

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18626

研究課題名(和文)日本人の性分化関連遺伝子バリエーションの頻度、および表現型との関連性の検討

研究課題名(英文)The study about pathological variants in genes associated with disorders of sex development in a whole-genome reference panel of 8380 Japanese individuals

研究代表者

近藤 亜希子(Kondo, Akiko)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：20644818

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究は東北メディカル・メガバンク機構が構築した日本人8380人を含む全ゲノム参照パネルにおいて、潜性遺伝形式の性分化疾患(DSD)および中枢性性腺機能低下症(CHG)に関連する遺伝子およびアンドロゲン受容体(AR)遺伝子、総計32遺伝子の病的バリエーションについて検討した。病的バリエーション候補(P)または病的バリエーションの可能性が高い(LP)バリエーションを、ClinVar、InterVarおよびHuman Gene Mutationのデータベースを用いて抽出した。25の遺伝子で91の病的バリエーション候補を認め、およそ157人に1人程度が潜性DSDおよびCHGの病的バリエーションを保有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、東北メディカル・メガバンク機構が構築した日本人8380人の全ゲノム参照パネルにおいて、潜性遺伝形式をとる性分化疾患、中枢性性腺機能低下症およびアンドロゲン受容体遺伝子に関連する遺伝子から抽出した32遺伝子の病的バリエーションについて検討した。病的バリエーション候補を抽出し、既存の遺伝子バリエーションのデータベースを用いて病的妥当性を評価した。25の遺伝子で91の病的バリエーション候補を認め、28の新規病的バリエーション候補が同定された。本研究は日本人の潜性遺伝形式性分化疾患および中枢性性腺機能低下症の原因解明に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文): Disorders of sex development (DSD) are congenital disorders in which chromosomal, gonadal, and anatomical sexual development is atypical. In this study, we conducted a screen for pathogenic variants in 32 genes associated with recessive DSD and central causes of hypogonadism (CHG) in a whole genome reference panel established by Tohoku Medical Megabank Organization including 8380 Japanese individuals. Pathogenic candidate (P) or likely pathogenic (LP) variants were annotated with the ClinVar, InterVar, and Human Gene Mutation databases. 91 candidate pathogenic variants were found in 25 genes, and 28 novel candidate variants were identified. Almost 1 in 40 individuals (ClinVar or InterVar P or LP) to 157 individuals (both ClinVar and InterVar P or LP) were found to be carriers of recessive DSD and CHG alleles. In this study, we describe the types and frequencies of causative variants of recessive DSD and CHG in the general Japanese population.

研究分野: 生殖内分泌

キーワード: 性分化疾患 DSD 性分化関連遺伝子 塩基配列変異 バリエーション 東北メディカル・メガバンク計画 全ゲノム解析 住民ゲノム参照パネル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

性分化は遺伝子、性腺、生殖器の性分化カスケードにより誘導される(1)。遺伝子の性は受精時の性染色体の構成で決定され、性腺は遺伝子の制御により分化誘導され、生殖器は性腺ホルモンにより形成され最終的な表現型が決定する。

性分化疾患(Disorders of sex development、以下DSD)の頻度は全出生あたり0.1-0.5%と比較的まれと推定されているが、患者の13%しか確定診断を得ていないとの報告もあり(2)、潜在的にはより多くの患者がいる可能性がある。性分化関連遺伝子は1000以上報告されている。性分化疾患の原因遺伝子としてsex-determining region of Y(SRY)やSOX9, Steroidogenic factor 1(SF-1)、WT1, dosage-sensitive sex reversal gene on the X chromosome(DAX1)等が、転写因子やロックアウトマウス作成による研究から性分化関連遺伝子として同定されてきた。性分化関連遺伝子バリエーションの一般集団における頻度は、副腎皮質過形成の原因遺伝子(CYP21A2)変異の保因者頻度を最大1000人において調査した報告(3、4)等を含め、世界的に5報告しかない。日本人の一般集団における性分化関連遺伝子バリエーションの頻度に関する報告はない。

