

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22132004

研究課題名（和文）ヒト疾患解析にもとづく性差構築機序の解明

研究課題名（英文）Clarification of underlying factors involved in the establishment of sex differences

研究代表者

緒方 勤（OGATA, TSUTOMU）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40169173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 143,400,000 円

研究成果の概要（和文）：性差は、遺伝的制御と内分泌的制御のもとに構築される。われわれは、約1,000におよぶヒト性差関連疾患患者検体を次世代シーケンサーおよびアレイCGHを含む最新の方法を用いて解析し、遺伝的制御にかかわる新規因子としてBHLHA9と複数の遺伝子が関与するoligogenecityの存在を、内分泌的制御にかかわる新規因子としてMAMLD1やPROKR1を同定すると共に、新規男性ホルモン産生経路backdoor pathwayの役割を明らかとした。さらに、生殖行動、攻撃行動、自発運動の性差形成に、脳内ステロイドの合成系と作用系に関わるgnihなど遺伝子群が重要な役割を担っていることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Sex difference is established by genetic and endocrine regulations. We studied a large number (~1,000) of patient samples by next generation sequencing and array CGH analysis, and identified BHLHA9 as the novel genetic factor as well as the relevance of oligogenecity, and MAMLD1 and PROKR1 as the novel endocrine factors as well as the presence of an alternative androgen production route called backdoor pathway. We also clarified the essential role of gnih and other genes for the production of brain steroids (e.g., 7 α -hydroxypregnenolone and estrogens) in the establishment of sex difference in reproductive, aggressive, and autonomous behaviors

研究分野：医歯薬学

キーワード：性差構築 ヒト疾患解析 性分化疾患 遺伝的制御 内分泌制御

1. 研究開始当初の背景

ヒトの性差は、主に胎児期と思春期に構築される。胎児期において、性腺は、男女共通の未分化性腺形成後、Y染色体(SRY)が存在するとき体細胞分化によりホルモン産生細胞を有する胎児精巣に、存在しないとき生殖細胞分化により減数分裂細胞(卵母細胞)を有する胎児卵巣に分化する。性腺位置、内・外性器、脳は、胎児精巣由来のテストステロン、インスリン様成長因子3、抗ミュラー管ホルモンが存在するとき男性型に、存在しないとき女性型に向かう。思春期では、視床下部-下垂体-性腺系の賦活化により、女性では体細胞分化によるホルモン産生と卵子形成が、男性ではホルモン産生再開と精子形成が生じ、二次性徴と配偶子形成の性差がもたらされる。

この性差構築過程における異常は、性分化疾患を招く。これに関し、われわれは、種々の性分化疾患患者約1,000例における分子生物学的解析により、胎児期発症性分化疾患責任遺伝子 *ARX* と *MAMLD1* の発見、男女両性において性分化疾患を招く性分化疾患を伴う *POR* 異常症の遺伝子型-表現型解析に基づく胎児期・乳児期早期特異的新規男性ホルモン産生経路の同定と *POR* プロモーターの 2.5 kb 領域への限局化、ゴナドトロピン分泌抑制ホルモン *GnIH* の発見とゴナドトロピン産生低下を招く *OTX2* 異常症の同定、エストロゲン受容体 α 遺伝子における内分泌攪乱化学物質感受性ハプロタイプの同定など、世界に先駆けて多数の成果を報告してきた。一方、このような先行研究から、胎児期あるいは思春期発症の性分化疾患を有する患者において、既知の全遺伝子の変異・欠失解析を行っても、異常検出率が 20%以下に留まることが明らかとなっていった。また、同定された遺伝子の機能解析による生理作用の解明も重要な課題として残されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、この性差構築過程の異常により発症する種々の性分化疾患の発症機序を明らかとすることである。これにより、ヒトにおける性差構築機序を解明し、「性差構築の分子基盤」の確立に繋げる。

3. 研究の方法

次世代シーケンサーやアレイ CGH などの最先端解析技術と種々の機能解析を組み合わせ実施した。なお、ヒトの解析においては、ヒトゲ

ノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成17年6月文部科学省厚生労働省経済産業省告示第1号)を遵守し、IRBの承認と書面同意のもとに実施した。

4. 研究成果

(1) 遺伝的制御にかかわる新規因子 *BHLHA9* の解析:われわれは、尿道下裂・停留精巣と裂手裂足症を合併する患者において *BHLHA9* の変異と重複を見出し、これに一致して、*BHLHA9* が、胎児期マウスの外性器で発現していることを明らかとした(図1)。これは、性ステロイド非依存性の性差構築機序の解明に大きく寄与する世界初のデータである。

