

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670173

研究課題名(和文) ヒトゲノム脆弱性に関する遺伝的および環境因子の解明

研究課題名(英文) Genetic and environmental factors involved in human genomic instability

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：先天性疾患患者におけるゲノム微細構造異常を同定し、その発症メカニズム、および、ゲノム構造と当該患者の表現型との関連の有無を検討した。

代表的成果として、アロマターゼ過剰症を招くゲノム再構成の解明、SHOX異常症の原因となる新規偽常染色体領域欠失の同定、精子形成障害のリスクとなるY染色体構造多型の同定などが挙げられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we characterized several submicroscopic chromosomal rearrangements that underlie human disorders. We utilized array-based comparative genomic hybridization and multiplex ligation dependent probe amplification. As a result, we identified simple and complex rearrangements underlying aromatase excess syndrome. We also detected a hitherto unreported deletion in the pseudoautosomal region of Y chromosome in a patient with Langer mesomelic dysplasia. In addition, we characterized multiple Y chromosomal rearrangements that are associated with the risk of azo/oligospermia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞遺伝学 ゲノム 染色体微細構造異常 疾患

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム再構成は、ヒトの遺伝病の原因として重要である。これまでの研究から、欠失、重複、逆位のようなゲノム微細構造異常の原因は、組み換え異常および DNA 複製エラーの2つに大別されることが知られている。組み換え異常には非対立遺伝子間相同組換え (non-allelic homologous recombination, NAHR) と非相同末端再結合 (non-homologous end joining, NHEJ) が含まれ、DNA 複製エラーには fork stalling and template switching (FosTeS), microhomology-mediated break-induced replication (MMBIR) などが含まれる。過去の研究から、これらの組み換え異常はランダムに生じるのではなく、周辺のゲノムバックグラウンドによって誘導されることが示唆されている。しかし、これらの発症機序は解明されていない。また、ゲノム微細構造異常に起因するヒト疾患については、未解明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、先天性疾患患者におけるゲノム微細構造異常を同定し、これらの発症メカニズム、および、ゲノム構造と当該患者の表現型との関連の有無を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) ゲノム構造異常が疑われる先天性疾患患者を対象として、アレイ comparative genomic hybridization (CGH) もしくは Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 解析を行い、ゲノムコピー数異常を同定した。

(2) 切断点の両側に設計したプライマーを用いた LA-PCR の産物をサブクローニングし、シークエンスすることによって、切断点の塩基配列を決定した。

(3) 切断点の塩基配列をバイオインフォマティックスの手法で解析し、2つの切断点を含む領域の相同性の有無、融合点における microhomology や short nucleotide stretch の有無を検討した。これらをもとに、当該ゲノム構造異常の原因が NAHR, NHEJ, DNA 複製エラーのいずれに由来するものであるか明らかとした。さらに、切断点周辺のゲノム再構成誘導モチーフの有無を検討した。

(4) 患者のデータを集積し、ゲノム構造異常のパターンと当該患者の表現型、疾患重症度の関連について検討した。

## 4. 研究成果

代表的成果は下記のとおりである。

(1) アロマターゼ過剰症を招くゲノム再構成の解明：臨床的にアロマターゼ過剰症が疑われる患者のゲノムコピー数解析を行い、新規患者6家系を同定した。これら6家系と既報3家系のゲノムコピー数解析を行い、下記の点を見出した。

アロマターゼ過剰症の発症には少なくとも11種類の15番染色体長腕ゲノム微細構造異常が関与する。これには、重複、欠失、染色体逆位、および、複雑ゲノム再構成が含まれる。

これらのゲノム構造異常は、CYP19A1 遺伝子翻訳領域またはプロモーター領域のコピー数増加、もしくはCYP19A1による広範囲発現性プロモーターの獲得を介してCYP19A1 過剰発現を招く。

これらゲノム構造異常の発生には、NAHR, NHEJ, FosTeS/MMBIR が関与する。これらの切断点周辺には、ゲノム再構成誘導モチーフの集積はなく、何らかの未知の機序が作用していると推測される。