東北大学メディカル・メガバンク機構(Tohoku Medical Megabank Organization、以下ToMMo)と岩手医科大学は、参加者の医療データとゲノムデータを統合し複合バイオバンクを構築しゲノムコホート研究を開始した(5)。ToMMoは、全ゲノム解析を使用して正確に特定された8380人の日本人の全ゲノム参照パネル8.3KJPNを公開した(<https://jMorp.megabank.tohoku.ac.jp/202102/>)。これには、一塩基バリエーション、挿入・欠失の頻度情報、アレル頻度情報などが含まれる。

以上の背景より、ToMMoの日本人の全ゲノム参照パネル8.3KJPNを利用して日本人の性分化関連遺伝子のバリエーションの分布や頻度を検証することによって、日本人におけるDSDや中枢性性腺機能低下症(central causes of hypogonadism、以下CHG)の疾患理解を深め、遺伝情報に基づいた個別化医療、個別化予防の一助となることを目指した。

### 2. 研究の目的

本研究は東北メディカル・メガバンクのゲノム参照パネル8.3KJPNを使用して、日本人における性分化関連遺伝子バリエーションを網羅的に解析し、以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1)日本人一般集団における、既知の性分化関連遺伝子バリエーションを解析し、日本人における既知の性分化関連遺伝子バリエーションの分布、保因者頻度を明らかにする。

(2)日本人一般集団における、新規の性分化関連遺伝子バリエーションを検証する。

なお、東北メディカル・メガバンクのゲノム参照パネルの規模とDSDおよびCHGの疾患頻度から、対象は潜在性遺伝形式のDSDおよびCHGに関連する遺伝子とした。

### 3. 研究の方法

#### (1)対象遺伝子の選定

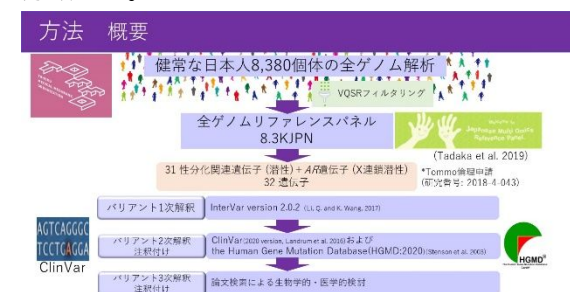
Lawson Wilkins 小児内分泌学会(LWPES)および欧州小児内分泌学会(ESPE)による疾患分類(6)、DSDおよびCHG関連遺伝子および候補遺伝子に関する報告(7、8)、PubMedおよびClinVar、HGMD、OMIMなどの臨床バリエーションデータベースを元に、対象遺伝子を常染色体潜在性遺伝形式の31遺伝子とX連鎖性遺伝形式のAndrogen receptor(AR)遺伝子、計32遺伝子とした。(図1)32遺伝子の内訳は、性腺の分化以上に関連する遺伝子群(Gonadal dysfunction:GD群)5遺伝子、ホルモン合成・機能に関連する遺伝子群(Disorders in hormone synthesis or action:HSA群)19遺伝子、中枢性性腺機能低下に関連する遺伝子群(Central causes of hypogonadism:CHG群)8遺伝子、と分類した。



(図1)

#### (2)データソースとバリエーションの注釈の概要(図2)

本研究は、東北大学、ToMMoの倫理委員会によって承認された(承認番号:2018-4-043)。8.3KJPNのアレル頻度に関するデータベースは、ポータルサイトのJapanese Multi Omics Reference Panel(<http://jMorp.megabank.tohoku.ac.jp/>)から入手した。バリエーションの注釈方法を図2に示