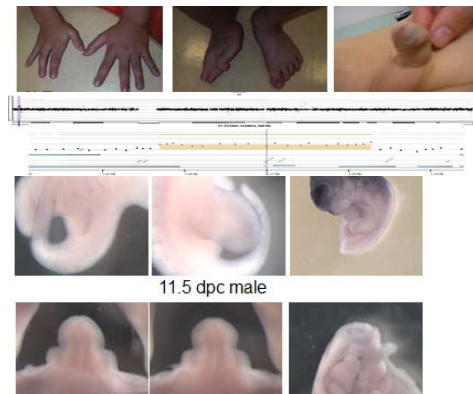


図1. 尿道下裂+裂手・裂足症患者における *BHLHA9* を含む約 200 kb の重複とマウス *Bhlha9* の肢芽と外性器(雌雄同等)の発現パターン

さらに、大腿骨・脛骨・裂手裂足症を伴う患者、脛骨・裂手裂足症を伴う患者、裂手裂足症のみを伴う患者を有する 51 家系を解析し、27 家系において、全く同一の日本人創始者効果による *BHLHA9* を伴う 210,050 bp の duplication/triplication を見いだした(図2)(*Orphanet J Rare Dis* 2014)。そして、本邦において複製過程の異常で生じた重複が、その後の組み替えにより triplication およびハプロタイプの多様性を獲得しながら国内で広く分布していることを報告した。

また、この研究過程で *FGFR1* がゴナドトロピン分泌不全と裂手裂足症を生じることを見だし、機能解析を終了した(論文執筆中)。

(2) 内分泌的制御にかかわる新規因子

MAMLD1 のノックダウン実験とノックアウトマウス解析:*MAMLD1* は、2006年にわれわれが同定した性分化疾患(尿道下裂)責任遺伝子である。マウスライディッチ細胞腫瘍株を用いたノックダウン実験とノックアウトマウスにおいて *MAMLD1* が *CYP17A1* を含むライディッチ細胞発現遺伝子の発現低下を介して男性ホルモン産生を傷害し、尿道下裂を招くことが判明した(図3)(*PLoS One* 2011, *Endocrinology* 2012)。

