

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10283

研究課題名(和文)性同一性障害当事者の全ゲノムシーケンス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) Whole genome sequencing analysis for investigation of biomarker candidates for Gender Dysphoria

研究代表者

仲地 ゆたか (Nakachi, Yutaka)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：10522097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は性別違和(性同一性障害とも、以下GD)について、早期診断の分子基盤となりうるようなGD関連遺伝子の探索を進めている。これまでの性ホルモン関連遺伝子に着目した解析ではGDに強く関連する多型や変異は見つかっていないため、我々はGD当事者のゲノム全域を対象として変異・多型を検出する全ゲノムシーケンス解析をおこなった。解析には標準参照配列(hg38/GRCh38)だけでなく日本人のゲノム配列や変異頻度の情報(JG2など)も利用した。また2次解析として先行研究のマウス脳での発現解析データとの統合やGO解析・転写因子認識配列解析などのバイオインフォマティクス解析もおこなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性別違和(性同一性障害)当事者は国内外で数万人に1人いる。当事者へのケアには性ホルモンの使用や外科的措置などの身体に不可逆な臨床・医療ケアが必要なことが多く、特に第2次性徴を迎えた若年GD当事者への迅速診断のための生物学的基準が望まれているが未だ実現していない。また当事者への医療介入には保険適用がなされない場合も多く、社会的な偏見も根強く残っている。本研究の成果は当事者への医療ケア改善に大きく貢献できる成果が得られるだけでなく、GDの社会的な認知の改善にも貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated for GD-related genes that can be the molecular basis for early diagnosis of Gender Dysphoria. Since any polymorphisms and mutations strongly related to GD have not been reported in the analysis focusing on sex hormone-related genes so far, we performed whole-genome sequence analysis to detect mutations and polymorphisms in the entire genome of the GD individuals. Not only the standard reference sequence (hg38 / GRCh38) but also the Japanese genome sequence and variant frequency information (JG2, etc.) were used. In addition, bioinformatics analysis such as integration with expression analysis data in mouse brain derived from previous studies, GO enrichment analysis, and transcription factor recognition sequence analysis was also performed.

研究分野：分子生物学

キーワード：性別違和 性同一性障害 全ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

性別違和 (Gender Dysphoria; 以前は性同一性障害とも、以下 GD) 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性別に強い違和を感じ、希死念慮は 7 割以上に及ぶことが知られている。GD 診断には複数の精神科医による長期の問診を要し、とくに第二次性徴期を迎えている若年当事者へのケアの遅れはその後の人生において著しい QOL 低下を招くことがある。しかし迅速診断可能なバイオマーカーはこれまで報告されていない。

哺乳類の脳では分界条床核といった「性的 2 型核」と呼ばれる領域では特定の神経細胞の数が雄雌で異なり、性差があることが知られている。このような組織学的な脳の特徴は、ヒト死後脳の研究でも見られており、ヒトにおいても GD 当事者では身体の性別より心の性別に一致するという報告がある¹⁾。そのため GD には生物学的機序の存在が予想されている。特に哺乳類の脳の性分化機構は進化的に保存されていて、胎生期・新生仔期などの脳の性分化期に性ホルモンに曝露されることで脳の性分化がおこり、分界条床核などでみられる性差や思春期後の性行動が決まることが判っている²⁾。そのためヒトの GD においても性ホルモンを介した機序が示唆されている³⁾。しかしこれまでおこなわれた遺伝学的な関連解析では性ホルモン受容体や性ホルモン代謝酵素に着目した解析のみであり、それらの解析からは GD に強く関連する変異・多型は発見されていない⁴⁻⁷⁾。疫学調査などから家族内集積性の示唆や双生児解析・同胞解析による GD の遺伝的背景の示唆もあるものの⁸⁾、現在も遺伝率や遺伝様式は不明である。

本研究に先立つ予備的研究で、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⁸⁾。そのため GD 関連遺伝子探索には全ゲノムにわたる網羅的な同定法が必要となる。ゲノム内に存在する多型や変異を網羅的に同定できる全ゲノム解析により、GD 当事者ゲノムにみられる変異・多型を検出することでバイオマーカー開発に重要な基盤情報が得られると着想した。