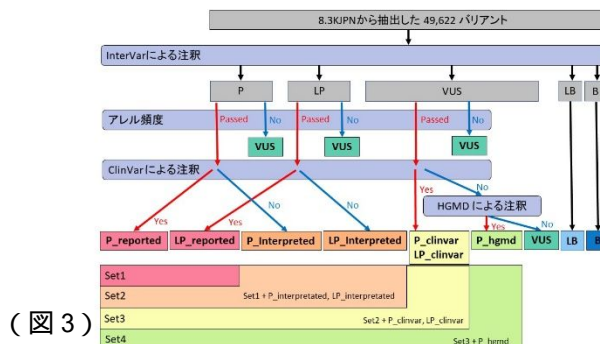


(図2)

す。健常な日本人 8380 個体の全ゲノム解析を行い、バリエントコールの最終チェックとして VQSR フィルタリングを行い、8.3KJPN が構築されている。VQSR は 8.3KJPN のバリエントコールの最終チェックに採用されている評価法で、品質に定評のある国際 1000 人ゲノムなどの公共データを規範データとし、規範データのバリエントの品質と機械学習で比較して品質管理している。VQSR フィルタリング後に抽出された 32 遺伝子の病的バリエント候補を、InterVar2.0.2 で一次解釈し、次に ClinVar および、Human Gene Mutation Database (以下 HGMD) により、2 次解釈および注釈付けを行う。最後に、3 次解釈として論文検索により生物学的、医学的に検討し注釈付けを行う。

### (3) 病的バリエントの分類法 (図3)

8.3KJPN にて得られた病的バリエント候補のうち、VQSR フィルタリングをパスした 49,622 のバリエントについて、図3の流れで注釈付けをする。まず、InterVar2.0.2 での一次解釈を経て、Pathogenic (以下 P) および likely pathogenic (以下 LP) に分類されたバリエントは、さらにアレル頻度 (minor allele frequencies, 以下 MAF) 0.03 以下の条件を満たすバリエントについて、ClinVar および HGMD で既報がある場合、P\_reported, LP\_reported に分類され、set1 と定義する。ClinVar および HGMD で既報を認めないバリエントを P\_interpreted, LP\_interpreted に分類し、set2 と定義する。InterVar の一次解釈で VUS に分類されたバリエントについて MAF0.03 以下の条件を満たすバリエントについて、ClinVar で既報を認めたバリエントは P\_clinvar, LP\_clinvar と分類し set3 と定義する。ClinVar で既報を認めず HGMD で既報を認めたバリエントは P\_hgmd に分類し、set4 と定義する。



(図3)

### (4) 予測保因者頻度の推定

Hardy-Weinberg 平衡を使用して保因者頻度の推定を実施する。

## 4. 研究成果

### (1) 病的バリエント候補について

本研究の基礎特性として遺伝的性別と自己申告の性別の間に不一致は認めなかった。32 の対象遺伝子について 49,622 のバリエントが検出され、注釈、分類した。まず、InterVar version 2.0.2 を使用した注釈と解釈に基づき、バリエントは、病的 (P; n=13)、病的バリエントの可能性が高いバリエント (LP; n=29)、病的意義が不明なバリエント (variant of uncertain significance (以下 VUS); n=43,856)、良性の可能性が高いバリエント (likely benign (以下 LB); n=445)、および良性バリエント (benign (以下 B); n=5279) に分類された。2 次解釈を経て、set1 は 14 バリエント、set2 は 42 バリエント、set3 は 57 バリエント、set4 は 91 バリエントに分類された。set1 から set4 に含まれる病的バリエント候補の総数は、25 個の遺伝子に対して 91 個であった。set2 から set1 の病的バリエント候補を差し引いた残りの 28 の病的バリエント候補はこれまでに既報がなく、InterVar による一次解釈上、新規の病的バリエントの可能性が高い。

