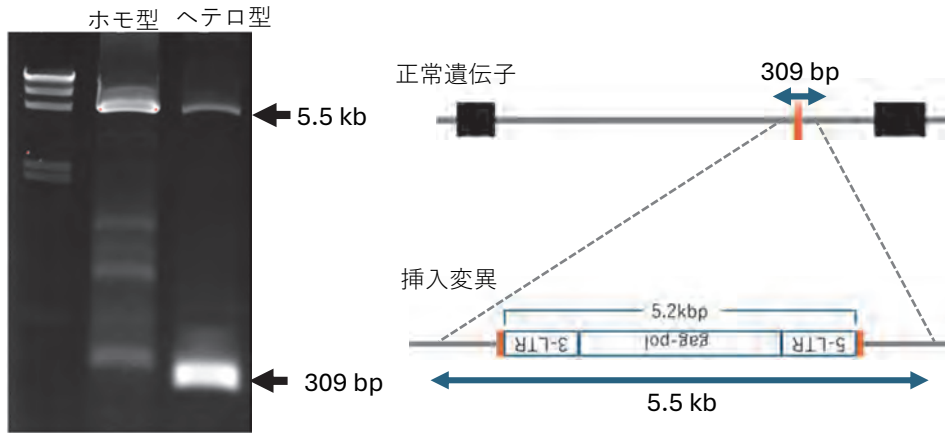
2週齢の正常マウス（左）とミュータントマウス（右）

図2 挿入変異が予想される領域のIGV画像



黄色破線で示した領域において、リードの分布寸断およびカバレッジ数の増加が認められる。  
上段：正常個体（野生型マウス） 下段：ミュータントマウス

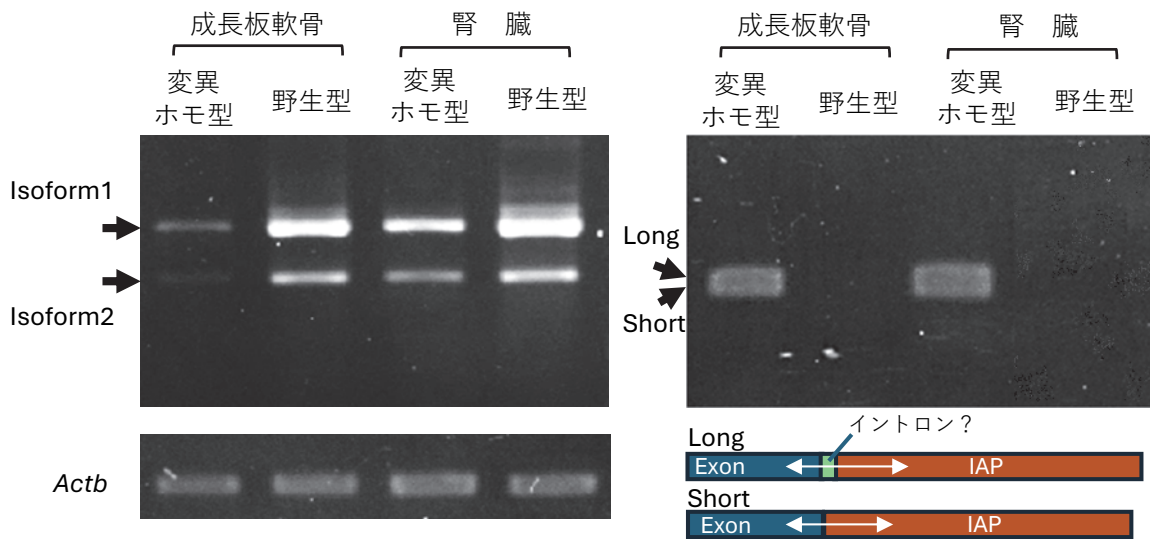
図3 挿入変異領域のPCR増幅結果と特定されたIAP挿入部位



左図：ミュータントマウス系統のホモ型とヘテロ型で増幅された正常アレル由来断片（309 bp）と挿入変異アレル（5.5 kb）。

右図：増幅断片の配列解析により特定されたIAP挿入の部位。

図4 挿入変異によるグルクロン酸転移酵素遺伝子発現への影響



左図：ミュータントマウスの変異ホモ型と野生型マウスの成長板軟骨と腎臓におけるグルクロン酸転移酵素遺伝子の全翻訳領域の転写産物（Isoform1 および2）に対するRT-PCRの結果。

右図：IAP配列を含む転写産物に対するRT-PCRの結果と出現した2種類のバンド（LongとShort）の予想される構造。

## 細胞増殖を主軸とした PIT-1 遺伝子 $\beta$ -isoform の機能解明

坂東 弘教

神戸大学医学部附属病院糖尿病・内分泌内科

### 背景・目的

下垂体特異的転写因子 PIT-1 は GH、PRL、TSH 産生細胞の増殖、ホルモン分泌に必須の転写因子である。同遺伝子は選択的 splicing により  $\alpha$  (促進性)、 $\beta$  (抑制性) の 2 種の isoform が産生される。近年、 $\beta$ -isoform が過剰産生される variant が先天性下垂体機能低下症の原因となることが国内外複数のグループから報告された (Am J Hum Genet. 2021;108:1526-1539.)。そのことから、下垂体においては、 $\alpha$  が促進性、 $\beta$  が抑制性 (dominant negative) の作用を有することが推測された。

一方、PIT-1 遺伝子は乳癌の病態にも関連していることが推測されている。同遺伝子の乳癌に対する意義としては、MCF7 細胞が用いた細胞増殖への意義などが解析されてきた (J Clin Invest. 2010;120:4289-302 など)。ただし、各 isoform 別の意義は明らかではなかった。

本研究では、MCF7 細胞における、 $\alpha$  と  $\beta$  の各 isoform の細胞増殖における意義を解明する。

### 方法

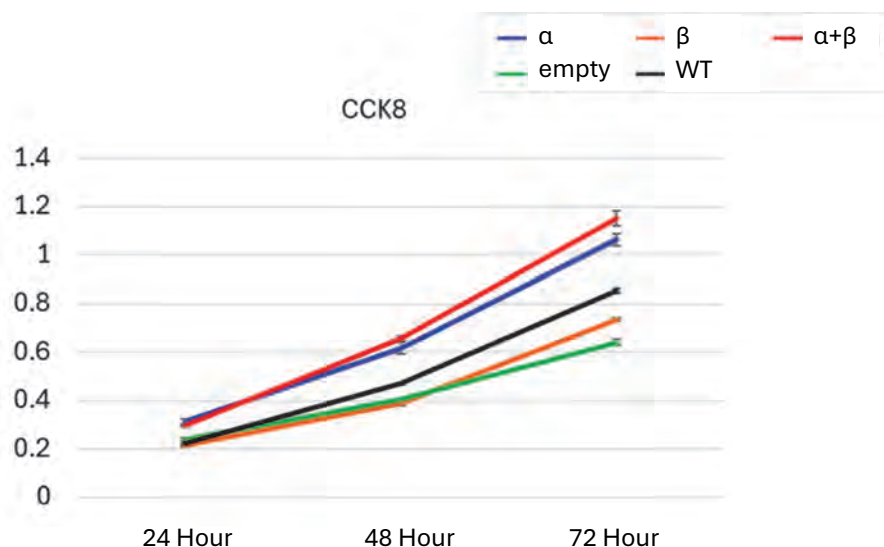
MCF7 細胞に①  $\alpha$ -isoform のみ、②  $\beta$ -isoform のみ、③  $\alpha$ -isoform と  $\beta$ -isoform 双方、④ empty vector の 4 条件で PIT-1 遺伝子を強制発現する。細胞株における増殖性を明らかにする。今回は、これらの細胞を用いて CCK8 assay を用いた解析を行った。また、PIT-1 の細胞増殖については上皮間葉転換 (EMT) に関連する遺伝子群が関連していると考えられており、Snail、Slug などの EMT 関連遺伝子発現量についても評価を行う。

### 結果

MCF7 細胞において、 $\alpha$ -isoform 強制発現は細胞増殖の促進を引き起こした。一方、 $\beta$ -isoform は  $\alpha$ -isoform と比較し、細胞増殖の促進は否定的ではあったものの、 $\alpha$ -isoform を抑制はしなかった。

本実験は、University of Santiago de Compostela (Prof. Roman Perez-Fernandez) で樹立された既報の PIT-1 安定細胞 MCF7 も同研究室から分与いただき、同様の実験を行った。

図1 MCF7 細胞における各 isoform 強制発現による細胞増殖 (CCK8 アッセイ)



分与された安定細胞株に各 isoform 導入を行った細胞でもほぼ同様の結果が得られた。

### 考察

今回の結果からは、 $\beta$ -isoform を増やすことにより、 $\alpha$ -isoform の促進性を乳癌においては抑制することはできなかった。このことは、乳癌と下垂体における組織・細胞間の差があることが示唆される。これまで下垂体においても  $\beta$ -isoform がどのように dominant negative の作用を呈するのかは明らかになっておらず、特異的な binding site などの解析が今後求められる。

もし  $\beta$ -isoform が  $\alpha$ -isoform の抑制を起こすのであれば、近年発達しつつある、exon skip などの手法を用いた PIT-1 陽性乳癌の治療について検討しうると思われる。しかしながら、今回の結果からは  $\beta$ -isoform を乳癌治療として臨床応用することは適切ではないことが推測される。

### 謝辞

この度は本研究を研究助成対象にいただき、成長科学協会の諸先生方に感謝申し上げます。

## 低ホスファターゼ症の病態形成におけるオステオポンチンの関与

道上 敏美

大阪母子医療センター研究所・骨発育疾患研究部門

### 1. 緒言

低ホスファターゼ症は、組織非特異型アルカリホスファターゼ (TNSALP) をコードする *ALPL* 遺伝子の機能喪失により引き起こされる遺伝性骨疾患である。TNSALP の基質であるピロリン酸の蓄積により骨石灰化障害を、ビタミン B6 の代謝異常により痙攣を引き起こすと考えられているが、ほかにも成長障害や筋力低下など多彩な症状を示し、未知の病態形成機構の存在が示唆される。そこで我々は、健常人由来 iPS 細胞 (iPSCs) にゲノム編集を適用することにより *ALPL*-knockout (KO) iPSCs を樹立し、解析に用いてきた。*ALPL* 以外は遺伝学的背景が同一なコントロール株と比較して解析するため、*ALPL* 欠損の影響を正確に評価することが可能である。興味深いことに、樹立した *ALPL*-KO iPSCs を骨芽細胞系列に分化誘導したところ、Osteopontin (OPN) の発現が著明に増加していた。OPN は多彩な機能を有し、骨石灰化制御にも関わるということが推察されている基質蛋白質である。そこで本研究においては、HPP の病態形成機構における OPN 発現増加の関与について明らかにするため、*ALPL*-KO iPSC に対してさらに CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を行い、*ALPL* および OPN をコードする *SPPI* 遺伝子の両者を欠損する *ALPL/SPPI*-double KO iPSC を作製し解析することとした。

### 2. 方法と結果

#### 1) CRISPR/Cas9 システムを用いた *ALPL/SPPI*-double KO iPSC の樹立

iPSC の維持培養はフィーダーフリーの条件下で行った。健常人由来 iPSC 細胞株 (610B1; 理化学研究所より購入) に *ALPL* の Exon 3, 4 の標的配列に対する合成 guide RNA と Cas9 蛋白質を導入し、両アレルに欠失とフレームシフトが誘導されたクローンを選定した。樹立した *ALPL*-KO iPSC (c.[81\_277del]; [c.81\_279inv]) は TNSALP 活性を完全に喪失していた。また、リン供与体として  $\beta$  グリセロリン酸を含む培地を用いて骨芽細胞系列に分化誘導した際の石灰化が、*ALPL*-KO 細胞では isogenic control に比し著明に低下しており、*SPPI* の発現が増加していた。

次に、*ALPL/SPPI*-double KO iPSC を作製するため、樹立した *ALPL*-KO iPSC に対し *SPPI* の Exon5 の標的配列に対する合成 guide RNA と Cas9 蛋白質を導入し、両アレルにフレームシフトが誘導されたクローンを選定した。今回、*SPPI* 遺伝子に複合ヘテロ変異 c.[430insG];[430insGG] (p.[Gly144GlyfsTer4];[Gly144fsTer9]) が同定されたクローンを解析に用いた。

#### 2) *In vitro* 石灰化能の評価

作製した *ALPL/SPPI*-double KO iPSC を、*ALPL*-KO iPSC、さらに *ALPL* および *SPPI* 以外は遺伝的に同質な isogenic control と共に、 $\beta$  グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメタゾン、レチノイン酸を含む培地で骨芽細胞系列に分化誘導し、アリザリンレッド染色と OsteoImage™

Fluorescent Assay (Ronza) により、*in vitro* 石灰化能を評価した。アリザリンレッドはカルシウムを染色し、また、OsteoImage™ Fluorescent Dye はハイドロキシアパタイト (HA) に特異的に結合することにより HA の沈着を定量的に評価することができる。*ALPL*-KO 細胞においては isogenic control に比べてアリザリンレッド染色性が低下しており、HA の蓄積量も著明に減少していた。*ALPL/SPPI*-double KO 細胞も *ALPL*-KO 細胞と同程度のアリザリンレッド染色性の低下および HA 蓄積量の減少を示した。

### 3) 遺伝子発現解析

*ALPL/SPPI*-double KO iPSC を、*ALPL*-KO iPSC、isogenic control とともに上述の通り骨芽細胞系列に分化誘導し、Day 7、Day 14、Day 28 に回収した RNA を用いて遺伝子発現を比較した。いずれの細胞においても *RUNX2* の発現が Day 7、Day 14 に比べて Day 28 に上昇した。興味深いことに、*ALPL/SPPI*-double KO 細胞においては、Day 28 における *RUNX2* の発現が、*ALPL*-KO 細胞や isogenic control に比較して著しく上昇していた。

## 3. 考察

OPN は多彩な機能を有し、骨石灰化制御にも関与することが推察されている。*ALPL/SPPI*-double KO iPSC 由来骨芽細胞系列細胞は、*ALPL*-KO 細胞と比較し、石灰化には明確な差を示さなかったが、*RUNX2* の著明な発現増加を認めた。このことから、HPP の病態形成においては、OPN の発現増加による骨芽細胞の機能変化が関与していることが示唆され、引き続き検討を進める予定である。

## 4. 文献

1. Michigami T, Ohata Y, Fujiwara M, Mochizuki H, Adachi M, Kitaoka T, Kubota T, Sawai H, Namba N, Hasegawa K, Fujiwara I, Ozono K. Clinical Practice Guidelines for Hypophosphatasia. *Clin Pediatr Endocrinol*, 29:9-24, 2020.
2. Michigami T, Tachikawa K, Yamazaki M, Kawai M, Kubota T, Ozono K. Hypophosphatasia in Japan: *ALPL* mutation analysis in 98 unrelated patients. *Calcif Tissue Int*, 106:221-231, 2020.
3. Yamazaki M, Kawai M, Kinoshita S, Tachikawa K, Nakanishi T, Ozono K, Michigami T. Clonal osteoblastic cell lines with CRISPR/Cas9-mediated ablation of *Pit1* or *Pit2* show enhanced mineralization despite reduced osteogenic gene expression. *Bone*, 151:116036, 2021.
4. Nakanishi T, Yamazaki M, Tachikawa K, Ueta A, Kawai M, Ozono K, Michigami T. Complex intrinsic abnormalities in osteoblast lineage cells of X-Linked hypophosphatemia: analysis of human iPSC cell models generated by CRISPR/Cas9-mediated gene ablation. *Bone*, 181: 117044, 2024.