2. 研究の目的

本研究では GD 機序解明と早期診断の分子基盤となりうるような GD 関連遺伝子の探索をおこなうべく、全ゲノムシーケンス解析をおこなった。GD 当事者の全ゲノム解析による変異・多型を網羅的に検出し、更に既得のマウス脳の発現解析データを用いたバイオインフォマティクス解析から GD に強く関連すると予想される変異・多型群を抽出し、マーカー開発の基盤情報を得ることを目的として研究を遂行した。

3. 研究の方法

大阪医科大学にて GD の確定診断がなされた GD 当事者の血液検体を収集した。本計画ではおよそ 30 例を解析していたが、現在までに Famele-to-male (FTM) 7 例、Male-to-Female (MTF) 5 例について解析を進めている。GD 機序は単一変異だけではなく多因子による原因が考えられるため、臨床情報から均一な事例を選択し、家族例・兄弟例または両親のサンプルが得られる場合はそれを優先した。得られた血液検体からゲノム DNA を抽出したのち、ゲル電気泳動によるスミアの目視と 2 本鎖 DNA 定量試薬により DNA の品質確認をおこなった。性差遺伝子 (AMELX、SRY) により遺伝的性別についても確認し、その後ゲノム DNA による全ゲノムシーケンシングをおこなった。全ゲノムシーケンスは Illumina HiSeq および MiSeq によっておこなった。ヒトゲノム参照配列 (国際参照配列 GRCh38 および日本人配列 JG1 および JG2 を使用) にデコイ配列 (decoyJRG v1) を付加したデータをした配列を用いて BWA によるマッピングをおこなった。遺伝子アノテーションとして公共データベース (RefSeq、Ensembl) の情報を利用して GATK による変異・多型の同定をおこない、挿入・欠失、非同義置換、スプライシングに影響する変異を抽出した。計算環境には Takeru for Sequencer (NABE International) を利用した。

同定した変異・多型から、GD 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) に着目して解析を進めた。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 (GO、KEGG) とも照合した。またバイオインフォマティクス解析として、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 (TRANSFAC、JASPAR) をおこない候補遺伝子探索のパイプラインに統合した。アレル頻度情報 (1000 genomes、dbSNP、ExAC、ToMMo) から、特にアジア・日本人集団内出の確認される遺伝子多型のアレル頻度にも着目した。

上記方法により抽出されてきた興味深い変異・多型に関して遺伝子発現や細胞内局在などへの影響を確認するため神経芽細胞腫由来細胞 (Neuro2A) などを利用した蛍光タンパクを付加し

た目的遺伝子の導入による安定株の確立と培養細胞評価系の構築も併せておこなった。

4 . 研究成果

これまで FTM と MTF の双方からそれぞれ各 2 万座位以上におよぶ非同義置換となる変異・多型を同定した。現在タンパク質の著しい機能変化が予測されるものや日本人やアジア人で頻度 5%以上の多型を日本人ゲノムのデータベースを利用し取り除くことで、FTM、MTF 双方よりそれぞれ 1、900 余りの変異・多型を同定している。またマウスを用いた発現解析の知見も統合し、関連遺伝子候補となる遺伝子セットを同定した。さらに候補遺伝子のいくつかについて発現解析をおこない、これまで脳神経系では機能未知であった X 染色体上の *Luzp4* 遺伝子 (マウス *Ott* 遺伝子の相同遺伝子) などについて、神経前駆細胞での発現と核内移行を確認した。現在はこれらの本研究計画で得られた成果についての論文投稿を準備している。今後は可能な範囲でのサンプル数増加も追求しつつ、統計的な検出力の向上を目指してバイオマーカー開発の基盤情報を確定させる予定である。また全ゲノムシーケンスだけでなくエピゲノム解析も視野に入れた解析を進めながら、今回作製した評価系などをもちいて候補遺伝子が脳神経系においてどのような働きを持つのかを考慮していくことで、GD 機序解明にも注力していく予定である。

