

201442062A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等実用化研究事業

性分化・性成熟領域38疾患の診療ガイドライン作成に向けた
遺伝子診断法の確立

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 深見 真紀

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省難治性疾患等実用化研究事業委託事業による委託業務として、深見真紀が実施した平成26年度「性分化・性成熟領域38疾患の診療ガイドライン作成に向けた遺伝子診断法の確立」の成果を取りまとめたものです。

委託業務成果報告書目次

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
性分化・性成熟領域38疾患の診療ガイドライン作成に向けた遺伝子診断法の確立 深見真紀	1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 性分化疾患の遺伝子解析 深見真紀	4
2. 研究成果に基づいた診療ガイドラインの作成 緒方勤	11
3. 性分化・性成熟疾患の遺伝子解析 長谷川奉延 （資料）表 1. 高速かつ包括的な遺伝子解析対象の性分化・性成熟領域 15 疾患	20
4. 臨床検体・臨床情報の集積とデータ解析 堀川玲子	24
5. 臨床検体・臨床情報の集積とデータ解析 長谷川行洋	28
6. 臨床検体・臨床情報の集積とデータ解析 小島祥敬	30
7. 疾患モデルの作成と解析 諸橋憲一郎	35
III. 学会等発表実績	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷	49

性分化・性成熟領域38疾患の診療ガイドライン作成に向けた遺伝子診断法の確立

担当責任者 深見真紀 国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部部长

研究要旨

本研究の目的は、難治性疾患等政策研究事業領域別基盤研究分野「性分化・性成熟疾患群における診療ガイドラインの作成と普及」班における診療ガイドライン作成の基盤となるエビデンスの構築である。本年度は、全国の臨床医や日本小児内分泌学会と連携して性分化・性成熟疾患患者の臨床検体300例以上を集積し、先行研究と合わせて800以上の検体を集積した。検体は、ナショナルセンターバイオバンク事業との連携でバンキングした。さらに次世代シーケンサーを用いた疾患パネル、アレイCGHを含むコピー数解析を含む効率的遺伝子診断システムを構築した。これを用いて代表的疾患症例約500の遺伝子解析を行った。この解析によって日本人患者の遺伝子変異パターンおよび臨床スペクトラムを明らかとし、データベースに登録した。また、SRY (+) 46,XY性分化疾患などの疾患成立機序の解明、治療法の提唱、モデル動物の解析を行った。以上の成果を英文論文、研究班ホームページ、学会招待講演などで公表した。

A. 研究目的

本研究の目的は、難治性疾患等政策研究事業領域別基盤研究分野研究班における診療ガイドライン作成の基盤となるエビデンスの構築である。

性分化・性成熟疾患は、外性器異常、思春期発来異常、性腺腫瘍、不妊を介して生涯にわたるQOL 低下を招く難病である。これらの疾患の診療ガイドライン作成には遺伝学的背景に基づく正確な病型分類が必須であるが、これまで遺伝子診断法は確立されていない。また、本症の発症メカニズムには未解明の点が多い。患者の網羅的遺伝子解析およびモデル動物解析によって、新たな疾患発症機序が解明されると期待される。さらに、本研究班で集積されるデータは、国際研究の基盤となる。

B. 研究方法

1. 臨床検体の集積

日本小児内分泌学会等と連携し、国内外の医療機関から性分化・性成熟疾患患者の検体および臨床情報を集積した。これらの検体と臨床情報は、独自のクラウドネットワークデータベースで管理した。さらに、検体の管理は、成育バイオバンク事業の一環として行った。

2. 遺伝子解析

(1) 既知疾患責任遺伝子解析: 次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンス(Haloplex, Agilent Technologies)もしくはターゲットエンリッチメント(Sureselect, Agilent Technologies) Multiplex

ligation dependent probe amplification (MLPA)、Array-comparative genomic hybridization (aCGH) など最新の遺伝子解析技術を用いて、患者の遺伝子解析を行った。さらに、遺伝子データと臨床情報を比較し、疾患重症度決定因子について検討を行った。

3. モデル動物解析

胎児精巣におけるステロイド産生制御を解明するモデル動物解析を開始した。本年度は、マウスの胎仔精巣を用いて、胎児型ライディッヒ細胞の前駆細胞を同定する解析を行った。胎児型ライディッヒ細胞の成熟過程を明らかにすることによって、男性性分化に関与する分子ネットワークが解明されると期待される。

(倫理面への配慮)

1. 遺伝子解析: 本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守して施行した。遺伝子解析を実施する国立成育医療研究センター倫理委員会と慶応義塾大学倫理委員会において下記研究課題が承認されている。さらに、試料の採取を行う各医療機関でも本研究課題が承認されている。

- ① 性分化疾患・性成熟疾患・生殖機能障害における遺伝的原因の探索(国立成育医療研究センター課題番号512;代表 深見真紀)
- ② 卵巣機能不全の分子基盤の探索(国立成

育医療研究センター課題番号646;代表 深見真紀)

- ③ 先天性ステロイドホルモン産生異常の原因遺伝子同定に関する研究(慶應義塾大学課題番号2011-149-2;代表 長谷川奉延)
2. 患者情報登録:本研究の検体と情報は、クローズドネットワークから成る登録システムで管理する。このシステムは、国立成育医療研究センター倫理委員会において承認されている。
 - ① 小児内分泌疾患患者登録システムの確立と推進に関する研究(国立成育医療研究センター課題番号637;代表 深見真紀)
3. 組換えDNA実験:カルタヘナ法を厳守して行った。これに関して、国立成育医療研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の講習を受け、実験計画番号(06-7および07-7)で組換えDNA実験が承認されている。
4. 動物実験:(独)国立成育医療研究センターおよび九州大学における動物実験に関する指針に準拠して研究を実施した。国立成育医療研究センターでは、実験動物委員会の講習を受け、承認を受けている(承認番号2008-001;代表 深見真紀)。

C. 研究結果

1. 臨床検体の集積

本研究期間において、300例以上の検体および臨床情報を集積した。集積された検体には、ゲノムDNA、リンパ芽球様不死化細胞株、皮膚繊維芽細胞などが含まれる。重要な点として、多数の尿道下裂および停留精巣患者の血液、包皮および陰囊皮膚検体組織採取データを集積した。また、患者の臨床症状の重症度や合併症の有無を調査した。先行研究で集積された検体と合わせて800例以上が集積された。検体は、成育医療センターが行っているナショナルセンターバイオバンク事業との連携でバンキングした。

2. 遺伝子解析

本研究期間において、約500例の遺伝子解析を行った。主な成果は下記のとおりである。

遺伝子診断:次世代シーケンサーによるターゲットエンリッチメントおよびアンプリコンシーケンスを用いて高速かつ包括的な性分化・性成熟領域38疾患の遺伝子解析系を立ち上げ、運用可能とした。さらにアレイCGHおよびMLPA法によって、正常核型患者における微細ゲノム構造異常を同定した。

