

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293224

研究課題名(和文)ゲノム解析に基づく性成熟疾患・性分化疾患の発症機序の解明

研究課題名(英文)Clarification of molecular basis of pubertal disorders and disorders of sex development

研究代表者

深見 真紀 (Fukami, Maki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40265872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：臨床検体の網羅的ゲノム解析によって、ヒト性成熟疾患・性分化疾患の新たな発症メカニズムを解明することを目的として研究を行った。
代表的成果は下記のとおりである。(i) ゴナドトロピン欠損症や非症候性尿道下裂における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新たな臨床スペクトラムを明確とした。(ii) 正常月経周期を認める女性において新規男性ホルモン産生経路が男性ホルモンの供給源として機能していることを明確とした。(iii) NR5A1遺伝子変異が遺伝的女性における精巣形成を招くことを初めて明らかとした。(iv) NROB1変異が、思春期早発症の原因となることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify novel causes of pubertal disorders and disorders of sex development (DSD), through systematic molecular analyzes of clinical samples. To this end, we employed various molecular technologies including next-generation sequencing (NGS), array-based comparative genomic hybridization (array CGH), microsatellite analysis, and pyrosequencing.
The results of this study include the following. (i) We clarified the contribution of each known causative gene to the etiology of gonadotropin deficiency and non-syndromic hypospadias. (ii) We determined the role of the backdoor pathway in the androgen production of eumenorrheic women. (iii) We identified a novel missense substitution of NR5A1 that induces testicular development in genetic females. (iv) We identified a protein truncating mutation of NROB1 that underlies precocious puberty.

研究分野：分子内分科学

キーワード：遺伝子 内分泌 疾患

1. 研究開始当初の背景

ヒト性成熟と性分化には、多数の遺伝子と環境要因が作用すると推測される。われわれは、先行研究で性成熟疾患・性分化疾患患者の遺伝子解析を行い、これらの患者の中で既知遺伝子変異が同定される症例は半数以下であることを見出した。このことから、これらの疾患には未知の因子の関与が大きいことが示唆された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代シーケンサーやアレイ comparative genomic hybridization を含む最新の遺伝子解析技術を用いた臨床検体の網羅的ゲノム解析によって、ヒト性成熟疾患・性分化疾患の新たな発症メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

国内外の臨床医や関連学会と連携し、性成熟疾患・性分化疾患患者の臨床サンプルを集積した。この検体を対象に、次世代シーケンサーを用いた既知疾患責任遺伝子と候補遺伝子の網羅的変異スクリーニング、アレイ comparative genomic hybridization (CGH) を用いた全ゲノムコピー数解析、パイロシーケンスを用いた包括的メチル化解析やマイクロサテライト解析などを行った。

次世代シーケンサーのバイオフィォマティクス解析には、先行研究で確立した独自のパイプラインを使用した。

4. 研究成果

代表的成果は下記のとおりである。

- 1). ゴナドトロピン欠損症患者を対象とした既知責任遺伝子のターゲットリシーケンスおよびアレイ CGH による全ゲノムコピー数解析を行い、58 例中 14 例において明らかな病的遺伝子変異を同定した。まれな遺伝子異常として、複合型下垂体機能低下症患者における *WDR11* スプライス変異、単独ゴナドトロピン欠損症患者における *FGFR1* 欠失と *SOX3* ポリアラニン欠失を同定した。これによって、日本人患者における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新たな臨床スペクトラムが明確となった。
- 2). 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見出した。陰茎部開口尿道下裂を呈する比較的軽度な症例においても、病的単一遺伝子変異が存在することが明らかとなった。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。

