

令和元年5月9日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09979

研究課題名(和文) 網羅的ゲノム解析に基づく性分化疾患の発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenic mechanisms of disorders of sex development using systematic molecular analysis

研究代表者

五十嵐 麻希 (Igarashi, Maki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・共同研究員

研究者番号：10623035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：性分化疾患(DSD)患者において網羅的遺伝子解析を行い、下記の成果を得た。1) 精巢性/卵精巢性DSD患者8症例のうち2例で、共通のNR5A1遺伝子変異を同定した。機能解析の結果、患者は女性の染色体を保有しているにも関わらず、この遺伝子変異によって精巢形成が引き起こされた可能性を始めて報告した。2) 46,XY DSDを呈する119症例において、GATA4遺伝子解析を行った。機能解析の結果、1症例で同定された変異が発症に関与している可能性を見出した。よって、46,XY DSDの発症に、GATA4遺伝子の関与が稀であることが判明した。3) 上記以外に、研究代表者は8報の英文科学論文の作成に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、性分化疾患患者の発症原因究明という点で社会的意義がある。性分化疾患患者は、出生直後に外性器の形状から、思春期以降は思春期発来の遅延によって発見されることが多く、患者にとってその原因を知ることが重要である。また、治療方針の決定にも発症原因遺伝子の情報が有用である。

本研究成果は、ヒトの性分化機構の解明という点で学術的意義がある。性分化患者の遺伝子解析を通じて、ヒトの性分化にどのような遺伝子が関与しているのかが見えてくる。これにより、生命の成り立ちをより深く理解することができる。

研究成果の概要(英文)： We performed systematic molecular analysis in patients with disorders of sex development(DSD). Remarkable findings as follows: 1) Identical NR5A1 mutation was found in 2 of 8 patients with testicular/ovotesticular DSD. As the results of functional analyses, we showed for the first time in the world that, this specific mutations in NR5A1 was likely to causes for testicular development in genetic female. 2) GATA4 gene analysis was performed in 119 patients with 46,XY DSD. As the results of functional analyses, we found that a mutation identified in one case might be involved in the onset. This study demonstrate that GATA4 mutations are rare in patients with 46,XY DSD. 3) In addition to the above, principal investigator contributed to the preparation of eight scientific papers.

研究分野：分子生物学

キーワード：性分化疾患 遺伝子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

性分化疾患 (DSD: Disorders of sex development) は、出生時の外性器異常、思春期発来異常および不妊の原因など多彩な臨床症状を招く病態である。本症は、単一遺伝子疾患および多因子疾患として発症する。これまでに、46,XY DSD 患者より、ヒト性分化機構に關与する遺伝子変異が数多く見出されている。一方、46,XX DSD 患者の発症責任遺伝子の報告数は少なく、卵巢分化のメカニズムには未解明な部分が多い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、性分化疾患 (DSD: Disorders of sex development) 患者の病因解明である。

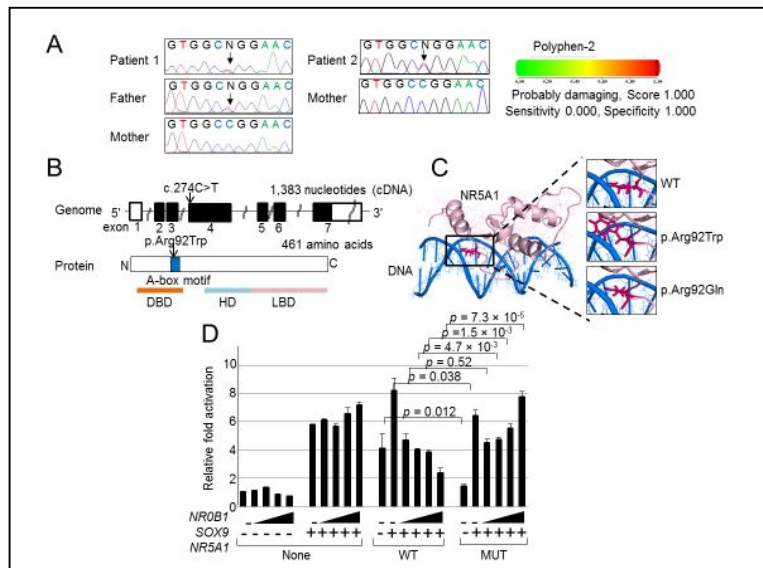
### 3. 研究の方法

これまでに集積した DSD 患者の臨床検体と、本研究期間内に新規に集積される検体を対象として、標的領域の次世代シーケンス解析を行う。また、稀な表現型を呈する症例について、エクソーム解析で新規候補遺伝子の探索を行う。変異陰性検体ではアレイ CGH を行い、ゲノムコピー数異常の有無を検討する。新規遺伝子に異常が同定された場合は、in silico 解析、in vitro 機能解析および in vivo 解析によって、遺伝子機能を解明する。