Oligogenic disorder, 多因子疾患の解析:代表的 Oligogenic disorder であるゴナドトロピン欠損症、多

因子疾患である非症候性尿道下裂を対象として、既知原因遺伝子網羅的変異解析およびゲノムコピー数解析を行った。これによって、既知疾患原因遺伝子変異の寄与の程度が明確となった。また、既知遺伝子変異異常症の臨床スペクトラムが明確となった。とくに重要な点として、非症候性尿道下裂が oligogenic disorder として発症する可能性がはじめて見出された。さらに、SOX3 ポリアラニン欠失や WDR11 ヘテロ接合性変異の新たな表現型の可能性が見出された。

希少疾患解析:さまざまな希少疾患患者において、遺伝子変異を同定した。以下の点を見出した。(1) SRY (+) 46,XY DSD (disorders of sex development) における性分化の程度は、X 染色体不活化の波及や position effect による SRY の発現低下以外に、異常 Xp;Yp 転座によるクロマチン3次元構造変化などに影響される。(2) IMAGE 症候群患者の性分化疾患発症の主因は胎盤形成不全である。(3) BHLHA9 を含む重複は、裂手裂足症のみならず外生殖器異常にも関与する。(4) backdoor pathway によるジヒドロテストステロン産生の有無の解析の用意が整った。(5) 脳の性分化(性自認)状態の研究を開始した。(6) NR5A1 遺伝子 LBD 領域に E304K 変異をもつ父-息子例を同定した。E304K 変異の機能解析を行い、残存する機能を確認した。NR5A1 機能低下変異が男性妊孕性を傷害しない可能性を見出した。

3. モデル動物解析:本研究期間には、胎児期男性化障害の動物モデルについて検討した。胎仔型ライディッチ細胞は胎仔精巣の前駆細胞から分化すると考えられてきたが、前駆細胞の実体は不明であった。この前駆細胞を含む細胞集団を分離し、その性質を明らかにするとともに、成獣精巣への移植実験により、これらの細胞が胎仔型ライディッチ細胞と成獣型ライディッチ細胞に分化する細胞によって構成されることを示した。これは、各発生段階における男性ホルモン産生の調節メカニズムの解明につながる期待される。

D. 考察

最新技術を用いた遺伝子解析は、oligogenic disorder や多因子疾患、希少疾患の遺伝診断に極めて有効であることが確認された。性分化疾患・性成熟疾患は遺伝的異質性を有する疾患であり、分子遺伝学的発症機序に基づく疾患分類が重要である。効率的遺伝子診断システムの構築は、ガイドライン策定の基盤となる。このような情報は、患者の予後の改善に直接後見すると期待される。さらに今後、既知遺伝子変異陰性患者のエクソーム解析、モデル動物解析などによって、新規発症機序が解明さ

れると期待される。

E. 結論

性分化・性成熟疾患患者の臨床検体を集積し、最新技術を用いた効率的遺伝子解析を行った。これにより、多数の日本人患者の分子基盤を明らかとした。今後さらに患者のデータを集積し、ガイドライン策定に貢献する。

F. 健康危険情報

該当なし

研究課題 性分化疾患の遺伝子解析

研究分担者 深見真紀（国立成育医療研究センター 分子内分泌研究部部長）

研究要旨

全国の臨床医や学会と連携して性分化・性成熟疾患患者の臨床検体296を集積した。検体は、ナショナルセンターバイオバンク事業との連携でバンキングした。さらに次世代シーケンサー、アレイCGHを含む最新の遺伝子解析技術を導入し、個々の疾患に対する効率的遺伝子診断システムを構築した。これを用いて代表的疾患症例260の遺伝子解析を行った。この解析によって日本人患者の遺伝子変異パターンおよび臨床スペクトラムを明らかとし、データベースに登録した。また、新たな疾患成立機序の解明、治療法の提唱を行った。以上の成果を英文論文、研究班ホームページ、学会招待講演などで公表した。

A. 研究目的

本研究の目的は、難治性疾患等政策研究事業領域別基盤研究分野「性分化・性成熟疾患群における診療ガイドラインの作成と普及」班における診療ガイドライン作成の基盤となるエビデンスの構築である。

性分化・性成熟疾患は、生涯にわたるQOL低下を招く難病である。これらの疾患の診療ガイドライン作成には遺伝学的背景に基づく正確な病型分類が必須であるが、現在遺伝子診断法は確立されていない。本疾患の遺伝子変異パターンと臨床像には人種差があるため、日本人患者のデータ集積が必要である。

B. 研究方法

1. 臨床検体の集積

日本小児内分泌学会等と連携し、国内外の医療機関から性分化・性成熟疾患患者の検体および臨床情報を集積した。これらの検体と臨床情報は、独自のクローズドネットワークデータベースで管理した。さらに、検体の管理は、成育バイオバンク事業の一環として行った。

2. 遺伝子解析

(1) 既知疾患責任遺伝子解析:次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンス(Haloplex, Agilent Technologies)もしくはターゲットエンリッチメント(Sureselect, Agilent Technologies) によって、患者ゲノムの既知疾患責任遺伝子の変異スクリーニングを行った。本解析は、難治性疾患実用化研究事業遺伝子拠点研究班と連携しておこなった。塩基置換は、Surecall system (Agilent Technologies) もしくは SAMtools 0.1.17 software (<http://samtools.sourceforge.net>) を用いて抽出した。病的意義が否定できない塩基置換は、サンガー法で確認した。

(2) 既知遺伝子変異の疾患スペクトラムと疾患重症度決定因子の解明: 遺伝子変異が同定された患者の臨床情報を解析し、表現型スペクトラム、遺伝子型-表現型関連の有無を検討した。

(3) Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA): 性分化疾患患者、先天奇形症候群患者のうち、特定染色体座位のコピー数異常が疑われる症例に対し、MLPA 解析(MRC Holland)を行った。

(4) Array-comparative genomic hybridization (aCGH): 原因不明の症例および上記 MLPA でこ

れまで報告のないコピー数異常が同定された患者を対象に、aCGH による全ゲノムコピー数解析 (Agilent Technologies)を行った。

(倫理面への配慮)

遺伝子解析:本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年)を遵守して施行した。国立成育医療研究センター倫理委員会において下記研究課題が承認されている。さらに、試料の採取を行う各医療機関でも本課題が承認されている。

1. 性分化疾患・性成熟疾患・生殖機能障害における遺伝的原因の探索(国立成育医療研究センター課題番号512)
2. 卵巣機能不全の分子基盤の探索(国立成育医療研究センター課題番号646)

上記研究課題では、研究への参加および撤回が自由意思で決定されること、検体が個人識別情報をなくして匿名化された後に解析されることが定められている。同意は全て書面で行われ、同意書および患者と匿名化番号の対応表は、個人情報管理者の部屋の鍵付きキャビネットで保管される。

組換えDNA実験:カルタヘナ法を厳守して行った。これに関して、国立成育医療研究センター遺伝子組換え実験安全委員会の講習を受け、実験計画番号(06-7および07-7)で組換えDNA実験が承認されている。

