

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 7 日現在

機関番号：82686

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460427

研究課題名(和文) 性腺の分化・形成異常と悪性腫瘍の多段階的発症機構の分子病理学的解明

研究課題名(英文) The pathogenetic mechanism of gonadal dysgenesis and malignant germ cell tumours

研究代表者

福澤 龍二 (Fukuzawa, Ryuji)

東京都立小児総合医療センター(臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：40245543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、性の分化異常症の性腺の形態学的解析を通して、早期病理診断の確立と悪性腫瘍発症のメカニズムを解明することであった。今まで臨床診断が困難であったNR5A1異常症において、診断の決め手となる性腺の病理所見を明らかにした。性腺からの悪性腫瘍が発生する頻度が高いとされるWT1遺伝子異常と性染色体異常を伴った混合性性腺異形成の40症例の性腺を解析した。腫瘍発症の基盤となる未分化性腺組織や性腺芽腫の発生は見られたが、実際に癌化していた症例は無かった。本研究で社会的な性の早期決定に有用な病理診断法を開発した。また、性腺の腫瘍発症のリスクは実際には低いと予想され、過度な治療は控えるべきと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish pathological diagnostic methods for Disorders of Sexual Development (DSD) and to clarify the pathogenetic mechanism of tumorigenesis in DSD. We examined histologic features of gonads associated with NR5A1 mutations, StAR mutations, WT1 mutations, and mixed gonadal dysgenesis. We found that characteristic testicular histology is useful for the identification of mutations in the NR5A1 gene. We examined molecular and histological characteristics of 40 patients with DSD (5 Denys-Drash syndrome and 35 mixed gonadal dysgenesis) who predispose to malignant germ cell neoplasms. While gonadoblastomas were found in undifferentiated gonadal tissues, no germ cell tumors were detected. We established useful diagnostic methods for DSD patients to promptly and accurately determine their social gender. Our results indicate that the risk of developing germ cell tumor in DSD might be lower than it has been thought. Thus, excessive treatments should be avoided.

研究分野：人体病理学

キーワード：性分化異常 性腺芽腫 胚細胞腫瘍 混合性性腺異形成 真性半陰陽 WT1 SF1

#### 1. 研究開始当初の背景

性の分化異常症 (Disorders of Sexual Development, 以下 DSD) は、外性器・内性器の形態だけでは男性であるか女性であるか判然としない病態を包括した疾患概念であり、しばしば確定診断が困難である。臨床上の問題点は、1) 自己の identity が確立する3歳頃までに、社会的性の割当 (男児とするか女児とするか決定) を行い、外性器形成術が必要とされる。2) 性腺から悪性腫瘍の発生の危険が高いことから、性腺切除術が行われるが、DSD の中でも妊娠可能な症例も少なからずある。以上から、尚早かつ適切な診断法の確立および腫瘍化のメカニズムの解明が必要である。

#### 2. 研究の目的

(1) 近年社会的な認知・理解が必要とされる性の分化異常症の病理学的診断の確立。

(2) 性分化異常症の患者の性腺組織の分化・形成異常および泌尿器・生殖器系の癌発症メカニズムの病理学的に解明することをめざす。

#### 3. 研究の方法

(1) 性の分化異常を示す疾患 (男性仮性半陰陽および真性半陰陽) の内、先天性に遺伝子異常のある症例 Denys-Drash 症候群 (WT1 遺伝子変異) SF1 異常症 (NR5A1 遺伝子変異)、先天性リポイド副腎過形成症 (StAR 遺伝子変異) および混合性性腺異形成に対して遺伝子検索または染色体核型の検査でスクリーニングを行った。

(2) 性の分化異常症の病理学的診断  
生検または手術で摘出された性腺組織標本から、HE 標本を作成し病理形態学的な観察を行うとともに、変異の見られた遺伝子および染色体異常について免疫組織化学的検索 (WT1, SF1, StAR) および FISH (SRY, X, Y probe) による解析を行った。