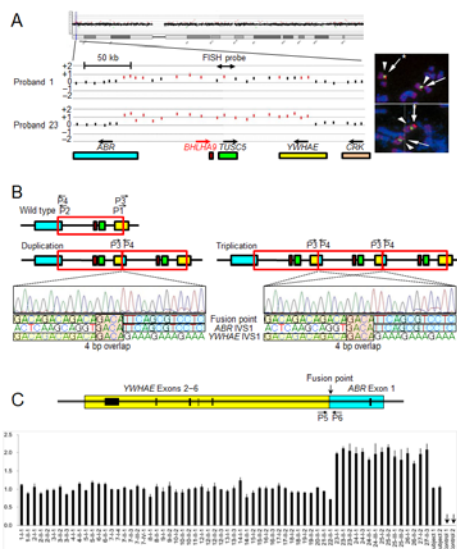


図 2. 同定された重複・3 重複領域。全ての患者で融合点構造は同一である。

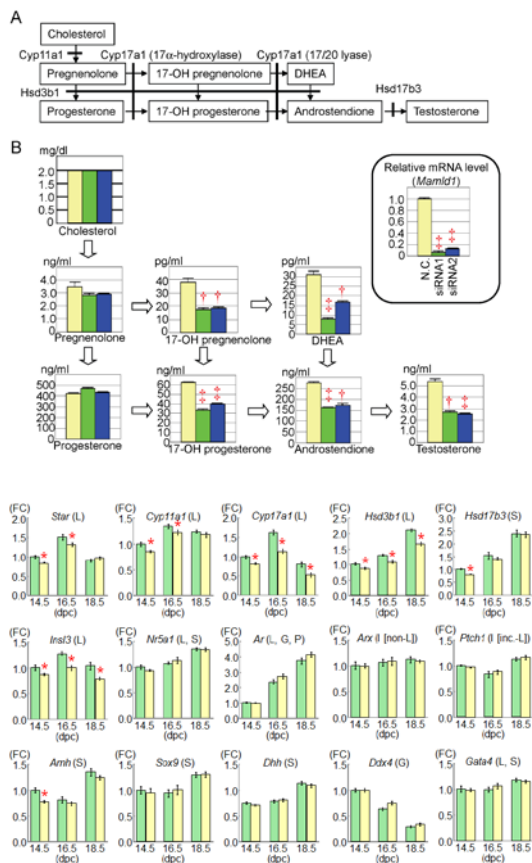


図 3. ノックダウン実験によるテストステロン産生低下(上)とノックアウトマウスにおけるライディッヒ細胞発現遺伝子の発現量低下。

さらに、雌のノックアウトマウスにおいて、分娩開始シグナルとなるプロゲステロン代謝に関与する *20alpha-Hsd* 遺伝子の発現量が野生型マウス卵巣に比較して低値であり、その結果血中プロゲステロン濃度が持続高値

を示し、分娩開始が遅延することを見出した。これに一致して、*Maml1d1* 遺伝子欠損妊娠マウスの分娩は、プロゲステロン受容体の拮抗薬である RU486 投与による子宮へのプロゲステロンシグナルの遮断によって誘導された (Cell Reports 投稿中)。

(3) 内分泌的制御にかかわるゴナドトロピ性早熟の新規遺伝子 *PROKRI* の同定:われわれは、性早熟女児において、*PROKRI* の短縮型タンパク産生変異を同定し、この変異蛋白が、正常タンパクと共存したときのみ機能亢進を招くことを見出した。これは世界初の成果であり、今後の思春期性差構築の内分泌制御の検討で有用になると期待される (論文執筆中)。

(4) 内分泌的制御にかかわる Backdoor pathway の作動解析:Backdoor pathway は、testosterone を経路しない dihydrotestosterone (DHT) 産生経路として、女児性分化疾患発症への関与が注目されている。われわれは、世界で初めて胎児診断された POR 欠損症患者の縦断的ステロイド分析および正常男児・女児の臍帯血を用いたステロイド分析により、Backdoor pathway が主に胎児副腎で営まれていること、中間代謝産物は多いものの DHT までの産生は乏しいことを世界で初めて見出した(図 4) (*Dev Dyn* 2013)。これは性差構築の内分泌的制御の解明に大きく貢献する。なお、本研究過程で POR 遺伝子のプロモーターを同定したことを付記する (*J Clin Endocrinol Metab* 2011)。

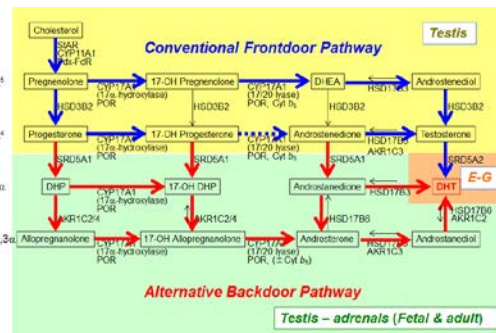


図 4. Backdoor 経路の模式図

(5) ゲノム異常としてのアロマターゼ過剰症の同定:アロマターゼ過剰症の発症に少なくとも 11 種類のゲノム構造異常が関与すること、これらのゲノム再構成の成立に反復配列依存性組み換え異常、非同源性末端結合、DNA 複製エラーのすべてが関与することを見出した(図 5) (*J Clin Endocrinol Metab* 2011, *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, *Exp Rev Endocrinol Metab* [Epub ahead of print], *Pediatr Endocrinol Rev* 2014.) また、アロマターゼ過剰症小児の乳房腫大に、副