C. 研究結果

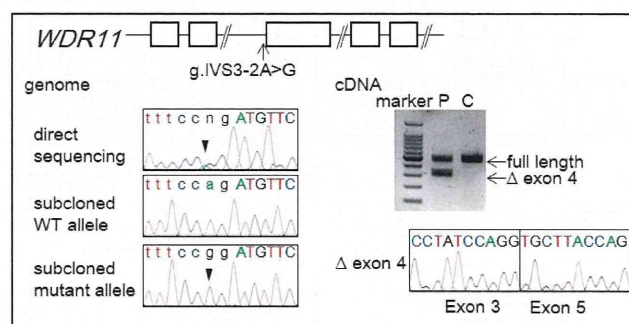
1. 臨床検体の集積

本研究期間において、296 の検体および臨床情報を集積した。検体には、ゲノム DNA、リンパ芽球様不死化細胞株、皮膚繊維芽細胞などが含まれる。

2. 遺伝子解析

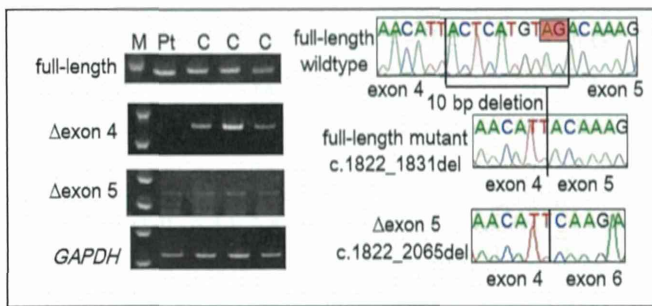
(1) 性成熟疾患:ゴナドトロピン欠損症患者を対象として、次世代シーケンサーを用いた既知責任

遺伝子のターゲットリシーケンスおよびアレイCGH による全ゲノムコピー数解析を行った。その結果、58 例中 14 例において明らかな病的遺伝子変異を同定した。まれな遺伝子異常として、複合型下垂体機能低下症患者における *WDR11* スプライス変異(下図)、単独ゴナドトロピン欠損症患者における *FGFR1* 欠失と *SOX3* ポリアラニン欠失を同定した。これによって、日本人患者における既知遺伝子変異の寄与の程度および既知遺伝子変異異常症の臨床スペクトラムが明確となった。さらに、*SOX10* 異常症のゴナドトロピン欠損の主病変が下垂体前葉ではなく、視床下部であることを明確とした。

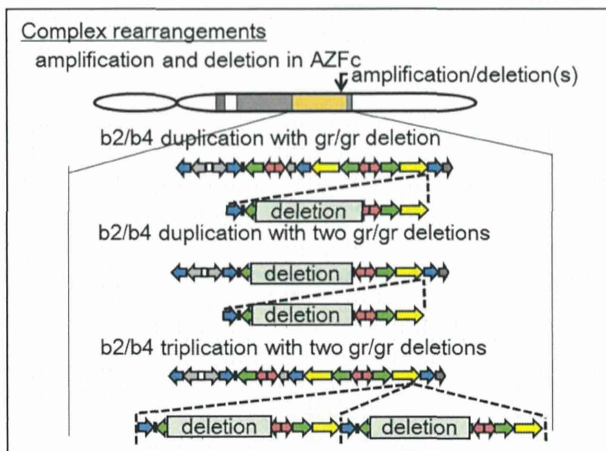


(2) 非症候性尿道下裂患者の網羅的遺伝子変異解析およびコピー数解析: 62 例の解析を行い、本症患者の 10%以上に既知単一遺伝子変異もしくはモザイク染色体構造異常が存在することを見出した。陰茎部開口尿道下裂を呈する比較的軽度な症例においても、病的単一遺伝子変異が存在することが明らかとなった。

(3) 尿道下裂患者における新規変異の同定:非症候性尿道下裂患者 1 例において、新規 *MAMLD1* スプライス変異を同定し、この変異が細胞内翻訳障害を招く可能性を見出した(下図)。これによって、*MAMLD1* 変異が機能低下蛋白の形成、nonsense-mediated mRNA decay のみならず、発現蛋白量の低下を介して性分化疾患を招くことが明らかとなった。



(4) 生殖機能障害: 56 例の無精子症/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 を含む多彩な構造変化が含まれる。2) AZF 領域のコピー数解析は、従来の報告より明らかに高頻度であり、多様性に富む(下図)。3) 日本人集団においては、AZF 領域内の微小欠失よりも微小重複が精子形成に対して悪影響を及ぼす可能性がある



D. 考察

本研究によって、ゴナドトロピン欠損症や非症候性尿道下裂における既知遺伝子変異の寄与の程度が明確となった。また、MAMLD1 異常症における新たな疾患発症機序、SOX3 ポリアラニン欠失や WDR11 変異の新たな表現型芽見出された。とくに重要な点として、非症候性尿道下裂が oligogenic disorder として発症する可能性がはじめて見出された。さらに、無精子症リスクに関与する Y 染色体構造多型が従来の報告より明らかに高頻度であり、多様性に富むことが明確となった。

最新技術を用いた遺伝子解析は、oligogenic disorder や多因子疾患の遺伝診断に極めて有効であることが確認された。今後、既知遺伝子変異陰性患者のエクソーム解析などによって、新規発症機序が解明されると期待される。

E. 結論

次世代シーケンサーやアレイ CGH を含む最新技術を用いた遺伝子解析は、性分化疾患・性成熟疾患患者における遺伝学的要因の探索にきわめて有用であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsubara K, Kataoka N, Ogita S, Sano S, Ogata T, Fukami M, Katsumata N. Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a *CYP11B1* mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: Implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder. *Endocr J.* 61(6):629-33, 2014
- 2) Suzuki J, Azuma N, Dateki S, Soneda S, Muroya K, Yamamoto Y, Saito R, Sano S, Nagai T, Wada H, Endo A, Urakami T, Ogata T, Fukami M. Mutation spectrum and phenotypic variation in nine patients with SOX2 abnormalities. *J Hum Genet.* 59(6):353-6, 2014
- 3) Seki A, Jinno T, Suzuki E, Takayama S, Ogata T, Fukami M. Skeletal deformity associated with *SHOX* deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol.* 23(3):65-72, 2014
- 4) Shozu M, Fukami M, Ogata T. Understanding the pathological manifestations of aromatase excess syndrome: lessons for the clinic. *Exp Rev Endocrinol Metab.* 9(4):397-409, 2014

- 5). 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. 81(2):314-6, 2014
- 6). 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. 102(4):1130-36, 2014
- 7). 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(10):549-53, 2014
- 8). Izumi Y, Musha I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, Ogata T, Fukami M, Ohtake A. Hypogonadotropic hypogonadism in a female patient previously diagnosed as having Waardenburg syndrome due to a *SOX10* mutation. Endocrine, 2014
- 9). Nagata E, Hiroki Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura K-I, Kosho T, Hasegawa T, Kimizuka M, Suzuki A, Shimizu K, Ohashi H, Haga N, Numabe H, Horii E, Nagai T, Yoshihashi H, Nishimura G, Toda T, Takada S, Yokoyama S, Asahara H, Sano S, Fukami M, Ikegawa S, Ogata T. Japanese founder duplications/triplications involving *BHLHA9* are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gollop-Wolfgang complex. Orphanet J Rare Dis. 9:125, 2014
- 10). Yagi H, Takagi M, Kon M, Igarashi M, Fukami M, Hasegawa Y. Fertility preservation in a family with a novel *NR5A1* mutation. Endocr J,2014[Epub ahead of print]
- 11). Fukami M, Ogata T. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. Pediatr Int. 56(6):805-8, 2014
- 12). 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 2015 in press
- 13). 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(3):499-506, 2015
- 14). Ruiz-Arana IL, Hübner A, Cetingdag C, Krude H, Grüters A, Fukami M, Biebermann H, Köhler B. A Novel Hemizygous Mutation of *MAMLD1* in a Patient with 46,XY Complete Gonadal Dysgenesis. Sex Dev 2015 in press
- 15). 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 2015 in press
- 16). 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 2015 in press