患者の疾患重症度は、おおむね獲得プロモーターの機能を反映するが、ゴナドトロピン分泌障害の程度は遺伝子異常パターンに無関係である。

(2) SHOX 異常症を招く性染色体微細構造異常の同定：SHOX ホモ接合性異常が示唆されるランガー中肢骨短縮症候群患者1例において、性染色体擬常染色体領域の複合ヘテロ結合性微細欠失を同定した。1つの欠失には、SHOX 遺伝子エクソンが含まれていた。もう一方の欠失は、既報の SHOX 下流エンハンサー領域の近傍であった。この成績は、SHOX 遺伝子に複数の遠位エンハンサーが存在する可能性を示唆する。

(3) SOX2 遺伝子欠失を招く機序の解明：眼球形成異常症患者におけるゲノムコピー数異常を同定し、その切断点を決定した。この解析によって、SOX2 半量不全が多彩な微細欠失によって生じること、またこのような欠失の少なくとも一部は、Alu 配列によって誘導される NAHR に起因する可能性が高いことを見出した。

(4) 8番染色体父性片親性アイソダイソミーにより CYP11B1 遺伝子劣性変異が顕在化し、11 水酸化酵素欠損症が発症した症例を同定した。常染色体劣性疾患の発症機序のひとつとして、片親性アイソダイソミーの可能性を考慮する必要性を明確とした。本症例の遺伝子異常には、母体高齢化の寄与はないと推測される。

(5) 56 例の非閉塞性無精子症/乏精子症患者を含む 121 例の日本人男性を対象として、MLPA を用いた Y 染色体 azoospermia factor (AZF) 領域のコピー数解析を行い、下記の点を明らかとした: 1) AZF 領域のゲノム再構成には、単純欠失と単純重複のほか、重複と欠失の組み合わせや triplication を含む多彩なゲノム構造変化が含まれる。2) AZF 領域のゲノム再構成は、従来の報告より明らかに高頻度であり、多様性に富んでいる。3) 日本人集団においては、従来報告されている AZF 領域内の微小欠失よりもコピー数増加が精子形成に対して悪影響を及ぼす可脳性がある。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計7件)

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.* 査読あり 98 E2013-21 2013. doi: 10.1210/jc.2013-2520.

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. *PlosOne* 査読あり 8 e68194, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0068194

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.* 査読あり 27 3198-208, 2013 doi: 10.1096/fj.12-222745

Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jinno T, Nakabayashi K, Nishimura G, Nagai T, Ogata T, Fukami M. Compound heterozygous deletions in pseudoautosomal region 1 in an infant with mild manifestations of langer

mesomelic dysplasia. *Am J Med Genet* 査読あり A164A 505-10, 2014 doi: 10.1002/ajmg.a.36284

Saito K, Miyado M, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Katsumi M, Saito H, Kubota T, Okada H, Ogata T, Fukami M. Copy-Number Variations in Y Chromosomal Azoospermia Factor Regions Identified by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification *J Hum Genet* 査読あり 60 127-131, 2015 10.1038/jhg.2014.115

Igarashi M, Mikami H, Katsumi M, Miyado M, Izumi Y, Ogata T, Fukami M. SOX3 Overdosage Permits Normal Sex Development in Females with Random X Inactivation Sex Dev 査読あり (in press) 2015

Katsumi M, Ishikawa H, Tanaka Y, Saito K, Kobori Y, Okada H, Saito H, Nakabayashi K, Matsubara Y, Ogata T, Fukami M, Miyado M. Microhomology-Mediated Microduplication in the Y Chromosomal Azoospermia Factor a (AZFa) Region in a Male with Mild Asthenozoospermia. *Cytogenet Genome Res* 査読あり 144 285-289, 2014 10.1159/000377649

### 〔学会発表〕(計5件)

Fukami M. Molecular diagnosis and management of hereditary gynecomastia. The 9th Joint meeting of pediatric endocrinology, (招待講演) 2013年09月19日~09月22日 Milan

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(招待講演) 2013年04月25日~04月27日 仙台

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.(招待講演) 2013年07月26日 大阪

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.(招待講演) 2013年07月27日 福岡

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(招待講演) 2014年01月25日 名古屋

### 〔その他〕

ホームページ等

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  
<http://nr.ichd.ncchd.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

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  
・分子内分泌研究部・研究員  
研究者番号：10623035

綾部 匡之 (AYABE, Tadayuki)

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：80566555