

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390249

研究課題名(和文) 希少疾患解析に基づく視床下部-下垂体-性腺系調節機構の解明

研究課題名(英文) Investigation for molecular basis of hypothalamo-pituitary-gonadal dysfunction

研究代表者

深見 真紀 (FUKAMI, MAKI)

独立行政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、(間接経費) 3,840,000円

研究成果の概要(和文)：生殖機能異常症患者の網羅的シーケンスおよびゲノムコピー数解析を行い、疾患に関連すると推測される遺伝学的異常を同定した。重要な成果は下記のとおりである。1)ゴナドトロピン欠損症や男性外性器異常発症における既知遺伝子変異の寄与の程度を明確とした。2) FGF8異常症の新規合併症を見出した。3)原因不明の性分化疾患患者における微小ゲノム構造異常を同定した。4)まれな性成熟疾患であるアロマターゼ過剰症(AEXS)の原因となる染色体構造異常の発生機序を解明した。5) AEXS患者の解析から、本症の性腺機能障害が主としてエストロゲンネガティブフィードバックによるFSH分泌障害であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to clarify the molecular basis of reproduction failure. We performed systematic mutation screening and genome-wide copy number analyses for patients with disorders of sex development (DSD), gonadotropin deficiency, and precocious puberty. Our results include; 1) Mutations in known causative genes account for only a small fraction of the etiology of 46,XY DSD and gonadotropin deficiency. 2) FGF8 haploinsufficiency may underlie thyroid dysfunction and cardiac anomalies. 3) Cryptic genomic rearrangements constitute rare causes of 46,XY, DSD. 4) Genomic rearrangements leading to aromatase excess syndrome (AEXS) are caused by recombination- and replication-based mechanisms. 5) Hypogonadism in patients with AEXS is ascribed to the negative-feedback effect of estrogens on FSH secretion. 6) Adrenal androgens serve as the major source of estrogens in prepubertal patients with AEXS. 7) SOX2 mutations are associated with a broad phenotypic variation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：遺伝子 ホルモン 先天疾患 性分化 小児内分泌学

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生殖機能は、視床下部、下垂体、性腺から分泌されるホルモンによって支配される。このホルモン分泌を調節する機構の破綻は、生殖機能異常症の原因となる。これまでゴナドトロピン分泌や性ホルモン分泌に關与する遺伝子が多数同定されている。一方、生殖機能異常症患者の中でこれら既知遺伝子変異を有する症例は少数であり、未知の因子の關与が大きいことが示唆される。

われわれはこれまで世界に先駆けて生殖機能異常症の臨床的・分子遺伝学的研究を行ってきた。これまでの成果として *POR* 異常症の発症機序と臨床像の解明、*TACR3* 異常症の病態の解明などがあげられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生殖機能異常症患者のゲノム解析とそのデータに基づいた *in vitro/in silico* 解析によって、ヒトの生殖機能を支配する視床下部-下垂体-性腺系のホルモン制御機構とその破綻による病態を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 性成熟疾患・性分化疾患に關与する遺伝子変異/多型の同定

新規遺伝子解析技術を用いた効率的変異スクリーニングシステムを活用し、多数の臨床検体を対象として既知発症責任遺伝子と候補遺伝子の網羅的変異解析を行った。解析対象には、46,XX 性分化疾患、46,XY 性分化疾患、ゴナドトロピン欠損症、中枢性性早熟症などが含まれる。変異スクリーニングは、次世代シーケンサーを用いたターゲットエンリッチメントもしくはアンプリコンシーケンス (Haloplex, Agilent technologies) を用いて行い、抽出された塩基置換をサンガ法シーケンサーで確認した。その後、同定された遺伝子異常の病的意義の有無を、*in vitro* 機能解析、*in silico* 機能予測、正常人の変異解析などによって検討した。

(2) 性成熟疾患・性分化疾患の原因となるゲノム構造異常の同定

原因不明の性成熟疾患・性分化疾患患者を対象にアレイ comparative genomic hybridization (CGH) (Agilent technologies) を用いてコピー数解析を行った。本研究では、全ゲノム解析 (カタログアレイ) もしくは染色体特定領域のカスタムアレイを作成し解析を行った。