- 17). 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. Cytogenetic and Genome Research 2015 in press
 - 18). 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 2014
 - 19). 深見真紀. Campomelic dysplasia 日本臨床神経症候群 IV その他の神経疾患を含めて. 2014
2. 学会発表
- 1). 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, September 18-20, 2014, Dublin
 - 2). 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. 53rd Annual ESPE Meeting, September 18-20, 2014, Dublin
 - 3). Saito K, Yoshida A, Kobori Y, Tanaka Y, Katsumi M, Miyado M, Ogata T, Kubota T, Saito H, Fukami M, Okada H. Genomic Variation in the AZF Region Associated with the Risk of Azoospermia. ASRM 2014 annual meeting, October 18-22, 2014, Hawaii
 - 4). 泉陽子, 鈴木江莉奈, 神崎晋, 八ツ賀秀一, 金城さおり, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀, 丸山哲夫, 末岡浩, 吉村泰典: 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 32 回日本受精着床学会, 東京, 2014 年 7 月 31 日
 - 5). 泉陽子, 西岡淳子, 八ツ賀秀一, 鈴木江莉奈, 佐野伸一郎, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀: 複合型下垂体ホルモン不全症患者における *WDR11* スプライスサイト変異の同定. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014 年 9 月 25 日
 - 6). 島彦仁, 梅木郁美, 加賀元宗, 上村美季, 箱田明子, 菅野潤子, 泉陽子, 深見真紀, 藤原幾磨: 成長ホルモン補充開始後に低血糖発作が改善し、*WDR11* 変異を認めた Septo Optic Dysplasia の一例. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014 年 9 月 26 日
 - 7). 松原圭子, 片岡直樹, 荻田聡子, 佐野伸一郎, 緒方勤, 深見真紀, 勝又規行: 8 番染色体片親性アインダイソミーにより顕在化した *CYP11B1* 遺伝子変異による 11 β 水酸化酵素欠損症例. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014 年 9 月 26 日
 - 8). 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸真美, 田中葉子, 岡田弘, 小堀善友, 吉田淳, 石川博通, 緒方勤, 久保田俊郎, 深見真紀: 非閉塞性無精子症・乏精子症患者における Y 染色体構造解析. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014 年 9 月 26 日
 - 9). 勝見桃理, 齊藤和毅, 宮戸真美, 田中葉子, 岡田弘, 小堀善友, 吉田淳, 石川博通, 緒方勤, 深見真紀: 無精子症・乏精子症患者のゲノムコピー数変化の同定. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014 年 9 月 26 日
 - 10). 中島信一, 大石彰, 高田史男, 河村秀樹, 小野裕之, 五十嵐麻希, 深見真紀, 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, 静岡, 2014 年 9 月 27 日
 - 11). 渡辺聡, 伊達木澄人, 近河日智, 中富明子,

- 木下英一, 吉浦孝一郎, 深見真紀, 緒方勤, 森内浩幸: 中枢神経奇形を合併した複合型下垂体機能低下症の2例: trio exome 解析による新規原因遺伝子同定の試み. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 12). 長崎啓祐, 志原大蔵, 佐藤英利, 小川洋平, 宮戸真美, 深見真紀: 遺伝性女性化乳房症に対するアロマトーゼ阻害剤治療効果の検討. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 13). 山口理恵, 檜村哲生, 加藤英弥子, 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, 静岡, 2014年9月27日
- 14). Matsubara K, Kataoka N, Ogita S, Sano S, Ogata T, Fukami M, Katsumata N. Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a *CYP11B1* mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 15). 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀: マウス分娩の開始と完了における *Maml1* 機能の解明. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 16). 五十嵐麻希, 三上仁, 勝見桃理, 泉陽子, 緒方勤, 深見真紀: 46,XX 精巣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, 静岡, 2014年9月27日
- 17). 今雅史, 室谷浩二, 長谷川行洋, 長崎啓祐, Dung Vu Chi, 上岡克彦, 大戸佑二, 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, 静岡, 2014年9月27日
- 18). 鈴木江莉奈, 泉陽子, 緒方勤, 深見真紀: 特発性思春期早発症女児における *ESR1* 遺伝子イントロン内欠失多型の検討. 第48回日本小児内分泌学会学術集会, 静岡, 2014年9月27日
- 19). 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀: 妊娠マウスにおける黄体退縮調節因子の同定. 第22回日本ステロイドホルモン学会学術集会, 東京, 2014年11月3日
- 20). 泉陽子, 武者育麻, 鈴木江莉奈, 堀川玲子, 雨宮伸, 緒方勤, 深見真紀, 大竹明: *SOX10* 半量不全は、Kallmann 症候群と Waardenburg 症候群を招く. 第59回人類遺伝学会, 東京, 2014年11月20日
- 21). 深見真紀: 先天性疾患の遺伝子診断. 第59回日本人類遺伝学会ランチョンセミナー, 東京, 2014年11月22日
- 22). 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: 疾患遺伝子パネルを用いた低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の遺伝子診断. 第59回人類遺伝学会, 東京, 2014年11月22日
- 23). 宮戸真美, 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀: 妊娠マウスの卵巣における *MAMLD1* の役割. 第37回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2014年11月27日
- 24). 五十嵐麻希, 今雅史, 泉陽子, 福井由宇子, 和田友香, 宮戸真美, 緒方勤, 深見真紀: ヒト性分化異常症の網羅的遺伝子変異解析. 第37回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2014年11月27日
- 25). 勝見桃理, 齊藤和毅, 宮戸真美, 田中葉子, 岡田弘, 小堀善友, 吉田淳, 石川博通, 緒方勤, 深見真紀: 無精子症・乏精子症発症に関与するゲノムコピー数変化の解明. 第37