<引用文献>

- 1) Zhou J-N, Hofman MA, Gooren LJG, Swaab DF. A sex difference in the human brain and its relation to transsexuality. *Nature*. 378(6552):68-70, 1995.
- 2) Wu MV, Manoli DS, Fraser EJ, Coats JK, Tollkuhn J, Honda S-I, Harada N, Shah NM. Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell*. 139(1):61-72, 2009.
- 3) Bao A-M, Swaab DF. Sexual differentiation of the human brain: relation to gender identity, sexual orientation and neuropsychiatric disorders. *Front Neuroendocrinol*. 32(2):214-26, 2011.
- 4) Heylens G, De Cuypere G, Zucker KJ, Schelfaut C, Elaut E, Vanden Bossche H, De Baere E, T'Sjoen G. Gender identity disorder in twins: a review of the case report literature. *J Sex Med*. 9(3):751-7, 2012.
- 5) Henningson S, Westberg L, Nilsson S, Lundström B, Ekselius L, Bodlund O, Lindström E, Hellstrand M, Rosmond R, Eriksson E, Landén M. Sex steroid-related genes and male-to-female transsexualism. *Psychoneuroendocrinology*. 30(7):657-64, 2005.
- 6) Bentz E-K, Hefler LA, Kaufmann U, Huber JC, Kolbus A, Tempfer CB. A polymorphism of the CYP17 gene related to sex steroid metabolism is associated with female-to-male but not male-to-female transsexualism. *Fertil Steril*. 90(1):56-9, 2008.
- 7) Hare L, Bernard P, Sánchez FJ, Baird PN, Vilain E, Kennedy T, Harley VR. Androgen receptor repeat length polymorphism associated with male-to-female transsexualism. *Biol Psychiatry*. 65(1):93-6, 2009.
- 8) Ujike H, Otani K, Nakatsuka M, Ishii K, Sasaki A, Oishi T, Sato T, Okahisa Y, Matsumoto Y, Namba Y, Kimata Y, Kuroda S. Association study of gender identity disorder and sex hormone-related genes. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33(7):1241-4, 2009.
- 9) 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*. 12(4):887-96, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲地ゆたか、金沢徹文、塚本翔、片桐岳信、岩本和也、岡崎康司、康純
2. 発表標題 性同一性障害（性別違和）関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第41回日本生物学的精神医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲地豊、金沢徹文、塚本翔、片桐岳信、岡崎康司、康純
2. 発表標題 性別違和（性同一性障害）関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲地豊、金沢徹文、塚本翔、片桐岳信、岡崎康司、康純
2. 発表標題 性別違和（性同一性障害）関連遺伝子の探索
3. 学会等名 GID学会第21回研究大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲地豊、金沢徹文、康純、岡崎康司
2. 発表標題 性別違和（性同一性障害）関連遺伝子の探索：ヒト全エクソーム解析とマウストランスクリプトーム解析から
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 仲地豊、金沢徹文、康純、岡崎康司
2. 発表標題 性同一性障害当事者DNAをもちいた全エクソーム解析
3. 学会等名 GID（性同一性障害）学会 第20回研究大会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲地ゆたか、金沢徹文、岩本和也、岡崎康司、康純
2. 発表標題 性別違和関連遺伝子候補の探索を目的とした全エクソーム解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲地ゆたか
2. 発表標題 ゲノム解析による性別違和（性同一性障害）関連遺伝子の探索
3. 学会等名 GID（性同一性障害）学会 第22回研究大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 仲地ゆたか、金沢徹文、岩本和也、岡崎康司、康純
2. 発表標題 性別違和関連遺伝子探索を目的とした全エクソーム解析
3. 学会等名 第42回日本生物学的精神医学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	金沢 徹文 (Kanazawa Tetsufumi) (20534100)	大阪医科大学・医学部・教授 (34401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	康 純 (Koh Jun) (40257853)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	
連携 研究者	岡崎 康司 (Okazaki Yasushi) (80280733)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------