## 成長ホルモンの GATA を介した新規シグナル伝達機構の 基盤解明と治療戦略への応用

光谷 真奈

武庫川女子大学薬学部臨床病態解析学研究室

田上 哲也

国立病院機構京都医療センター臨床研究センター

内分泌代謝高血圧研究部

分子内分泌代謝研究室

### 研究の背景と目的

成長ホルモン (Growth hormone: GH) は、甲状腺ホルモン (Thyroid hormone : TH) と共に、骨や骨格筋の成長に深く関与している。特に小児期において、GH と TH は共に成長や代謝調節に関与しており、成長やエネルギー代謝において重要である。TH は GH の分泌や作用を調節し、GH もまた TH の作用を修飾するなどして、成長に関して重要な身長伸長の調節を行っている。小児期、GH が不足すると成長ホルモン分泌不全低身長症を呈する。一方、TH が不足するとクレチン症を呈する。これまでに、甲状腺ホルモン不応症 (Refetoff 症候群) に伴う低身長では、GH 療法に反応しないことが報告されている。その一方で、GH 分泌不全症の低身長は、TH の補充で骨端線の閉鎖前であれば一定程度の伸長が期待できることも知られている。以上の臨床上の知見より推察できることは、両ホルモンは身長制御に関してクロストークの分子メカニズムを持っていることである。しかしながら、具体的なシグナル伝達とそれを担う分子種などの詳細は不明であった。

既報では、GH は間接的に甲状腺ホルモンの活性化を促すことは知られていた。このメカニズムとして、GH は肝臓や腎臓における脱ヨウ素酵素 (Deiodinase : DIO) のうち DIO1 と DIO2 の発現を増加させ、サイロキシン (T4) から活性型のトリヨードチロニン (T3) への変換を促進する。これにより標的細胞内における T3 レベルが上昇する結果、代謝活性が高まるというものである。いずれも現象面の記述はあるが、そのクロストークのメカニズムを担う分子種は不明であった。

GH と TH とのクロストークのメカニズムを解明することを最終的な目的として、まず GH の細胞内のシグナル伝達に関連する分子群について転写因子である GATA の発現について解析を行った。次に、GH シグナル伝達の鍵となる分子種として Dio を念頭に、GATA を含め成長板軟骨のモデルとして ATDC5 細胞などの細胞を用いて検討を行った。

### 研究方法

#### 1) プラスミド構築

レポータープラスミドとして、ヒトゲノムから GATA1 ~ GATA3 のプロモーター領域を PCR によりクローニングし、ルシファラーゼ発現ベクター pGL4.10 に結合して、pGL4.10-GATA1 ~ 3-promoter-luciferase (GATA1 pro-Luc, GATA2 pro-Luc, GATA3 pro-Luc) を作成した。ま

た、ヒトゲノムから DIO2 および DIO3 のプロモーター領域を PCR によりクローニングし、ルシファラーゼ発現ベクター pGL4.10 に結合し、pGL4.10-DIO2,3-promoter-luciferase (DIO2 pro-Luc, DIO3 pro-Luc) を作成した<sup>1),2)</sup>。転写因子発現プラスミドとして、恒常活性型の変異を導入した pCMX-m1\*6STAT5A (aSTAT5A)、pCMX-m1\*6STAT5AB (aSTAT5B)<sup>3)</sup>、pEF-GATA1、2、3 (GATA1 ~ 3) を用いた<sup>4),5)</sup>。

## 2) 細胞培養

検討にはヒト HTC/C3 細胞 (甲状腺乳頭がん由来)、ヒト H-EMC-SS 細胞 (軟骨肉腫由来)、ヒト K562 細胞 (慢性骨髄性白血病由来)、ヒト U937 細胞 (前単球性白血病由来)、ヒト MCF-7 細胞 (乳がん由来)、ヒト MDA-MB-231 細胞、ヒト MDA-MB-468 細胞 (いずれもトリプルネガティブ乳がん由来)、マウス C2C12 細胞 (筋芽細胞由来)、マウス ATDC5 細胞 (奇形腫由来)、マウス 3T3-L1 細胞 (線維芽細胞由来)、マウス TtT/GF 細胞 (TSH 産生細胞)、ヒト HEK293 由来 TSA201 細胞 (胎児がん細胞) を用いた。

上記のうち、3T3-L1 細胞は以下の方法で分化誘導を行った。10cm dish にコンフルエントになった細胞を 6 well plate に播種し、10% FBS、100 U/mL Penicillin-Streptomycin (P/S)、2mM L-glutamine 含有 DMEM で 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。播種 2 日後に培養液を培地 (1  $\mu$  M デキサメタゾン、0.5  $\mu$  M イソブチルメチルキサンチン、10  $\mu$ g/mL インスリン含有 high glucose-DMEM) に置換した。さらに、4 日後に培養液を培地 (10  $\mu$ g/mL インスリン含有 high glucose-DMEM) に置換した。分化誘導後、L-glutamine 含有 high glucose-DMEM (WAKO) に培養液を交換し 2 時間スターベーションを行った。

マウス胎生期がん由来 ATDC5 細胞は、5%FBS、100U/mL P/S、2mM L-glutamine 含有 DMEM/Ham's F12 1:1 培地 (Wako) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。その後 6 well plate に播種し、同様の条件で培養した後、培養液を 5%FBS、1%P/S、L-glutamine、insulin 10  $\mu$ g/mL を含む分化誘導用 DMEM/Ham's F12 1:1 に置換、1 日ごとに培養液の交換し、肥大軟骨細胞へ分化させた。

K562 細胞および U937 細胞は、10%FBS、2mM L-glutamine、100U/mL の P/S、および 100U/mL のストレプトマイシンを添加した RPMI 1640 培地 (#05918, Shimadzu Diagnostics Corporation, Tokyo, Japan) で培養・維持した。赤血球系分化を誘導するために、K562 細胞を 2mM 乳酸ナトリウム (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) で 3 日間処理し、ヘモグロビン合成細胞へと変換させた。

MCF-7 細胞、MDA-MB-231 細胞、MDA-MB-468 細胞は 10%FBS、100U/mL Penicillin-Streptomycin (P/S)、2mM L-glutamine 含有 E-MEM (WAKO) で培養した。

TtT/GF 細胞、TSA201 細胞、および HTC/C3 細胞は、先行研究の通り、Dulbecco 改変 DMEM 培地 (#05919, Shimadzu Diagnostics Corporation, Tokyo, Japan) で培養した。

これらの細胞は、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 3) 遺伝子導入及びレポーターアッセイ

TSA201 細胞を播種後、16 時間後にレポータープラスミドとして GATA1 ~ 3pro-Luc、および DIO2、3、pro-Luc をそれぞれ 50ng/μL、20ng/μL で、転写因子発現プラスミド (aSTAT5A, aSTAT5B, GATA1 ~ GATA3) は 50、200、400ng/μL の濃度勾配を配し、リン酸 Ca<sup>2+</sup> 法を用いて遺伝子導入を行った。その 5 時間後に 10% Charcoal treated FBS、1% P/S、L-glutamine 含有 high glucose-DMEM (WAKO) に置換した。その後 20 時間後に回収し、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega, E1910) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

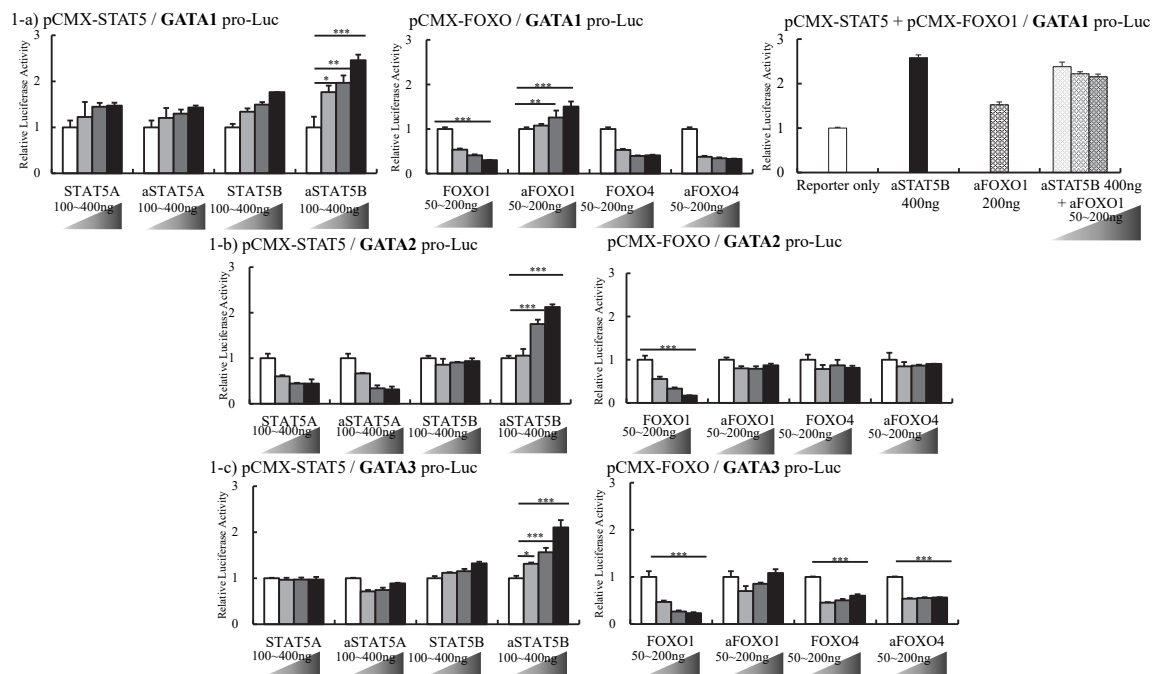
### 4) Real-time qPCR

培養細胞に、Control 群には vehicle の dH<sub>2</sub>O を、GH 刺激群には rhGH (WAKO) を 2μg/mL で添加した。rh GH 添加後 24 時間または 48 時間インキュベートし、RNAiso Plus (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて total RNA を抽出した。次に iScript Advanced Reverse transcriptase (BioRad Laboratories, Inc., CA, USA) または GeneAce Reverse Transcriptase (NIPPON GENE CO., LTD., Tokyo, Japan) を用いて逆転写反応を行い合成した cDNA を鋳型とし、定量 PCR 法を用いて DIO2、DIO3 の mRNA 発現量の評価を行った。

## 結果

### 結果 1) GH のシグナル伝達下流のターゲット遺伝子として GATA が存在する。

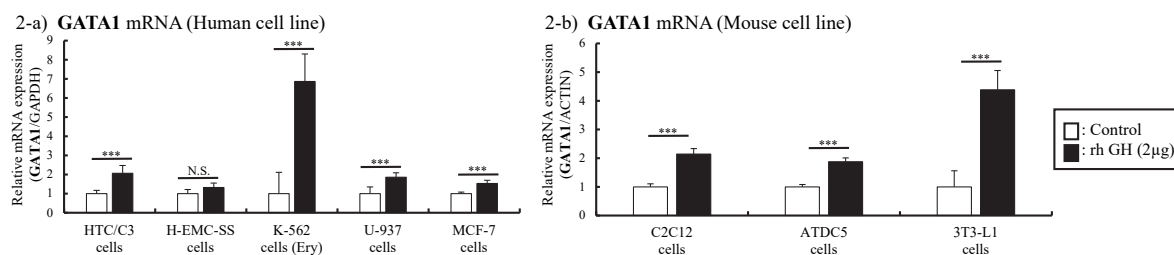
図 1



GH は、成長ホルモン受容体 (GHR) に結合すると Janus kinase/Signal Transduction and Activator of Transcription (JAK/STAT) 経路の下流に存在する STAT5B をリン酸化して機能を発揮する。今回、transient expression assay により恒常活性型 STAT5B (aSTAT5B) を用いて濃度勾配を配したところ、GATA1 ~ 3 のプロモーターの転写活性量は濃度依存的に増加した。一方、IGF-1 シグナル伝達の下流に存在する FOXOs では有意な差を認めなかった (図 1)。FOXO1 との相乗効果も認めていない (図 -1a 右図)。

**結果 2) GH は JAK/STAT を介して GATA1 の mRNA 発現を増加させる。**

**図 2**

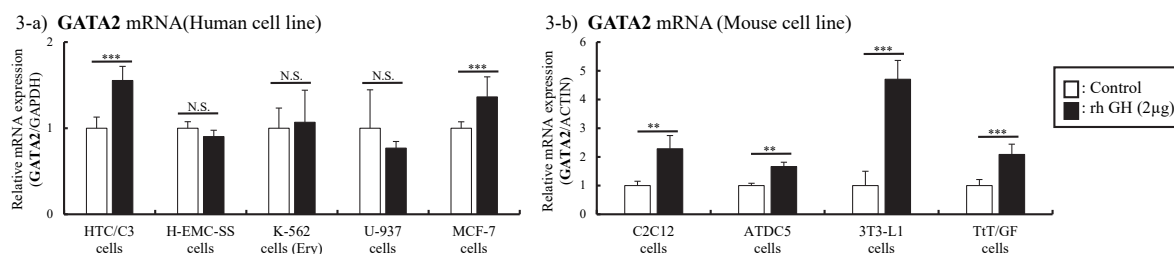


Error bar=Mean ± S.D, \*\*\*, P<0.01., (n=3)

ヒト HTC/C3 細胞 (甲状腺乳頭がん由来)、ヒト H-EMC-SS 細胞 (軟骨肉腫由来)、ヒト K562 細胞 (慢性骨髄性白血病由来)、ヒト U937 細胞 (前単球性白血病由来)、ヒト MCF-7 細胞 (乳がん由来)、マウス C2C12 細胞 (筋芽細胞由来)、マウス ATDC5 (奇形腫由来)、マウス 3T3-L1 細胞 (線維芽細胞由来) を用いて、GH 添加後の GATA1 の mRNA 発現を検討した。HTC/3C、赤血球系へ分化誘導した K562、MCF-7、C2C12、ATDC、3T3-L1 細胞では、GH 刺激で、GATA1 の mRNA 発現量は Control と比較して有意に増加した。

**結果 3) GH は GATA2 の mRNA 発現量を増加させる。**

**図 3**

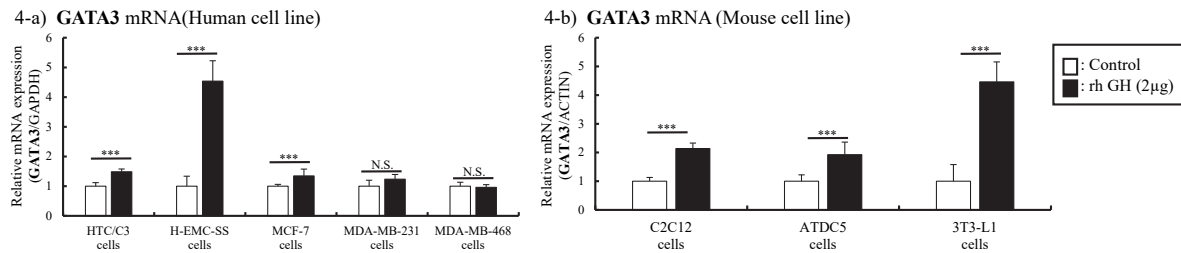


Error bar=Mean ± S.D, \*\*, P<0.01., (n=3), \*\*\*, P<0.005.

HTC/3C、MCF-7、C2C12、ATDC、3T3-L1、TtT/GF 細胞の各細胞において GH で刺激すると、GATA2 の mRNA 発現量は Control と比較して有意に増加した。

結果 4) GH は GATA3 の mRNA 発現量を増加させる。

図 4

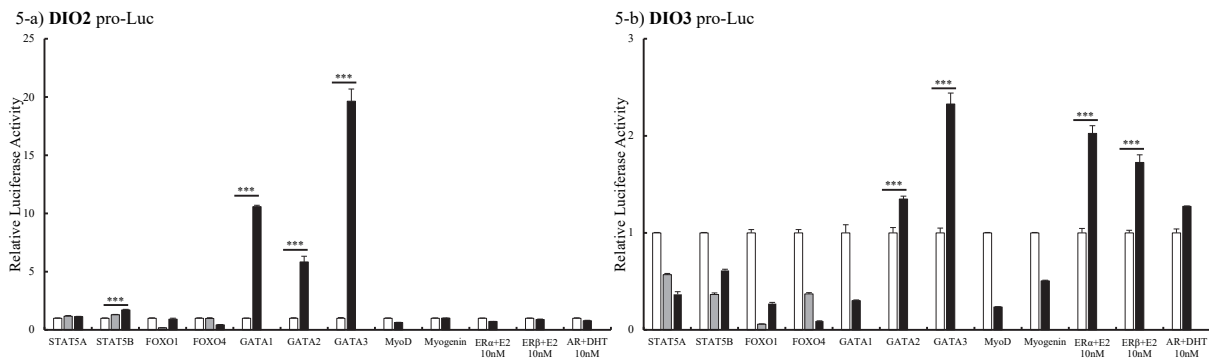


Error bar=Mean ± S.D, \*\*\*, P<0.001 (n=3)

HTC/C3、H-EMC-SS、MCF-7、C2C12、ATDC5、3T3-L1細胞を用いて、GH添加後のGATA3の発現を検討したところ、Controlと比較してGATA3のmRNA発現量は有意に増加した。

結果 5) GATAs は Dio2 ならびに Dio3 の転写活性を増加させる。

図 5

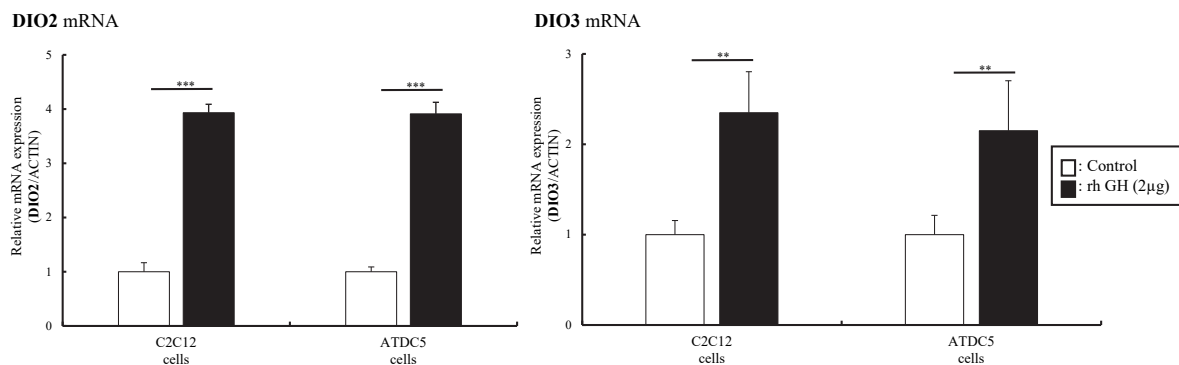


Error bar=Mean ± S.D, \*\*\*, P<0.001., (n=3)

Transient expression assay により、DIO2 の転写活性はコントロールである reporter only と比較し、GATA1 ~ 3 の発現プラスミドの添加により増加した。同様に、DIO3 の転写活性は reporter only と比較し、GATA1 により減少した。一方、GATA2、GATA3 では増加した。これらの結果より、GATAs は DIO2 ならびに DIO3 転写活性に影響を与えることが示唆された。

結果 6) GH は ATDC5 細胞において DIO2 ならびに DIO3 の mRNA 発現量を有意に増加させる。

図 6



Error bar=Mean ± S.D, \*\*, P<0.01,\*\*\*, P<0.005., (n=3)

GH の標的細胞として C2C12 細胞、ATDC5 細胞を用いて GH 刺激時の DIO2、DIO3 の mRNA 量の変化を qPCR 法で評価した。Control と比較して DIO2、DIO3 の mRNA 発現量は有意に増加した。

考察

小児における成長障害は、染色体異常や甲状腺機能の低下によるクレチン症など、様々な要因で引き起こされる。原因がどのようなものであれ、成長をキャッチアップさせるためにはホルモンによる治療が欠かせない。