- 回日本分子生物学会年会, 神奈川, 2014年11月27日
- 26). 齊藤和毅, 勝見桃理, 宮戸真美, 岡田弘, 小堀善友, 吉田淳, 田中葉子, 石川博通, 緒方勤, 齊藤英和, 久保田俊郎, 深見真紀: 非閉塞性無精子症・乏精子症患者におけるMLPA法を用いたY染色体構造解析. 第59回日本生殖医学会, 東京, 2014年12月4日
- 27). 泉陽子, 鈴木江莉奈, 佐野伸一郎, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 末岡浩, 田中守, 緒方勤, 深見真紀: 思春期早発症女児2例におけるNMUR2機能低下多型の同定. 第59回日本生殖医学会, 東京, 2014年12月5日
- 28). Miyado M, Miyado K, Saito K, Katsumi M, Ogata T, Fukami M: *Maml1* deficient female mice exhibit delayed parturition. Young Scientist Meeting for Sexual Differentiation, 静岡, 2014年12月9日
- 29). Igarashi M, Kon M, Izumi Y, Kato-Fukui Y, Suzuki E, Wada Y, Miyado M, Ogata T, Fukami M: Systematic mutation analysis of patients with disorders of sex development. Young Scientist Meeting for Sexual Differentiation, 静岡, 2014年12月9日
- 30). Katsumi M, Saito K, Miyado M, Tanaka Y, Okada H, Kobori Y, Yoshida A, Ishikawa H, Ogata T, Fukami M: Copy number variations associated with a risk of azoospermia and oligospermia. Young Scientist Meeting for Sexual Differentiation, 静岡, 2014年12月9日
- 31). 泉陽子, 鈴木江莉奈, 佐野伸一郎, 中林一彦, 梅澤明弘, 秦健一郎, 緒方勤, 深見真紀: 思春期早発症女児2例におけるNMUR2機能低下多型の同定. 第19回日本生殖内分泌学会学術集会, 大阪, 2015年1月10日
- 32). 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, 梅沢明弘, 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, 大阪, 2015年1月10日
- 33). Kagami M, Hayano K, Hosomichi K, Fukami M, Ogata T, Inoue I: Methylome analysis of the 14q32.2 imprinted region in patients with imprinting defects on human chromosome 14. International Symposium on Genome Science 2015, 東京, 2015年1月20日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究委託業務（難治性疾患等克服研究事業
（難治性疾患実用化研究事業）研究 分担報告書

研究成果に基づいた診療ガイドラインの作成

研究分担者 緒方勤 浜松医科大学 小児科教授

研究要旨

本研究の目的は、性分化・性成熟領域 38 疾患の遺伝子診断法を確立し、厚生労働省領域別基盤研究分野「性分化・性成熟領域 38 疾患における診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの作成と普及」班における診療ガイドライン作成に貢献することである。研究分担者は、日本小児内分泌学会代表として、小児慢性特定疾病における内分泌疾患群の概要、診断の手引き、医療意見書を取りまとめており、本研究班においては、遺伝子診断の重要性、遺伝子診断供給体制について日本小児内分泌学会と協力して提唱する予定である。

本年度の成果には以下が含まれる。(1) SRY (+) 46,XY DSD (disorders of sex development) における性分化の程度は、X 染色体不活化の波及や position effect による SRY の発現低下以外に、異常 Xp;Yp 転座によるクロマチン 3 次元構造変化などに影響される。(2) Silver-Russell 症候群類縁疾患である IMAGe 症候群患者において CDKN1C 変異を同定し、性分化疾患発症原因が胎盤形成不全であることを見出した。(3) 裂手裂足症と尿道下裂を有する患者の解析を契機として、日本人創始者効果として形成された BHLHA9 を含む重複が裂手裂足症の主因であること、BHLHA9 が外性器で発現していることを見出した。(4) 新規男性ホルモン産生経路として注目されている backdoor pathway によるジヒドロテストステロン産生の有無の解析が世界で初めて開始しうることになった。(5) 脳の性分化(性自認)状態の研究を開始した。

これらの成果は、遺伝子診断の重要性を支持するものである。そして、研究分担者は、本研究班において得られたデータを加味した診療ガイドライン作成を進める。

A. 研究目的

本研究の目的は、性分化・性成熟領域 38 疾患の遺伝子診断法を確立し、厚生労働省領域別基盤研究分野「性分化・性成熟領域 38 疾患における診断基準・重症度分類・診療ガイドラインの作成と普及」班における診療ガイドライン作成に貢献することである。研究分担者は、日本小児内分泌学会代表として、小児慢性特定疾病における内分泌疾患群の概要、診断の手引き、医療意見書を取りまとめており、本研究班においては、遺伝子診断の重要性、遺伝子診断供給体制について日本小児内分泌学会と協力して提唱する予定である。

対象:性分化・性成熟疾患と診断された患者・家族である。

(倫理面への配慮)

遺伝学的解析:本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して行い、検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集した。なお、下記の研究課題が、浜松医科大学倫理委員会で承認されていることを付記する。

- 成長障害における遺伝的原因の探索
- 先天性奇形症候群における遺伝的原因の探索

B. 研究方法

- 胎児・胎盤の成長・発達における遺伝および環境因子の検討

また、下記の研研究課題を申請中である

- Functional MRI を用いた性分化疾患患者の中枢神経構造・機能解析

分子生物学的解析では、シーケンス解析、メチル化解析、マイクロサテライト解析、アレイCGH解析、MLPA解析など、現在なしている解析を全て行った。

C. 研究結果

1) SRY (+) 46,XY DSD (disorders of sex development) における性分化状態の解析
われわれは、外性器異常を有する2例と正常男性型外性器を呈する2例の患者を解析した(表1、図1)。

表1. 解析した4例の臨床像

	症例1	症例2	症例3	症例4
年齢(年:月)	2:5	2:6	23:0	3:11
検査の理由	外性器異常	臆弓症候群	早産	高齢出産
外性器表現型	小陰茎 左停留精巣 尿道下裂	小陰茎	正常男性型	正常男性型
陰茎長	2.3 cm	2.5 cm	不明	不明
内性器	子宮様構造	不明	異常なし	不明
精巣容量	1-2 mL (両側)	2 mL (両側)	矮小	2 mL (両側)
ホルモン基礎値				
検査時年齢(年:月)	0:3	2:3	18:6	0:8
Testosterone (ng/mL)	4.69	<0.05	2.1	不明
LH (mIU/mL)	2.6	<0.3	17.8	不明
FSH (mIU/mL)	6.7	0.62	32.2	不明

図1. 症例1の外性器。



転座 Y 染色体サイズ、欠失 X 染色体サイズ、X 染色体不活化パターン、転座融合点の同定を行った。代表的結果を図2に示す。その結果、転座 Y 染色体のサイズ、X 染色体不活化パターンに一定のルールが存在しないことが判明した(表2)。したがって、SRY (+) 46,XX TSD の性分化は、従来から言及されているような X 染色体不活化の波及や position effect による SRY の発現低下以外に、異常 Xp;Yp 転座によるクロマチン 3 次元構造変化など、複数の原因が推定される。また、Xp;Yp の転座発症機序には、少なくとも NAHR と NHEJ の 2 つが存在するこ

とが判明した(FoSTeS は不明)。

表2. SRY (+) 46,XY DSD の4例におけるデータ

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
外性器	小陰茎 左停留精巣 尿道下裂	小陰茎	正常男性型	正常男性型
転座Y特異的染色体サイズ	~0.75 Mb	~6.5 Mb	~2.3 Mb	~72 kb
X不活化比率	79%:21% (X ^P :X ^M)	84%:16% (X ^P :X ^M)	56%:44%	47%:53%