3 次解釈で 3 つのあいまいなバリエント (*CBX2*:p.Gln211\*, *GNRHR*:p.Arg205\*, および *CYP19A1*:chr15:g.51630691C>T) を削除した。*CBX2*:p.Gln211\* を例に 3 次解釈の過程を示す。このバリエントは *CBX2* 遺伝子の病的バリエント候補の一つであった。ClinVar や HGMD に既報はない。InterVar により、*CBX2* のアイソフォームのうち、主要転写産物である、NM\_005189 のイントロンのバリエントとして注釈され、機能喪失型バリエントとして set2 と分類された。しかし、NCBI Reference Sequence Database、refSeq で確認したところ、実際にはこちらの短いアイソフォーム、転写産物 NM\_032647 をコードし、この短いアイソフォームの終止コドンの直前に停止コドンを獲得するバリエントであった。よって、このバリエントは set2 ではなく、VUS として注釈されるべきと考え、既報もないので病的バリエント候補から除外した。このような 3 次解釈を経て、このバリエント候補を含めて、3 つの病的バリエント候補を除外した。

10 個体が異なる 2 つの異なる対象遺伝子に対して一つずつの病的バリエント候補を保有していた。1 個体は *CYP21A2* 遺伝子の 2 つの異なる病的バリエント候補を保有していた。この個体は複合ヘテロの可能性はあるが、表現型は確認できていない。1 個体は *POR* 遺伝子の病的バリエント候補、c.G1738C:p. Glu580Gln をホモ接合体で保有していた。この病的バリエント候補は P\_hgmd に分類されており日本人のバリエントとしても既報があるが、*POR* 活性の欠損には必須でなく病的意義が確実でないためバリエント病原性は過大評価されている可能性が高い。この個体について詳細な表現型を確認できなかった。

### (2) 保因者頻度の推定について

3 つのあいまいなバリエント (*CBX2*:p.Gln211\*, *GNRHR*:p.Arg205\*, および *CYP19A1*:

chr15:g.51630691C>T) を削除した後、set1、set2、set3、および set4 の合計 MAF はそれぞれ 0.00322、0.00668、0.01248、および 0.02997 であった。したがって、ほぼ 157 人に 1 人(set 1)、73 人に 1 人(set2)、40 人に 1 人(set3)、および 16 人に 1 人(set4) の頻度で、本研究の対象遺伝子の病的バリエーション候補の保因者であると推定された。

次に病的バリエーション候補のバイアレル不活性化 (biallelic inactivation、以下 BI) またはホモ接合の頻度を検討した。GD、HSA、CHG の 3 群と AR 遺伝子において、set1 から set4 までの BI 頻度、推定出生頻度を示した (表 1)。本検討より HSA 群がほかの群と比較して明らかに BI 頻度が高いこと、その HSA 群でみたときに、set1 から set2、set2 から set3 とほぼ 2 倍程度の増加に対して、set3 から set4 は約 7 倍と急増している。set1 の BI 頻度は 211,000 出生に 1 人、set2 の BI 頻度は 118,000 出生あたり 1 人であった。Set3 の BI 頻度は、HSA 群のみが大きな上昇率 (2.37 倍) 示し、GD (増加なし) 群 および CHG 群 (1.14 倍) に比較して大きな上昇率であった。これは、ClinVar および InterVar による注釈間の不一致が HSA 群でより頻繁に発生することを示唆している。set3 の BI 頻度は、50,700 の出生に 1 人であった。set 4 の場合、HSA 群は 7 倍以上の増加を示し、set 4 の BI 頻度は 6787 出生あたり 1 人であり、既知の性分化疾患および中枢性性腺機能低下症の疾患頻度と比較して明らかに高率であり、P\_hgmd に分類されたバリエーションに偽陽性が存在することを示唆している。また AR 遺伝子については、バリエーション候補は set4 の 3 つしか認めなかった。そこから推定された男性の推定有病率は男性 2,293 人に 1 人であり、アンドロゲン不応症の有病率 4 - 9 万人に 1 人、からかなりかけ離れた推定となった。このことから HGMD の DM バリエーションには偽陽性が含まれている可能性が強く示唆された。出生頻度からは set3 のバリエーションコールが最も妥当な可能性が示唆された。