(3) 変異陽性患者の遺伝子型 表現型解析
遺伝子異常が同定された患者の臨床解析を行い、当該遺伝子異常症の臨床スペクト

ラムを明確とし、さらに疾患重症度決定因子について検討した。

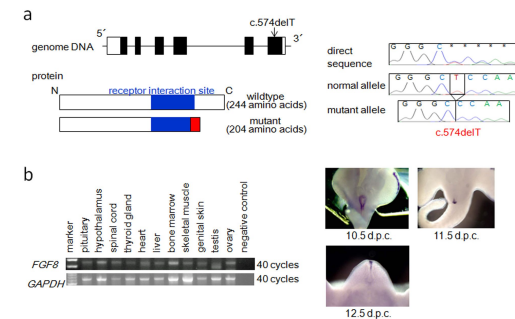
(4) 倫理面の配慮

本研究は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認のもとに行った。遺伝子解析は、患者本人もしくは両親からの同意取得後にヒトゲノム・遺伝子解析研究に關する倫理指針を遵守して実施した。

4. 研究成果

(1) 性成熟疾患・性分化疾患に關与する遺伝子変異/多型の同定

(a) ゴナドトロピン分泌不全症の発症機序の解明：次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンスによって、ゴナドトロピン分泌不全症患者の既知遺伝子変異スクリーニングを行った。多数の患者において病的変異を同定した。重要な成果として、男性患者 1 例においてはじめて *FGF8* フレームシフト変異を同定し、*FGF8* 機能喪失がゴナドトロピン欠損のみならず先天性甲状腺機能低下や心奇形の発症に關与する可能性を見出した。また患者のデータに基づいてマウスを用いた実験を行い、*FGF8* 変異が視床下部 下垂体機能異常のみならず、胎児期の陰茎伸展障害を介して重度の外性器男性化不全を招くことを見出した。

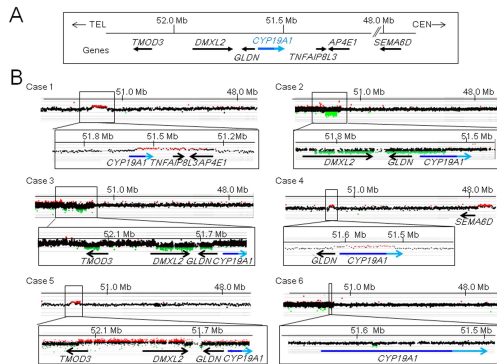


(b) 46,XY 性分化疾患の発症機序の解明：60 例の外性器異常症患者のアンプリコンシーケンスによって、約 10% 患者において疾患に關与すると推測される塩基置換を同定した。重要な点として、*SFI* 変異が合併症を伴わない外性器異常を招く可能性が見出された。一方、患者群において既報のリスク多型の集積は認められず、日本人患者においてはこのような多型の寄与が少くないことが示唆された。

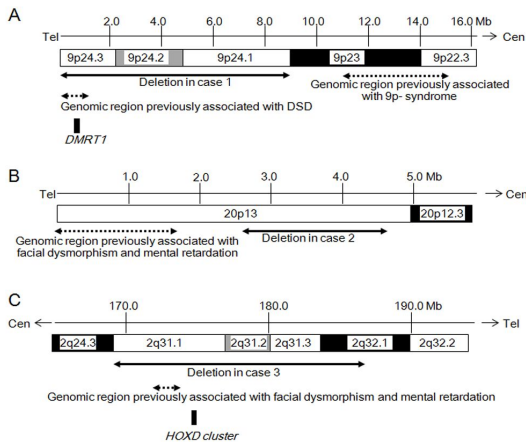
(2) 性成熟疾患・性分化疾患の原因となるゲノム構造異常の同定

(a) アロマターゼ過剰症 (AEXS) の発症機序の解明；まれな性成熟疾患である AEXS の原因となる 15 番染色体微細構造異常の発生機序を解明した。すなわち、本症の発症に Non-B やパリンドローム配列などの既知染色体再構成誘導モチーフに依存しない DNA 複製エラーと non-homologous

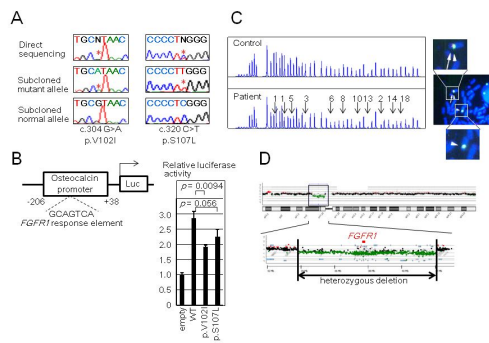
end joining、および反復配列依存性に生じる非対立遺伝子間相同組換えが関与することを見出した。さらに、乳がんの発症にはこのようなアロマターゼ遺伝子周辺の体細胞性ゲノム構造異常の関与が少ないことを明らかとした。



(b) 46,XY 性分化疾患の発症機序の解明：アレイ CGH 解析によって、原因不明の性分化疾患患者 4 例における微小欠失を同定し、性分化疾患発症におけるゲノム構造異常の寄与を明確とした。また、20 番染色体に新規性分化疾患関連遺伝子が存在する可能性を見出した。