今回、骨、なかでも成長板軟骨の性質をもっている ATDC5 細胞を用いて、両者のクロストークのメカニズムを解明することを初期の目的として解析を行った。GH は、骨などの標的細胞の細胞膜受容体に結合して細胞内のシグナルを伝達する。TH は、標的細胞内の核内受容体に結合して遺伝子を制御している。これら GH と TH のクロストークのメカニズムには、(1) T3 が下垂体の甲状腺ホルモン受容体 (TR) に結合し、GH 遺伝子の転写を促進する結果、成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) による GH 分泌が増強されること。(2) GH は、細胞内シグナル伝達において JAK2/STAT5 シグナル経路を介して作用するが、T3 は STAT5 のリン酸化を増強し GH の作用を増幅すると報告されていること。(3) TH 分泌不全では、T3 が低下していると GH が分泌されても IGF-1 の産生が低下し、成長が阻害される。これらのことから、GH は肝臓で IGF-1 の産生を促進するが、この過程にも T3 が関与している。(4) GH は、肝臓や腎臓における DIO1、DIO2 の発現を増加させ、T4 から T3 への変換を促進すること。これらの諸相の総和により、血中 T3 レベルが上昇し代謝活性が高まる。よって、甲状腺機能低下症では、T3 が不足すると GH の分泌が低下し、さらに GH ならびに IGF-1 産生が低下するために、成長障害や代謝低下が起こる。一方、甲状腺機能亢進症では、過剰な T3 は GH 分泌を促進するが、同時に IGF-1 の調節も乱れ、異常な成長や代謝異常 (筋肉の異化亢進など) を引き起こすことで結果的に成長も障害される。

(1) に関しては、以前より視床下部-下垂体では GATA2 と DIO2 との関係性は報告されていた<sup>6)</sup>。今回の検討で、そのシグナル伝達の上流に GH も関与していることが分かった。GH が関与しているとされる脂肪細胞分化と脂質代謝の促進についても、GATA2 と GATA3 が関与していることが

分かった。さらに血球系細胞では、GHがGATA1を介していることが示唆された。(4)について、GHはGATAの発現を介してDio2とDio3の発現を調節することで、標的細胞内におけるT3レベルを調節している可能性が示唆された。

GHとTHの相互の補完性やクロストークのメカニズムの詳細については、現象を裏付けための分子基盤は不明であった。本検討より、GHはシグナル伝達の下流でGHR/JAK/STAT5/GATAsを介して、DIO2/DIO3を正に調節することにより、細胞でT4からT3への変換が促進される可能性が示唆された。また、IGF-1シグナル伝達下流に存在するFOXOsは関与していなかったことから、GH単独での作用であることが示唆された。骨や骨格筋の成長作用においてGHとTHが協同して作用を発揮するためには、成長組織においてGATAsの発現と機能が必要条件となる分子の1つであることが示唆された。

今後、個別標的組織におけるGATAsの発現と成長障害の有無や程度を臨床成績に基づき評価を重ねて行きたい。また成長障害患者の治療に臨床応用できる分子生物学に最適な介入ポイントの探索を継続して行きたい。

## 謝辞

今回の研究を行うにあたり、多大な研究助成金を賜りました成長科学協会に対し、心より謝辞を申し述べます。

## 参考文献

1. Yamauchi I, Sakane Y, Okuno Y, Sugawa T, Hakata T, Fujita H, Okamoto K, Taura D, Yamashita T, Hirota K, Ueda Y, Fujii T, Yasoda A, Inagaki N. High-throughput Screening in Combination With a Cohort Study for Iodothyronine Deiodinases. *Endocrinology*. 2022 Aug 1;163(8):bqac090. doi: 10.1210/endo/bqac090. PMID: 35695766.
2. Futawaka K, Tagami T, Fukuda Y, Koyama R, Nushida A, Nezu S, Imamoto M, Kasahara M, Moriyama K. Growth hormone regulates the expression of UCP2 in myocytes. *Growth Horm IGF Res*. 2016 Aug;29:57-62. doi: 10.1016/j.ghir.2016.04.005. PMID: 27150070.
3. Mitsutani M, Matsushita M, Yokoyama M, Morita A, Hano H, Fujikawa T, Tagami T, Moriyama K. Growth hormone directly stimulates GATA2 expression. *Growth Horm IGF Res*. 2024 Feb;74:101572. doi: 10.1016/j.ghir.2024.101572. PMID: 38281404.
4. Mitsutani M, Yokoyama M, Hano H, Morita A, Matsushita M, Tagami T, Moriyama K. Growth hormone is involved in GATA1 gene expression via STAT5B in human erythroleukemia and monocytic cell lines. *Blood Cells Mol Dis*. 2025 Feb;110:102894. doi: 10.1016/j.bcmed.2024.102894. PMID: 39303396.
5. Matsunaga H, Sasaki S, Suzuki S, Matsushita A, Nakamura H, Nakamura HM, Hirahara N, Kuroda G, Iwaki H, Ohba K, Morita H, Oki Y, Suda T. Essential Role of GATA2 in the Negative Regulation of Type 2 Deiodinase Gene by Liganded Thyroid Hormone Receptor  $\beta$  2 in Thyrotroph. *PLoS One*. 2015 Nov 16;10(11):e0142400. doi: 10.1371/journal.pone.0142400. PMID: 26571013; PMCID: PMC4646574.

## 包括的メチル化解析による SGA 児の 生活習慣病発症のバイオマーカー探索とリスク層別化研究

山澤 一樹

国立病院機構東京医療センター  
遺伝診療科／小児科

### 背景と目的

胎児期・新生児期はエピゲノムの可塑性が高い時期であり、この時期の栄養環境はメタボリックメモリーとしてエピゲノムに記憶され、将来の生活習慣病に対する疾患感受性を決定するという概念が提唱され、Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) 説と呼ばれる。近年、我が国においては、妊婦の痩せに伴い胎児が子宮内で低栄養環境にさらされ、不当軽量 (SGA: Small-for-Gestational Age、出生時体重が在胎週数基準と比して 10 パーセント未満) 児が急増しており、次世代での生活習慣病の増加が懸念されるが、その分子生物学的機序は明らかでない。

今回、我々は DNA メチル化に注目し、DOHaD 説におけるメタボリックメモリーは DNA メチル化の変動で説明できるのではないかとこの着想に至った。SGA は母体因子、胎盤因子、胎児因子等の様々な要素に起因する heterogeneous な病態であるが、SGA 児の頬粘膜メチル化は健常児とは明確に異なるパターンを呈することから、頬粘膜によるメチル化解析によって SGA 児の生活習慣病の疾患感受性を定量的に捉えることが可能である。成人後の生活習慣病発症の at risk 集団である SGA 児の唾液 DNA メチル化レベルと、児の BMI や血圧等との関連を明らかし、これをもとに、生活習慣病発症のリスクを示すバイオマーカーの開発を目指すことが本研究の目的である。

### 対象と方法

全国の共同研究施設から、SGA 児 310 例と正常コントロール児 40 例をリクルートし、頬粘膜試料と臨床情報を収集した。頬粘膜試料からゲノム DNA を抽出した後、バイサルファイト処理を行った。2024 年度は、インプリンティング異常症に関連する下記 10 箇所のメチル化可変領域 (DMR) のメチル化レベル (0 ~ 100% の連続値) をパイロシーケンス法を用いて解析した。

H19-DMR, PEG1-DMR, PEG10-DMR, ZAC1-DMR, KvDMR1, IG-DMR, MEG3-DMR, SNRPN-DMR, GNAS A/B-DMR, ZNF597-DMR.

### 結果と考察

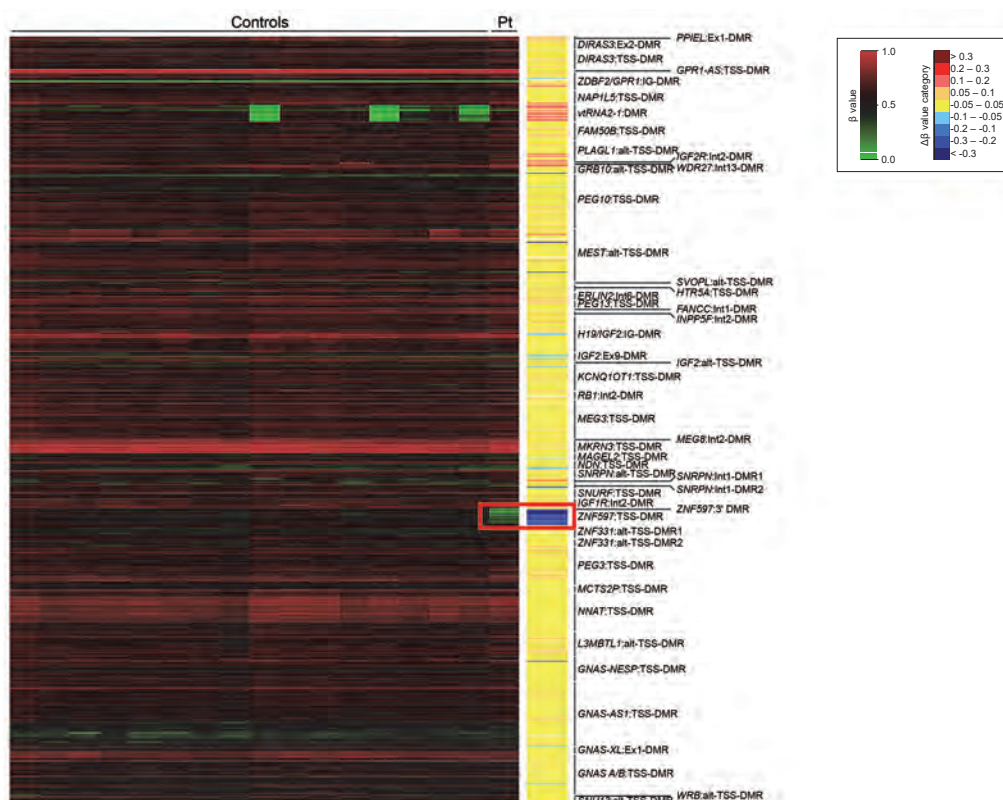
310 例中 6 例 (1.9%) にいずれかの DMR のメチル化異常を認め、インプリンティング異常症が示唆された (表 1、図 1)。この結果により、SGA 児の中にインプリンティング異常症が一定数含まれることが示された。メチル化解析によってインプリンティング異常症の診断に至れば、治療方針や自然歴が明確になり、診療の質の向上が期待される。加えて、メチル化異常や片親性ダイソミーといったエピバリエントは原則として *de novo* に生じると想定され、遺伝カウンセリングを行う上でも重要な情報となり得る。

現在、パイロシーケンス法によるターゲットメチル化解析に加えて、DNAメチル化ビーズアレイ（イルミナ社 Infinium MethylationEPIC BeadChip）を用いたゲノム全領域85万箇所のCpGサイトのメチル化レベルの解析を実施している。胎児期・新生児期においてメチル化状態は可塑性を伴い様々な要因により変動することから、メチル化の「ゆらぎ」は、胎児期・新生児期の内的・外的環境負荷に起因するものと推察され、メチル化の乱れが正常範囲を逸脱すると、代謝やシグナル伝達、遺伝子発現ネットワークなどの動的恒常性に動揺を来し、表現型の変容、疾病の発症を招くと考えられる。SGA児においてこうした指標と相関のあるメチル化の「ゆらぎ」を特定できれば、生活習慣病発症のリスクを判定するバイオマーカーとして活用することが期待される。

表1 パイロシーケンス法によりインプリンティング異常症が示唆された6例

| 症例 | 登録時年齢  | 出生時身長 (SDS) | 登録時身長 (SDS) | メチル化異常を認めた DMR                                   | 座位      | 示唆されるインプリンティング疾患                       | 確定診断 |
|----|--------|-------------|-------------|--|---------|--|------|
| 1  | 2歳9か月  | -3.15       | -3.73       | <i>PLAGL1</i> :alt-TSS-DMR                       | 6q24.2  | Silver-Russell症候群<br>(6番染色体母性片親性ダイソミー) | ○    |
| 2  | 13歳5か月 | -1.38       | -1.18       | <i>MEG3/DLK1</i> :IG-DMR<br><i>MEG3</i> :TSS-DMR | 14q32.2 | Temple症候群                              |      |
| 3  | 5歳4か月  | -1.18       | -2.59       | <i>SNURF</i> :TSS-DMR                            | 15q11.2 | Prader-Willi症候群                        |      |
| 4  | 0歳10か月 | -1.92       | -1.39       | <i>SNURF</i> :TSS-DMR                            | 15q11.2 | Prader-Willi症候群                        |      |
| 5  | 1歳7か月  | -1.87       | -1.00       | <i>ZNF597</i> :3' DMR<br><i>ZNF597</i> :TSS-DMR  | 16p13.3 | 16番染色体母性片親性ダイソミー                       |      |
| 6  | 6歳0か月  | -1.43       | 0.31        | <i>ZNF597</i> :TSS-DMR                           | 16p13.3 | <i>ZNF597</i> メチル化異常症                  | ○    |

図1 上記症例6のメチル化ビーズアレイ解析。*ZNF597* 遺伝子の低メチル化を認めた（赤枠）。



## *HMGA2-PLAG1-IGF2* 経路の異常に起因する シルバーラッセル症候群の臨床像解明

矢本 香織

浜松医科大学医化学講座

### 研究目的

シルバーラッセル症候群 (Silver-Russell syndrome, SRS) は、出生前後の成長障害・相対的頭圍拡大・三角形の顔貌・摂食障害・半身低形成・胎盤低形成などを特徴とする稀な先天性疾患である。11 番染色体短腕に存在する父性発現遺伝子 *IGF2* は、個体・胎盤の成長・発達に大きな役割を果たしており、事実、*H19-DMR* の低メチル化 (エピ変異) による *IGF2* 発現低下は、SRS の発症原因の約 40% を占める。さらに近年、*HMGA2* および *PLAG1* が *IGF2* の発現を制御することが明らかとなっている (*HMGA2-PLAG1-IGF2* 経路)<sup>1)</sup>。しかし、これらの遺伝子変異の報告は稀である。そこで本研究では、SRS もしくは SRS-like の臨床所見が認められる患者に対して、全エクソーム解析を施行し、*IGF2*、*HMGA2*、*PLAG1* 遺伝子変異をもつ症例の臨床的特徴の解明をめざす。

### 研究方法および結果

SRS 患者ならびに子宮内胎児発育不全 (IUGR) 患者のうち、MS-MLPA 法で *H19-DMR* の低メチル化が否定された 5 家系に対して、患者および両親の血液全血由来あるいは頬粘膜由来ゲノム DNA を用いて全エクソーム解析を施行した。得られたシーケンスデータに対して、公共のデータベースに登録のあるアレル頻度や変異に対する病的予測スコアを用いて、抽出された変異の病原性を評価した。その結果、それぞれ別の家系で、*HMGA2* 遺伝子の *de novo* フレームシフト変異 (NM\_003483.6:c.138\_141delinsCT, p. (Lys46Asnfs\*16))、*HMGA2* を含む 12q14.2-q15 領域の *de novo* 欠失、*TMEM67* 遺伝子の compound heterozygous 変異を同定した (図 1)。

*HMGA2* 遺伝子変異または欠失が同定された症例において、SRS の臨床診断基準として用いられている Netchine-Harbison clinical scoring system (N-H CSS) の 6 項目に加え、手指奇形、外性器異常、胎盤所見などを含めた臨床所見を確認した。さらに、これまでに報告のある 1) *HMGA2* 遺伝子変異群 (Group1)、2) *HMGA2* を含む欠失群 (Group2)、3) *PLAG1* 遺伝子変異群 (Group3)、4) *PLAG1* を含む欠失群 (Group4)、5) *IGF2* 遺伝子変異群 (Group5)、6) *H19/IGF2:IG-DMR* エピ変異群 (Group6) における臨床所見を比較検討し、以下の知見を得た (表 1)。

1. これまでに、*HMGA2* 遺伝子変異群 (Group1) が 24 例、*HMGA2* を含む欠失群 (Group2) が 23 例報告されている。*HMGA2* 遺伝子変異は、そのほとんどが truncating variant であるが、重度の低身長を呈するホモ接合性ミスセンス変異を有する家系も報告されている<sup>2)</sup>。Group1 および 2 の臨床所見を比較すると、N-H CSS の 4 項目以上が認められたのは、それぞれ 57%、32% で、前額部突出や逆三角形の顔貌を含む SRS 様の臨床的特徴は、Group2 より Group1 で頻度が高い傾向が認められた。一方、口蓋裂や小顎症などの他の特徴は、Group1 より Group2 で頻度が高い傾

向が認められた。このことは、*HMGA2* 以外の複数の遺伝子の欠失または破壊が、Group2 では SRS の表現型を不明瞭にし、非 SRS の表現型を促進したと考えられる。

2. *HMGA2* 遺伝子変異群 (Group1) と *PLAG1* 遺伝子変異群 (Group3) を比較すると、臨床的特徴はかなり類似しており、それぞれの項目で有意差は認められなかった。このことは、*HMGA2* は、*IGF2* 発現の直接的調節機能よりも、主に *PLAG1* を介した間接的調節機能を損なうことによって、*IGF2* 発現を低下させることが推測される。
3. *HMGA2* 遺伝子変異群 (Group1) と *IGF2* 遺伝子変異群 (Group5) およびエピ変異群 (Group6) を比較したところ、N-H CSS を満たす患者の頻度、相対的頭囲拡大に関して、Group1 ではそれぞれ約半数程度であるのに対し、Group5 および 6 ではほぼ全例が満たしており、Group5 および 6 でより重症の phenotype を示した。また、Group6 では体の左右非対称性が高頻度に認められ、これは、*H19*/*IGF2*:IG-DMR が正常にメチル化された細胞と、低メチル化された細胞がモザイク状になっていることに起因すると考えられる。

## 結語

今回同定された *HMGA2* 変異は、本邦初となるもので、*HMGA2* が SRS 発症に関与していることを支持する結果である。これまでに報告された症例の臨床所見の比較から、*HMGA2* 遺伝子変異群は *PLAG1* 遺伝子変異群と同様の臨床所見を示すが、*IGF2* 遺伝子変異群やエピ変異群と比較すると、軽症であることを見出した<sup>3)</sup>。

## 参考文献

1. Abi Habib W, Brioude F, Edouard T, Bennett JT, Lienhardt-Roussie A, Tixier F, et al. Genetic disruption of the oncogenic *HMGA2*-*PLAG1*-*IGF2* pathway causes fetal growth restriction. *Genet Med*. 2018;20(2):250-8.
2. Hübner CT, Meyer R, Kenawy A, Ambrozaityte L, Matuleviciene A, Kraft F, et al. *HMGA2* variants in Silver-Russell Syndrome: homozygous and heterozygous occurrence. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(7):dgaa273.
3. Yamoto K, Saitsu H, Ohkubo Y, Kagami M, Ogata T. Pathogenic sequence variant and microdeletion affecting *HMGA2* in Silver-Russell syndrome: case reports and literature review. *Clin Epigenetics*. 2024;16(1):73.

