

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860837

研究課題名(和文)次世代技術を用いた性分化疾患の網羅的遺伝子解析と機能解明

研究課題名(英文)Identification and functional elucidation of genetic abnormalities in patients with disorders of sex development using next-generation approaches

研究代表者

五十嵐 麻希(IGARASHI, MAKI)

国立研究開発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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：性分化疾患(DSD)患者173例の網羅的遺伝子解析を行った。特記すべき成果として、(1)尿道下裂患者におけるMAMLD1遺伝子変異の同定、(2)骨異常を伴わない46,XY DSD尿道下裂患者3例におけるSOX9遺伝子異常の同定、(3)尿道下裂患者8例における発症責任遺伝子の同定、(4)DSDを伴わない女性におけるSOX3遺伝子重複の同定、(5)尿道下裂患者における無精子症関連領域コピー数多型の同定、(6)46,XX精巢性/卵精巢性DSD2例に共通するNR5A1遺伝子変異の同定が挙げられる。研究成果(1)から(5)は、論文として英文科学雑誌に発表し、研究成果(6)は現在投稿中である。

研究成果の概要(英文)：We performed systematic molecular analysis of 173 patients with disorders of sex development (DSD). Remarkable findings include: (1) Identification of a splice site mutation of MAMLD1 in a patient with hypospadias. (2) Identification of genetic alterations in SOX9 and its flanking region in 3 patients with 46,XY DSD without campomelic dysplasia. (3) Identification of causative gene mutations in 8 patients with hypospadias. (4) Identification of copy number gain of SOX3 in DSD-negative females. (5) Identification of copy number variations at azoospermia-related region in patients with hypospadias. (6) Identification of identical NR5A1 mutations in two 46,XX individuals with testicular tissues. The findings from (1) to (5) were published in scientific journals, and (6) was submitted.

研究分野：分子生物学

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、出生時の外性器異常、思春期発来異常および不妊の原因など多彩な臨床症状を招く病態である。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。これまでに、46,XY DSD 発症に關与する遺伝子が数多く見出されている。一方、46,XX DSD 発症メカニズムには未解明な部分が多い。

研究代表者は、2011 年から DSD 患者検体を対象として次世代シーケンサー (NGS) を用いた遺伝子変異解析、およびアレイ CGH を用いたゲノムコピー数解析行ってきた。これまでの研究成果から、DSD 患者における網羅的遺伝子変異解析の有用性が明確となった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、DSD 患者を対象とした次世代シーケンサーとアレイ CGH を用いた網羅的遺伝子解析、および、病因候補遺伝子の in vitro 解析、in silico 解析、in vivo 解析、臨床解析によって、新規 DSD 原因遺伝子の発見と機能の解明を行うことである。

3. 研究の方法

本研究では、以下の検討を行った。先行研究で集積した DSD 患者を対象として遺伝子解析を行い、既知および新規遺伝子異常を同定した。機能解析によって個々の変異による DSD 発症機序を解明した。変異陽性患者の臨床解析により、疾患の病態を明らかにした。

4. 研究成果

研究期間において、DSD 患者 173 例の網羅的遺伝子解析を行った。特記すべき成果は、下記である。

1) MAMLD1 スプライスサイト変異を尿道下裂患者において同定した。この変異が蛋白合成障害を引き起こすことにより疾患の発症に關与した可能性を見出した。

2) 骨異常を伴わない 46,XY DSD の 2 症例における SOX9 遺伝子変異と、1 例における SOX9 遺伝子上流の欠失を同定した。これらが、SOX9 の異常によって疾患を引き起こした可能性を見出した。

3) 合併症のない尿道下裂患者 66 例に対して 25 遺伝子を標的とした網羅的遺伝子解析を行った。8 例で既知発症責任遺伝子変異を同定し、このうち 1 例で 2 種類の既知遺伝子変異を同定した。この成果により、尿道下裂症例で初めて oligogeneciy の可能性を示した。

4) SOX3 遺伝子とその隣接領域の重複は 46,XX DSD の原因となることが知られている。研究代表者は、SOX3 遺伝子領域の重複を持つ DSD 陰性女性の解析により、SOX3 の重複のみでは性分化異常を生じないことを示した。

5) 尿道下裂患者 89 例において、無精子症関連領域と SRY 領域のヒコピー数変化を調べた。これらの領域は尿道下裂の疾患発症に寄与しないことを示した。

6) 46,XX 精巢性/卵精巢性 DSD 患者 2 例に

おいて、共通の NR5A1 遺伝子変異を同定した。研究代表者は、この変異が X X 性腺内で NROB1 の抑制を免れることにより疾患発症に關与した可能性を見出した。