腎由来アンドロゲンの寄与が大きいことを明確とした (*Clin Endocrinol* 2014)。

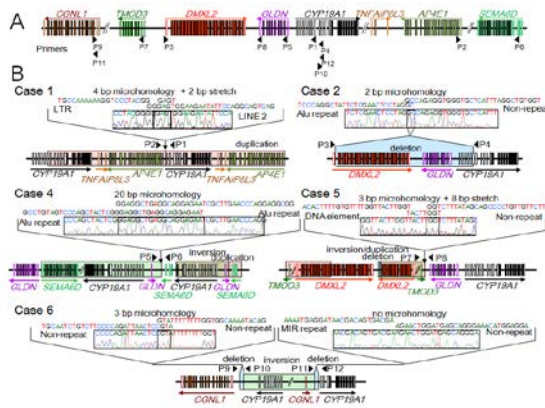


図 5. 代表的なアロマターゼ過剰症におけるゲノム構造異常

(6) 性分化疾患の分子基盤の解明: 非症候性尿道下裂患者の網羅的遺伝子変異解析およびコピー数解析を行い、本症患者の 10% 以上に既知単一遺伝子変異もしくはモザイク染色体構造異常が存在することを明らかとした (図 6)。とくに重要な点として、本症が oligogenic disorder として発症する可能性がはじめて見出された (*Hum Reprod* 2015, *Endocr J* [Epub ahead of print])。さらに、アンドロゲン受容体機能低下変異陽性患者の臨床症状の改善に選択的エストロゲン受容体モジュレーターが有用であることをはじめて明らかとした。 (*Horm Res Pediatr* 2014)。また、原因不明の 46XY 性分化疾患患者において染色体微細構造異常を同定し、*DMRT1* と *HOXD* クラスターを包含する欠失が外生殖器異常を招くことや 20 番染色体に新規性分化疾患責任遺伝子が存在する可能性を見出した (図 7) (*Plos One*, 2013, *Mol Cell Pediatr* [Epub ahead of print])。

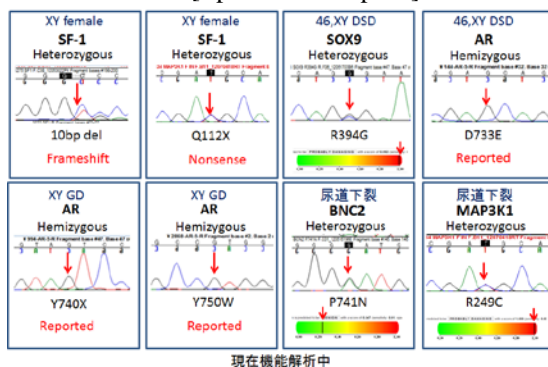


図 6. 次世代シーケンサー解析で同定された遺伝子変異。

(7) 性成熟疾患の病態の解明: 性成熟異常を呈するゴナドトロピン欠損症患者を対象として、全既知責任遺伝子のターゲットリシーケンスおよび

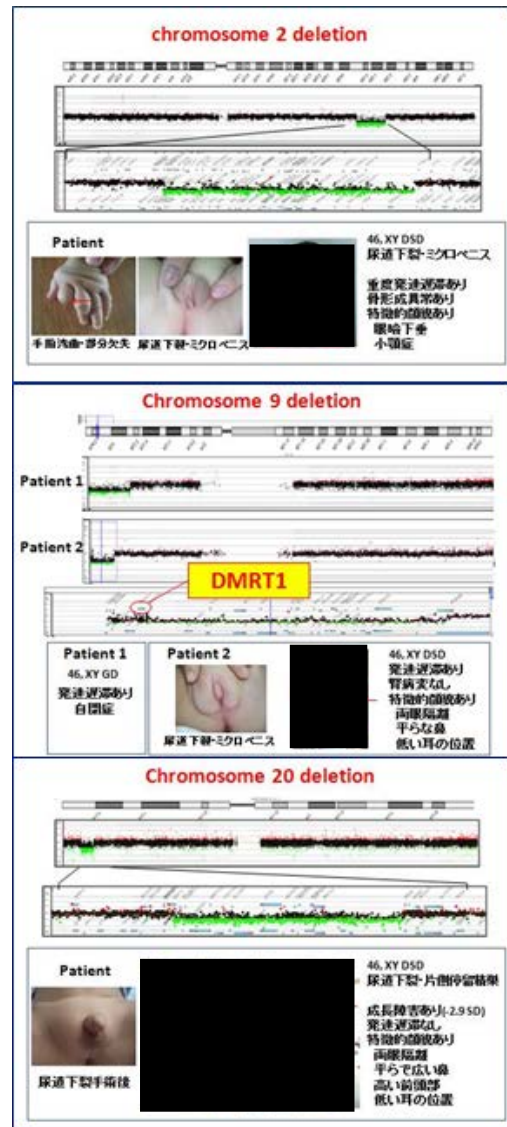


図 7. ゲノムワイドアレイ CGH で同定されたゲノム構造異常。

び全ゲノムコピー数解析を行い、既知遺伝子変異の寄与の程度および既知遺伝子変異異常症の臨床スペクトラムを明確とした (*Fertil Steril* 2014)。また、*FGF8* フレームシフト変異をはじめて同定し、本遺伝子変異陽性男性患者においては、ゴナドトロピン産生障害と外陰部形成障害の両者に起因する重度のマイクロペニスが生じることを見出した (*Horm Res Paediatr* 2014)。さらに、症候性ゴナドトロピン欠損症を招く *SOX2* 異常症と *SOX10* 異常症の遺伝子変異パターンと臨床スペクトラムを解明した。また、これらの遺伝子異常が優性阻害効果ではなく、半量不全によって臨床症状を招くことを明らかとした (*J Hum Genet* 2014, *Endocrine* [Epub ahead of print])。