図1 *HMGA2* 遺伝子変異 (Case1) および *HMGA2* を含む欠失 (Case2) 症例の解析結果

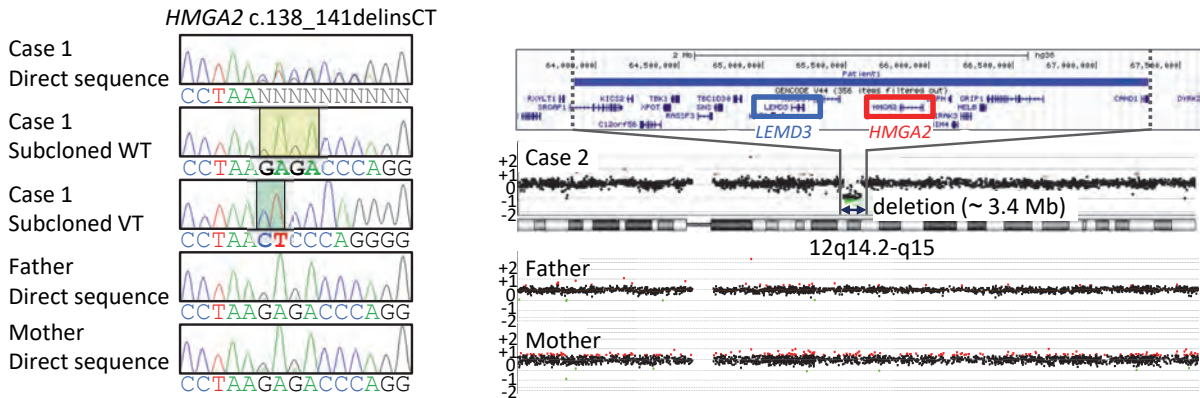


表1 臨床像のまとめ

|   | Case 1 | Case 2 | Group 1<br><i>HMGA2</i> intragenic<br>sequence<br>variants/deletions | Group 2<br><i>HMGA2</i> -containing<br>deletions<br>(n=23) | Group 3<br><i>PLAG1</i> intragenic<br>sequence variants<br>(n=11) | Group 4<br><i>PLAG1</i> -containing<br>deletions<br>(n=5) | Group 5<br><i>IGF2</i> intragenic<br>sequence variants<br>(n=14) | Group 6<br><i>H19/IGF2</i> :IG-DMR<br>epimutations<br>(n=43-226) |
|---|--------|--------|--|--|---|---|--|--|
| <b>&lt;Netchine-Harbitson scoring system features for Silver-Russell syndrome&gt;</b> |        |        |  |  |   |   |  |  |
| Diagnosis of SRS (≥4/6)   | +      | +      | 13/23 (56.5%)  | 7/22 (31.8%)   | 5/11 (45.5%)  | 2/5 (40%)   | 14/14 (100%)   | 43/43 (100%)   |
| Birth length and/or weight -2 SDS   | +      | +      | 19/21 (90.5%)  | 15/21 (71.4%)  | 11/11 (100%)*   | 3/5 (60%)*  | 14/14 (100%)   | 35/35 (100%)   |
| Postnatal height -2 SDS (~ 2 years)   | +      | +      | 23/23 (100%)   | 22/22 (100%)   | 7/7 (100%)  | 2/4 (50%)   | 14/14 (100%)   | 145/173 (83.8%)  |
| Relative macrocephaly at birth  | +      | +      | 6/16 (37.5%)   | 5/22 (22.7%)   | 4/7 (57.1%)   | 3/5 (60%)   | 14/14 (100%)   | 111/112 (99.1%)  |
| Prominent forehead (1-3 years)  | +      | -      | 15/20 (75%)*   | 6/22 (27.3%)*  | 6/7 (85.7%)   | 4/5 (80%)   | 14/14 (100%)   | 118/126 (93.7%)  |
| Body asymmetry  | -      | -      | 2/18 (11.1%)   | 0/22 (0%)  | 0/9 (0%)  | 0/5 (0%)  | 3/14 (21.4%)†  | 175/226 (77.4%)†   |
| Feeding difficulties and/or low BMI   | +      | +      | 16/19 (84.2%)  | 15/16 (93.8%)  | 9/10 (90%)  | 4/4 (100%)  | 14/14 (100%)   | 124/173 (71.7%)  |
| <b>&lt;Pregnancy and delivery&gt;</b>   |        |        |  |  |   |   |  |  |
| Gestational age (weeks)   | 39     | 39     | 39 (29 ~ 42) (n=18)  | 40 (27 ~ 42) (n=20)  | 39 (31 ~ 40) (n=11)   | 36 (30 ~ 38) (n=5)  | 36 (29 ~ 43) (n=14)  | 38 (34 ~ 40) (n=36)  |
| Placental weight (SDS)  | -0.82  | -1.65  | ...  | ...  | ...   | ...   | -2.7 ± 0.5 (n=4)   | -2.1 ± 0.7 (n=14)  |
| Hypoplastic placenta (< 80%)  | -      | +      | ...  | ...  | ...   | 4/4 (100%)  | ...  | 11/12 (91.6%)  |
| Oligohydramnios   | +      | -      | ...  | ...  | ...   | ...   | 3/6 (50.0%)  | 7/11 (63.6%)   |
| <b>&lt;Craniofacial features not involved in Netchine-Harbitson criteria&gt;</b>      |        |        |  |  |   |   |  |  |
| Triangular face   | +      | +      | 13/18 (72.2%)  | 9/22 (40.9%)   | 8/9 (88.9%)   | 5/5 (100%)  | 14/14 (100%)   | 73/74 (98.6%)  |
| Low set ears or ear anomalies   | -      | -      | 3/17 (17.6%)   | 3/21 (14.3%)   | 0/5 (0%)  | 3/5 (60%)   | 7/11 (63.6%)   | 70/140 (50.0%)   |
| Cleft palate  | -      | -      | 0/15 (0%)  | 1/21 (4.8%)  | 0/5 (0%)  | 0/5 (0%)  | 6/14 (42.8%)   | ...  |
| Micrognathia  | +      | +      | 2/15 (13.3%)   | 8/21 (38.1%)   | 1/5 (20%)   | 1/5 (20%)   | 8/8 (100%)   | 59/79 (74.7%)  |
| <b>&lt;Limb/digital features&gt;</b>  |        |        |  |  |   |   |  |  |
| Long bone deficiency  | -      | -      | 0/18 (0%)  | 0/21 (0%)  | 0/5 (0%)  | 0/5 (0%)  | 1/14 (7.1%)  | ... (0%)   |
| Ectrodactyly  | -      | -      | 0/18 (0%)  | 0/21 (0%)  | 0/5 (0%)  | 0/5 (0%)  | 3/14 (21.4%)   | ... (0%)   |
| Polydactyly   | -      | -      | 0/18 (0%)  | 0/21 (0%)  | 0/5 (0%)  | 0/5 (0%)  | 1/14 (7.1%)  | ... (0%)   |
| Syndactyly  | -      | -      | 2/18 (11.1%)   | 0/21 (0%)  | 0/5 (0%)  | 0/5 (0%)  | 5/14 (35.7%)   | 59/141 (41.8%)   |
| Clinodactyly  | +      | +      | 6/18 (33.3%)   | 5/21 (23.8%)   | 1/5 (20%)   | 3/5 (60%)   | 12/14 (85.7%)  | 142/176 (80.7%)  |
| Osteopoikilosis   | ...    | +      | ...  | 7/20 (35.0%)   | ...   | ...   | ...  | ...  |

# F G H R 臨 床 研 究 報 告

## 抗原特異的抗下垂体抗体評価法の開発と 免疫チェックポイント阻害薬関連下垂体障害のバイオマーカー確立に関する研究

岩間 信太郎

名古屋大学医学部附属病院糖尿病・内分泌内科

### 背景

免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) を用いたがん免疫療法では、免疫関連有害事象 (irAE) として下垂体機能低下症 (下垂体 irAE) が高率に発生する<sup>1)</sup>。下垂体 irAE は、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌低下症が必発であることから、診断が遅れた場合に副腎クリーゼとなり得る極めて重篤な有害事象である<sup>2)</sup>。また、下垂体 irAE 発症者では ICI 治療開始前または発症時に血中抗下垂体抗体が陽性となることが知られている<sup>3)</sup>。したがって、抗下垂体抗体は下垂体 irAE の発症リスクを事前に判別するバイオマーカー候補と考えられるが、現状では抗下垂体抗体は、ヒト下垂体組織切片を用いて定性的に測定されるため汎用性に課題があり、標的抗原も不明である。

### 目的

抗 CTLA-4 抗体関連下垂体 irAE 発症者で認められる抗下垂体抗体の標的抗原を同定することで、抗原特異的抗下垂体抗体評価法を開発し、ICI 関連下垂体 irAE のバイオマーカーの確立に繋げる。

### 方法

1. ヒト下垂体 mRNA から作製した cDNA ライブラリを HEK-293T 細胞に強制発現させ、下垂体 irAE 発症時の患者血清 (4 名) と反応する細胞を特定した。次いで陽性細胞に導入されたプラスミドのシーケンスにより標的抗原遺伝子を解析した。
2. 次に、同定された標的抗原をコードする遺伝子のプラスミドを導入した HEK-293T 細胞と、下垂体 irAE 9 人およびコントロール 10 人 (下垂体 irAE 非発症者) の血清を用いた免疫細胞化学により、標的抗原に対する抗体の有無を評価した。
3. 下垂体 irAE 感受性 HLA アリルと標的抗原蛋白の関連を評価するため、HEK-293T 細胞に感受性 HLA アリルをコードする遺伝子 (未発表データ) および標的抗原遺伝子をそれぞれ導入し、標的抗原の発現を免疫細胞化学で評価した。

### 結果

1. 4 名の患者プール血清を用いた発現クローニングにより、5 種の標的抗原遺伝子候補が同定された。そのうち 3 種は下垂体特異的に発現する遺伝子 (A, B, C) であり、特に遺伝子 C の発現は ACTH 産生細胞に特異的であった (図 1)。
2. 下垂体 irAE では ACTH 分泌低下症が必発であることから遺伝子 C に着目し、遺伝子 C のプラスミドを導入した HEK-293T 細胞と、下垂体 irAE およびコントロールの血清を用いた免疫細胞化学を実施した。その結果、下垂体 irAE 9 人中 6 人 (66.7%)、コントロール 10 人中 2 人 (20.0%) で遺伝子 C がコードする蛋白 C に対する抗体が認められた。

3. 下垂体 irAE 感受性 HLA アリルと遺伝子 C を導入した HEK-293T 細胞では、細胞膜上において蛋白 C の染色が認められた (図 2A)。一方、非感受性 HLA アリルと遺伝子 C を導入した HEK-293T 細胞では蛋白 C の染色が認められなかった (図 2B)。

**考察**

抗 CTLA-4 抗体関連下垂体 irAE 発症者の血清とヒト下垂体 cDNA ライブラリを用いた発現クローニングにより標的抗原候補が抽出された。特に遺伝子 C は、発現が ACTH 産生細胞に特異的であること、下垂体 irAE で ACTH 分泌低下症が必発であることを考慮すると、有力な抗下垂体抗体の標的抗原候補と考えられた。

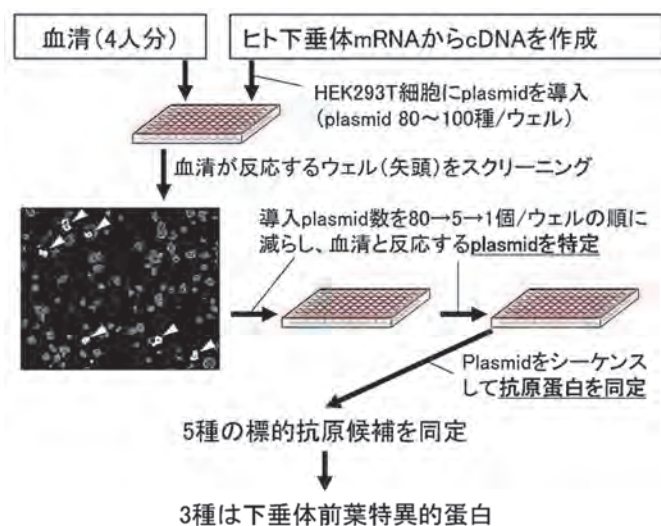
蛋白 C を発現する HEK-293T 細胞を用いた免疫細胞化学において、下垂体 irAE 発症者では非発症者と比し蛋白 C に対する抗体陽性者の割合が高い傾向が認められた。今後の症例数を増やした検討により、抗原 C に対する特異的抗下垂体抗体測定法の開発につながる可能性が期待された。

また、蛋白 C は、下垂体 irAE 感受性 HLA 存在下で細胞表面に提示されたと考えられたことから、下垂体 irAE における炎症発症に関与する可能性が示唆された。本知見は下垂体における炎症の発症機序解明につながる可能性がある。

**結語**

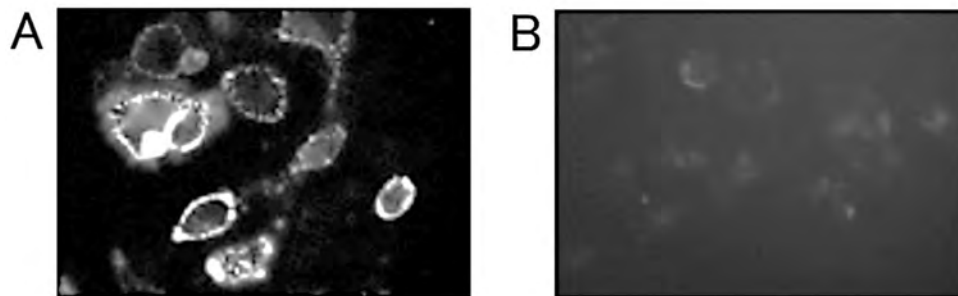
下垂体 irAE の標的抗原として ACTH 産生細胞特異的に発現する蛋白 C を同定した。バイオマーカー開発および病態解明に向け、今後の症例数を増やした検討が重要と考えられた。

図 1 発現クローニングによる抗下垂体抗体の標的抗原スクリーニング



|     | 細胞特異性    | 発現部位 | 機能     |
|-----|----------|------|--------|
| 抗原A | 下垂体前葉細胞  | 核    | 前葉の分化  |
| 抗原B | 下垂体前葉細胞  | 細胞質  | ホルモン分泌 |
| 抗原C | ACTH産生細胞 | 細胞質  | ホルモン分泌 |

図2 蛋白Cは感受性HLAにより提示される



### 文献

1. Iwama S, Kobayashi T, and Arima H. Management, biomarkers and prognosis in people developing endocrinopathies associated with immune checkpoint inhibitors. *Nature reviews Endocrinology*. 2025.
2. Kobayashi T, Iwama S, Yasuda Y, Okada N, Okuji T, Ito M, et al. Pituitary dysfunction induced by immune checkpoint inhibitors is associated with better overall survival in both malignant melanoma and non-small cell lung carcinoma: a prospective study. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e000779.
3. Kobayashi T, Iwama S, Sugiyama D, Yasuda Y, Okuji T, Ito M, et al. Anti-pituitary antibodies and susceptible human leukocyte antigen alleles as predictive biomarkers for pituitary dysfunction induced by immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*. 2021;9(5).