(3) 性腺組織の分化・形成異常から癌化へのプロセス

生検または手術で摘出された性腺組織標本

から、HE 標本を作成し病理形態学的に性腺の分化発育の異常、性腺芽腫の形成、早期胚芽腫の発症について、免疫染色により胚細胞の成熟 (OCT3/4, CD117)、精巣のリネージ (SOX9)、卵巣のリネージ (FOXL2)、SRY タンパクの発現を検討した。

(4) 性分化異常症の泌尿器に見られる腫瘍発生

上記の(2)の生殖器の腫瘍に加えて、泌尿器系に見られる腫瘍の特徴を遺伝子発現プロファイルで解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 250 例の男性仮性半陰陽の性腺の組織像を解析し、SF1 異常症 (NR5A1 遺伝子の変異) に関連する特異な組織像を見出した。すなわち、NR5A1 の変異のある精巣は、著明な精細管の低形成と脂肪滴の貯留した Leydig 細胞が出現していた。SF1 異常症は、臨床的に診断の決め手となる特徴的な所見はなかったが、本研究で見出した性腺の組織所見から、NR5A1 遺伝子の変異を予知することが出来、SF1 異常症を診断できることを報告した (文献 1)。StAR 遺伝子に先天性変異のある先天性リポイド副腎過形成では、SF1 に類似した組織所見であるが性腺は脂肪滴を含んだ組織球の浸潤により腫大する点で両者が異なることを明らかにした (文献 2)。WT1 に異常のある症例の性腺は、病理組織学的に異形成性精巣 (dysgenetic testis) で本疾患に特異的組織所見ではなかった。

(2) 混合性性腺異形成 (Mixed gonadal dysgenesis, MGD) のリンパ球の基本的核型は、46XY/45X であるが、この核型を有する患者では診断は容易である。しかし、稀ながら 46XY のみの核型を有する症例があり診断に苦慮する。このような 46XY のみの核型の症例では、性腺組織において 45X の核型を持つ細胞も存在していることを FISH 法と蛍光多重染色により明

らかにした。また、MGD の患者の性腺を用いてソフトウェアを使った 45X 細胞の同定法 (MGD の診断法) を確立し報告した(文献 3)。

- (3) MGD としばしば鑑別が必要になる疾患として真性半陰陽がある。真性半陰陽は、近年 ovotesticular disorders of sexual development (ODSD) と呼ばれ、組織学的に分化した精巣および卵巣を有するものと定義されている。しかし、ODSD の中には、dysgenetic testis や未分化性腺組織 (streak gonad with epithelial cord-like structures) が含まれていることが明らかになった(文献 4)。ひとつの性腺組織の中に精巣と卵巣が混在する卵精巣では、卵胞上皮内に XY の核型を持つ細胞、精細管内には XX の XY の核型を持つ細胞が存在していることをヒトで初めて明らかにした。これらの性染色体が逆転している細胞は、精細管内ではセルトリ細胞に分化し、卵胞内で卵胞上皮に分化していることが、SOX9 および FOXL2 による免疫染色によって確認された。このことは、ヒトの性腺の形成は、性染色体だけでなく、局所環境の影響を受けることが明らかになった(文献 4)。
- 以上(1)(2)(3)では、性分化異常症の社会的性の早期決定に診断に役立つ正確な病理学的診断手法を開発した。

- (4) MGD の性腺を 35 性腺(23 名)のうち 4 例に性腺芽腫を認め、22 性腺が索状性腺であった。性腺芽腫は、腫瘍の前駆病変として知られるが、組織学的には形成異常の範疇であり、検索した検体では未分化性腺組織の中にその発症が見られた。過去の病理診断で早期胚芽腫 (early germinoma) と報告されていた 4 症例は、予期に反して実際には胚芽腫ではなく未分化性腺組織の一亜型 (streak gonad with epithelial cord-like structures)