(表 1)

### 病的バリエーション候補のバイアレル不活性化 (Biallelic inactivation (BI) ) 頻度の検討

カテゴリ	Set 1	Set 2	Set 3	Set 4
GD	0	1.86E-07	1.86E-07	1.86E-07
HAS	4.71E-06	8.13E-06	1.93E-05	1.46E-04
AR*	0	0	0	4.37.E-04
CHG	1.44E-08	1.72E-07	1.97E-07	2.00E-07
総計 (頻度) **	4.73E-06	8.49E-06	1.97E-05	1.47E-04

\* Hemizygous for male \*\*AR is not included

本研究は日本人の一般集団における、常染色体潜性遺伝形式をとる DSD や CHG の病的バリエーションを検討した最初の研究である。Tommo の日本人の全ゲノム参照パネル 8.3KJPN を用い、人口規模や背景から潜性遺伝形式の DSD や CHG に焦点を当て、バリエーションの種類と頻度を決定した。本検討の結果は、DSD や CHG の症例における遺伝子診断や遺伝カウンセリング、特に患者の表現型の原因遺伝子を特定するために MAF に基づいてターゲット遺伝子の優先順位を決める際に非常に有用であると考えられる。

#### 引用文献

- 1.Arboleda VA. et al. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. Clinical genetics. 83(1):35-43(2013).
- 2.Baumgartner-Parzer SM.et al. Carrier frequency of congenital adrenal hyperplasia (21-hydroxylase deficiency) in a middle European population. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 90(2):775-8(2005).
- 3.Lee HH.et al. Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency in Chinese. The Journal of clinical endocrinology and metabolism.85(2):597-600(2000).
- 4.Phedonos AA. et al. High carrier frequency of 21-hydroxylase deficiency in Cyprus. Clinical genetics.84(6):585-8(2013).



5. Kuriyama, S. et al. The Tohoku Medical Megabank project: design and mission. *J. Epidemiol.* 26, 493-511 (2016).
6. Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F. & Lee, P. A. Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society/European Society for Paediatric Endocrinology Consensus Group Consensus statement on management of intersex disorders. *J. Pediatr. Urol.* 2, 148-162 (2006).
7. Eggers, S. et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.* 17, 243 (2016).
8. Melmed, S., Polonsky, K. S., Larsen, P. R., Kronenberg, H. M. *Williams Textbook of Endocrinology* 13th Edition, Elsevier: Philadelphia, (2015).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naomi Shiga, Yumi Yamaguchi-Kabata, Saori Igeta, Jun Yasuda, Shu Tadaka, Takamichi Minato, Zen Watanabe, Junko Kanno, Gen Tamiya, Nobuo Fuse, Kengo Kinoshita, Shigeo Kure, Akiko Kondo, Masahito Tachibana, Masayuki Yamamoto, Nobuo Yaegashi & Junichi Sugawara	4. 巻 34
2. 論文標題 Pathological variants in genes associated with disorders of sex development and central causes of hypogonadism in a whole-genome reference panel of 8380 Japanese individuals	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-022-00213-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志賀尚美、山口由美、井ヶ田小緒里、藤峯絢子、久野貴司、横山絵美、近藤亜希子、渡邊善、立花真仁、安田純、菅原準一、八重樫伸生
2. 発表標題 Estimating carrier frequencies of pathogenic gene variants associated with sex development in general Japanese individuals
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術集会 JSOG Congress Award Candidate
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志賀尚美
2. 発表標題 日本人8380人の全ゲノム参照パネルを用いた性分化疾患関連遺伝子の病的変異の探索
3. 学会等名 第66回日本人類遺伝学会 / 第28回日本遺伝子診療学会
4. 発表年 2021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
研究協力者	志賀 尚美  (SHIGA NAOMI)		

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