## 日本人家族性アルドステロン症の臨床像の解明および新規責任遺伝子の検索

内田 登

済生会中央病院小児科 /

慶應義塾大学医学部小児科学教室

### 背景

原発性アルドステロン症 (PA) は、副腎からの自律的なアルドステロン分泌によって引き起こされる二次性高血圧の原因である。PA は 40 歳未満で発症した高血圧患者の 10% から 17.8% を占めると報告されている<sup>1),2)</sup>。遺伝性の PA である家族性アルドステロン症 (FH) には、FH タイプ 1 (FH1) - FH タイプ 5 (FH5) の 5 つのサブタイプがある<sup>3)-5)</sup>。FH5 は PASNA 症候群とも呼ばれる<sup>5),6)</sup>。FH1 は、ACTH の調節を受けるステロイド水酸化酵素である 11  $\beta$  水酸化酵素 (CYP11B1) とアルドステロン合成酵素 (CYP11B2) の遺伝子の不等交差から生じるキメラ遺伝子によって引き起こされる<sup>7)</sup>。この *CYP11B1/CYP11B2* キメラ遺伝子は、副腎束状帯における ACTH 依存性の異所性アルドステロン産生を引き起こす<sup>7)</sup>。FH2-FH5 は、副腎球状帯の CYP11B2 活性を制御するイオンチャネル構成要素をコードする遺伝子 (*CLCN2*, *KCNJ5*, *CACNA1H*, *CACNA1D*) の機能獲得型バリエーションが原因になる<sup>6),8)-10)</sup>。FH1-FH3 患者は早期発症の PA のみを示すのに対し、FH4 患者の一部<sup>11)</sup> および全 FH5 患者<sup>6)</sup> は、知的障害、自閉スペクトラム症、てんかんなどの神経学的症状も示す。

現在までに、日本において遺伝学的に確認された FH 患者は数例しか報告されていない<sup>12)-16)</sup>。我々は FH および 20 歳未満で発症した PA (早期発症 PA) に関する情報を収集するため、全国調査を実施した。日本人 8 家系から 12 名の FH 患者の情報を得て、遺伝学的および臨床的特徴を解析した。

### 目的

FH または早期発症 PA 患者を同定するため、5 学会 (日本内分泌学会、日本小児内分泌学会、日本高血圧学会、日本内分泌外科学会、日本泌尿器科学会) の全評議員に連絡を取り、臨床情報および末梢血サンプルの採取を依頼した。臨床情報には、性別、高血圧診断年齢、PA の診断に至った初期症状または所見、PA 診断時の血圧 (BP) ・血漿アルドステロン濃度 (PAC) ・血漿レニン活性 (PRA) ・アルドステロンレニン比 (ARR) ・血清カリウム値、および治療の詳細が含まれた。小児におけるアルドステロン抑制試験の診断基準が確立されていないため、PA は  $ARR > 200$  (pg/mL) / (ng/mL/h) かつ  $PAC \geq 60$  pg/mL<sup>17)</sup> を満たすものと定義した。FH は以下のように遺伝学的に診断した。末梢血サンプルからゲノム DNA を抽出し、既知の FH 患者における診断確認と、遺伝学的に診断されていない早期発症型 PA 患者における FH1、FH2、および FH3 のスクリーニングのために遺伝子検査を実施した。FH1 については、既報<sup>18)</sup> と同様に、*CYP11B1/CYP11B2* キメラ遺伝子のロング PCR 増幅を実施した。FH2 および FH3 については、*CLCN2* および *KCNJ5* 遺伝子

の PCR- シークエンスを実施した。FH1-FH3 と診断されていない患者については、エクソームシークエンスを実施した。

群間比較は Mann-Whitney *U* 検定を用いて実施した。*p* 値 <0.05 を統計的に有意と判定した。

## 結果

合計 91 施設から回答があり、4 家系 8 例の FH1 患者、3 家系 3 例の FH3 患者、2 家系 2 例の遺伝学的に未診断の早期発症 PA 患者を同定した。FH1 患者は全員、*CYP11B1/CYP11B2* キメラ遺伝子を有していた。FH3 患者は全員、*KCNJ5* の病的バリエーション (p.Gly151Arg, N=2; p.Thr158Arg, N=1) を有していた。遺伝学的に、見診断の早期発症 PA 患者 2 例中 1 例は *KCNJ5* 病的バリエーション (p.Glu145Gln) を有しており、FH3 と診断された。もう 1 例には *CYP11B1/CYP11B2* キメラ遺伝子、*CLCN2* および *KCNJ5* の病的バリエーションとも認められず、エクソームシークエンスでも *CACNA1H*, *CACNA1D* を含むアルドステロン産生に関連する遺伝子の病的バリエーションは同定されなかった。最終的に、4 家系 8 例の FH1 患者と 4 家系 4 例の FH3 患者を同定した。

FH1、FH3 合計 12 例の患者の遺伝型・表現型をまとめた (表 1)。これらの患者の一部は以前に報告されている<sup>13)-16), 19), 20)</sup>。

表 1 家族性アルドステロン症患者の遺伝型・表現型のまとめ

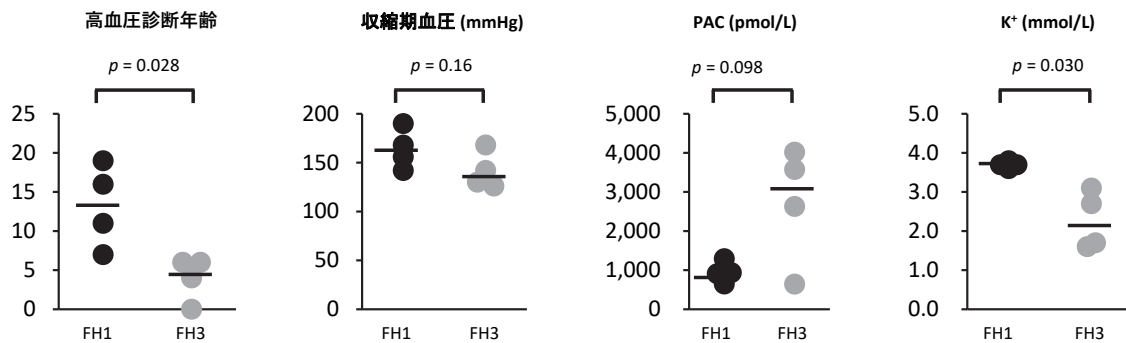
| 患者     | 病的バリエーション                | 性 | 高血圧  |             | 診断契機    | 原発性アルドステロン症診断時の所見 |              |              |                         |                      | 治療 |
|--------|--------------------------|---|------|-------------|---------|-------------------|--------------|--------------|-------------------------|----------------------|----|
|        |                          |   | 診断年齢 | 診断          |         | BP [mmHg]         | PAC [pmol/L] | PRA [μg/L/h] | ARR [(pg/mL)/(ng/mL/h)] | K* [mmol/L]          |    |
| FH1-A1 | <i>CYP11B2/CYP11B2</i>   | 男 | 7    | 偶発的高血圧      | 152/100 | 939               | < 0.2        | > 1695       | 3.8                     | Dex                  |    |
| FH1-A2 | <i>CYP11B2/CYP11B2</i>   | 男 | 22   | 家族解析        | 136/80* | 582               | 0.28         | 750          | 3.8                     | Dex                  |    |
| FH1-B  | <i>CYP11B2/CYP11B2</i>   | 女 | 11   | 偶発的高血圧      | 190/130 | 1296              | 0.1          | 4680         | 3.6                     | Dex, MRA, Ca blocker |    |
| FH1-C1 | <i>CYP11B2/CYP11B2</i>   | 男 | 16   | 偶発的高血圧      | 156/111 | 912               | 0.1          | 3292         | 3.7                     | MRA, Ca blocker      |    |
| FH1-C2 | <i>CYP11B2/CYP11B2</i>   | 男 | 20   | 家族解析        | 120/80* | 299               | 0.3          | 360          | 4                       | MRA, Ca blocker      |    |
| FH1-D1 | <i>CYP11B2/CYP11B2</i>   | F | 19   | 偶発的高血圧      | 173/107 | 648               | < 0.1        | > 2340       | 3.7                     | Dex, Ca blocker      |    |
| FH1-D2 | <i>CYP11B2/CYP11B2</i>   | 男 | 5    | 家族解析        | 126/65  | 964               | 0.1          | 3480         | 4.1                     | -                    |    |
| FH1-D3 | <i>CYP11B2/CYP11B2</i>   | 男 | -    | 家族解析        | 91/74   | 1017              | 0.3          | 1223         | 4.3                     | -                    |    |
| FH3-E  | <i>KCNJ5</i> p.Glu145Gln | F | 0    | 偶発的高血圧      | 168/132 | 4017              | < 0.1        | > 14500      | 2.7                     | MRA, Ca blocker, ARB |    |
| FH3-F  | <i>KCNJ5</i> p.Gly151Arg | F | 4    | 多飲多尿        | 130/90  | 641               | 0.1          | 2314         | 3.1                     | MRA                  |    |
| FH3-G  | <i>KCNJ5</i> p.Gly151Arg | F | 6    | 心雑音         | 142/88  | 2630              | < 0.1        | > 9494       | 1.7                     | 両側副腎摘出               |    |
| FH3-H  | <i>KCNJ5</i> p.Thr158Arg | 男 | 6    | 心電図での QT 延長 | 126/94  | 3573              | < 0.1        | > 12900      | 1.6                     | MRA                  |    |

Dex：デキサメタゾン、MRA：ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬、Ca blocker：カルシウム拮抗薬、ARB：アンジオテンシン II 受容体拮抗薬

FH1 の発端者 4 例において、PA の診断契機は偶発的高血圧だった。対照的に、FH3 の 4 例の発端者のうち 2 例では、低カリウム血症関連の症状または徴候 (多飲多尿、および心電図での QT 延長) が PA の診断契機になっていた。FH1 の 2 例は、子が FH1 と診断された後の家族解析で PA と診断された。FH1 の患者 1 例は、3 歳時に ARR が上昇していたが正常血圧であった。FH3 の患者 1 例は、高血圧コントロールのため両側副腎摘出術を受けていた。

FH1 と FH3 の発端者の PA 診断時臨床所見の比較を図 1 に示す。

図1 FH1 と FH3 の発端者の原発性アルドステロン症診断時の臨床所見の比較



高血圧診断年齢の中央値は、FH1 が FH3 よりも有意に高かった (13.5 歳対 5.0 歳、 $p = 0.028$ )。収縮期血圧の中央値 (162 対 136、 $p = 0.14$ ) および PAC 値 (925.5 対 3101.5 pg/mL、 $p = 0.25$ ) には、FH1 と FH3 の間に有意差は認められなかった。血清カリウム値は FH1 の全患者で正常であったが、FH3 の全患者で低下していた (中央値 3.7 対 2.2、 $p = 0.020$ )。

## 考察

本研究では、全国調査により収集された日本人の FH 患者 12 例について報告する。全例が FH1 または FH3 だった。FH1 患者 8 例中 5 例と FH3 患者 4 例全例が早期発症型 PA を呈した。本研究の結果は、日本において、早期発症 PA を呈する FH の主要な病型は FH1 と FH3 であることを示唆している。

FH1 患者全例で血清カリウム値は正常であったが、FH3 患者全例で低カリウム血症を認めた。これらの結果は、FH1 では他の病型の PA と比較して低カリウム血症が少ないとする過去の研究結果<sup>5), 21), 22)</sup>と一致している。尿中への異常なカリウム排泄は、アルドステロンが病的に上昇した場合にのみ起こる<sup>23)</sup>。FH1 では、アルドステロン分泌が ACTH 依存的に大きく変動するため、アルドステロン分泌が低い時期にカリウムが貯留する可能性がある。さらに、カリウム基準範囲の下限は乳児期から若年成人期まで一定出あり<sup>24)</sup>、若年患者における低カリウム血症の検出を容易にしている。したがって、血清カリウム値は早期発症 PA を呈する FH 患者の病型鑑別のための有用な臨床マーカーとなり得る。

FH1 患者は FH3 患者よりも有意に高年齢で高血圧と診断されていることも明らかにした。これは、高血圧と診断されたときの年齢の中央値が、遺伝学的に確認された FH1 患者 (N=19)<sup>25)</sup>では 14 歳、FH3 患者 (N=23、Monticone ら<sup>26)</sup> および Pons ら<sup>27)</sup> の総説に引用された報告から算出<sup>15), 28)</sup> -<sup>35)</sup>では 2 歳であったという過去の報告と一致している。本研究では、FH3 患者 4 例中 2 例が低カリウム血症関連の症状または徴候を発現し、早期診断につながった。一方、FH1 患者は低カリウム血症関連症状を呈する可能性が低いため、高血圧が偶然に診断されない限り診断されない可能性が高い。米小児科学会は 3 歳以上の小児に年 1 回の血圧スクリーニングを推奨している<sup>36)</sup>が、日本ではそのようなスクリーニングは普及していない。乳幼児および学童期の小児における定期的な血圧測定を推進する全国的な取り組みは、FH の早期診断を促進し、低カリウム血症関連症状または徴候が高血圧診断の時期にどのように影響するかを明らかにするのに役立つであろう。

本研究の主な限界は、全発端者は早期発症 PA を契機に診断されたという選択バイアスの存在である。FH2 は成人期に発症する可能性があり、不完全浸透であるため、本研究 FH2 患者が見逃されている可能性がある。以前の研究では、両側副腎過形成を伴う PA 患者の 2% で FH2 が同定されている<sup>8)</sup>。年齢を問わない両側副腎過形成を伴う PA 患者を対象とした遺伝学的スクリーニングは、日本において早期発症 PA を伴わない FH を同定するのに役立つだろう。

## 結論

我々は日本人集団において、早期発症 PA を呈する FH は、低カリウム血症がなければ FH1、あれば FH3 であることを示した。

## 参考文献

1. Gilani M, Asif N, Nawaz A, Akram A. Frequency of primary hyperaldosteronism in young hypertensives in a tertiary care setting of Rawalpindi. *J Coll Physicians Surg Pakistan*. 2019;29(1):58–61.
2. Alam S, Kandasamy D, Goyal A, Vishnubhatla S, Singh S, Karthikeyan G, et al. High prevalence and a long delay in the diagnosis of primary aldosteronism among patients with young-onset hypertension. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2021;94(6):895–903.
3. Mulatero P, Scholl UI, Fardella CE, Charmandari E, Januszewicz A, Reincke M, et al. Familial hyperaldosteronism: an European Reference Network on Rare Endocrine Conditions clinical practice guideline. *Eur J Endocrinol*. 2024;190(4):G1–14.
4. Perez-Rivas LG, Williams TA, Reincke M. Inherited Forms of Primary Hyperaldosteronism: New Genes, New Phenotypes and Proposition of A New Classification. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2019;127(2–3):93–9.
5. Lenzini L, Prisco S, Carocchia B, Rossi GP. Saga of familial hyperaldosteronism yet a new channel. *Hypertension*. 2018;71(6):1010–4.
6. Pinggera A, Mackenroth L, Rump A, Schallner J, Beleggia F, Wollnik B, et al. New gain-of-function mutation shows CACNA1D as recurrently mutated gene in autism spectrum disorders and epilepsy. *Hum Mol Genet*. 2017;26(15):2923–32.
7. Lifton RP, Dluhyt RG, Powers M, Richt GM, Cookt S, Ulick S, et al. A chimaeric 11 beta-hydroxylase/aldosterone synthase gene causes glucocorticoid-remediable aldosteronism and human hypertension. *Nature*. 1992;355:262–5.
8. Fernandes-Rosa FL, Daniil G, Orozco IJ, Göppner C, El Zein R, Jain V, et al. A gain-of-function mutation in the CLCN2 chloride channel gene causes primary aldosteronism. *Nat Genet*. 2018;50(3):355–61.
9. Choi M, Scholl UI, Yue P, Björklund P, Zhao B, Nelson-Williams C, et al. K<sup>+</sup> channel mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas and hereditary hypertension. *Science* (80-). 2011;331(6018):768–72.

10. Scholl UI, Stölting G, Nelson-Williams C, Vichot AA, Choi M, Loring E, et al. Recurrent gain of function mutation in calcium channel CACNA1H causes early-onset hypertension with primary aldosteronism. *Elife*. 2015;4:e06315.
11. Daniil G, Fernandes-Rosa FL, Chemin J, Blesneac I, Beltrand J, Polak M, et al. CACNA1H Mutations Are Associated With Different Forms of Primary Aldosteronism. *EBioMedicine*. 2016;13:225–36.
12. Ise T, Shimoda A, Takakuwa H, Kato T, Izumiya Y, Shimizu K, et al. A chimeric CYP11B1/CPY11B2 gene in glucocorticoid-insuppressible familial hyperaldosteronism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(1):131–4.
13. Yokota K, Ogura T, Kisida M, Suzuki J, Otsuka F, Mimura Y, et al. Japanese family with glucocorticoid-remediable aldosteronism diagnosed by long-polymerase chain reaction. *Hypertens Res*. 2001;24(5):589–94.
14. Nakano Y, Iwata N, Ogura-Ochi K, Hasegawa K, Hirasawa A, Otsuka F. Preclinical diagnosis and identification of the chimeric CYP11B1/CYP11B2 gene in two pediatric cases of a Japanese family with glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Hypertens Res*. 2021;44(7):891–3.
15. Adachi M, Muroya K, Asakura Y, Sugiyama K, Homma K, Hasegawa T. Discordant genotype-phenotype correlation in familial hyperaldosteronism type III with KCNJ5 gene mutation: A patient report and review of the literature. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(2):138–42.
16. Takizawa N, Tanaka S, Nishimoto K, Sugiura Y, Suematsu M, Ohe C, et al. Familial Hyperaldosteronism Type 3 with a Rapidly Growing Adrenal Tumor: An In Situ Aldosterone Imaging Study. *Curr Issues Mol Biol*. 2022;44(1):128–38.
17. Naruse M, Katabami T, Shibata H, Sone M, Takahashi K, Tanabe A, et al. Japan Endocrine Society clinical practice guideline for primary hyperaldosteronism. *Endocr J*. 2022;69:327–59.
18. MacConnachie AA, Kelly KF, McNamara A, Loughlin S, Gates LJ, Inglis GC, et al. Rapid diagnosis and identification of cross-over sites in patients with glucocorticoid remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(12):4328–31.
19. Takaya J, Isozaki Y, Hirose Y, Higashino H, Noda Y, Kobayashi Y. Long-term follow-up of a girl with primary aldosteronism: Effect of potassium supplement. *Acta Paediatr Int J Paediatr*. 2005;94(9):1336–8.
20. Kojo K, Yoshinaga M, Kucho Y, Hazeki D, Tanaka Y, Mizota M. A 6-year-old boy with secondary long QT syndrome. *J Arrhythmia*. 2012;28(1):61–4.
21. Mulatero P, Tizzani D, Viola A, Bertello C, Monticone S, Mengozzi G, et al. Prevalence and characteristics of familial hyperaldosteronism: The PATOGEN study (Primary aldosteronism in TORino-GENetic forms). *Hypertension*. 2011;58(5):797–803.
22. Araujo-Castro M, Parra P, Martín Rojas-Marcos P, Paja Fano M, González Boillos M, Pascual-Corrales E, et al. Differences in the clinical and hormonal presentation of patients with familial and sporadic primary aldosteronism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15(March):1–8.
23. Rabinowitz L. Aldosterone and potassium homeostasis. *Kidney Int*. 1996;49:1738–42.