であった。従って、MGD 症例では性腺芽腫から胚芽腫への進展は見られず、悪性所見は認められなかった。また、WT1 に変異のある Drash 症候群 5 例についても、MGD と同様に性腺芽腫から胚芽腫への進展は見られず、性腺の悪性化は認めなかった。胚細胞の OCT3/4 蛋白の発現は、性腺芽腫を伴う未分化性腺組織で高頻度に核内陽性像が見られる一方で、索状性腺では極めて低いことが明らかになった。このことから、OCT3/4 の発現が将来の腫瘍発生のリスクを高めることが予想された。本研究で、overdiagnosis が明らかとなった早期胚芽腫と未熟性腺組織の鑑別法についての詳細とこれによる過度な治療を避けることを警鐘するために英文雑誌への投稿を準備中である。

- (5) (4) の性分化異常の症例において性腺からの悪性化が見られなかったため、これらの患者の一部に発症した泌尿器系の胎児性腫瘍 (Wilms 腫瘍) について、発現プロファイルのデータを解析しその臓器発生と腫瘍化のプログラムを解析した。腫瘍は、間葉系幹細胞様 (中胚葉由来) のマーカー、WNT シグナルの亢進、腎臓の発生を示す分子的な特徴を持っていた。この結果を validation するために、免疫染色により発現しているタンパクの局在と発生学的な構造を確認した。これらの結果より、WT1 遺伝子の異常を持つ患者の腎臓腫瘍は、中間中胚葉と傍軸中胚葉の組織に分化する間葉系幹細胞を起源として発生することが示唆された。腫瘍が腎臓の発生のプログラムを展開していることを見出した点に意義があり、英文雑誌への投稿を準備している。

(文献)

1. [Nishina-Uchida N](#), [Fukuzawa R](#) et al. Characteristic testicular histology is useful for the identification of NR5A1

gene mutations in prepubertal 46,XY patients, Hormone Research in Paediatrics, 80(2):119-2

2. Ishii T, Fukuzawa R, Sato T, Muroya K, Adachi M, Ihara K, Igaki J, Hasegawa Y, Sato S, Mitsui T, Hasegawa T. Gonadal macrophage infiltration in congenital lipoid adrenal hyperplasia. Eur J Endocrinol. 75(2):127-32, 2016

3. Nishina-Uchida N, Fukuzawa R et al. Identification of X monosomy cells from a gonad of mixed gonadal dysgenesis with a 46,XY karyotype, Medicine, 94(14):e720

4. Nishina-Uchida N, Fukuzawa R, Ishii T, Anaka M, Hasegawa T, Hasegawa Y. The Distribution and Cellular Lineages of XX and XY Cells in Gonads Associated with Ovotesticular Disorder of Sexual Development, in press

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Nishina-Uchida N, Fukuzawa R, Ishii T, Anaka M, Hasegawa T, Hasegawa Y. The Distribution and Cellular Lineages of XX and XY Cells in Gonads Associated with Ovotesticular Disorder of Sexual Development, 査読あり, 印刷中

Ishii T, Fukuzawa R, Sato T, Muroya K, Adachi M, Ihara K, Igaki J, Hasegawa Y, Sato S, Mitsui T, Hasegawa T. Gonadal macrophage infiltration in congenital lipoid adrenal hyperplasia. European Journal of Endocrinology. 査読有り 175(2):127-32, 2016

Nishina-Uchida N, Fukuzawa R\*, Hasegawa Y, Morison IM Identification of X monosomy cells from a gonad of mixed gonadal dysgenesis with a 46,XY karyotype, Medicine, 査読有り, 94(14):e720

Nishina-Uchida N, Fukuzawa R\*, Numakura C, Suwanai AS, Hasegawa T, Hasegawa Y Characteristic testicular histology is useful for the identification

of NR5A1 gene mutations in prepubertal 46,XY patients, Hormone Research in Paediatrics, 査読有り 80(2):119-2

\* Corresponding author

〔学会発表〕(計 11 件)

石井智弘, 福澤龍二, 佐藤武志, 室谷浩二, 安達昌功, 井原健二, 井垣純子, 長谷川行洋, 佐藤清二, 三井俊賢, 長谷川奉延 先天性リポイド副腎過形成症における性腺リモデリングの病態解析日本小児科学会学術集会 2016年 5月 13-15日