(8) 内分泌攪乱環境化学物質感受性因子の同定: *ESR1* (エストロゲン受容体 α 遺伝子) の特定

ハプロタイプが尿道下裂・停留精巣発症の感受性因子であること、ならびに、**ESR2**(エストロゲン受容体β遺伝子)の特定ハプロタイプが精子形成障害発症の感受性因子であることを見いだした (*J Hum Genet* 2012)。

(9) 生殖行動、攻撃行動、自発運動の性差形成機序の解明: 従来の研究により、哺乳類、鳥類などの脊椎動物の脳に雄型と雌型という性的二型が存在することが発見され、脳の性的二型により種々の本能行動に性差がもたらされることが明らかになっている。われわれは、鳥類(ウズラやニワトリなど)と両生類(イモリなど)を用いた研究により、以下の重要な成果を得た。

①種々の本能行動の中でも、生殖行動(性指向、求愛行動、性行動)、攻撃行動、自発運動(活動性)には特に大きな性差が存在することを明らかにした (*Tobari et al., J Neurosci* 2014;

Tsutsui et al., Front Neuroendocrinol 2013 他)。

① 視床下部で産生される生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン(**GnIH**と命名)は、脳内のエストロゲン合成酵素(**P450arom**)の活性を高め、脳内で合成されるエストロゲン量を増加させることで、生殖行動と攻撃行動を抑制することを明らかにした (*Ubuka et al., Nat Commun* 2014 他)。

③脳内で合成されるエストロゲン量や脳内の**P450arom**、エストロゲン受容体(**ER**)の発現量には性差があり、エストロゲンの性差は生殖腺や体内の性ステロイド環境とは無関係に、生涯にわたって固定されることを明らかにした (*Maekawa et al., Nat Commun* 2013 他)。

④ 脳内で合成される**7α**-水酸化プレグネロンは自発運動を支配しており、**7α**-水酸化プレグネロン量と**7α**-水酸化プレグネロン合成酵素(**P450_{7α}**)の発現量には性差が存在することを明らかにした (*Haraguchi et al., Endocrinology* 2010; *Haraguchi et al., Endocrinology* 2012;

Tsutsui et al., Front Neuroendocrinol 2013 他)。また、それらの性差は生活史の早い段階の一時期に形成され、一生涯にわたって維持されることがわかった (*Tsutsui et al., Front Neuroendocrinol* 2013 他)。

⑤ 出生前後の時期において脳が性分化するプロセスに、脳が合成するステロイドによる脳内遺伝子のヒストン修飾と**DNA**メチル化が関与していることが示唆された(未発表)。

以上の研究成果により、生殖行動、攻撃行動、自発運動の性差形成には、脳内のステロイドの合成系と作用系に関わる**gnih**など遺伝子群が重要な役割を担っており、それらの遺伝子群の発現は生活史の早い段階にエピジェネティックに制御されていると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 260 件)

英文 215 報 和文 45 報

1. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. Kon M, **Ogata T, Fukami M.** (著者 22 名中 20 番目、22 番目). **Hum. Reprod.** 30: 499–506, 2015. (査読有)
2. Japanese founder duplications/ triplications involving *BHLHA9* are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gollop-Wolfgang complex. Nagata E, **Fukami M, Ogata T.** (著者 31 名中 29 番目、31 番目). **Orphanet J. Rare Dis.** 9: 125, 2014. (査読有)
3. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. Izumi Y, **Ogata T, Fukami M.** (著者 16 名中 14 番目、16 番目). **Fertil. Steril.** 102: 1130–1136.e3, 2014. (査読有)
4. Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. **Tsutsui K** (著者 8 名中 8 番目) **Nat. Commun.** 5, 3061, 2014 (査読有)
5. Backdoor pathway for dihydrotestosterone biosynthesis: implications for normal and abnormal human sex development. **Fukami M, Ogata T.** (著者 4 名中 1 番目、4 番目). **Dev. Dyn.** 242: 320–329, 2013.
6. Genomic basis of aromatase excess syndrome: recombination- and replication-mediated rearrangements leading to *CYP19A1* overexpression. **Fukami M, Ogata T.** (著者 14 名中 1 番目、14 番目). **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 98: E2013–2021, 2013. (査読有)
7. Cryptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY disorders of sex development. Igarashi M, **Ogata T, Fukami M.** (著者 1 名中 11 番目、12 番目). **PLoS One** 8: e68194, 2013. (査読有)
8. *Maml1* deficiency significantly reduces mRNA expression levels of multiple genes expressed in mouse fetal Leydig cells but permits normal genital and reproductive development. Miyado M, **Fukami M, Ogata T.** (著者 8 名中 7 番目、8 番目). **Endocrinology** 153: 6033–6040, 2012. (査読有)
9. Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure. **Ogata T, Fukami M.** (著者 7 名中 1 番目、2 番目). **J. Hum. Genet.** 57: 434–441, 2012. (査読有)