さらに、原因不明の複合型下垂体機能低下症患者において *FGFR1* を含むヘテロ接合性微小欠失を同定し、*FGFR1* 機能喪失がゴナドトロピン分泌障害のみならず、下垂体前葉形成の異常を招く可能性を見出した。



この成績は、視床下部 下垂体系の形成に

おける *FGFR1*-*FGF8* を介した新たな遺伝子相互作用の可能性を示唆する。

(3) 変異陽性患者の遺伝子型 表現型解析

(a) AEXS の疾患重症度決定因子の解明：AEXS 患者の表現型解析から、本症の性腺機能障害が主として視床下部におけるエストロゲンネガティブフィードバックによる FSH 分泌障害であること、エストロゲン過剰が男性妊孕性を阻害しないこと、本症の内分泌異常の改善にアロマターゼ阻害剤が有効であることを明確とした。また思春期前患者の臨床像と内分泌学的データから、小児 AEXS 患者におけるエストロゲンの基質として副腎由来アンドロゲンの関与が大きいことを明らかとした。さらに、獲得されたプロモーターの組織特異性と生理的アロマターゼプロモーターの数が、当該患者の疾患重症度を決定することを見出した。

(b) 単一遺伝子疾患の臨床スペクトラムの解明：性成熟異常を招く *SOX2* 異常症患者の遺伝子型 表現型解析を行い、本症の表現型重症度に変異体残存活性が影響しないことを見出した。また、さまざまな遺伝子異常症の病態を明確とした。特記すべき成果として、性分化における *GSTA* 遺伝子群の機能、*CYP21A2* 異常症の表現型スペクトラムを明らかとした。

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 12 件)

1. Fukami M, Tsuchiya T, Takada S, Kanbara A, Asahara H, Igarashi A, Kamiyama Y, Nishimura G, Ogata T. Complex genomic rearrangement in the *SOX9* 5' region in a patient with Pierre Robin sequence and hypoplastic left scapula. *Am J Med Genet A*. 158A(7):1529–1534, 2012 doi: 10.1002/ajmg.a.35308.
2. Nagasaki K, Iida T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T, Fukami M. *PRKARIA* mutation affecting cAMP-mediated G-protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 97(9):E1808–1813, 2012 doi: 10.1210/jc.2012-1369
3. Miyado M, Nakamura M, Miyado K, Morohashi K, Sano S, Nagata E, Fukami M, Ogata T. *Maml1* Deficiency Significantly Reduces mRNA Expression Levels of Multiple Genes Expressed in Mouse Fetal Leydig Cells but Permits Normal Genital and Reproductive