24. Hoq M, Matthews S, Karlaftis V, Burgess J, Cowley J, Donath S, et al. Reference values for 30 common biochemistry analytes across 5 different analyzers in neonates and children 30 days to 18 years of age. *Clin Chem.* 2019;65(10):1317-26.
25. Tan ST, Boyle V, Elston MS. Systematic Review of Therapeutic Agents and Long-Term Outcomes of Familial Hyperaldosteronism Type I. *Hypertension.* 2023;80(7):1517-25.
26. Monticone S, Tetti M, Burrello J, Buffolo F, De Giovanni R, Veglio F, et al. Familial hyperaldosteronism type III. *J Hum Hypertens.* 2017;31(12):776-81.
27. Pons Fernández N, Moreno F, Morata J, Moriano A, León S, De Mingo C, et al. Familial hyperaldosteronism type III a novel case and review of literature. *Rev Endocr Metab Disord.* 2019;20(1):27-36.
28. Geller DS, Zhang J, Wisgerhof M V., Shackleton C, Kashgarian M, Lifton RP. A novel form of human mendelian hypertension featuring nonglucocorticoid-remediable aldosteronism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(8):3117-23.
29. Mulatero P, Tauber P, Zennaro MC, Monticone S, Lang K, Beuschlein F, et al. KCNJ5 mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism. *Hypertension.* 2012;59(2):235-40.
30. Charmandari E, Sertedaki A, Kino T, Merakou C, Hoffman DA, Hatch MM, et al. A novel point mutation in the KCNJ5 gene causing primary hyperaldosteronism and early-onset autosomal dominant hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(8):1532-9.
31. Scholl UI, Nelson-Williams C, Yue P, Grekin R, Wyatt RJ, Dillon MJ, et al. Hypertension with or without adrenal hyperplasia due to different inherited mutations in the potassium channel KCNJ5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(7):2533-8.
32. Mussa A, Camilla R, Monticone S, Porta F, Tessaris D, Verna F, et al. Polyuric-polydipsic syndrome in a pediatric case of nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism. *Endocr J.* 2012;59(6):497-502.
33. Monticone S, Hattangady NG, Penton D, Isales CM, Edwards MA, Williams TA, et al. A novel Y152C KCNJ5 mutation responsible for familial hyperaldosteronism type III. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(11):1861-5.
34. Monticone S, Bandulik S, Stindl J, Zilbermint M, Dedov I, Mulatero P, et al. A case of severe hyperaldosteronism caused by a de novo mutation affecting a critical salt bridge Kir3.4 residue. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(1):E114-8.
35. Tong A, Liu G, Wang F, Jiang J, Yan Z, Zhang D, et al. A novel phenotype of familial hyperaldosteronism type III: Concurrence of aldosteronism and cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(11):4290-7.
36. Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM, Blowey D, Carroll AE, Daniels SR, et al. Clinical practice guideline for screening and management of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics.* 2017;140(3). DOI: 10.1542/peds.2017-1904.

## アミノ酸プロファイルがもたらす成長探索研究 ～出生時から小児期まで～

鞆嶋 有紀

島根大学医学部小児科学教室

### 目的

成長は多くの因子に規定されるが、栄養はその中でも最も重要な因子である。共同研究者の伯野らは、近年、マウスやラットにおいて必須アミノ酸のアミノ酸プロファイルの変化がIGF1分泌を抑制することを発見し、現在成長障害患者において解析を進めている。本研究では、臍帯血と食物アレルギー患者の血液からアミノ酸プロファイルを作成し、体重、身長、IGF1などの相関をAIを用いて解析し、アミノ酸プロファイルと成長の関連について詳細に検討する。

### 概要

1. 同意を得られた臍帯血または10才未満の、食物アレルギー（FA）児の血漿および血清を採取する。
2. サンプルおよび個人情報を抜いた形の臨床情報を東京大学大学院農学生命科学研究科（農学部）へ郵送し、必須アミノ酸摂取量の低下で血液中に分泌され成長遅滞との関連が指摘されているホルモン（IGF1およびFGF21）を測定、血漿からアミノ酸を抽出し、LC-MS/MS法を用いて対象者毎のアミノ酸プロファイルを作成する。
3. このアミノ酸プロファイルデータと、FGF21、IGF1、臨床情報（臍帯血の場合：在胎週数、出生時身長、体重、頭囲、アプガースコア、胎盤重量、母体体重、身長、BMI、分娩前の最終食事日時、母体への輸液投与有無 FAの場合：年齢、性別、身長、体重、BMI、肥満度、食物アレルギーの有無とアレルゲン摂取状況、合併疾患と内服薬の状況、空腹時間、既往歴、現在の鶏卵・牛乳・小麦の摂取状況など）を入力値として、Self-organizing map（SOM）解析またはMulti-perceptron（MLP）解析および多変量解析を行う。以上の方法でアミノ酸プロファイルの変化と臍帯血であればIGF1、体重との関連について検討し、FAであれば食物制限の程度とアミノ酸プロファイルの変化、体重、身長との関連について検討し、アミノ酸プロファイルと成長との相関について検討を行う。

### 結果

#### ● 臍帯血におけるアミノ酸プロファイル分析

島根大学医学部附属病院にて、2023年1月から2024年2月までの在胎37週0日から41週6日までの間に出生した児の臍帯血を妊産婦の同意を得て取得した。本研究は島根大学医学部倫理審査委員会にて承認されている（KS20220904-1）。出生体重が10%タイル未満のLFD（light-for-dates）児の臍帯血が16例、出生体重が標準体重であるAFD（appropriate for gestational age）の臍帯血が61例あった。これらの臍帯血を用いて、IGF1値、アミノ酸プロファイル解析を行った。

表1 AFD と LFD アミノ酸のレーダーチャート

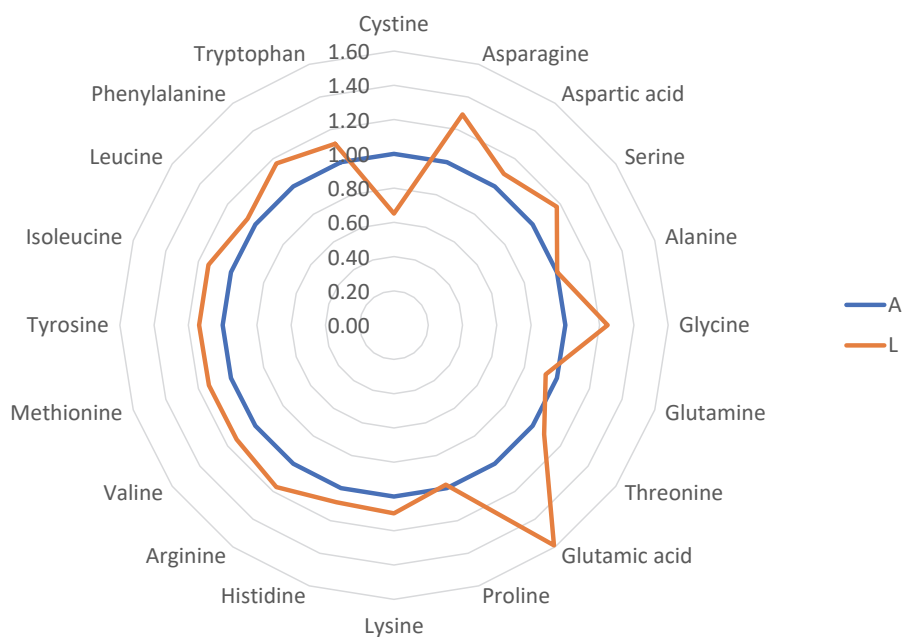


図1はAFD群、LFD群のアミノ酸の平均値のレーダーチャートである。ばらつきはあるものの、AFD群にくらべ、LFD群はCystineの低下、Glutamic acidの上昇が有意にみられた。また現在母体要因、胎盤重量、出生体重、IGF1値の相関関係について、またAI（ランダムフォレスト）を用いて、アミノ酸値と他の要因、体重との法則があるか解析中である。現状LFD群、AFD群にはアミノ酸プロファイルに一定の傾向がみられており、それがなにを意味するのか、今後の長期的な追跡が必要と考えている。

● 臍帯血におけるアミノ酸プロファイル分析

同意が得られた10歳以下の食物アレルギー児の血漿を現在39人採取しており、コントロールの採血を行っているところである。

まだ測定にいたっておらず、今年度測定、解析予定である。

## カスタム遺伝子パネルを用いた小児頭蓋咽頭腫の分子プロファイル解析

藤尾 信吾

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科脳神経外科学

### 研究目的

頭蓋咽頭腫は、小児に多いエナメル上皮腫型 (adamantinomatous craniopharyngioma: ACP) と、成人に多い乳頭型 (papillary craniopharyngioma: PCP) に大別される。ACP におけるドライバー遺伝子が CTNNB1 であることは 2002 年に報告されているが<sup>1)</sup>、BRAF/MEK 阻害薬が著効する PCP とは異なり、ACP において Wnt シグナル伝達経路を標的とした治療は依然として困難な状況である。そのため、ACP における新たな創薬ターゲットの同定を目的として、全ゲノム解析が各国で進められているものの、融合遺伝子に着目した研究報告はこれまでにない。申請者らの研究グループは、2018 年よりカスタム遺伝子パネル検査を運用し、脳腫瘍におけるドライバー遺伝子変異、コピー数異常に加えて、融合遺伝子の検出および報告を行ってきた。

本研究では、小児期に発症した頭蓋咽頭腫を対象として、カスタム遺伝子パネルを用いた分子プロファイリング解析を実施し、新たな遺伝子制御機構の同定を目的とする。

### 対象と方法

2022 年 1 月から 2024 年 12 月に当院で手術を施行し、遺伝子パネル検査への同意が得られた頭蓋咽頭腫患者を対象とした。カスタム遺伝子パネルは、脳腫瘍関連ドライバー遺伝子を含む DNA パネル (50 遺伝子) および頭頸部脳腫瘍間葉系腫瘍を標的とした融合遺伝子を検出可能な RNA パネル (37 遺伝子) から構成される<sup>2)</sup>。患者の FFPE 切片から DNA および RNA を抽出し、次世代シーケンサー (イルミナ社、MiSeq 及び NextSeq1000) を用いて遺伝子変異、コピー数、融合遺伝子解析を行った。メチル化パネルでは、抽出した DNA をバイサルファイト処理後、断片化したゲノム DNA 上のターゲット領域をプローブを用いて配列選択的にキャプチャーし、単離した配列を対象に次世代シーケンサーで解析を行った。

### 結果

遺伝子パネルへ提出された 16 症例中、検体品質を理由に 2 例が除外された。全例が成人で、小児例はなかった。14 例の平均年齢は 53.6 歳で、9 例 (64.3%) が男性であった。病理診断は、ACP が 6 例、PCP が 8 例であった。CTNNB1 変異は ACP の 5 例 (83.3%) に検出された。PCP の 7 例 (87.5%) に BRAF V600E が検出された。既知のがん関連遺伝子変化として、ATRXp.Q2042 \* が ACP の 1 例に、PIK3CAp.D520V が PCP の 1 例に検出された。その他、9 例 (64.3%) に H3F3A p.K65N、PIK3CA p.L586F などの遺伝子変異が検出されたが、融合遺伝子は認められなかった。

### 考察および今後の展望

複数のがん関連遺伝子異常が検出され、分子標的薬のスクリーニングとしてカスタム遺伝子パネルの有用性が示唆されたが、期間中、小児例は含まれなかった。今後、症例を蓄積し、解析で得られた分子情報を、臨床情報（年齢、性別、内分泌所見、無再発期間、全生存期間）、病理所見（形態学的特徴、Ki-67）、医用画像情報（腫瘍局在、腫瘍径、浸潤パターン）などと統合し、腫瘍発生、治療反応性、治療抵抗性に関連する遺伝子の探索を進めていく予定である。また、さらなる検体収集のため、多施設共同研究とすることも検討している。

### 参考文献

1. Sekine S, Shibata T, Kokubu A, Morishita Y, Noguchi M, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor beta-catenin gene mutations. *Am J Pathol.* 2002;161(6):1997-2001.
2. Higa N, Akahane T, Kirishima M, Yonezawa H, Makino R, Uchida H, Yokoyama S, Takajo T, Otsuji R, Fujioka Y, Sangatsuda Y, Kuga D, Yamahata H, Hata N, Horie N, Kurosaki M, Yamamoto J, Yoshimoto K, Tanimoto A, Hanaya R. All-in-one bimodal DNA and RNA next-generation sequencing panel for integrative diagnosis of glioma. *Pathol Res Pract.* 2024 Nov;263:155598.

## 本邦における単一遺伝子異常による小児肥満の成因、診断、治療に関する研究

森 潤

大阪市立総合医療センター  
小児代謝内分泌・腎臓内科

### 研究の背景

肥満は、世界的に最も深刻な健康問題の一つである。肥満は、遺伝的要因や環境要因などの様々な因子が関係しており、適切に管理をするためには遺伝的要因や環境要因を把握し、個人個人に合った医療（個別化医療）を提供する必要がある。実際、海外においては単一遺伝子異常症に対して Melanocortin 4 receptor (MC4R) agonist である setmelanotide が臨床応用されてきている。しかし、本邦においては肥満における単一遺伝子異常についての検討はほとんどされていない。

### 研究の目的

本研究では、遺伝子異常が疑われる肥満症例に対して、遺伝子解析を行い、遺伝的背景を明らかにすることにより将来的な個別化医療に繋げることを目的とした。

### 対象と方法

#### 対象：

以下の選択基準を満たす当院に通院中の肥満患者

- ① 同意取得時において年齢が1歳以上18歳未満の研究対象者
- ② 高度肥満（BMIパーセントタイル値で120%以上あるいは肥満度が6歳から17歳で50%以上、6歳未満で30%以上）の研究対象者
- ③ 本研究への参加にあたり十分な説明を受けた後、十分な理解の上、研究対象者本人あるいは保護者の自由意思による文書同意が得られた研究対象者

※ 体重増加の原因となる薬物を、内服中やクッシング症候群など二次性肥満を引き起こす疾患の研究対象者は除外する。

#### 方法：

対象患児より末梢血3-5mLを採血し、ゲノムDNAを抽出した後、下記遺伝子について解析を行った。

*LEP, LEPR, MC4R, SIM1, KSR1, POMC, CSK1, NTRK2, MRAP2, SH2B1, BDNF, UCPI, UCP3, CARTPT, DYRK1B, NROB2, PCSK1, PCSK2, PPARG, PPP1R3A, PPARGC1A, CCK, SLC2A4, TUB, ADCY3, SREBF1, ADRB2, ADRB3, AGRP, MC3R, ENPPI, PPARGC1B, PYY, SDC3, ADIPOQ, NAMPT, CFD, RETN, NPY, ADD1, PTPN1, IRS-1, GHRL, NEGR1, GIPR, TMEM18, FTO, SLC22A1, ALMS1, BBS1, BBS10*

## 結果

表 1 初診時の年齢、BMI パーセントイル、および肥満度の男女別および全体比較

|             | 女兒 (n=12)     | 男児 (n=10)     | 全体 (n=22)     | p 値   |
|-------------|---------------|---------------|---------------|-------|
| 初診時年齢(月)    | 134.3 (±45.3) | 113.3 (±51.6) | 124.7 (±48.3) | 0.323 |
| BMI パーセントイル | 99.7 (±0.4)   | 99.2 (±0.7)   | 99.5 (±0.6)   | 0.061 |
| 肥満度(%)      | 66.6 (±29.6)  | 59.5 (±16.9)  | 63.3 (±24.4)  | 0.508 |

p 値は、男女間の各項目における差を比較した結果を示している。

本研究では、22 例の症例を対象に遺伝子解析を行い、複数の遺伝子 (PCSK1 遺伝子 3 例、POMC 遺伝子 1 例、GHRL 遺伝子 5 例) において疾患との関連性が示唆されるバリエントを検出した。しかし、これらのバリエントが単独で疾患の原因となるかについては、現時点では結論づけられない。さらに、病的意義の有無を含め、さらなる検討が必要なバリエントも複数認めた。これらの知見を踏まえ、今後、症例数の増加、機能解析、家系調査などを含めた更なる検討を行うことで、これらのバリエントと疾患との関連性を明らかにしたいと考えている。

