

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15433

研究課題名(和文)性同一性障害当事者の全エクソーム解析によるバイオマーカー開発の基盤構築

研究課題名(英文)Development of biomarker related to gender dysphoria (gender identity disorder) based on whole exome sequencing analysis.

研究代表者

仲地 豊 (NAKACHI, Yutaka)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10522097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は性同一性障害(GID)当事者ゲノムの全遺伝子のうち、エクソン領域を対象とした全エクソーム解析による研究計画であった。しかし海外の研究グループから性同一性障害と関連が示唆されるエクソン領域以外の多型が報告された。当初予定していた全エクソーム解析ではエクソン領域近傍100bp程度の範囲までしか変異・多型を検出することができないため、手法を当初の計画から変更し全ゲノム解析に移行して再解析をする必要があった。予備解析でイントロン領域や遺伝子間領域にみられる反復配列多型の検出も全ゲノム解析で十分可能であったため、手法を変更して10例のGID当事者サンプルについて全ゲノム解析をおこなった。

研究成果の概要(英文)：This research project was a research plan based on whole-exome analysis of the Gender Identity Disorder/Gender Dysphoria (GID) genome DNA. However, several polymorphisms other than the exon region, which are implied to be related to gender identity disorder, have been reported from foreign research groups. Since it is not possible to detect variants and polymorphisms only up to the flanking range of about 100 bp of the exon region with the original plan, it is necessary to change the method to the whole-genome sequencing analysis and re-analyze our samples. Detection of repetitive sequence polymorphisms found in intron regions and intergenic regions by preliminary analysis was also feasible enough for whole-genome analysis, therefore total genome analysis was performed on ten GID samples by changing the method.

研究分野：分子生物学、ゲノム科学、バイオインフォマティクス

キーワード：性同一性障害 性別違和 全エクソーム解析 全ゲノム解析 変異・多型

1. 研究開始当初の背景

(1) 性同一性障害 (Gender Identity Disorder または性別違和 Gender Dysphoria; 以下GID)当事者は心と身体の性別が一致しない状態にある。当事者は就学前から強い性別違和を抱え、希死念慮は7割以上に及ぶ。GID 診断には複数の精神科医による長期的問診を要し、当事者へのケアの遅れは著しいQOL低下を招く。しかし迅速診断可能なマーカーは見つかっていない。

(2) ヒトやマウスの脳の分界条床核などには性差があり、GID 当事者の分界条床核の特徴は身体の性別より心の性別に一致する。そのためGIDには生物学的機序が予想されている。またヒトを含む哺乳類の脳の性分化機構は進化的に保存されている。特に胎生期または新生仔期の脳が性ホルモンに曝露することで脳の性分化がおり、分界条床核などの性差や思春期後の性行動が決まる。そのためヒトGID機序でも性ホルモンの役割が示唆される。しかし性ホルモン受容体や性ホルモン代謝酵素に着目した関連解析からは強く関連する変異・多型の発見に至っていない。強い家族内集積性や双生児解析・同胞解析からGIDの遺伝的背景の指摘もあるが、遺伝率や遺伝様式は不明である。

(3) われわれのこれまでの研究で、性ホルモンにより脳の性分化を逆転させたマウスの脳では、300以上の遺伝子の発現変化が誘導されることが示された(仲地ら2015、引用文献)。そのためGIDバイオマーカー探索には、網羅的な同定法が必要となる。ゲノム中の全エクソンに存在する多型や変異を同定できるエクソーム解析により、GID当事者ゲノムにみられる遺伝子変異・多型を検出することでバイオマーカー発見に重要な知見が得られるとわれわれは着想した。

<引用文献>

Nakachi Y, Iseki M, Yokoo T, Mizuno Y, Okazaki Y. Gene expression profile of the neonatal female mouse brain after administration of testosterone propionate. *J Sex Med.* 2015;12(4):887-896. doi:10.1111/jsm.12802.

