

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2005～2008

課題番号：17390294

研究課題名 (和文) 性分化異常症の網羅的な病因・病態の解明

研究課題名 (英文) Comprehensive investigation of etiology and pathophysiology of disorders of sex development (DSD).

研究代表者

藤枝 憲二 (FUJIEDA KENJI)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：60173407

研究成果の概要：

ヒト性分化異常症 (disorders of sex development; DSD) の病因・病態の解明を目的に以下の研究を行った。

- 候補遺伝子アプローチにより 46, XY DSD を対象に遺伝子解析を行った。その結果、WT1 遺伝子に既知の変異を、SOX9、AR、Ad4BP/SF-1 にそれぞれ新規遺伝子変異を同定した。このうち Ad4BP/SF-1 変異は副腎不全を伴わない精巣形成不全患者において同定された。
- DSD のなかで最も頻度が高いステロイドホルモン産生異常症についての成因探索を目的に、先天性リポイド過形成症の病因である StAR 蛋白と、X 連鎖性先天性副腎低形成症の原因である DAX-1/AHC についてヒト副腎 cDNA ライブラリーを作成し、それぞれの相互作用因子についてのスクリーニングを yeast two-hybrid システムを用いて行った。その結果、候補因子をそれぞれ 3 種、30 種同定した。現在各候補因子についてその病因的意義を検討している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	4,000,000	0	4,000,000
2006 年度	4,000,000	0	4,000,000
2007 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	15,000,000	2,100,000	17,100,000

研究分野：小児内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：性分化異常症 (DSD)、yeast two-hybrid screening、先天性リポイド過形成症、先天性副腎低形成症、StAR、DAX-1/AHC、相互作用因子

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト性分化機構の全体像の解析にはほど遠い現状にある。このためヒト性分化異常症を対象にした病因・病態に関する研究は、その性分化機構に関連した機序を明らかにす

る可能性がある。

## 2. 研究の目的

性分化異常に関連する疾患の病因・病態の

説明を目指し、以下の検討を行う。

- ・ 46, XY 性転換症例における候補原因遺伝子の変異解析ならびに変異体機能解析
- ・ 尿道下裂症例における候補原因遺伝子の変異解析ならびに変異体機能解析
- ・ 46, XY 性転換を合併する屈曲肢異形成症の原因遺伝子である SOX9 の細胞内局在に関する検討
- ・ マウス胎仔生殖腺分化過程における Sox9 細胞内局在の変化に関与する機能修飾因子同定の試み
- ・ 性分化異常症を合併する先天性副腎ステロイドホルモン産生異常症の原因遺伝子である StAR, DAX-1/AHC と相互作用する新規因子の同定

### 3. 研究の方法

- (1) 46, XY DSD 症例における候補原因遺伝子の変異解析ならびに変異体機能解析：既に原因遺伝子として同定されている SRY, SOX9, WT1, Ad4BP/SF-1, StAR, CYP21, CYP11A, ATRX や、動物実験などから報告される候補因子 (Emx-2, Dmrt-1, Lhx9, M33 など) について直接シーケンス法等の手法を用いて遺伝子解析を行う。また、研究期間中に新たな候補因子の報告があれば即座に遺伝子解析を行えるような体制を組み立てる。その結果、遺伝子変異が認められた場合には可能な限り機能解析の実験系を組み立て、病態との関連や臨床型との相関などについての解析を進める。
- (2) 性分化異常症を合併する先天性副腎ステロイドホルモン産生異常症の原因遺伝子である StAR, DAX-1 と相互作用する新規因子の同定：yeast two-hybrid システムを用いてヒト副腎の cDNA ライブラリーでスクリーニングを行う。そのスクリーニングにおいて発見されたタンパクについては各因子との相互作用の再確認を行い、さらに生体内組織における時間的・空間的発現プロフィール、細胞内発現局在などを確認し、そのタンパクの性分化機構に関する機能解析に迫る。さらに、有望な相互作用因子を同定できた場合には、ノックアウトマウスの作出も考慮に入れる。

### 4. 研究成果

- (1) 46, XY DSD 症例における候補原因遺伝子の変異解析ならびに変異体機能解析：
  - ① Denys-Drash 症候群と診断された症例において WT1 遺伝子のエクソン 8 に既知のナンセンス変異 p. R362X をヘテロ接合性に同定した。
  - ② 完全型アンドロゲン不応症と診断された同胞例においてアンドロゲン受容体 (AR)