- 3). 尿道下裂患者 1 例において、新規 *MAMLD1* スプライス変異を同定し、この変異が細胞内翻訳障害を招く可能性を見出した。これによって、*MAMLD1* 変異が機能低下蛋白の形成、nonsense-mediated mRNA decay のみならず、発現蛋白量の低下を介して性分化疾患を招くことが明らかとなった。
- 4). 8 番染色体父性片親性アイソダイソミーにより *CYP11B1* 遺伝子劣性変異が顕在化し、11 水酸化酵素欠損症が発症した症例を同定した。常染色体劣性疾患の発症機序のひとつとして、片親性アイソダイソミーによる劣性変異顕在化の可能性を考慮する必要性を明確とした。
- 5). 明らかな campomelic dysplasia 骨変形を伴わない 46,XY 性分化疾患患者 3 例において *SOX9* 遺伝子ミスセンス変異と遺伝子上流微小欠失を同定し、*SOX9* 異常症の新たな表現型を明らかとした。また、*SOX9* の精巢特異的遠位エンハンサーのゲノム上の位置を限局化した。
- 6). *SOX10* 遺伝子異常症患者の遺伝学および臨床解析に基づき、本症の主病変が視床下部であること、本症が優性阻害効果でなく半量不全によって発症すること、*SOX10* 変異が明らかな Waardenburg 徴候を伴わないゴナドトロピン欠損症の原因となることを明らかとした。
- 7). 非症候性尿道下裂患者におけるゲノムコピー数解析を行い、本症発症における Y 染色体微細構造多型の寄与は限定的であることを明確とした。
- 8). 正常月経周期を認める女性において新規男性ホルモン産生経路 backdoor pathway 由来代謝産物の定量を行い、この経路が男性ホルモンの供給源として機能していることを明確とした。
- 9). 先天奇形を伴う 46,XY 性成熟疾患患者 1 例において 4 番、7 番、X 染色体の複雑構造異常を同定し、これらの染色体上に疾患関連遺伝子が存在する可能性を見出した。
- 10). 原因不明の 46,XX 性分化疾患患者の全エクソーム解析によって、血縁関係のない 2 例に *NR5A1* 遺伝子の同一ミスセンス変異 p.R92W を同定した。さらに in vitro 発現実験によってこの *NR5A1* 変異体が *NR0B1* による抑制を逃れることで未分化性腺における *SOX9* 過剰発現を招く可能性を見出した。本研究により、単一遺伝子のミスセンス変異が遺伝的女性における精巢形成を招きうることが初めて明らかとなった。
- 11). 合併症のない思春期早発症を呈する男児

1例でNR0B1フレームシフト変異を同定した。この成績は、NR0B1のN末端欠失変異タンパクが、副腎機能低下を伴わない性早熟を招く可能性を示唆する。変異陽性患者では、ゴナドトロピン依存性および非依存性に性早熟が生じると推測される。

- 12). 思春期遅発症を呈する男性患者でKAL1遺伝子を包含するXp22.31領域の染色体微細欠失を同定した。切断点の構造解析によって、このようなゲノム微細構造異常が microhomology-mediated break-induced replication の機序で生じること、および、隣接遺伝子欠失症候群の1症状としてのゴナドトロピン欠損症を招くことを見出した。
- 13). 明らかな眼球形成異常のないゴナドトロピン欠損症患者でSOX2フレームシフト変異を同定した。これにより、SOX2異常症の新規表現型スペクトラムが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 16 件)

- 1). Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 102(4): 1130–1136. 2014
- 2). Katsumi M, Ishikawa H, Tanaka Y, Saito K, Kobori Y, Okada H, Saito H, Nakabayashi K, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Miyado M. Microhomology-Mediated Microduplication in the Y Chromosomal Azoospermia Factor a (AZFa) Region in a Male with Mild Asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res*. 144(4): 285–289, 2015
- 3). Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Kohri K, Ogata T, Fukami M. Novel Splice Site Mutation in MAMLD1 in a Patient with Hypospadias. *Sex Dev*. 9(3): 130–135 2015
- 4). Saito K, Miyado M, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Katsumi M, Saito H, Kubota T, Okada H, Ogata T, Fukami M. Copy-Number Variations in Y Chromosomal Azoospermia Factor Regions Identified by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. *J*

- Hum Genet*. 60(3): 127–131, 2015
- 5). Izumi Y, Musha I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, Ogata T, Fukami M, Ohtake A. Hypogonadotropic hypogonadism in a female patient previously diagnosed as having Waardenburg syndrome due to a *SOX10* mutation. *Endocrine*. 49(2): 553–556, 2015
- 6). Igarashi M, Mikami H, Katsumi M, Miyado M, Izumi Y, Ogata T, Fukami M. *SOX3* Overdosage Permits Normal Sex Development in Females with Random X Inactivation. *Sex Dev*. 9(3): 125–129, 2015
- 7). Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: Systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. *Hum Reprod*. 30(3): 499–506, 2015
- 8). Kon M, Saito K, Mitsui T, Miyado M, Igarashi M, Moriya K, Nonomura K, Shinohara N, Ogata T, Fukami M. Copy-Number Variations of the Azoospermia Factor Region or *SRY* Are Not Associated with the Risk of Hypospadias. *Sex Dev*. 10(1): 12–15, 2016
- 9). Saito K, Matsuzaki T, Iwasa T, Miyado M, Saito H, Hasegawa T, Homma K, Inoue E, Miyashiro Y, Kubota T, Irahara M, Ogata T, Fukami M. Steroidogenic pathways involved in androgen biosynthesis in eumenorrheic women and patients with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 158: 31–37, 2016
- 10). Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nagasaki K, Horikawa R, Nagai T, Tsuchiya T, Suzuki E, Miyado M, Hata K, Nakabayashi K, Hayashi K, Matsubara Y, Baba T, Morohashi K, Igarashi A, Ogata T, Takada S, Fukami M. Testicular Dysgenesis/Regression without Campomelic Dysplasia in Patients Carrying Missense Mutations and Upstream Deletion of *SOX9*. *Mol Genet Genom Med*. 3(6): 550–557, 2016
- 11). Suzuki E, Izumi Y, Chiba Y, Horikawa R, Matsubara Y, Tanaka M, Ogata T, Fukami M, Naiki Y. Loss-of-Function *SOX10* Mutation in a Patient with Kallmann Syndrome, Hearing Loss, and Iris Hypopigmentation. *Horm Res Pediatr*. 84(3): 212–216, 2015
- 12). Okuno M, Ogata T, Nakabayashi K, Urakami T, Fukami M, Nagasaki K. Endocrinopathies in a Boy with Cryptic Copy-number Variations on 4q, 7q, and Xp. *Hum Genome Variat*. 2:15020, 2015
- 13). Hattori A, Zukeran H, Igarashi M, Toguchi S, Toubaru Y, Inoue T, Katoh-Fukui Y,