### 4. 研究成果

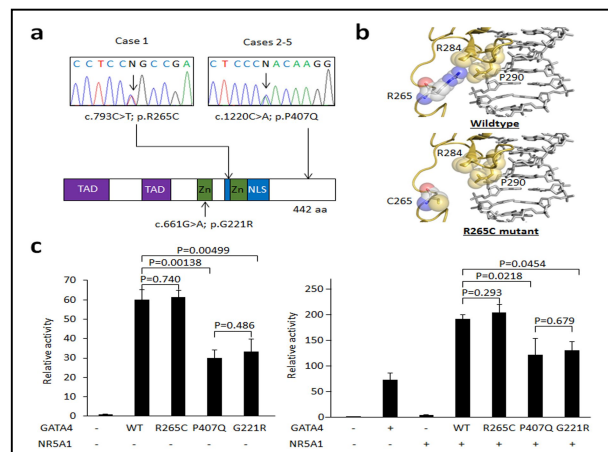
研究代表者は、研究期間内に 10 報の科学論文 (2 報の筆頭論文を含む) に関わっている。特記すべき成果は、下記である。

1) 精巢性/卵巢性 DSD 患者 8 症例のうち 2 例で、共通の NR5A1 遺伝子変異 (p.R92W) を同定した。家族解析の結果、この変異は、患者の父親由来もしくは de novo であることが判明した (A 左)。この遺伝子変異は、データベース登録がなく、機能予測ツールにより機能低下変異と予測された (A 右)。また、3次元立体構造予測ツールにでは、DNA 結合部位に存在し (B)、変異により DNA 結合能が低下することが予測された (C)。In vitro 機能解析の結果、この遺伝子変異により、精巢形成に大きく関わる SOX9 発現が増加する可能性を見出した (D)。この結果から、患者は女性の染色体を保有しているにも関わらず、この遺伝子変異によって精巢形成が引き起こされた可能性を世界で始めて報告した。この成果は筆頭著者として科学論文にて報告した他、当該患者の臨床情報の詳細は 2 報の科学論文として報告した。



1)の研究成果

2) 46,XY DSD を呈する 119 症例において、GATA4 遺伝子解析を行った。機能解析の結果、5 症例から 2 種類の塩基置換 (p.R265C、p.P407Q) が同定された (a)。このうち p.R265C は、データベースに登録がなく、ジンクフィンガードメインに存在し、塩基置換によって機能低下が予測された。このことから、機能低下変異であることが可能性が考えられた (b)。一方、p.P407Q は in vitro 機能解析では機能低下を示したにも関わらず、データベースに登録があり、尿道下裂を呈していない検体からも同定されたことから、46,XY DSD の発症原因でない可能性が高いと考えられた (c)。以上の結果から、46,XY DSD の発症には、GATA4 遺伝子の関与が稀であることが判明した。この成果は筆頭著者として科学論文にて報告した。



2)の研究成果

## 5. 主な発表論文等

1. Tanase-Nakao K, Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Hara M, Matsumoto K, Matsubara Y, Igarashi M, Miyado M, Fukami M. Dihydrotestosterone induces minor transcriptional alterations in genital skin fibroblasts of children with and without androgen insensitivity. *Endocr J*. 2019 Feb 19.
2. Saito-Hakoda A, Kanno J, Suzuki D, Kawashima S, Kamimura M, Hirano K, Sakai K, Igarashi M, Fukami M, Fujiwara I. A Follow-Up from Infancy to Puberty in a Japanese Male with SRY-Negative 46,XX Testicular Disorder of Sex Development Carrying a p.Arg92Trp Mutation in NR5A1. *Sex Dev*. 2019 Feb 9.
3. Shima H, Hayashi M, Tachibana T, Oshiro M, Amano N, Ishii T, Haruna H, Igarashi M, Kon M, Fukuzawa R, Tanaka Y, Fukami M, Hasegawa T, Narumi S. MIRAGE syndrome is a rare cause of 46,XY DSD born SGA without adrenal insufficiency. *PLoS One*. 2018 13:e0206184.
4. Igarashi M, Mizuno K, Kon M, Narumi S, Kojima Y, Hayashi Y, Ogata T, Fukami M. *GATA4* mutations are uncommon in patients with 46,XY disorders of sex development without heart anomaly. *Asian journal of andrology*. 2018 20:629-631.
5. Takasawa K, Igarashi M, Ono M, Takemoto A, Takada S, Yamataka A, Ogata T, Morio T, Fukami M, Kashimada K. Phenotypic Variation in 46,XX Disorders of Sex Development due to the NR5A1 p.R92W Variant: A Sibling Case Report and Literature Review. *Sex Dev*. 2018 Jan 24;11(5-6):284-288.
6. Fukami M, Suzuki E, Igarashi M, Miyado M, Ogata T. Gain-of-function mutations in G-protein-coupled receptor genes associated with human endocrine disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018 Mar;88(3):351-359
7. Fukami M, Suzuki E, Izumi Y, Torii T, Narumi S, Igarashi M, Miyado M, Katsumi M, Fujisawa Y, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Matsubara Y, Yamauchi J, Ogata T. Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein-coupled receptor PROKR2 promotes early puberty. *J Cell Mol Med*. 2017 Oct;21(10):2623-2626.
8. Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, Baba T, Morohashi KI, Tajima T, Hata K, Nakabayashi K, Matsubara Y, Sekido R, Ogata T, Kashimada K, Fukami M. Identical *NR5A1* Missense Mutations in Two Unrelated 46,XX Individuals with Testicular Tissues. *Human mutat*. 38, pp39-42, 2017.
9. Fukami M, Suzuki E, Izumi Y, Torii T, Igarashi M, Miyado M, Katsumi M, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Matsubara Y, Yamauchi J, Ogata T. Paradoxical gain-of-function mutant of the G-protein coupled receptor PROKR2 promotes early puberty. *J Cell Mol Med*. 10.1111/jcmm.13146. 2017.
10. Hattori A, Zukeran H, Igarashi M, Toguchi S, Toubaru Y, Inoue T, Katoh-Fukui Y, Fukami M. A novel C-terminal truncating NR5A1 mutation in dizygotic twins. *Hum Genome Var*. 16: 17008 2017.

