

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791103

研究課題名(和文)性分化疾患における新規原因遺伝子の同定と機能解明

研究課題名(英文) Identification and functional elucidation of novel causative genes in patients with disorders of sex development

研究代表者

五十嵐 麻希 (IGARASHI, 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・研究員

研究者番号：10623035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、次世代遺伝子解析技術を用いて性分化疾患(DSD: Disorders of sex development)患者における既知および新規原因遺伝子変異を同定することを目的に行われた。

257例に対して次世代遺伝子解析を行った。特記すべき成果は下記の通りである。(1)重度のDSDの47症例のうち、8例で病的意義が明確な既知遺伝子変異、29例で候補遺伝子変異、4例で染色体微小欠失を検出した。(2)尿道下裂の150症例のうち、7例で既知遺伝子変異、23例で疾患感受性多型を同定した。(3)低ゴナドトロピン性性腺機能低下症例においてはじめてFGF8遺伝子のフレームシフト変異を同定した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify genetic defects in patients with disorders of sex development (DSD). We performed next generation sequencing and array-based comparative genomic hybridization.

The results obtained from 257 DSD patients included the following findings. 1) Of 47 patients with the severe DSD, 8, 29 and 4 had causative mutations, candidate mutations and submicroscopic chromosomal deletions, respectively. 2) Of 150 patients with the hypospadias, 7 and 23 carried causative mutations and disease susceptibility polymorphisms, respectively. 3) A patient with hypogonadotropic hypogonadism was shown to have a frameshift mutation in FGF8. These data provided novel information about molecular basis of DSD.

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：遺伝子診断

キーワード：性分化疾患 次世代シーケンス アレイCGH

## 1. 研究開始当初の背景

性分化疾患 (DSD: Disorders of sex development) は、「染色体、生殖腺、もしくは解剖学的に性の発達が先天的に非定型的である状態」と定義された、約 60 種類以上の疾患群である。発症頻度は 4500 人に一人程度と推定され、外性器の形成異常、思春期発来が遅延、不妊などにより発見される。本症は、単一遺伝子疾患および多因子疾患として発症する。DSD 患者の遺伝子診断においては、さまざまな遺伝子が対象となる。これまでの DSD 患者の遺伝子解析では、比較的少数の既知遺伝子の解析が行われてきた。そのため、DSD 患者の変異同定率は低く、大部分の患者において遺伝的原因は未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代シーケンサーとアレイ CGH を用いた DSD 患者の変異解析と変異陽性患者の臨床解析、および、in vitro 解析、in silico 解析による新規 DSD 原因遺伝子の発見と機能の解明を行うことであった。

## 3. 研究の方法

### (1) DSD 発症の原因遺伝子の検索

国立成育医療研究センター (旧国立成育医療センター) にて、2002 年から 2011 年までに遺伝子解析依頼があった DSD 患者のうち、未だ原因遺伝子の特定に至らない約 400 例の末梢血または組織検体より採取した DNA を集積した。集積した DNA のうち、解析に必要な DNA 量がない場合は、末梢血または組織より作成され凍結保存されている細胞株を培養し、DNA の再抽出を行った。検体の DNA 量を確認し、次世代シーケンサーを用いて標的遺伝子の網羅的な変異解析を行った。また、カスタムアレイ CGH 解析により、標的遺伝子の欠失または重複の

有無を確認した。これらの解析により、遺伝子変異または欠失・重複が検出された場合、ダイレクトシーケンス、サブクローニングにより再現性の確認を行った。

次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析

1) サンプルの前処理: DSD の既知原因遺伝子および候補遺伝子を標的とするカスタムターゲットエンリッチメントシステムキットもしくはカスタムアンプリコンシーケンスキットを用いて、サンプルの前処理を行った。2) 次世代シーケンサーを用いて前処理したサンプルのシーケンスおよび解析を行った。3) 患者データをバイオフィォーマティックスの手法で解析し、リファレンスデータと異なる塩基配列を抽出した。4) ダイレクトシーケンスおよびサブクローニングにより、抽出した結果の再現性を確認した。