- Fukami M. A novel C-terminally truncating *NR5A1* mutation in dizygotic twins. *Hum Genome Variat.* 4:17008, 2017
- 14). Nagai K, Shima H, Kamimura M, Kanno J, Suzuki E, Ishiguro A, Narumi S, Kure S, Fujiwara I, Fukami M. Xp22.31 microdeletion due to microhomology-mediated break-induced replication in a boy with contiguous gene deletion syndrome. *Cytogenet Genome Res* 2017 [Epub ahead of print]
 - 15). Shima H, Yatsuga S, Nakamura A, Sano S, Sasaki T, Katsumata N, Suzuki E, Hata K, Nakabayashi K, Momozawa Y, Kubo M, Okamura K, Kure S, Matsubara Y, Ogata T, Narumi S, Fukami M. NR0B1 Frameshift Mutation in a Boy with Idiopathic Central Precocious Puberty. *Sex Dev.* 10(4): 205–209, 2016
 - 16). 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. *Hum Mutat* 38(1): 39–34, 2017
- [学会発表] (計 8 件)
- 1). 深見真紀. 先天性疾患の遺伝子診断. 日本人類遺伝学会ランチョンセミナー 平成 26 年 11 月 22 日, 船堀
 - 2). 深見真紀. 性分化疾患の遺伝子診断と遺伝カウンセリング. 第 68 回福井臨床遺伝研究会, 福井, 2015.7.27
 - 3). 深見真紀. 性分化疾患の遺伝子診断. 第 88 回日本内分泌学会学術総会シンポジウム, 東京, 2015.4.25
 - 4). 深見真紀. Year Book 性分化疾患. 第 49 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2015.10.9
 - 5). Igarashi M, Izumi Y, Kon M, Kato-Fukui Y, Suzuki E, Wada Y, Miyado M, Ogata T, Fukami M. Systematic mutation analysis of patients with disorders of sex development. Seventh international symposium in the biology of vertebrate sex determination, Hawaii, 2015.4.15
 - 6). 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 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society, Tokyo, 2016.11.18
 - 7). Shima H, Yatsuga S, Nakamura A, Sano S, Sasaki T, Katsumata N, Suzuki E,

- Ogata T, Narumi S, Fukami M. NR0B1 Frameshift Mutation in a Boy with Precocious Puberty and Normal Adrenal Function. The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society, Tokyo, 2016.11.18
- 8). Nagai K, Shima H, Kamimura M, Kanno J, Fujiwara I, Suzuki E, Narumi S, Ishiguro A, Fukami M. X chromosomal deletion due to microhomology-mediated break-induced replication in a boy with Xp22.3 contiguous gene deletion syndrome: Implications for novel genomic defects leading to Kallmann Syndrome. The 9th Biennial Scientific Meeting of the Asia Pacific Paediatric Endocrine Society, Tokyo, 2016.11.18

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 件)
該当なし

取得状況 (計 件)
該当なし

[その他]

ホームページ等

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
<http://nrchd.ncchd.go.jp/endocrinology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

深見真紀 (Fukami, Maki)

国立成育医療研究センター・分子内分 泌 研 究 部・部長

研究者番号: 40265872

(2)研究分担者

小島祥敬 (Kojima Yoshiyuki)

福島県立医科大学泌尿器科 教授

研究者番号: 60305539

(3)研究協力者

五十嵐 麻希 (IGARASHI, Maki)

国立成育医療研究センター・分子内分 泌 研 究 部・研究員

研究者番号: 10623035