遺伝子のエクソン 1 に 37 塩基の欠失 (c. 1307\_1343del) を同定した。同定した AR 遺伝子の変異はこれまでのところ報告のない新規変異であった。37 塩基の欠失であることからその後フレームシフトをおこし、コドン 465 が終止コドンへと変化することから、転写因子としての機能を喪失することが容易に予想された。また、他の 1 例において AR の DNA 結合に重要な領域である Zn フィンガーモチーフ内に新たなミスセンス変異 (p. H570Q) を同定した。

- ③ 屈曲肢異形成症と診断された症例において SOX9 遺伝子に新規変異を 2 種類同定した。どちらも 1 塩基の挿入変異であり、c. 259\_260insG (exon1) と、c. 887\_888insC (exon3) であった。
- ④ 副腎不全を呈さない性分化異常症患者 5 名について転写因子 Ad4BP/SF-1 の遺伝子解析を行ったが、遺伝子異常は見出せなかった。しかし、精巣形成不全のみで副腎不全のない患者 1 例において機能喪失を示すミスセンス変異 p. V41G を同定した。
- ⑤ SOX9 細胞内局在および機能修飾因子同定に関する研究は方法論に難しさがあり進展していない。
- (2) 性分化異常症を合併する先天性副腎ステロイドホルモン産生異常症の原因遺伝子である StAR, DAX-1/AHC と相互作用する新規因子の同定：
  - ① StAR 相互作用因子に関する研究：リポイド過形成症の病因である StAR 蛋白との相互作用因子についてのスクリーニングを、作成したヒト副腎 cDNA ライブラリーを用いて yeast two-hybrid システムを利用して計 3 回行い、最終的に候補因子が 3 種に絞られた。しかし、これまでの報告からその発現やステロイド産生に関連する情報について検討した結果、いずれも有望な因子とは思えないものであった。
  - ② DAX-1/AHC 相互作用因子に関する研究：X 連鎖性先天性副腎低形成症の病因である DAX-1/AHC との相互作用因子についてのスクリーニングを、作成したヒト副腎 cDNA ライブラリーを用いて yeast two-hybrid システムを利用して行い、候補因子が 30 種に絞られた。現在それらの病因的意義について、DAX-1/AHC の転写抑制効果に与える影響に関してと、発現の局在関連性に関しての検討を行っている。