### アレイ CGH 解析

検体と同じ核型をもち、かつ妊孕性のある正常人の DNA をコントロールとして、アレイ CGH 解析を行った。

### (2) DSD 発症の原因遺伝子の確定

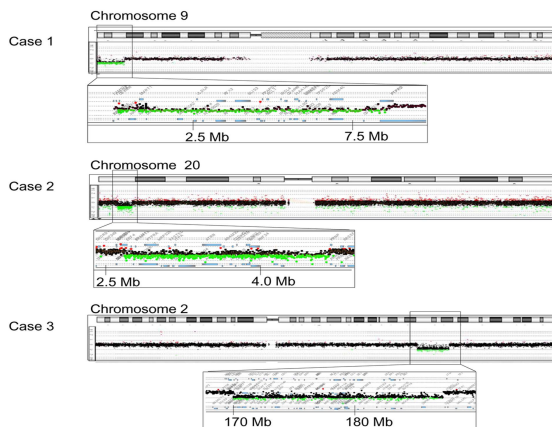
(1) で検出した遺伝子変異もしくは欠失・重複が、既報であるか否かを検索した。新規であった場合は、in silico 解析および in vitro 機能解析を行い、DSD 発症の原因遺伝子であるか否かを検討した。

(3) DSD 症例の病態と遺伝子型の関連検討  
(2) で得られたデータと、臨床情報を詳細に分類し、病態と遺伝子型の関連について検討した。

## 4. 研究成果

(1) 重度の外性器異常を伴う 46,XY DSD/46,XX DSD (47 症例)  
既知 DSD 責任遺伝子と候補遺伝子計 120 を

対象とするターゲットエンリッチメント、および、全ゲノム CGH を行った。次世代シーケンス解析の陽性対照として、4 例の既知変異陽性患者を同時に解析した。次世代シーケンス解析では、62 種類の遺伝子変異が同定された。変異の約 80% が直接塩基配列決定で再現可能であった。陽性対照の変異はすべて検出された。8 例において病的意義が明確な既知遺伝子変異 (AR, SF1, SOX9, BNC2) が、29 例で候補遺伝子の変異が同定された。CGH 解析では、4 例の染色体微小欠失が検出された (DMRT1 遺伝子領域を包含する 9 番染色体 2 例、2 番染色体 1 例、20 番染色体 1 例)。なお、この成果は 2013 年の Plos One に掲載された。



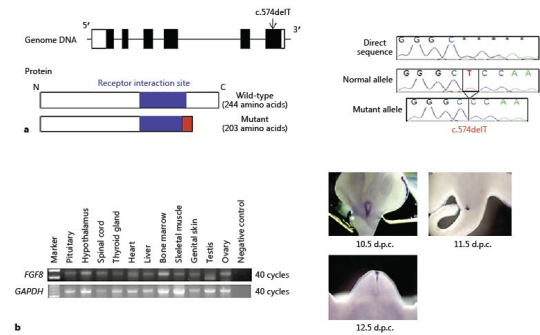
(2) 比較的軽度の外性器異常を伴う 46,XY DSD (n=150)

既知 DSD 責任遺伝子と候補遺伝子を対象とする次世代シーケンス解析を行った。7 例で既知遺伝子変異が 23 例で疾患感受性多型が同定された。現在成果を論文化している。

(3) 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 (60 例)

低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の既知責任遺伝子と候補遺伝子を対象とする次世代シーケンス解析を行った。FGF8 遺伝子のフレームシフト変異が、視床下部下垂体不全の病因である事を示した。この成果

は、2014 年の Hormone Research in Paediatrics に掲載された。



本研究では、次世代遺伝子解析技術が、遺伝的異質性を有する疾患の変異スクリーニングに有用であることが明らかとした。重症度の異なる DSD における既知遺伝子変異の寄与が明確となり、DSD 発症における oligogeneity の可能性および既知遺伝子変異による表現型の多様性が見出された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Saito R, Tamamoto Y, Goto M, Araki S, Kubo K, Kawada Y, Kusuhara K, Igarashi M, Fukami M. Tamoxifen treatment for pubertal gynecomastia in two siblings with partial androgen insensitivity syndrome. Hormone Research in Paediatrics. 81; 211-6. 2014. 査読有 DOI: 10.1159.

Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Haka K, Umezawa A, Yamada G, Ogata T, Fukami M. De novo Framishift mutation in fibroblast growth factor 8 in a male patient with gonadotropin deficiency. Hormone Research in Paediatrics. 2014. 査読有 DOI: 10.1159/000355380.

Igarashi M, Dung VC, Suzuki E, Ida S, Nakacho M, Nakabayashi K, Mizuno K, Hayashi Y, Kohri K, Kojima Y, Ogata

T, Fukami M. Cyptic genomic rearrangements in three patients with 46,XY disorders of sex development. PLOS One. Vol. 8. e68194. 2013. 査読有 DOI: 10.1371

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. May 9. 2013.

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/60/8/60\\_EJ13-0023/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/60/8/60_EJ13-0023/_article)

[学会発表](計 22 件)

五十嵐麻希, 宮戸真美, 和田友香, 中村美智子, 小島祥敬, 水野健太郎, 林祐太郎, 郡健二郎, 緒方勤, 深見真紀: MAMLD1 変異による尿道下裂発症機序の探索. 第 18 回日本生殖内分泌学会学術集会, 東京, 2013.12.7

五十嵐麻希, 宮戸真美, 和田友香, 中村美智子, 小島祥敬, 水野健太郎, 林祐太郎, 郡健二郎, 緒方勤, 深見真紀: 新規 MAMLD1 イントロン変異による尿道下裂発症機序の解明. 日本人類遺伝学会第 58 回大会, 仙台, 2013.11.21

泉陽子, 金城さおり, 鈴木江莉奈, 五十嵐麻希, 中林一彦, 緒方勤, 吉村泰典, 深見真紀: 特発性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症患者 25 例のゲノムコピー数解析. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2013.10.12

今雅史, 鈴木江莉奈, 長谷川行洋, 五十嵐麻希, 福井由宇子, 水野健太郎, 小島祥敬, 林祐太郎, 群健二郎, Dung Vu Chi, 緒方勤, 野々村克也, 深見真紀: 尿道下裂患者における既知発症

責任遺伝子および感受性遺伝子変異解析. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2013.10.12

五十嵐麻希, 宮戸真美, 和田友香, 中村美智子, 小島祥敬, 水野健太郎, 林祐太郎, 郡健二郎, 緒方勤, 深見真紀: 新規 MAMLD1 イントロン変異による尿道下裂発症機序の解明. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2013.10.10

鈴木江莉奈, 八ツ賀秀一, 五十嵐麻希, 宮戸真美, 中林一彦, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀: Kallmann 症候群患者における FGF8 フレームシフト変異の同定. 第 47 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2013.10.10

Igarashi M, Vu Chi Dung, Suzuki E, Ida S, Mizuno K, Kojima Y, Muroya K, Takakuwa S, Oto Y, Takazawa K, Stuji Y, Hasegawa Y, Horikawa R, Ogata T, Fukami M: Molecular analyses using next-generation technologies for 141 patients with disorders of sex development. 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology, Milan, Italy, 2013.9.20

Saito R, Yamamoto Y, Gotoh M, Araki S, Kubo K, Kawagoe R, Kawada Y, Kusuhara K, Igarashi M, Kato F, Fukami M: A rare case of siblings with partial androgen insensitivity syndrome diagnosed following gynaecomastia and the successful management of gynaecomastia using tamoxifen. 9th Joint Meeting of Paediatric Endocrinology, Milan, Italy, 2013.9.21

五十嵐麻希, ブウジュンイチ, 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 2012 年 12 月 11-14 日、福岡 .  
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 17 回日本生殖内分泌学会 . 2012 年 12 月 8 日、東京 .  
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 日本人類遺伝学会第 57 回大会 . 2012 年 10 月 24-27 日、東京 .  
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  
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  
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 , Kona , Hawaii , USA , 2012 .

〔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://nr ichd.ncchd.go.jp/endocrinology/ken.htm>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 麻希 ( IGARASHI , Maki )

( 独 ) 成育医療研究センター ・ 研究所 ・

分子内分泌研究部 ・ 研究員

研究者番号 : 10623035