[雑誌論文](計 0件)

[学会発表](計 11件)

Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kanno J, Takada S, Miyado M, Tajima T, Sekido R,

Ogata T, Kashimada K, Fukami M. Identical NR5A1 missense mutations in two unrelated 46,XX individuals with testicular tissues. The 9<sup>th</sup> Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Pediatric Endocrine Society. 2016年11月

Hattori A, Kato-Fukui Y, Matsubara K, Igarashi M, Suzuki E, Nakamura A, Tanaka H, Nagasaki K, Muroya K, Horikawa R, Ida S, Tanaka T, Kamimaki T, Mitani M, Ogata T, Fukami M. The 9<sup>th</sup> Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Pediatric Endocrine Society. 2016年11月

Igarashi M, Takasawa K, Hakoda A, Kannno J, Takada S, Miyado M, Tajima T, Sekido R, Ogata T, Kashimada K, Fukami M. Identical NR5A1 missense mutations in two unrelated 46,XX individuals with testicular tissues.第50回日本小児内分泌学会学術集会 2016年11月

鈴木江莉奈、泉容子、鳥居知宏、五十嵐麻希、宮戸真美、勝見桃理、鳴海覚志、山内淳司、藤澤泰子、緒方勤、深見真紀。内分泌疾患の原因となる新たなGタンパク共役型受容体機能亢進メカニズムの解明。第50回日本小児内分泌学会学術集会 2016年11月

五十嵐麻希、高澤啓、箱田明子、菅野潤子、高田修治、乾雅史、宮戸真美、福井由宇子、鳴海覚志、田島敏広、秦健一郎、中林一彦、松原洋一、緒方勤、鹿島田健一、深見真紀。NR5A1は46,XX 精巢性分化疾患の新規責任遺伝子である。第39回日本分子生物学会 2016年12月

五十嵐麻希、高澤啓、箱田明子、菅野潤子、高田修治、乾雅史、宮戸真美、福井由宇子、鳴海覚志、田島敏広、秦健一郎、中林一彦、松原洋一、緒方勤、鹿島田健一、深見真紀。NR5A1は46,XX 精巢性分化疾患の新規責任遺伝子である。第39回日本小児遺伝学会学術集会 2016年12月

宮戸真美、乾雅史、五十嵐麻希、福井由宇子、玉野萌恵、緒方勤、高田修治、深見真紀。NR5A1ミスセンス変異 p.R92W はヒトとマウスに共通する46,XY 精巢形不全とヒト特異的46,XX 精巢形成を招く。第21回日本生殖内分泌学会 2017年1月

五十嵐麻希、金城健一、堀川玲子、緒方勤、深見真紀。46,XY 性分化疾患兄弟例におけるMAP3K1変異の同定。第62回日本人類遺伝学会 2017年11月

五十嵐麻希、金城健一、堀川玲子、緒方勤、深見真紀。Nonsense-associated altered splicing leading to a human disorder: Identification of MAP3K1 mutations in two brothers with 46,XY Disorders of sex development. 第40回日本分子生物学会 2017年12月

五十嵐麻希。ナンセンス随伴性プライス変更による46,XY 性分化疾患の発症。性スペクトラムー連続する表現型としての雌雄 第一回班会議 2018年1月

五十嵐麻希、金城健一、中尾美奈子、宮戸真美、堀川玲子、緒方勤、深見真紀。MAP3K1 遺伝子のナンセンス随伴性プライス変更による46,XY 性分化疾患の発症。性スペクトラムー連続する表現型としての雌雄 第二回班会議 2018年10月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://nr.ichd.ncchd.go.jp/endocrinology/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：高田修治

ローマ字氏名：(TAKADA shuji)

所属研究機関名：国立成育医療研究センター研究所

部局名：システム発生・再生医学研究部

職名：部長

研究者番号(8桁): 20382856

### (2)研究分担者

研究分担者氏名：深見真紀

ローマ字氏名：(FUKAMI, maki)

所属研究機関名：国立成育医療研究センター研究所

部局名：分子内分泌研究部

職名：部長

研究者番号(8桁): 40265872

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。