2) IMAGE 症候群患者における CDKN1C 変異の同定

最近 IMAGE 症候群(子宮内発育遅滞、骨幹端異形成、副腎低形成、男児外性器異常)の原因が、インプリンティング遺伝子(母性発現遺伝子) CDKN1C の機能亢進変異であることが示された。われわれは、本邦における IMAGE 症候群3例を解析し、2例において CDKN1C の機能亢進変異を同定した(図3)。そして、(1) IMAGE 症候群表現型がシルバーラッセル症候群の表現型を含むこと、(2) 相対的頭圍拡大が存在し、これは CDKN1C が脳においてのみ両親性発現を示すことに一致すること、(3) 副腎低形成が糖質ステロイドのみの欠乏症状を伴いうること、(4) 外性器異常が、胎盤低形成に起因する胎盤ゴナドトロピン分泌低下に起因することを、世界で初めて見出した。特に、外性器異常に関しては、症状陽性患者において、羊水過小が存在したこと、思春期において下垂体・精巣の内分泌データが正常であったことが確認されている(表3)。

【症例 1】

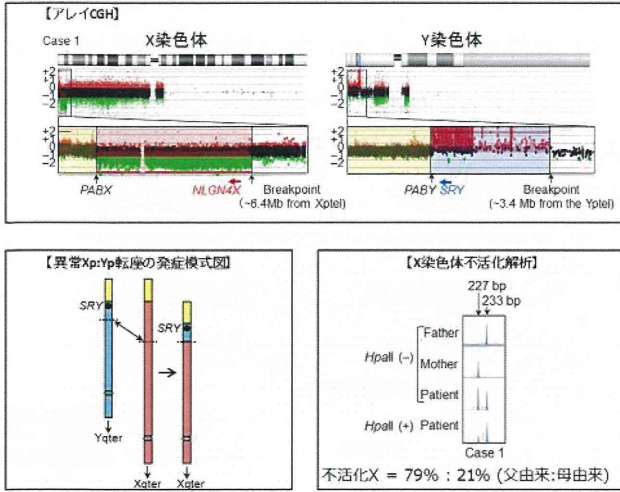


図 2. 症例 1 のアレイ CGH, X 染色体不活化パターン

図 3. IMAGE 症候群における CDKN1C 変異

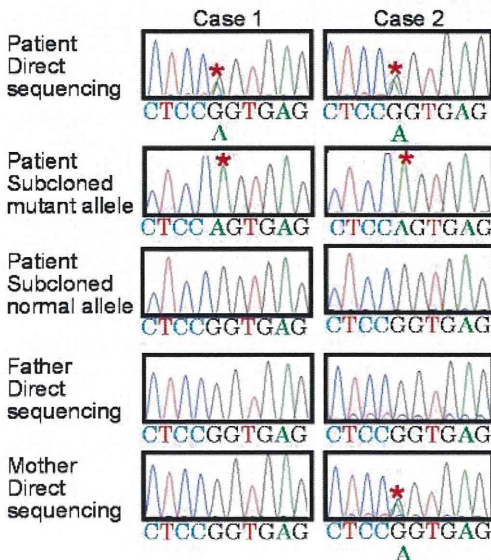
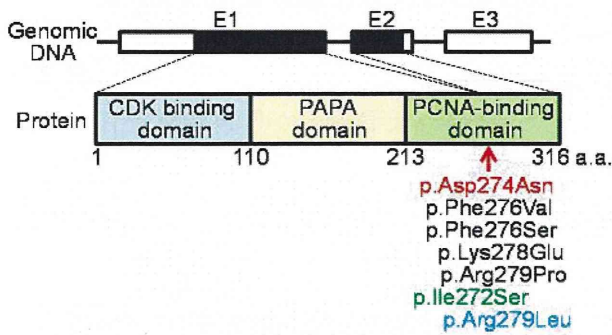


表 3. IMAGE 症候群患者の臨床像

IMAGE 症候群	Case 1	Case 2	Case 3
核型	46,XX	46,XY	46,XY
年齢 (y)	8.5	16.5	15
子宮内発育遅延	+	+	+
骨幹端異形成症	+	+	+
副腎低形成症	+	+	+
外性器異常	...	+	+
特徴的顔貌	+	+	+
身長 (cm) (SD)	92.8 (-6.2)	124.7 (-7.8)	135.2 (-5.1)
体重 (kg) (SD)	16.0 (-1.9)	25.4 (-3.5)	30.4 (-2.6)
頭囲 (cm) (SD)	52.0 (-0.2)	53.0 (-2.5)	...
LH (mIU/mL)	<0.1 [<0.1~ 1.3]	3.9 [0.2~ 7.8]	4.8 [0.2~ 7.8]
After GnRH-stimulation	3.5 [1.6~ 4.8]	N.E.	N.E.
FSH (mIU/mL)	0.7 [<0.1~ 1.3]	4.2 [0.3~ 18.4]	17.6 [0.3~ 18.4]
After GnRH-stimulation	12.0 [10.7~ 38.1]	N.E.	N.E.
Testosterone (ng/mL)	...	4.3 [1.7~ 8.7]	3.7 [1.7~ 8.7]
		羊水過少	

3) 裂手裂足症・尿道下裂と BHLHA9

われわれは、大腿骨・脛骨・裂手裂足症を伴う患者、脛骨・裂手裂足症を伴う患者、裂手裂足症のみを伴う患者を有する 51 家系を解析し、27 家系において、全く同一の日本人創始者効果による BHLHA9 を伴う 210,050 bp の duplication/triplication を見いだした (図 4)。

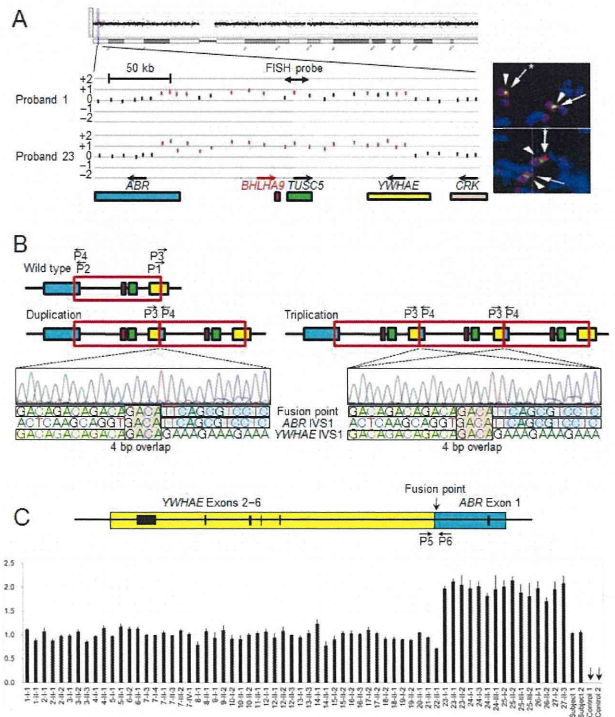


図4. 同定された重複・3重複領域。全ての患者で融合点構造は同一である

そして、その中に外性器異常(尿道下裂)を呈する患者が存在した(図5)。



図5. 外性器異常(尿道下裂)を呈する裂手裂足症患者

そして、BHLHA9 発現パターンを調べたところ、BHLHA9 は、肢芽と外性器で発現していた(図6)。これは、BHLHA9 が、HOX13 paralog 同様、四肢末端と外性器の形成に関与することを示唆する。