Ryuji Fukuzawa The developmental programme for genesis of the "entire" kidney is recapitulated in Wilms tumour 2015年11月19日-21日 Paediatric Pathology Society Meeting Perth Australia

Aya Shimada, Masaki Takagi, Kentaro Miyai, Ryuji Fukuzawa, Yukihiro Hasegawa A Perioperative Change of Anti-Mullerian Hormone and E2 in a Patient with Sex Cord Tumour with Annular Tubules 2015年10月1日-3日 54<sup>th</sup> European Society for Paediatric Endocrinology, Barcelona, Spain

Noriko Nishina, Ryuji Fukuzawa, Tomohiro Ishii, Tomonobu Hasegawa, Yukihiro Hasegawa The localization of cells with XX and XY in gonadal tissues associated with ovotesticular disorder of sexual development with a 46,XX/46,XY karyotype 2015年 10月 1日-10月 3日 54<sup>th</sup> European Society for Paediatric Endocrinology, Barcelona, Spain

仁科 範子, 福澤 龍二, 石井 智弘, 長谷川 奉延, 長谷川 行洋 46,XX/46,XY の核型を持つ DSD 患者における性染色体と性腺組織の関連 2014年 11月 28日-29日 第24回臨床内分泌代謝 Update 大宮ソニックシティ

仁科 範子, 福澤 龍二, 長谷川 行洋  
混合性性腺異形成症における 45,X 細胞の同  
定と精巣・卵巣への分化異常 ~ 性逆転細胞  
と両性分化細胞の出現 ~

2014年9月25日-27日 第48回日本小児内  
分泌学会学術集会 アクトシティ浜松

島田綾, 宮井健太郎, 小森広嗣, 福澤龍  
二, 長谷川行洋 輪状細管を伴う性索腫瘍  
(Sex Cord Tumor with Annular Tubules)の  
周術期における AMH および Estradiol の  
変動

2014年9月25日-27日 第48回日本小児内  
分泌学会学術集会 アクトシティ浜松

Megumi Hatano, Ryuji Fukuzawa

Yukihiro Hasegawa Mosaicism Ratios of 45,X  
to 46,X IdicY Explained a Phenotype in a  
Case with Mixed Gonadal Dysgenesis

2014年9月19-22日 European Society for  
Paediatric Endocrinology, Dublin, Ireland

Ishii T, Fukuzawa R, Sato T, Muroya K,  
Adachi M, Ihara K, Igaki J, Hasegawa Y,  
Sato S, Mitsui T, Hasegawa T. Ovarian  
macrophage infiltration in adult women  
with congenital lipoid adrenal  
hyperplasia.

2014年6月21日-24日 16<sup>th</sup> International  
Congree of Endocrinology & the Endocrine  
Society 96<sup>th</sup> Annual Meeting, Chicago, USA

仁科 範子, 宮井 健太郎, 佐藤 裕之,  
福澤 龍二, 長谷川 行洋 混合性性腺異形  
成症の性腺組織における FISH 解析の有用性  
について

2014年1月24日-25日 第23回臨床内分泌  
代謝 Update 名古屋国際会議場

Noriko Nishina, Ryuji Fukuzawa,  
Chikahiko Numakura, Ayuko Suwanai,  
Tomonobu Hasegawa, Yukihiro Hasegawa  
Characteristic testicular histology is  
useful for the identification of *NR5A1*  
gene mutations in prepuberty 46, XY

patients

2013年9月19日-9月22日 9<sup>th</sup> Joint  
Meeting of Paediatric Endocrinology,  
Milan, Italy

〔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:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

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

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

福澤 龍二 ( Fukuzawa Ryuji )  
東京都立小児総合医療センター 臨床研  
究部・その他の部局等・その他  
研究者番号: 40245543

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

仁科 範子 ( Nishina Noriko )  
東京都立小児総合医療センター 臨床研  
究部・その他の部局等・その他  
研究者番号: 80649616