### 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 19 件)

- 1) Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai

- T, Hanaki K, Uematsu A, Ishii T, Numakura C, Sawada H, Nakacho M, Kowase T, Motomura K, Haruna H, Nakamura M, Ohishi A, Adachi M, Tajima T, Hasegawa Y, Hasegawa T, Horikawa R, Fujieda K, Ogata T: Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: Identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab.* (有)2009 in press
- 2) Tajima T, Fujiwara F, Fujieda K: A novel heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) gene (NR5A1) in a 46, XY disorders of sex development (DSD) patient without adrenal failure. *Endocr J* (有) 2009 in press
- 3) Okuhara K, Abe S, Kondo T, Fujita K, Koda N, Mochizuki H, Fujieda K, Tajima T: Four Japanese patients with adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism caused by DAX-1 gene mutations: mutant DAX-1 failed to repress steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and luteinizing hormone beta-subunit gene promoter activity. *Endocr J.* (有) 55; 2008; 97-103
- 4) 藤枝憲二: 先天性副腎低形成、日本内科学会誌、(無) 97; 2008; 736-742
- 5) 緒方勤、堀川玲子、長谷川奉延、位田忍、向井徳男、安達昌功、有坂治、藤枝憲二: 性分化異常症の管理に関する合意見解、日本小児内分泌学会性分化委員会報告、日本小児科学会雑誌、(無) 112; 2008; 565-578
- 6) 藤枝憲二: DAX-1 異常症、最新医学、(無) 62; 2007; 1241-1247
- 7) 藤枝憲二: 性分化異常症の診断と治療—特に先天性副腎過形成症を中心に、日本小児泌尿器科学会雑誌、(無) 16; 2007; 125-129
- 8) Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA, LWPES/ESPE Consensus Group (Fujieda K, et al): Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child.* (有) 91; 2006; 554-563
- 9) 藤枝憲二、勝又規行: SCC異常症、ホルモンと臨床、(無) 54; 2006; 61-64
- 10) 藤枝憲二: 先天性副腎過形成症、新領域別症候群シリーズ No. 1、内分泌症候群(第2版)、別冊日本臨床、(無)2006; pp673-676
- 11) 藤枝憲二: リポイド過形成症、新領域別症候群シリーズ No. 1、内分泌症候群(第2版)、別冊日本臨床、(無) 2006; pp692-695
- 12) 藤枝憲二: 20, 22 デスマラーゼ欠損症、新領域別症候群シリーズ No. 1、内分泌症候群(第2版)、別冊日本臨床、(無) 2006; pp696-698
- 13) 藤枝憲二: 副腎性器症候群、新領域別症候群シリーズ No. 2、内分泌症候群(第2版)、別冊日本臨床、(無) 2006; pp643-646
- 14) 鈴木滋、藤枝憲二: ステロイドサルファターゼ欠損症、新領域別症候群シリーズ No. 3、内分泌症候群(第2版)、別冊日本臨床、(無) 2006; pp494-496
- 15) Fujieda K, Tajima T: Molecular basis of adrenal insufficiency. *Pediatr Res.* (有) 57; 2005: 62R-69R
- 16) Franzese A, Brunetti-Pierri N, Spadaro R, Mukai T, Valerio G: Inappropriate tall stature and renal ectopy in a male patient with X-linked congenital adrenal hypoplasia due to a novel missense mutation in the DAX-1 gene. *Am J Med Genet.* (有)135A; 2005; 72-74
- 17) 藤枝憲二、田島敏広、向井徳男: 先天性副腎皮質ステロイド合成異常症の分子基盤、医学の歩み、(無) 213; 2005; 401-407
- 18) 藤枝憲二、向井徳男: 先天性副腎過形成症、周産期医学、(無) 35; 2005; 1245-1248
- 19) 藤枝憲二: 副腎ステロイド合成酵素異常症の診断基準・病型分類・重症度、内科、(無) 95; 2005; 1835-1839
- [学会発表] (計 24 件)
- 1) Sugawara T, Kudo M, Fujieda K, Sakuragi N: Congenital lipoid adrenal hyperplasia with bilateral ovarian endometrioma. 41st Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, May 27-30, 2008, Kailua-Kona, USA
- 2) Fujieda K: Disorders of steroidogenesis, other than 21-hydroxylase. ENDO 2007 Meet-the-Professor Session, June 2-5, 2007, Toronto, Canada
- 3) Sugawara T, Hoshi N, Fujieda K: Steroidogenic acute regulatory protein-binding protein is associated with apoptosis and controls steroidogenesis. ENDO 2007, June 2-5, 2007, Toronto, Canada
- 4) 田島敏広、藤枝憲二: P450 oxidoreductase (POR) 欠損症の遺伝子診断、第 17 回臨床内分泌 Update、平成 19 年 3 月 10 日、東京
- 5) 藤枝憲二: 性分化異常症の診断と治療—特に先天性副腎過形成症を中心に—、第 16 回日本小児泌尿器科学会総会、平成 19 年 7 月 14 日、神戸
- 6) 田島敏広、石津桂、藤枝憲二: NR5A1 遺伝子異常 (Ad4/BP) による精巣形成不全の