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 9 件)

1. Kon M, Saito K, Mitsui T, Miyado M, Igarashi M, Moriya K, Nonomura K, Shinohara N, Ogata T, Fukami M. Copy Number Variations of the Azoospermia Factor Region and SRY Are Not Associated with the Risk of Hypospadias. Sex Dev. Pp12-15, 10, 2016.
2. Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nagasaki K, Horikawa R, Nagai T, Tsuchiya T, Suzuki E, Miyado M, Hata K, Nakabayashi K, Hayashi K, Mastubara Y, Baba T, Morohashi K, Igarashi A, Ogata T, Takada S, Fukami M. Testicular dysgenesis/regression without campomelic dysplasia in patients carrying missense mutations and upstream deletion of SOX9. Mol Genet Genomic Med. 3, pp550-557, 2015.
3. Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Kohri K, Ogata T, Fukami M. Novel Splice Site Mutation in MAMLD1 in a Patient with Hypospadias. Sex Dev. 9, pp130-135, 2015.
4. 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. 9, pp125-129, 2015.
5. Kon M, Suzuki E, Dung VC, Hasegawa Y, Mitsui T, Muroya K, Ueoka K, Igarashi N, Nagasaki K, Oto Y, Hamajima T, Yoshino K, Igarashi M, Kato-Fukui Y, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Matsubara Y, Moriya K, Ogata T, Nonomura K, Fukami M. Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients. Hum Reprod. 30, pp499-506, 2015.

6. Nakashima S, Ohishi A, Takada F, Kawamura H, Igarashi M, Fukami M, Ogata T. Clinical and molecular studies in four patients with SRY-positive 46,XX testicular disorders of sex development: implications for variable sex development and genomic rearrangements. *J Hum Genet.* 59, pp549-553. 2014.
7. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 112, pp1130-1136. 2014.
8. Inui M, Miyado M, Igarashi M, Tamano M, Kubo A, Yamashita S, Asahara H, Fukami M, Takada S. Rapid generation of mouse models with defined point mutations by the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep.* 4, pp1-8, 2014.
9. Yagi H, Takagi M, Kon M, Igarashi M, Fukami M, Hasegawa Y. Fertility preservation in a family with a novel NR5A1 mutation. *Endocr J.* 62, pp289-295, 2014.
4. 福井 由宇子、五十嵐 麻希、長崎 啓祐、位田 忍、堀川 玲子、鈴木 江莉奈、宮戸 真美、中村 明枝、緒方 勤、深見 真紀。Vanishing Testis Syndrome における DSD 関連遺伝子の網羅的変異解析。第 49 回 日本小児内分泌学会学術集会。2015 年 10 月 8 日-10 日。東京。
5. 山口 理恵、榎村 哲生、加藤 芙弥子、門 奈央子、五十嵐 麻希、深見 真紀、緒方 勤。SOX9 伸長変異(p.Q496fsX578) はタンパク不安定性を介して acampomelic campomelic dysplasia を招く。第 49 回 日本小児内分泌学会学術集会。2015 年 10 月 8 日-10 日。東京。
6. 五十嵐 麻希、今 雅史、福井 由宇子、鈴木 江莉奈、和田 友香、宮戸 真美、緒方 勤、深見 真紀。ヒト性分化疾患の網羅的遺伝子変異解析、第 88 回 日本内分泌学会学術総会。2015 年 4 月 23 日-25 日。東京。
7. Igarashi M, Izumi Y, Kon M, Kato-Fukui Y, Suzuki E, Wada Y, Miyado M, Ogata T, Fukami M. Systematic mutation analysis of patients with disorders of sex development. Seventh international symposium in the biology of vertebrate sex determination. 2015 年 4 月 13 日-17 日。ハワイ。
8. 鈴木 江莉奈、泉 陽子、神崎 晋、八ツ賀 秀一、金城 さおり、五十嵐 麻希、中林 一彦、梅澤 明弘、秦 健一郎、緒方 勤、深見 真紀。低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 58 例の網羅的遺伝子解析。第 19 回 日本生殖内分泌学会学術集会。2015 年 1 月 10 日。大阪。