10. Possible role of pineal allopregnanolone in Purkinje cell survival. Haraguchi S, **Tsutsui K** (著者 5 名中 5 番目) **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 109, 21110-21115, 2012 (査読有)
11. Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding site. Soneda S, **Fukami M. Ogata T.** (著者 8 名中 3 番目、8 番目). **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 96: E1881-1887, 2011. (査読有)
12. *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. Nakamura M, **Fukami M. Ogata T.** (著者 6 名中 2 番目、3 番目). **PLoS One** 6: e19123, 2011. (査読有)
13. Aromatase excess syndrome: identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of *CYP19A1* and assessment of phenotypic determinants. **Fukami M. Ogata T.** (著者 15 名中 1 番目、15 番目). **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 96: E1035-1043, 2011. (査読有)
14. The IG-DMR and the *MEG3*-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. **Kagami M. Ogata T.** (著者 12 名中 12 番目). **PLoS Genet.** 6: e1000992, 2010. (査読有)
15. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. **Tsutsui K.** (著者 6 名中 1 番目) **Front Neuroendocrinol** 31, 284-295, 2010 (査読有)

[学会発表] (招待講演計 145 件以上)
国際学会招待講演 57 件
国内学会・研究会招待講演 88 件以上

1. **Ogata T: Environmental Impacts on Male Sexual Differentiation.** In: Symposium Global Human Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals. In: 16th International Congress of Endocrinology & the Endocrine Society's 96th Annual Meeting & Expo. June 21-24, 2014. Shicago, USA.
2. **Ogata T:** Genetics of DSD (Disorders of sex development). Plenary Lecture. In: PAS/ASPR (Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research) 2014. May 3-6, 2014, Vancouver, Canada.
3. **K. Tsutsui:** Evolution of GnIH structures and functions in chordates. The 8th International Congress of Neuroendocrinology. Sydney, Australia, August 17-20, 2014
4. **K. Tsutsui** (2013) **Bargmann-Scharrer**

Lectureship Award: Breakthrough in neuroendocrinology by discovering novel neuropeptides and neurosteroids. The 17th International Congress of Comparative Endocrinology. Barcelona, Spain, July 15-19, 2013

5. **Ogata T:** Genetics of DSD (Disorders of sex development). In: Disorders of sex development. The 15th International and 14th European Congress of Endocrinology (ICE/ECE). May 5-9, 2012, Florence, Italy.
6. **Ogata T:** Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency: A Unique Disease Leading to Disorders of Sex Development in Both 46,XY and 46,XX Patients. Invited Lecture. In: The 6th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination. April 23-27, 2012. Kona Hawaii, USA.
7. **Ogata T:** Disorders of Sex Development: Recent Progress. Plenary Lecture. In: The 13th European Congress of Endocrinology (ECE 2011). April 30-May 4, 2011. Rotterdam Netherlands.

[図書] (計 32 件)
英文 12 報 和文 21 報

[その他]

ホームページ

• <http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/pediatr/index.html>

• <http://www.ncchd.go.jp/research/nch/endocrinology/>

• <http://www.f.waseda.jp/k-tsutsui/>

国際学会オーガナイザー: 6 件

新聞発表: 9 件

TV 報道: 1 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 勤 (OGATA TSUTOMU)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号: 40169173

(2) 研究分担者

深見 真紀 (FUKAMI MAKI)

(独) 国立成育医療研究センター研究所・分

子内分泌研究部・部長

研究者番号: 40265872

筒井 和義 (TSUTSUI KAZUYOSHI)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号: 20163842

(3) 連携研究者

鏡 雅代 (KAGAMI MASAYO)

(独) 国立成育医療研究センター研究所・分子

内分泌研究部・室長

研究者番号: 70399484