- 1 例、第 15 回日本ステロイドホルモン学会学術集会、平成 19 年 11 月 24 日、仙台
- 7) Fujieda K: Congenital adrenal disorders: From newborn screening to molecular mechanism. LWPES Trans-Pacific Lecture, Pediatric Academic Societies' 2006 Annual Meeting, April 29-May 2, 2006, San Francisco, USA
- 8) Fujieda K: Disorders of steroidogenesis, other than 21-hydroxylase. ENDO 2006 Meet-the-Professor Session, June 24-27, 2006, Boston, USA
- 9) Sugawara T, Makita Y, Fujieda K: Association of spermatogenesis with Ser164Arg and Arg417Trp polymorphism in the gene of steroidogenic acute regulatory protein-binding protein. ENDO 2006, June 24-27, 2006, Boston, USA
- 10) Fujieda K, Pang S: International newborn screening (NBS) collaborative study on 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia (CAH). Workshop 5, 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening, Sep 16-19, 2006, Awaji, Japan
- 11) Tajima T, Fujieda K: New disease in CAH screening. Workshop 5, 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening, Sep 16-19, 2006, Awaji, Japan
- 12) Adachi M, Fujieda K: National survey of the treatment for congenital adrenal hyperplasia detected by mass-screening. Workshop 5, 6th Meeting of the International Society for Neonatal Screening, Sep 16-19, 2006, Awaji, Japan
- 13) Fujieda K, Tajima T, Mukai T: The genetic mutations of adrenal insufficiency. Symposium IV, Adrenal, 4th Biennial Scientific Meeting Asia Pacific Paediatric Endocrine Society 2006, Nov 1-4, 2006, Pattaya, Thailand
- 14) 藤枝憲二: 性分化異常症の診断と治療—特に先天性副腎過形成症を中心に、シンポジウム 5「小児泌尿器科：半陰陽の診断と治療」、第 94 回日本泌尿器科学総会、平成 18 年 4 月 12-15 日、福岡
- 15) 藤枝憲二: 先天性副腎疾患 Update、第 97 回日本内分泌学会学術総会 教育講演、平成 18 年 5 月 19-21 日、神戸
- 16) Fujieda K, Mukai T, Okuhara K, Tajima T: Transcription factors and adrenal development, ESPE/LWPES 7th Joint Meeting, Sep 21-24, 2005, Lyon, France
- 17) Mukai T, Okamoto T, Suzuki S, Matsuo K, Ueda O, Ito Y, Fujieda K: Two novel mutations in SOX9 gene in the patients with campomelic dysplasia. ESPE/LWPES 7th Joint Meeting, Sep 21-24, 2005, Lyon, France
- 18) Tajima T, Tsubaki J, Okuhara K, Ogawa E, Fujieda K: Two Japanese patients caused by P450 oxidoreductase (POR) deficiency. ESPE/LWPES 7th Joint Meeting, Sep 21-24, 2005, Lyon, France
- 19) 田島敏広、藤枝憲二: P450 と内分泌疾患—先天性副腎皮質過形成症を中心に、第 15 回臨床内分泌代謝 Update、平成 17 年 3 月 12-13 日、札幌
- 20) 田島敏広、藤枝憲二: 先天性副腎過形成症の遺伝子診断と出生前診断・治療、第 108 回日本小児科学会総会、平成 17 年 4 月 22-24 日、東京
- 21) 向井徳男、藤枝憲二: シンポジウム「性成熟異常症の最近の進歩」AHC (DAX-1) 異常症、第 78 回日本内分泌学会学術総会、平成 17 年 7 月 1-3 日、東京
- 22) 田島敏広、藤枝憲二: 新生児マススクリーニングでみつかると副腎疾患、第 33 回新生児マススクリーニング学会、平成 17 年 10 月 7 日、久留米
- 23) 向井徳男、鈴木滋、松尾公美浩、上田修、安達かおり、藤枝憲二: アンドロゲン受容体遺伝子に新規部分欠失を同定したアンドロゲン不応症の同胞例、第 39 回日本小児内分泌学会学術集会 平成 17 年 10 月 20-22 日 東京
- 24) 藤枝憲二: ヒト副腎・生殖腺の発生分化・機能の異常による性分化異常症、第 10 回日本生殖内分泌学会シンポジウム「性分化異常の基礎と臨床」、平成 17 年 11 月 3 日、東京
- 〔図書〕 (計 3 件)
- 1) 藤枝憲二: 先天性副腎過形成症、小児疾患診療のための病態生理、東京医学社、小児内科 40 増刊号、2008、pp752-759
- 2) 藤枝憲二: 内分泌 臨床分野での進歩 性成熟異常症 最近の進歩、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2007、金原出版、2007、pp215-221
- 3) 藤枝憲二、向井徳男、田島敏広: 先天性副腎過形成症、先端医療シリーズ、34、小児科の新しい流れ、柳澤正義、衛藤義勝、五十嵐隆編集、先端医療技術研究所、2005、pp51-56
- 〔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.pediatric-world.com/asahikawa/gel/kenkyu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤枝 憲二 (FUJIEDA KENJI)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：60173407

### (2) 研究分担者

向井 徳男 (MUKAI TOKUO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50374799

中村 英記 (NAKAMURA EIKI)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：20396352

### (3) 連携研究者

鈴木 滋 (SUZUKI SHIGERU)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：80516394