2. 研究の目的

本研究では性同一性障害当事者サンプルによる全エクソーム解析によりGIDに関連する多型・変異を網羅的に同定することを目的とした。またバイオインフォマティクス解析による統合解析から生物学的背景を考慮したGIDバイオマーカー開発を目指し、客観的な診断基準やリスク評価の構築へと展開するための基盤構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) GIDの確定診断がなされた日本人GID当事者から血液検体を収集して得られたゲノムDNAサンプルをもちいて、全エクソン領域DNA断片をオリゴキャプチャーにより濃縮して全エクソーム解析に用いた。または全ゲノム解析としてゲノム全領域をサンプルとして用いる。超並列高速シーケンサー(次世代シーケンサー)で配列決定をおこなった。得られたDNA配列をヒト参照ゲノム配列(hg19、hg37)にBWA(Burrows-Wheeler Aligner、引用文献)にてマッピングをおこなった。得られたマッピング結果をもちいて、GATK(引用文献)によりデータ処理後、公共データベース情報(RefSeq、Ensembl)を利用して、非同義置換、挿入・欠失などタンパク質の構造や機能に変化をもたらす変異・多型を網羅的に同定した。その際、日本人ゲノムに特異的なデコイ配列(ToMMo decoyJRGv1)も組み込むことでより正確なマッピングを目指した。

(2) 同定した変異・多型について、同定した変異・多型から、GID当事者群で濃縮される変異・多型を抽出した。特に脳で発現する遺伝子や脳の性決定期に脳で発現変化する遺伝子(仲地ら*J Sex Med.* 2015、引用文献)にも着目した。上記以外の遺伝子が関連する可能性も考慮し、性ホルモン代謝経路やホルモンシグナル経路などの遺伝子注釈データにも着目する。またバイオインフォマティクス解析からも、有力な変異候補を抽出する。遺伝子近傍配列を利用した性ホルモン受容体標的遺伝子予測解析をおこない候補遺伝子を探索する。公共データベースの発現解析・ChIP-seq解析情報も積極的に活用する。またアレル頻度情報(1000 genomes、dbSNP、ExAC、ToMMo 1KJPN)などから、アジア・日本人集団内でのアレル頻度にも着目する。

<引用文献>

BWA <http://bio-bwa.sourceforge.net>

GATK <https://software.broadinstitute.org/gatk/>

4. 研究成果

(1) 本研究課題は性同一性障害(性別違和、以下GID)当事者ゲノムの全遺伝子のうち、RNAに転写されるエクソン領域やタンパク質に翻訳されるコード領域を対象とした全エクソーム解析を手法とした研究計画であった。しかし遺伝子近傍やイントロン領域など、海外の研究グループからエクソン領域以外にみられる反復配列の多型がGIDと関連することを示唆する報告があった(引用文献)。本研究課題が当初予定していた全エクソーム解析ではエクソン領域以外の配列は近傍100bp程度の範囲までしか変異・多型を検出することができず、報告されている遺伝子間領域などに存在する変異・多型が存在し

ていたとしても確認することができない。またまた既報領域以外にも同様の変異・多型が複数存在していると予想され、今後は全ゲノム領域についての配列決定が必須になることから、手法を当初の計画から変更し全ゲノム解析に移行して再解析をする必要があった。そこで予備解析として既存サンプルをもちいて全ゲノム解析をおこない検証した。その結果、イントロン領域や遺伝子間領域にみられる反復配列多型の検出も十分可能であると判断したため、2016年度より手法を変更し、10例のGID当事者サンプルについて全ゲノム解析をおこなった。その際に参照ゲノムを最新の配列(hg19からhg38に)にアップデートし、既報の関連領域や、これまでに取得していたエクソーム解析の結果や実験動物をもちいた発現解析などのデータをバイオインフォマティクスの再統合して検証した。