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 五十嵐 麻希、鹿島田 健一、箱田 明子、高澤 啓、菅野 潤子、宮戸 真美、加藤 朋子、乾 雅史、関戸 良平、高田 修治、緒方 勤、深見 真紀。SRY 陰性 46,XX 精巢性/卵精巢性性分化疾患患者 2 例に共通する NR5A1 ミスセンス変異の同定。日本人類遺伝学会 第 60 回大会。2015 年 10 月 14 日-17 日。東京。
2. 山口 理恵、榎村 哲生、加藤 芙弥子、門 奈央子、五十嵐 麻希、深見 真紀、緒方 勤。SOX9 伸長変異(p.Q496fsX578) はタンパク不安定性を介して acampomelic campomelic dysplasia を招く。日本人類遺伝学会 第 60 回大会。2015 年 10 月 14 日-17 日。東京。
3. 五十嵐 麻希、鹿島田 健一、箱田 明子、高澤 啓、菅野 潤子、宮戸 真美、加藤 朋子、乾 雅史、関戸 良平、高田 修治、緒方 勤、深見 真紀。SRY 陰性 46,XX 精巢性/卵精巢性性分化疾患患者 2 例に共通する NR5A1 ミスセンス変異の同定。第 49 回 日本小児内分泌学会学術集会。2015 年 10 月 8 日-10 日。東京。
9. 五十嵐 麻希、今 雅史、福井 由宇子、鈴木 江莉奈、和田 友香、宮戸 真美、緒方 勤、深見 真紀。ヒト性分化疾患の網羅的遺伝子変異解析、第 37 回 日本分子生物学会年会。2014 年 11 月 25 日-27 日。神奈川。
10. 五十嵐 麻希、三上 仁、勝見 桃理、泉 陽子、緒方 勤、深見 真紀。46,XX 精巢性性分化疾患を伴わない母娘例における SOX3 重複の同定。第 48 回 日本小児内分泌学会学術集会。2014 年 9 月 25 日-27 日。静岡。
11. 中島 信一、大石 彰、高田 史男、河村 秀樹、小野 裕之、山口 恵理、五十嵐 麻希、深見 真紀、中西 俊樹、緒方 勤。SRY(+)_{46,XX} 精巢性性分化疾患 4 症例における性分化決定因子と転座発症機序の解析。第 48 回 日本小児内分泌学会学術集会。2014 年 9 月 25 日-27 日。静岡。
12. 山口 理恵、榎村 哲生、加藤 芙弥子、永田 絵子、中島 信一、馬場 崇、諸橋 憲一郎、五十嵐 麻希、深見 真紀、緒方 勤。SOX9 frameshift mutation in a patient with acampomelic campomelic

- dysplasia: the second case. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会。2014 年 9 月 25 日-27 日。静岡。
13. 今 雅史、室谷 浩二、長谷川 行洋、長崎 啓祐、Dung Vu Chi、上岡 克彦、大戸 祐二、五十嵐 登、三井 貴彦、鈴木 江莉奈、五十嵐 麻希、福井 由宇子、守屋 仁彦、野々村 克也、緒方 勤、深見 真紀。非症候性尿道下裂発症における単一遺伝子変異の寄与の解明。第 48 回日本小児内分泌学会学術集会。2014 年 9 月 25 日-27 日。静岡。
 14. Igarashi M, Horikawa R, Nakabayashi K, Hata K, Ogata T, Fukami M. Identification of a missense MAP3K1 mutation in a patient with hypospadias. 53th annual ESPE meeting. 2014 年 9 月 18 日-20 日。Dublin。
 15. Kon M, Igarashi M, Izumi Y, Kato-Fukui Y, Mizuno K, Hayashi Y, Kohri K, Kojima Y, Nonomura K, Ogata T, Fukami M. Mutation analysis of KDM3A (lysine-specific demethylase 3A) in patients with hypospadias. 53th annual ESPE meeting. 2014 年 9 月 18 日-20 日。Dublin。
 16. 八木 弘子、高木 優樹、長谷川 行洋、五十嵐 麻希、今 雅史、深見 真紀。妊娠性が確認できた新規 SF1 遺伝子異常症の父子例。第 87 回日本内分泌学会学術総会。2014 年 4 月 24 日-26 日。福岡。
 17. 中島 信一、大石 彰、高田 史男、永田 絵子、加藤 英弥子、山口 理恵、五十嵐 麻希、深見 真紀、中西 俊樹、緒方 勤。SRY 陽性 46,XX DSD (disorders of sex development)4 症例の遺伝学的解析。第 87 回日本内分泌学会学術総会。2014 年 4 月 24 日-26 日。福岡。

〔図書〕(計 1 件)

五十嵐 麻希、深見 真紀。日常診療における性分化の診かた。性分化疾患と遺伝子異常。小児内科。東京、46 巻 7 号, pp895-899, 2014

〔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://nrichd.ncchd.go.jp/endocrinology/ken.htm>

6. 研究組織
(1)研究代表者
五十嵐 麻希 (IGARASHI, Maki)
(国)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