# ノルディサイエンス研究報告

## AYA 世代の成人成長ホルモン分泌不全症における weekly GH 製剤の至適投与量についての検討

市橋 洋輔

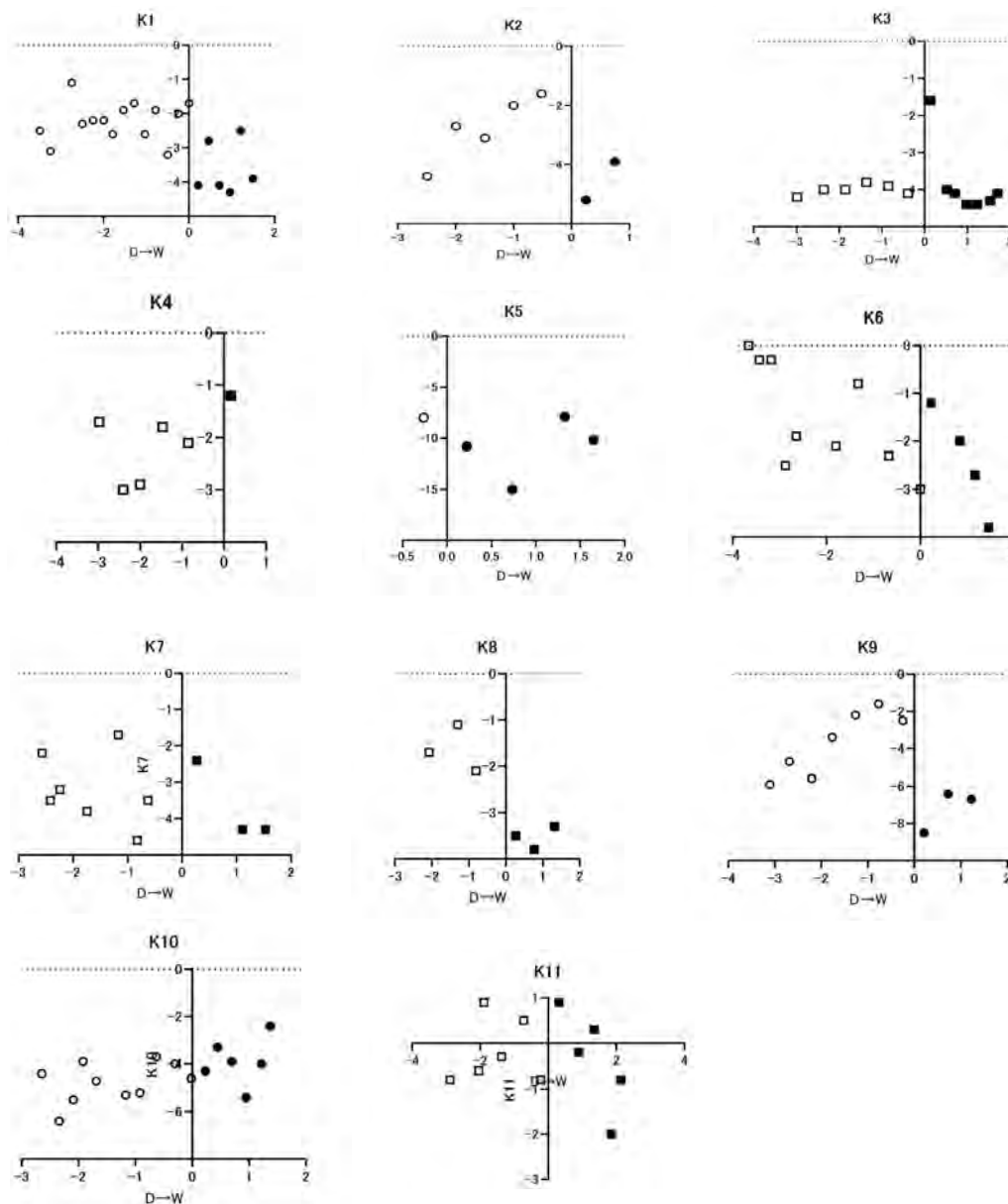
慶應義塾大学医学部小児科

2024年12月31日までに慶應義塾大学病院小児科に通院中の成人成長ホルモン分泌不全症患者で、daily GH 製剤から somapacitan に変更した患者を somapacitan 使用履歴から抽出し、解析した。Somapacitan への変更時の年齢が 35 歳未満の成人成長ホルモン分泌不全症患者 11 人の、IGF-1 SDS に対する製剤変更時の用量について検討した。

表 1 対象患者の臨床的特徴

|                            |             |
|----------------------------|-------------|
| 年齢（歳）（中央値）                 | 26 (18-35)  |
| 性別（人）                      | 男性 5 女性 6   |
| *GHD診断年齢（歳）（中央値）           | 3 (0-27)    |
| 原疾患（人）                     |             |
| 下垂体腫瘍性疾患術後                 | 5           |
| 下垂体発生異常                    | 4           |
| その他                        | 2           |
| **AGHD評価時 GH頂値(ng/mL)（中央値） | 0.1 (0-0.4) |
| 性ホルモン補充（人）                 | 10          |
| *GHD：成長ホルモン分泌不全症           |             |
| **AGHD：成人成長ホルモン分泌不全症       |             |

図1 Daily → Weekly 変更時の IGF-1 SDS の経時的変化



それぞれのグラフが1患者のデータを表している。横軸はDaily → Weeklyにした時点を0として年の単位であらわしている。○が女性、□が男性、黒塗りが weekly になってから測定した IGF-1 SDS。

当院での成人成長ホルモン分泌不全症に対する somapacitan の最大用量は 2.5mg/week であった。多くの場合は 1.5mg/week で開始されていた。線形混合効果モデルを使用して統計学的な解析を行った結果、dailyGH 製剤と比較して IGF-1 SDS として 0.92 有意に低い ( $p < 0.001$ ) という結果であった。当院でのデータから 35 歳未満で somapacitan に変更する場合は、IGS-1 SDS を daily 製剤と同等にするためには 1.5mg/week では不十分であることが多い。特に経口エストロゲン製剤内服中の女性では、2.5mg で -1SD を超えた患者はいなかった。

## Sparsely granulated type の病理型を示す GH 産生下垂体腫瘍における $\beta$ カテニンの細胞内局在と新規治療法の開発

亀田 啓

北海道大学病院糖尿病・内分泌内科

### 1. 研究背景

成長ホルモン (GH) 産生下垂体腫瘍のうち、sparsely granulated type (SG type) の病理型を示す群は、densely granulated type (DG type) と比較して治療抵抗性が高く、その病態解明が課題となっている。Wnt/ $\beta$ -カテニン経路は様々な腫瘍の発生に関与することが報告されており、下垂体腫瘍においても ACTH 産生腫瘍やゴナドトロピン産生腫瘍などで Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の活性化が報告されている。しかし、GH 産生下垂体腫瘍における Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の役割は解明されていない。

### 2. 研究目的

本研究では SG type の GH 産生下垂体腫瘍における Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の役割を検討し、新たな治療標的となりうるかを検証することを目的とした。

### 3. 研究方法

ヒト下垂体腫瘍検体を用いた実験：成長ホルモン産生下垂腫瘍の患者手術検体を Neural Tissue Dissociation Kits (Miltenyi Biotec 社) を用いて単離し、24 ウェルの PLL コーティング培養プレートに播種した。Wnt/ $\beta$ -カテニン経路阻害薬 (iCRT14、 $\beta$ カテニン応答性転写の阻害作用を有する) を  $10^{-9}$  ~  $10^{-5}$ M の濃度で投与し、24 時間後の細胞増殖を WST-1 法 (タカラバイオ社) で評価した。また、遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR 法で確認した。

病理検体の免疫染色：患者病理検体に対して抗  $\beta$ カテニン抗体 (Cell signaling 社) を用いた  $\beta$ カテニンの蛍光免疫染色を行い、 $\beta$ カテニンの細胞内局在を評価した。また、サイトケラチン染色を行い病理型を評価した。また、症例の年齢・性別等の基本情報ならびに腫瘍サイズ、GH 基礎値や 75gOGTT 時の底値、術後寛解したかの評価結果などの情報を収集し、病理型と合わせて腫瘍検体における Wnt/ $\beta$ -カテニン経路阻害薬の治療効果との相関を検討した。

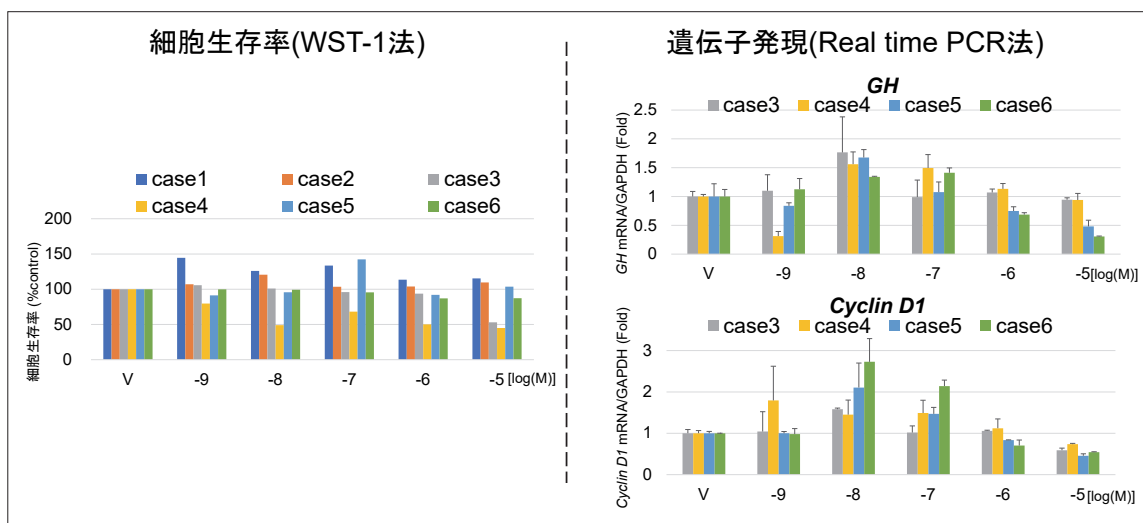
### 4. 結果

ヒト下垂体腫瘍検体を用いた実験：6 例の患者検体を用いて検討を行った。臨床背景を表 1 に示す。iCRT14 投与後の細胞生存率は 3 例で低下し、遺伝子発現では CyclinD1 の発現が薬剤高濃度域で低下した (図 1)。

表 1

|                   | case1 | case2 | case3 | case4 | case5   | case6 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|
| 手術時の年齢 (歳)        | 45    | 74    | 47    | 51    | 67      | 61    |
| 性別                | 男性    | 男性    | 男性    | 男性    | 女性      | 男性    |
| 診断時の腫瘍径 (mm)      | 6     | 7     | 22    | 24    | 14      | 50    |
| 診断時の GH (ng/mL)   | 1.65  | 6.93  | 130.5 | 86.3  | (3.44)  | 2.42  |
| 診断時の IGF-1 (SD)   | +5.02 | +6.87 | +5.57 | +7.84 | (+2.83) | +1.48 |
| OGTT の GH 底値      | -     | -     | 148.5 | 83    | 不明      | 5.31  |
| OGTT での GH 奇異性上昇  | あり    | あり    | なし    | なし    | 不明      | なし    |
| 術後の OGTT で GH<0.4 | ○     | ×     | ×     | ×     | ×       | ×     |

図 1



病理検体の免疫染色：βカテニンの免疫染色では、陽性像を核内にドット状に認めたドットパターン (DP) 群と細胞質や細胞膜に認めた非 DP 群に分類された (図 2)。次に臨床的な背景との関連を検討したところ、DP 群で腫瘍径が大きくマクローアデノーマの頻度が高いこと、術後寛解率が低いこと、病理型で SG type の割合が大きいことが明らかとなった (表 2)。

図 2

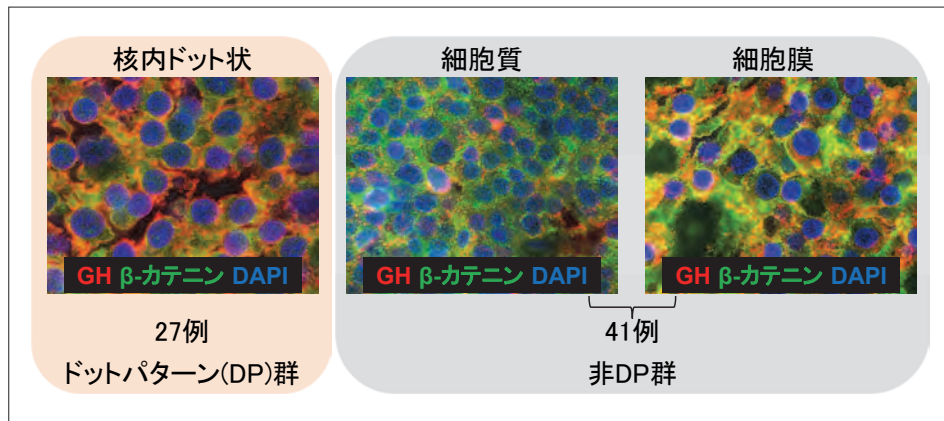


表 2

|                                | DP 群 (n=27)                      | 非 DP 群 (n=41)       | p 値   |
|--------------------------------|----------------------------------|---------------------|-------|
| 女性 / 男性 (例)                    | 14/13                            | 22/19               | 0.73  |
| 手術時の年齢 (歳)                     | 46 ± 16                          | 53 ± 13             | 0.10  |
| 腫瘍径 (mm)                       | 19.4 ± 10.9                      | 13.6 ± 7.4          | <0.05 |
| マクロアデノーマ (例)                   | 24 (89%)                         | 27 (68%)            | <0.05 |
| 診断時の GH (ng/mL)                | 10.1 [6.0, 26.6]                 | 12.8 [6.9, 25.0]    | 0.44  |
| 診断時の IGF-1 (SD)                | + 5.9 [3.9, 8.5]                 | + 6.8 [5.2, 8.2]    | 0.34  |
| 診断時の 75gOGTT*1 の GH 底値 (ng/mL) | 6.1 [3.7, 13.7] *2               | 12.0 [5.5, 28.1]*3  | 0.09  |
| 術後寛解*4 (例)                     | 4 (15%)                          | 17 (41%)            | <0.05 |
| 術後 6 か月の GH (ng/mL)            | 1.5 [1.1, 4.1]                   | 1.3 [0.6, 2.4]      | 0.14  |
| 術後 6 か月の IGF-1 (SD)            | + 0.2 [-0.6, + 1.6]              | + 0.6 [-1.2, + 1.5] | 0.95  |
| 病理分類                           | Densely granulated (DG) タイプ (例)  | 17 (63%)            | <0.05 |
|                                | Sparsely granulated (SG) タイプ (例) | 8 (30%)             |       |

平均 ± SD または中央値 [四分位範囲]、\*1 75g 経口ブドウ糖負荷試験 (Oral Glucose Tolerance Test)、\*2 GH が基礎値の 30% 以上に増加、\*3 IGF-1 正常範囲かつ 75gOGTT で GH 底値 0.4 ng/mL 未満

### 5. 考察と結語

ヒト下垂体腫瘍初代培養細胞を用いた検討から、Wnt/ $\beta$ カテニン経路阻害薬はサイクリン D1 を介して GH 産生下垂体腫瘍の増殖抑制作用を示す可能性が示された。GH 産生下垂体腫瘍の病理検体を用いた検討から、 $\beta$ カテニン経路の活性化が腫瘍増大傾向、寛解率が低い点などの SG type の臨床的特徴の背景に存在することが示唆され、今後の新規治療法の開発につながると考えられた。

2023 年度分

## 成長ホルモン及び IGFs 測定に関する研究

|       |       |                           |
|-------|-------|---------------------------|
| 主任研究者 | 安藏 慎  | (東京都立大塚病院、現：聖マリアンナ医科大学)   |
| 共同研究者 | 島津 章  | (淡海医療センター、国立病院機構京都医療センター) |
|       | 勝又 規行 | (国立成育医療研究センター研究所)         |
|       | 肥塚 直美 | (東京女子医科大学)                |
|       | 堀川 玲子 | (国立成育医療研究センター)            |
|       | 横谷 進  | (福島県立医科大学ふくしま国際医療科学センター)  |
|       | 望月 貴博 | (希望の森成長発達クリニック)           |
|       | 金本 巨哲 | (大阪市立総合医療センター)            |
|       | 福田いずみ | (日本医科大学大学院医学研究科)          |
| 顧問    | 田中 敏章 | (たなか成長クリニック)              |

GH・関連因子測定検討専門委員会では、市販されているすべての GH 測定キットによる測定値の平均を従属変数として線形関係式を求め、補正式を考案してきた。また、GH 測定キットの標準品をリコンビナント GH や校正標品 (WHO 98/574) に準拠した GH を用いることで、世界に先駆けて日本において GH 測定値の標準化を可能とし、測定キットによる GH 分泌異常症の診断や治療の判定結果が異なる不都合を防ぐことができた<sup>1),2)</sup>。しかし、GH 測定キット間差は依然として残っており、引き続き原因の究明と GH 測定値の標準化、補正式の妥当性に関する継続した検討が求められている<sup>3)</sup>。

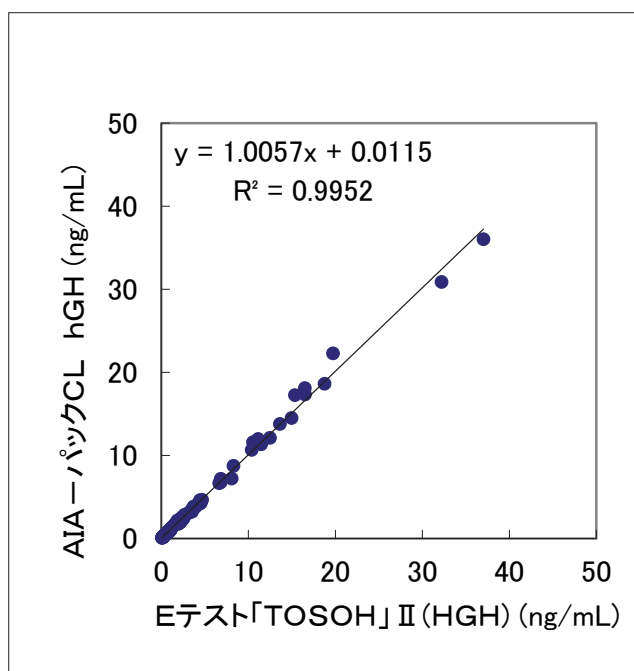
現在、市販されている各社の GH 測定キットを表 1 に示した。

表 1 現在市販されている成長ホルモン測定キットの一覧

| 製品名                  | 販売会社                   | 製造承認        |
|----------------------|------------------------|-------------|
| エクルーシス試薬 hGH         | ロシュ・ダイアグノスティクス㈱        | 2011 年 2 月  |
| アクセス hGH             | バックマン・コールター㈱           | 2010 年 12 月 |
| AIA-パック CL hGH       | 東ソー㈱                   | 2017 年 1 月  |
| E テスト「TOSOH」II (HGH) | 東ソー㈱                   | 2006 年 10 月 |
| シーメンス・イムライズ GH II    | シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス㈱ | 2009 年 1 月  |

GH・関連因子測定検討専門委員会では、これまでエクルーシス試薬 hGH、アクセス hGH、E テスト「TOSOH」II (HGH)、シーメンス・イムライズ GH II について性能比較試験を実施してきた。しかし AIA-パック CL hGH についての比較試験がなかったことから、今回東ソー(株)よりデータの提供を受けて、E テスト「TOSOH」II (HGH) と AIA-パック CL hGH の性能比較試験が実施された。その結果、臨床検体を用いた E テスト「TOSOH」II (HGH) (x 軸) と「AIA-パック CL hGH」(y 軸) の相関関係式は  $y=1.0057x + 0.0115$  ( $r=0.998$ : Deming 法回帰式) であった (図 1)。

図1 臨床検体 (n=100) における E テスト hGH (x 軸) および AIA- パック CL hGH (y 軸) の相関関係



上記の結果は、参考文献<sup>4)</sup>において報告された E テスト hGH と AIA- パック CL hGH の相関関係と同様であった。さらに参考文献<sup>4)</sup>では AIA- パック CL hGH (y 軸) とエクルーシス試薬 (x 軸) との比較において、 $y=0.925x+0.10$  ( $r=0.999$ ,  $n=111$ ) と良好な相関関係式が報告されている。今後、その他の GH 測定キットとの性能比較試験を実施したうえで、補正式の妥当性を再確認する必要がある。

#### 参考文献

1. Tanaka T, Tachibana K, Shimatsu A, Katsumata N, Tsushima T, Hizuka N, Fujieda K, Yokoya S, Irie M. A nationwide attempt to standardize growth hormone assays. *Horm Res.* 2005; 64 Suppl 2:6-11.
2. Saito T, Tachibana K, Shimatsu A, Katsumata N, Hizuka N, Fujieda K, Yokoya S, Tanaka T. Standardization of blood growth hormone levels measured by different kits using a linear structural relationship. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2006;15:79-84.
3. Katsumata N, Shimatsu A, Tachibana K, Hizuka N, Horikawa R, Yokoya S, Tatsumi KI, Mochizuki T, Anzo M, Tanaka T. Continuing efforts to standardize measured serum growth hormone values in Japan. *Endocr J.* 2016;63:933-936.
4. 戸来孝, 他. : 化学発光酵素免疫測定時法 (CLEIA) によるヒト成長ホルモン測定試薬「AIA-パック CL hGH」の評価及び GH 受容体拮抗薬ベグビソマンと胎盤性 GH に対する交差反応性の評価. *日本臨床検査自動化学会誌 (JJCLA)* 2017;42:591-598.