- Development. *Endocrinology*. 153(12):6033–6040, 2012 doi: 10.1210/en.2012-1324
4. Ayabe T, Matsubara K, Ogata T, Ayabe A, Murakami N, Nagai T, Fukami M. Birth Seasonality in Prader-Willi Syndrome Resulting from Chromosome 15 Microdeletion. *Am J Med Genet A*. 161(6):1495–1497, 2013 doi: 10.1002/ajmg.a.35893
 5. Fukami M, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S, Ogata T. Submicroscopic deletion involving the *fibroblast growth factor receptor 1* gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J*. 60(8):1013–1020, 2013
 6. Fukami M, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunasima R, Ogata T, Shozu M, Noguchi S. Lack of Genomic Rearrangements Involving the Aromatase Gene *CYP19A1* in Breast Cancer. *Breast Cancer*. 2013 [Epub ahead of print] doi: 10.1007/s12282-013-0471-5
 7. Matsumura T, Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Ayabe T, Katsumata N, Fukami M, Inatani M, Akagi Y, Umezawa A, Ogata T, Miyamoto K. Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *FASEB J*. 227(8):3198–3208, 2013 doi: 10.1096/fj.12-222745.
 8. Hayashi M, Kataoka Y, Sugimura Y, Kato F, Fukami M, Ogata T, Homma K, Hasegawa T, Oiso Y, Sasano H, Tanaka H. A 68-year-old phenotypically male patient with 21-hydroxylase deficiency and concomitant adrenocortical neoplasm producing testosterone and cortisol. *Tohoku J Exp Med*. 231(2):75–84, 2013
 9. Igarashi M, Dung VC, Suzuki E, Ida S, Nakacho M, Nakabayashi K, Mizuno K, Hayashi Y, Kohri K, Kojima Y, Ogata T, Fukami M. Cryptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY disorders of sex development. *Plos One*. 8(7):e68194, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0068194
 10. Fukami M, Tsuchiya T, Vollbach H, Brown KA, Abe S, Ohtsu S, Wabitsch M, Burger H, Simpson ER, Umezawa A, Shihara D, Nakabayashi K, Bulun SE, Shozu M, Ogata T. Genomic Basis of Aromatase Excess Syndrome: Recombination- and Replication-Mediated Rearrangements Leading to *CYP19A1* Overexpression. *J Clin Endocrinol Metab*. 98(12):E2013-21, 2013 doi: 10.1210/jc.2013-2520.
 11. Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Ogata T, Nagasaki K, Fukami M. Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol* 2013[Epub ahead of print] doi: 10.1111/cen.12329
 12. 深見真紀 アロマターゼ過剰症候群 内科 109 (6)、2012
- 〔学会発表〕(計 16 件)
1. Fukami M. Aromatase Excess Syndrome: Molecular Basis and Phenotypic Determinants. In: Topic Symposium. Annual Meeting of Pediatric Academic Societies April 28-May 1 2012, Boston
 2. Fukami M. Molecular diagnosis and management of hereditary gynecomastia. In: Meet-the-expert session. The 9th Joint meeting of pediatric endocrinology, September 19-22 2013 Milan
 3. 深見真紀 . アロマターゼ過剰症とゴナドトロピン分泌. 日本内分泌学会シンポジウム 2012 年 4 月 26 日、名古屋
 4. 深見真紀、五十嵐麻希、阿部修司、山本幸代、金城さおり、緒方勤 男性における乳房腫大(女性化乳房)。第 46 回小児内分泌学会 とっておきの症例 2012 年 9 月 27-29 日、大阪
 5. 深見真紀 . POR 異常症とは。第 12 回大阪小児内分泌勉強会 2012 年 11 月 22 日、大阪
 6. Fukami M. Aromatase Excess Syndrome 6th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, April 23-27, 2012, USA
 7. 五十嵐麻希, Dung Chi Vu, 小島祥敬, 堀川玲子, 緒方勤, 深見真紀. 次世代遺伝子解析技術を用いた性分化疾患 141 例の病因解析 . 第 35 回日本分子生物学会ワークショップ 2012 年 12 月 11-14 日、福岡
 8. Igarashi M, Kato F, Tsuji Y, Hasegawa Y, Ogata T, Fukami M. Silent mutations of androgen receptor gene in two patients with partial androgen insensitivity syndrome. 6th International Symposium on the Biology of Vertebrate Sex Determination, April 23-27, 2012, USA
 9. 宮戸真美, 緒方勤, 深見真紀. 精巢における男性ホルモン産生制御機構: MAMLD1 変異陽性患者とノックアウトマウスからの知見 第 35 回日本分子生物学会ワークショップ 2012 年 12 月 11-14 日、福岡

10. 五十嵐麻希, Dung Chi Vu, 小島祥敬, 堀川玲子, 緒方勤, 深見真紀. 次世代遺伝子解析技術を用いた性分化疾患 141 例の病因解析. 第 46 回日本小児内分泌学会学術集会 2012 年 9 月 27-29 日、大阪
11. 鈴木江莉奈, 五十嵐麻希, 宮戸真美, Dung Chi Vu, 緒方勤, 深見真紀. 46, XY 性分化疾患患者における 2 番染色体長腕部分欠失の同定. 第 46 回日本小児内分泌学会学術集会 2012 年 9 月 27-29 日、大阪
12. 深見真紀. 内分泌疾患のゲノムコピー数解析. 第 86 回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム 2013 年 4 月 25-27 日、仙台
13. 深見真紀. 新規遺伝子解析技術を用いたヒト性分化疾患・性成熟疾患の病因解析. 日本アンドロロジー学会第 32 回学術大会. 教育講演. 2013 年 7 月 26-27 日、大阪
14. 深見真紀. 小児内分泌疾患の遺伝子解析：新規解析技術を用いた疾患成立機序の解明. 第 22 回小児内分泌代謝フォーラム in 九州. 特別講演. 2013 年 7 月 27 日、福岡
15. 深見真紀. POR 欠損症の分子基盤と臨床像. 第 21 回日本ステロイドホルモン学会学術集会. シンポジウム 平成 25 年 11 月 16 日、大阪
16. 深見真紀. 性分化疾患の遺伝子診断. 第 23 回臨床内分泌代謝 Update. シンポジウム 平成 26 年 1 月 25 日、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
<http://www.ncchd.go.jp/research.php>
<http://nch.go.jp/endocrinology/>

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
 深見真紀 (FUKAMI, Maki)
 独立行政法人 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
 曾根田瞬 (SONEDA, Shun)
 独立行政法人 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：10367378

加藤芙弥子 (KATO, Fumiko)
 浜松医科大学・小児科・研究員
 研究者番号：10462798

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：