(2) これまで海外のグループから報告されたGID関連座位の多型について検証したところ、いずれも日本人では高頻度で同定される多型であることがわかった。また性分化疾患の原因遺伝子としてすでに知られている座位も多くみられた。また、今回同定した変異・多型については、仲地ら(*J Sex Med* 2015、引用文献、上記参照)の発現解析データと顕著に一致する遺伝子はみられなかった。

(3) これまでに海外グループから報告されている座位が直接GIDの生物学的機序に関係してくるとは上記結果から考えにくい。また非コードRNA転写やエピジェネティクスなどのオミックス情報との統合解析も今後必要になると考えられる。引き続きサンプルを追加し解析を続ける予定である。現在、本研究課題にて得られた解析データを元に原著論文の投稿を準備している。

<引用文献>

Fernández R, Esteva I, Gómez-Gil E, Rumbo T, Almaraz MC, Roda E, Haro-Mora J-J, Guillamón A, Pasaro E. The (CA)_n polymorphism of ER gene is associated with FtM transsexualism. *J Sex Med.* 2014;11(3):720-728. doi:10.1111/jsm.12398.

Fernández R, Cortés-Cortés J, Esteva I, Gómez-Gil E, Almaraz MC, Lema E, Rumbo T, Haro-Mora J-J, Roda E, Guillamón A, Pasaro E. The CYP17MspA1 Polymorphism and the Gender Dysphoria. *J Sex Med.* 2015;12(6):1329-1333. doi:10.1111/jsm.12895.

Cortés-Cortés J, Fernández R, Teijeiro N, Gómez-Gil E, Esteva I, Almaraz MC, Guillamón A, Pasaro E. Genotypes and

Haplotypes of the Estrogen Receptor Gene (ESR1) Are Associated with Female-to-Male Gender Dysphoria. *J Sex Med.* 2017;14(3):464-472. doi:10.1016/j.jsexm.2016.12.234.

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

ポスター発表：GID(性同一性障害)学会第19回研究大会(2017/3/19、札幌医科大学、北海道札幌市)「性同一性障害当事者DNAをもちいた全エクソーム解析」仲地 豊, 金沢 徹文, 康 純, 岡崎 康司

ポスター発表：第39回日本分子生物学会年会(2016/11/30、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)「性別違和(性同一性障害)関連遺伝子の探索：マウス発現解析とヒトエクソーム解析によるアプローチ」仲地 豊, 金沢 徹文, 伊関 美緒子, 横尾 友隆, 水野 洋介, 康 純, 米田 博, 岡崎 康司

口頭発表：GID(性同一性障害)学会第18回研究大会(2016/3/19、日本教育会館、東京都千代田区)「超並列高速シーケンサーによる性同一性障害当事者ゲノムDNAをもちいた全エクソーム解析」仲地 豊, 金沢 徹文, 康 純, 岡崎 康司

ポスター発表：BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)(2015/12/2、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市)「性別違和(性同一性障害)関連遺伝子の探索：マウス発現解析とヒトエクソーム解析によるアプローチ」仲地 豊, 金沢 徹文, 伊関 美緒子, 横尾 友隆, 水野 洋介, 康 純, 米田 博, 岡崎 康司

口頭発表：第35回日本性科学学会学術講演会(2015/10/10、埼玉県県民健康センター、埼玉県さいたま市)「新生仔雌マウス脳での遺伝子発現解析による性別違和(性同一性障害)関連遺伝子の探索」仲地 豊, 伊関美緒子, 横尾友隆, 水野洋介, 岡崎康司

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div07_TR/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲地 豊 (NAKACHI, Yutaka)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：10522907

(2) 研究分担者

金沢 徹文 (KANAZAWA, Tetsufumi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：20534100

(3) 連携研究者

康 純 (KOH, Jun)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40257853

岡崎 康司 (OKAZAKI, Yasushi)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：80280733

(4) 研究協力者

なし