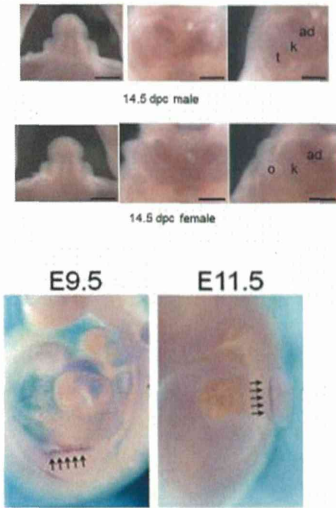


図6. マウス Bhlha9 の発現パターン

4) Backdoor pathway によるジヒドロテストステロン産生の有無

Backdoor pathway は、testosterone (T) を経由しない dihydrotestosterone (DHT) 産生経路として有袋類とげっ歯類において同定された。ヒトでは、POR 異常症 (PORD) や 21 水酸化酵素異常症 (21-OHD) における 46,XX DSD 発症の原因として注目され、胎児副腎と永久副腎の相互作用が backdoor pathway 由来男性ホルモン産生を招くと推測されている(図7)。しかし、backdoor pathway 由来の中間代謝産物の増加は PORD 患者および 21-OHD 患者の cross-sectional な尿ステロイド分析で示されているものの、backdoor pathway による DHT 産生を

直接的に示すデータは存在しない。これは、尿ステロイド分析では DHT を正確に測定できないこと、血中ステロイド分析では倫理的問題から健常新生児・乳児との比較ができないことによる(健常新生児・乳児の採血ができない)。

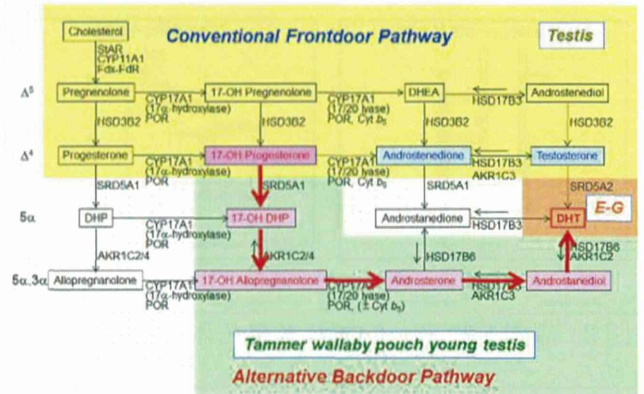


図7. Backdoor pathway の模式図

われわれは、娠中の母体男性化、在胎週数と共に進行する外性器男性化、妊娠末期における胎児エコー上の上腕骨・尺骨融合から PORD を有すると出生前診断され、臍帯血を用いた解析で、46,XY (SRY+) と POR 遺伝子変異 (p.Q201X/p.R457H) が同定された生後 2 カ月の POR 異常症男児を同定した。そして、この POR 異常症男児および健常男性新生児 5 例の臍帯血は既に採取済みである(臍帯血の採取は新生児に負荷をかけないことから、浜松医大倫理委員会において承認されている)。現在、さらなる健常男性新生児の検体採取を進めている。また、胎児副腎の影響を解析するために、患児の日齢 0、日齢 5、日齢 31 の血液検体を採取済みであり、また、月齢 3、月齢 6、月齢 12 の検体採取の同意を得ている。次年度、最も鋭敏なステロイド代謝産物測定法である LC-MS/MS で分析し、backdoor pathway 由来 DHT の存在の有無と、backdoor pathway における胎児副腎の関与を明らかとする。

5) 脳の性分化(性自認)状態の解析

近年、社会的性の決定に際し、脳の性分化状態が重要であることが明確となっている。すなわち、自身の性自認と合致する社会的性のもとで生きることが

患者にとって最も重要である。例えば、自身を男性と認識している患者にとって、外性器の状態や性腺機能がより女性的であったとしても、女性として生きることは極めて困難である。

しかし、脳の性分化状態は、ある程度外性器や性腺の状態と平行するものの、両者の間にはしばしば乖離が見られ、脳の性分化状態を客観的に評価できる指標は存在しない。特に、46,XY 5 α 還元酵素欠損症患者は、外性器が女性的であるために女性として養育された場合においても、成人期に約60%の患者が男性へと性別変更を行う。また、46,XY 不完全型アンドロゲン受容体異常症患者では男性から女性および女性から男性への性別変更がしばしば認められ、さらに46,XX 重症型21水酸化酵素欠損症患者では女性から男性への性別変更がときに報告されている。

ここで、脳構造の性差や視覚・聴覚刺激に反応する脳領域の性差が存在することから、患者のデータと健常男女の中枢神経構造・機能解析データを比較することで、脳の性分化状態を客観的に評価する指標が得られると期待される。このためには、functional MRIを用いた解析が有用であるが、このような器機は臨床現場の要望で常時フル稼働しており、研究に用いることはできなかった。

今回、東京大学大学院総合文化研究科に設置されたSiemens社製3テスラPrismaを用いて共同研究を行うこととなった。この機器は最新のMRI機器であり、臨床ではなく純粋に研究目的で導入されたものであるため、余裕をもって使用することが可能である。

D. 考察

これらの成果は、性分化疾患の診断における遺伝子診断の重要性を支持するものである。さらに、外性器の状態の評価や、脳の性分化状態の把握は、性分化疾患の医療に貢献する。例えば、重症度分類において必須の項目となる。

研究分担者は、本研究班において得られたデータを加味した診療ガイドライン作成の役割を担っており、これからの研究期間において、本研究班で得られるデータを活用し、性分化疾患診断がいどらい

ん、重症度分類を進めてゆく。

E. 結論

本年度、以下の成果が挙げられた。(1) SRY(+) 46,XY DSD (disorders of sex development) における性分化の程度は、X染色体不活化の波及や position effect による SRY の発現低下以外に、異常 Xp;Yp 転座によるクロマチン3次元構造変化などに影響される。(2) IMAGE 症候群患者の性分化疾患発症の主因は胎盤形成不全である。(3) BHLHA9を含む重複は、裂手裂足症のみならず外性器異常にも関与する。(4) backdoor pathway によるジヒドロテストステロン産生の有無の解析の用意が整った。(5) 脳の性分化(性自認)状態の研究を開始した。

これらの成果は、遺伝子診断の重要性を支持するものである。そして、研究分担者は、本研究班において得られたデータを加味した診療ガイドライン作成を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujisawa Y*, Yamaguchi R, Satake E, Ohtaka K, Nakanishi T, Ozono K, Ogata T: Identification of *AP2S1* mutation and effects of low calcium formula in an infant with hypercalcemia and hypercalciuria. *J Clin Endocrinol Metab* 98 (12): E2022–2027, 2013.
2. Fukami M*, Suzuki J, Nakabayashi K, Tsunashima R, Ogata T, Shozu M, Noguchi S: Lack of genomic rearrangements involving the aromatase gene *CYP19A1* in breast cancer. *Breast Cancer* 21 (3): 382–385, 2014.
3. Nagasaki K*, Asami T, Sato H, Ogawa Y, Kikuchi T, Saitoh A, Ogata T, Fukami M: Long term follow up study for a patient with Floating-Harbor syndrome due to a hotspot *SRCAP* mutation. *Am J Med Genet A* 164 (3): 731–735, 2014.
4. Shihara D, Miyado M, Nakabayashi K, Shozu M, Nagasaki K, Ogata T, Fukami M*:

- Aromatase excess syndrome in a family with upstream deletion of *CYP19A1*. *Clin Endocrinol* 81(2): 314–316, 2014.
5. Tsuchiya T, Shibata M, Numabe H, Jinnno 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 A* 164A (2): 505–510, 2014.
 6. Yagasaki H*, Nakane T, Saito T, Koizumi K, Kobayashi K, Ogata T: Disorder of sex development in an infant with molecularly confirmed 46,XY,+der(10)t(10;21)(q21.1;q21.3),-21. *Am J Med Genet A* 164 (3): 841–843, 2014.
 7. Sasaki A, Sumie M, Eada S, Kosaki R, Kurosawa K, Fukami M, Sago H, Ogata T, Kagami M*: Prenatal Genetic testing for a microdeletion at chromosome 14q32.2 imprinted region leading to upd(14)pat-like phenotype. *Am J Med Genet A* 164A (1): 264–266, 2014.
 8. Kitsuda K*, Yamaguchi R, Nagata E, Nakagawa Y, Ohzeki T, Ogata T, Ishii M, Nakanishi T: Hypertrophic cells in hypophagic intrauterine growth retarded rats without catch-up growth. *Kitasato Med J* 44 (1): 38–46, 2014.
 9. Kato F, Hamajima T, Hasegawa T, Amano N, Horikawa R, Nishimura G, Nakashima S, Fuke T, Sano S, Fukami M, Ogata T*: IMAGE syndrome: clinical and genetic implications based on investigations in three Japanese patients. *Clin Endocrinol* 80 (5): 706–713, 2014.
 10. Court F, Tayama C, Romanelli V, Martin-Trujillo A, Iglesias-Platas I, Okamura K, Sugahara N, Simon C, Moore H, Harness J, Keirstead H, Vicente Sanchez-Mut J, Kaneki E, Lapunzina P, Soejima H, Wake N, Esteller M, Ogata T, Hata K, Nakabayashi K, Monk D*: Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of the human imprintome and suggests a germline methylation independent establishment of imprinting. *Genome Res* 24 (4): 554–569, 2014.
 11. Amano N, Mukai T, Ito Y, Narumi S, Tanaka T, Yokoya S, Ogata T, Hasegawa T*: Identification and functional characterization of two novel *NPR2* mutations in Japanese patients with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 99 (4): E13–18, 2014.
 12. Ogata T*, Niihori T, Tanaka N, Kawai M, Nagashima T, Funayama R, Nakayama K, Nakashim S, Kato F, Fukami M, Aoki Y, Matsubara Y: *TBX1* mutation identified by exome sequencing in a Japanese family with 22q11.2 deletion syndrome-like craniofacial features and hypocalcemia. *PLoS One* 9 (3): e91598, 2014.
 13. Yamamoto M, Iguchi G, Bando H, Fukuoka H, Suda K, Takahashi M, Nishizawa H, Matsumoto R, Tojo K, Mokubo A, Ogata T, Takahashi Y*: A missense single-nucleotide polymorphism in the sialic acid acetyl esterase gene is associated with anti-PIT-1 antibody syndrome. *Endocr J* 61 (6): 641–644, 2014.
 14. Suzuki J, Azuma N, Dateki S, Soneda S, Muroya K, Yamamoto Y, Saito R, Sano S, Nagai T, Wada H, Endo A, Urakami T, Ogata T, Fukami M*: Mutation Spectrum and Phenotypic Variation in Nine Patients with *SOX2* abnormalities. *J Hum Genet* 59 (6): 353–356, 2014.
 15. Matsubara K, Kataoka N, Ogata S, Sano S, Ogata T, Fukami M*, Katsumata N: Uniparental disomy of chromosome 8 leading to homozygosity of a *CYP11B1* mutation in a patient with congenital adrenal hyperplasia: Implication for a rare etiology of an autosomal recessive disorder. *Endocr J* 61 (6): 629–633, 2014.

16. Ohishi A, Nakashima S, Ogata T, Iijima S: Early vitamin K deficiency bleeding in a neonate associated with maternal Crohn's disease. *J Perinatol* 34 (8): 636–639, 2014
17. Suzuki E, Yatsuga S, Igarashi M, Miyado M, Nakabayashi K, Hayashi K, Hata K, Umezawa A, Yamada G, Ogata T, Fukami M*: De novo frameshift mutation in fibroblast growth factor 8 in a male patient with gonadotropin deficiency. *Horm Res Paediatr* 81 (2): 139–44, 2014
18. Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kishi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, Ogata T, Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Saitoh H: Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC Public Health* 2014 Jan 10;14:25. doi: 10.1186/1471-2458-14-25.
19. Higashimoto K, Jozaki K, Kosho T, Matsubara K, Sato T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H*: A novel *de novo* point mutation of OCT-binding site in the *IGF2/H19*-imprinting control region in a patient with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* 86 (6): 539–544, 2014.
20. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K, Hitomi H, Nakabayashi K, Makita Y, Tonoki H, Okamoto N, Takada F, Ohashi H, Migita M, Kosaki R, Matsubara K, Ogata T, Matsuo M, Hamasaki Y, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Mukai T, Hata K, Soejima H*: Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions (DMRs) to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med* 16 (12): 903–912, 2014.
21. 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* 102 (4): 1130–1136, 2014.
22. Ishikawa T*, Takehara Y, Yamashita S, Iwashima S, Sugiyama M, Wakayama T, Johnson K, Wieben O, Sakahara H, Ogata T: Hemodynamic assessment in a child with renovascular hypertension using time-resolved three-dimensional cine phase-contrast MRI. *J Magn Reson Imaging* 41 (1): 165–168, 2015.
23. Nakashima S, Oishi 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 (10):549-53, 2014.
24. Nagata E, Kano H, Kato F, Yamaguchi R, Nakashima S, Takayama S, Kosaki R, Tonoki H, Mizuno S, Watanabe S, Yoshiura K, Kosho T, Hasegawa T, Kimizuka M, Suzuki A, Shimizu K, Ohashi H, Haga N, Numabe H, Horii E, Nagai T, Yoshihashi H, Nishimura G, Toda T, Takada S, Yokoyama S, Asahara H, Sano S, Fukami M, Ikegawa S, Ogata T*: Japanese founder duplications/triplications involving *BHLHA9* are associated with split-hand/foot malformation with or without long bone deficiency and Gallop-Wolfgang complex. *Orphanet J Rare Dis* 9 (1): 125, 2014.
25. Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T, Fukami M, Ogata T*: Epimutations of the IG-DMR and the *MEG3*-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet* (in press).