## 胎盤・臍帯血中の IGF signaling の調節機構の解明

藤本 正伸

鳥取大学医学部周産期・小児医学分野

我々は、これまでに臍帯血中の pregnancy-associated plasma protein-A2 (PAPPA2)・IGF1 を含む GH/IGF 関連タンパクの測定を行い、PAPP-A2 による IGFBP-3 の分解によって IGF1 の生体利用率 (Free/Total IGF-1) が制御されていることを示した (Fujii, et al. The 12th APPEES Scientific Meeting, Seoul, South Korea, 2022)。しかし、先行研究において胎児循環において IGF の作用を抑制的に制御する IGFBP-1 の評価はできていなかった。

本研究で、胎盤及び臍帯血中の IGF-1 signaling の調節に PAPP-A2 及び IGFBP-1 がどのように関与しているか、それら測定値と新生児体格との関連を検討した。

現在までに 2020 年 4 月から 2022 年 8 月に当院で出生し、家族から臍帯血の検体利用同意を得られた Appropriate for Gestational Age (AGA) 児について検討した。AGA 児 91 名 (男児 47 名) は、出生時の平均身長 46.6 cm (-0.47 SD)、平均出生体重 2,650 g (-0.24 SD) であった (表 1)。SGA 児の臍帯血は解析に必要な十分量の血清サンプルが得られておらず、解析を断念した。

表 1 研究参加者背景

| ALL                    | n    | Mean           | SD   | 95% CI        |
|------------------------|------|----------------|------|---------------|
| <b>Mothers</b>         |      |                |      |               |
| Maternal age (yrs)     | 91   | 32.9           | 5.4  | 31.8 - 34.0   |
| Maternal height (cm)   |      | 160.0          | 5.2  | 158.9 - 161.1 |
| Pre-pregnancy BW (kg)  |      | 54.1           | 8.6  | 52.3 - 55.9   |
| Pre-pregnancy BMI      |      | 21.1           | 3.2  | 20.4 - 21.8   |
| <b>Neonates</b>        |      |                |      |               |
|                        | 91   | M = 47, F = 44 |      |               |
| Gestational age (wks)  |      | 37.6           | 1.6  | 37.3 - 38.0   |
| Preterm (< 37wks)      | (10) | 34.4           | 0.55 | 34.0 - 34.8   |
| Birth length (cm)      |      | 46.6           | 2.5  | 46.1 - 47.1   |
| BL-SDS                 |      | -0.47          | 0.71 | -0.62 - -0.32 |
| Birth weight (g)       |      | 2650           | 405  | 2566 - 2735   |
| BW-SDS                 |      | -0.24          | 0.75 | -0.40 - -0.08 |
| Head circumference(cm) |      | 33.1           | 1.5  | 32.8 - 33.4   |
| HC-SDS                 |      | 0.27           | 0.93 | 0.08 - 0.46   |

凍結保存しておいたサンプルより臍帯血中の Total IGF-1、Free IGF-1、Total IGFBP-3、Intact IGFBP-3、PAPP-A2、IGFBP-5、IGFBP-1 を ELISA 法にて測定した。PAPP-A2 は、 $1.73 \pm 0.56$  ng/mL、IGF-1 bioavailability の指標として用いた Free/Total (F/T) IGF-1 は、 $2.40 \pm 1.97\%$  であった (表 2)。IGFBP-1 については残検体量が不十分であり、検討ができなかった。各測定項目間の関連を評価したところ、PAPP-A2 は F/T IGF-1 と正の相関 ( $r = 0.28, p < 0.05$ )、Intact/Total IGFBP-3 と負の相関 ( $r = -0.30, p < 0.01$ ) を示したが、IGFBP-5 とは相関を示さなかった ( $r = 0.048, p = 0.65$ )。よって、我々の先行研究 ( $n = 70$ ) に、サンプル数を増加させても同様の結果が得られたことから、PAPP-A2 は臍帯血中で、IGFBP-3 を介して、IGF-1 bioavailability の制御に関与することの確からしさが増したと考えられた。

表 2 臍帯血測定項目値

|                        | Mean | SD   | 95%CI       |
|------------------------|------|------|-------------|
| PAPP-A2 (ng/ml)        | 1.73 | 0.56 | 1.61 – 1.85 |
| Free IGF-1 (ng/mL)     | 2.26 | 1.42 | 1.93 – 2.59 |
| Total IGF-1 (ng/mL)    | 71.6 | 36.0 | 64.0 – 79.1 |
| F/T IGF-1 (%)          | 2.40 | 1.97 | 2.05 – 2.83 |
| Intact IGFBP-3 (ng/mL) | 343  | 81   | 326 – 360   |
| Total IGFBP-3 (ng/mL)  | 577  | 240  | 524 – 629   |
| I/T IGFBP-3 (%)        | 58.0 | 15.8 | 54.3 – 61.7 |
| IGFBP-5 (ng/mL)        | 351  | 68   | 337 – 366   |

加えて、各測定項目と出生した児の体格について検討したところ、PAPP-A2 濃度のみが児の身長 SDS や体重 SDS の両者と有意な負の相関関係を認めた (表 3)。よって、PAPP-A2 は至適な胎児成長が得られたかを評価する指標となる可能性が示唆された。

表 3 測定項目と出生時体格の相関解析

|        | PAPP-A2 |        | Free IGF-1 |        | Total IGF-1 |        | F/T IGF-1 |       | Intact IGFBP-3 |        | Total IGFBP-3 |       | I/T IGFBP-3 |       | IGFBP-5 |        |
|--------|---------|--------|------------|--------|-------------|--------|-----------|-------|----------------|--------|---------------|-------|-------------|-------|---------|--------|
|        | r       | P      | r          | P      | r           | P      | r         | P     | r              | P      | r             | P     | r           | P     | r       | P      |
| BL_SDS | -0.338  | <0.01  | 0.0191     | 0.872  | 0.0814      | 0.443  | -0.143    | 0.231 | 0.181          | 0.0854 | 0.1           | 0.368 | 0.0513      | 0.666 | -0.123  | 0.245  |
| BW_SDS | -0.362  | <0.001 | 0.216      | 0.0658 | 0.482       | <0.001 | 0.00501   | 0.967 | 0.462          | <0.001 | 0.222,        | <0.05 | 0.0894      | 0.452 | 0.177,  | 0.0928 |
| HC_SDS | -0.033  | 0.758  | 0.163      | 0.167  | 0.3         | <0.01  | 0.141     | 0.237 | 0.262          | <0.05  | 0.028         | 0.802 | 0.0719      | 0.545 | 0.0899, | 0.397  |

胎盤組織の検討のため、新規に AGA または SGA で出生した新生児の胎盤を採取し、パラフィンブロックを作成した。Nishizawa ら (Mol Hum Reprod. 2008) のプロトコルを参考に、PAPP-A2、PAPP-A、STC1、STC2、IGFBP-1 に対する免疫組織染色を行ったが、評価に十分な結果は得られなかった。今後、別の抗体・プロトコルを検討して、同評価を継続する。

本研究を通じ、PAPP-A2 が臍帯血中の IGF-1 bioavailability の制御に寄与していること、胎児成長を評価する新たなマーカーになる可能性が考えられた。今後、IGFBP-1 についての血清学的・組織学的評価を再考する。

## 小児腎不全者の成長ホルモン注射の使用実態と使用量

幡谷 浩史

東京都立小児総合医療センター総合診療科

腎臓・リウマチ膠原病科

### 背景・目的

小児腎不全者の合併症の一つに成長障害があり、小児期特有の重要な合併症である。成長障害は小児腎不全者の入院率や死亡リスクの上昇と関連するとともに、学歴や就職、結婚などの社会生活の質の低下に繋がる。

腎移植は腎機能を再獲得できる唯一の治療法である。移植後に成長の改善を認められるが、その改善の程度は移植時年齢や成長障害の程度、移植後腎機能など様々な要因が影響を受ける。移植後低身長に対しても成長ホルモンは有効であり、保険適応も拡大されたが、臨床の現場では効果・適応に対する認識の不十分であることが予想される。

小児腎不全者の中で、腎移植後患者の成長ホルモン治療について、使用頻度や投与量と効果を明らかにするため、全国調査を行う。

### 方法

#### 1) 研究デザイン

後方視的、多施設共同観察試験

施設調査と症例調査の2段階に分けて行う

#### 2) 方法

<施設調査>

小児期腎移植治療を症例数多く行っている施設が加入している小児腎移植研究会参加施設を対象に、症例調査の対象基準を満たす症例数を調査した。

<症例調査>

対象基準

1. 小児腎移植研究会に参加している施設の症例
2. 2023年4月1日時点で16歳以下の腎移植を受けた患者
3. 2年間以上の経過観察を受けている患者

除外基準

本人または代理人から参加拒否の申し出があった患者

#### 3) 評価項目

主要評価項目：eGFRが $<75$  mL/分/1.73m<sup>2</sup>で身長が $-2SD$ 以下の患者のうち、rhGH治療の有無とその割合、およびrhGH治療症例の投与量(0.175 mg/kg/週もしくは0.35 mg/kg/週)とその割合。

副次評価項目：

1. 腎機能（慢性腎臓病 CKD のステージ）別での rhGH 治療の割合と成長率
2. 男女別での rhGH 治療の割合と成長率
3. 年齢別での rhGH 治療の割合と成長率
4. 身長 SD 別での rhGH 治療の割合と成長率
5. 腎不全に至った原疾患別での rhGH 治療の割合と成長率
6. 腎疾患以外の併存症別での rhGH 治療の割合と成長率
7. ドナー（生体腎、献腎）別での rhGH 治療の割合と成長率
8. rhGH 治療を行わない理由
9. rhGH 治療の有無と移植拒絶反応の有無・回数
10. rhGH 治療と rhGH 治療に起因すると思われる有害事象の有無

4) 調査項目

1. 患者背景・情報

生年月、性別、人種、周産期歴、調査日、移植日およびその時点での身長・Tanner 分類、骨端線閉鎖の有無、血液生化学検査データ、移植腎の種類、直近 1 年間の免疫抑制薬使用歴、腎不全に至った原疾患、腎疾患以外の併存症（低身長に関連する症候群や遺伝子異常、糖尿病の有無、大島分類を含む）、移植拒絶反応の有無とその時期、rhGH 治療の有無、治療例では開始日と使用量、未治療例ではその理由、rhGH 治療によると思われる合併症の有無。

2. 治療経過に関する情報

患者情報：身長、体重、血清 Cr 値

薬剤情報：ステロイド薬の有無と種類、投与量

5) 研究協力機関（小児腎移植研究会）

1. 東京都立小児総合医療センター
2. 東邦大学大森病院
3. 東京女子医科大学病院
4. あいち小児保健医療センター
5. 大阪母子医療センター
6. 北里大学
7. 静岡県立こども病院
8. 日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院
9. 新潟大学
10. 北海道大学
11. 九州大学
12. 国立成育医療研究センター
13. 順天堂大学

### 研究経過

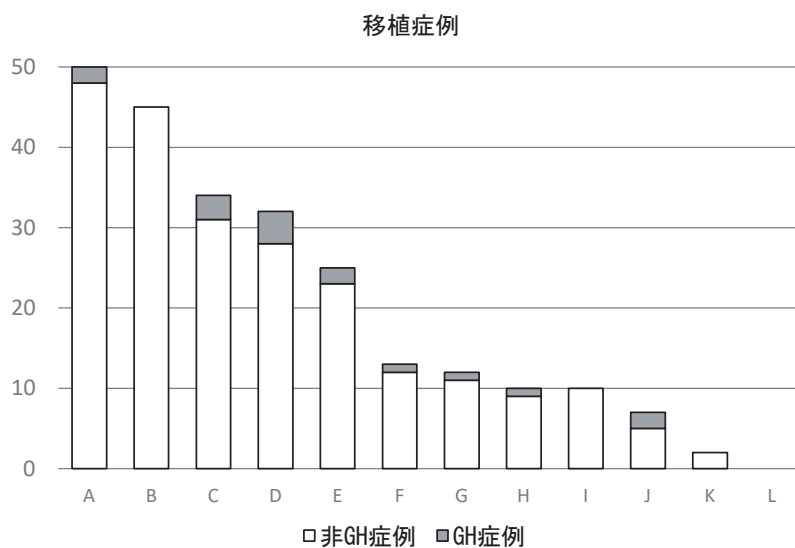
参加施設 13 施設の分布 (図 1) を示す。小児腎移植拠点病院であり、分布に偏りを認められる。

施設調査の結果 (図 2) を示す。12 施設から得た回答 (症例を有するのは 11 施設) では、対象を満たす腎移植症例数は 2 ~ 50 症例 (中央値 13 症例)、rhGH 治療症例は 0 ~ 4 症例 (中央値 1 症例)、治療割合は 0 ~ 29% (中央値 8%) だった。

図 1 参加施設の分布



図 2 施設毎の移植症例と GH 治療症例数



## 考察

rhGH 治療割合は中央値 8% であり、0% の施設も 3 施設あった。一方、NAPRTCS (North American Pediatric Renal Trials and Collaborative Studies) による 2010 年のデータでは、移植後から rhGH 治療症例の割合は徐々に増加し、全移植患者の 9%、低身長がある移植患者の 14% が移植後 5 年の時点で rhGH 治療を行い、+0.5SD の身長獲得を報告している<sup>1)</sup>。

2015 年に改訂された本邦の rhGH 治療適応は、①骨年齢が男子 17 歳未満、女子 15 歳未満、②身長が同性、同年齢の標準値 -1.0SD 以下、あるいは年間の成長速度が 2 年以上にわたって標準成長率 -1.5SD 以下、③血清 Cr 値が性別年齢別基準値の 1.5 倍以上、もしくは eGFR <75 mL/分/1.73m<sup>2</sup> である。一方、2012 年の報告であるが、本邦腎移植症例の移植時身長が  $-2.4 \pm 1.6SD$ 、最終身長が  $-2.1 \pm 1.7SD$  である<sup>2)</sup>。腎機能基準は腎移植後症例の多くの症例が満たすと予想されることから、治療対象となり得る症例の多くが何らかの理由で治療されていないことが予想される。

現在進めている症例調査の解析により、rhGH 治療の適応となる症例のなかで実際に治療されている割合などの解明を進める。

## 次年度の予定

症例調査を進め、腎移植症例の rhGH 治療についてデータ解析を行う。

## 引用文献

1. Fine RN, Martz K, Stablein D. What have 20 years of data from the North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study taught us about growth following renal transplantation in infants, children, and adolescents with end-stage renal disease? *Pediatr Nephrol.* 2010 Apr;25(4):739-46. doi: 10.1007/s00467-009-1387-3. Epub 2009 Dec 16. PMID: 20013293.
2. Motoyama O, Hasegawa A, Aikawa A, Shishido S, Honda M, Tsuzuki K, Kinukawa T, Hattori M, Ogawa O, Yanagihara T, Saito K, Takahashi K, Ohshima S. Final height in a prospective trial of late steroid withdrawal after pediatric renal transplantation treated with cyclosporine and mizoribine. *Pediatr Transplant.* 2012 Feb;16(1):78-82. doi: 10.1111/j.1399-3046.2011.01614.x. Epub 2011 Nov 29. PMID: 22122015.

研究年報 第48号 2024年度

2025年12月1日発行

編集 公益財団法人 成長科学協会  
発行 公益財団法人 成長科学協会  
東京都文京区本郷5-1-16 (〒113-0033)  
電話 (03) 5805-5370  
印刷 株式会社デイ・エム・ピー  
東京都新宿区早稲田鶴巻町561 (〒162-0041)  
電話 (03) 5292-6800

非売品