

26. 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* (in press).
27. Nakashima S, Kato F, Kosho T, Nagasaki K, Kikuchi T, Kagami M, Fukami M, Ogata T*: Silver-Russell syndrome without body asymmetry in three patients with duplications of maternally derived chromosome 11p15 involving *CDKN1C*. *J Hum Genet* (in press).
28. Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Fukai R, Imagawa E, Ohba C, Kuki I, Makita Y, Ogata T, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N*: Detecting copy number variations in whole exome sequencing data using exome hidden markov model - an expectation of “exome-first” approach. *J Hum Genet* (in press).
29. 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* (in press).
30. Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T*: Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet* (in press)
31. Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Jofri K, Ogata T, Fukami M*: Novel splice site mutation in *MAMLD1* in a patient with hypospadias. *Sex Dev* (in press).
32. 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* (in press).
33. Fujisawa Y, Napoli E, Wong S, Song G, Yamaguchi R, Matsui T, Nagasaki K, Ogata T, Giulivi C Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency. *BBA Clinical* (in press).
34. 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* (in press).
35. Momori Katsumi^a, Hiromichi Ishikawa^b, Yoko Tanaka^c, Kazuki Saito^{a, d}, Yoshitomo Kobori^e, Hiroshi Okada^e, Hidekazu Saito^d, Kazuhiko Nakabayashi^f, Yoichi Matsubara^g, Tsutomu Ogata^{a, h}, Maki Fukami^a, Mami Miyado^a Microhomology-Mediated Microduplication in the Y Chromosomal Azoospermia Factor a (AZFa) Region in a Male with Mild Asthenozoospermia. *Cytogenetic and Genome Research* (in press).
36. Fukami M*, Miyado M, Nagasaki K, Shozu M, Ogata T: Aromatase excess syndrome: a rare autosomal dominant disorder leading to pre- or peri-pubertal onset gynecomastia. *Pediatr Endocr Rev* 11 (3): 298–305, 2014.
37. Shozu M*, Fukami M, Ogata T: Understanding the pathological manifestations of aromatase excess syndrome: lessons for the clinic. *Expert Rev Endocrinol Metab* 9 (4): 397–409, 2014.
38. Fukami M*, Ogata T: Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: Rare congenital disorder leading to skeletal malformations and

steroidogenic defects. *Pediatr Int* 2014 Oct 8.

doi: 10.1111/ped.12518. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

省略

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

性分化・性成熟疾患の遺伝子解析

研究分担者 長谷川奉延 慶應義塾大学教授

研究要旨

性分化・性成熟領域38疾患のうち、15疾患の既知責任遺伝子計39個を、ベンチトップ型次世代シーケンサーを用いて高速かつ包括的に解析する系を立ち上げ、運用を開始した。

A. 研究目的

本研究の目的は、ベンチトップ型次世代シーケンサー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、運用することである。本年度は 38 疾患のうち、15 疾患（表 1 参照）を対象とした。

B. 研究方法

性分化・性成熟領域 15 疾患の発症に関わる既知の多数の遺伝子塩基配列を高速解析するため、Agilent 社のウェブページ eArray (<https://carray.chem.agilent.com/carray/>)を利用して 39 個の責任遺伝子 (*AKRIC2*, *AKRIC4*, *AR*, *ARX*, *CBX2*, *CYP17A1*, *DHH*, *DUSP6*, *FGF17*, *FGFR1*, *FLRT3*, *GNAS1*, *GNRH1*, *GNRHR*, *HSD3B2*, *HSD17B3*, *HS6ST1*, *IL17RD*, *KAL1*, *KISS1*, *KISS1R*, *LHCGR*, *MAP3K1*, *NELF*, *NR0B1*, *NR5A1*, *POR*, *PROK2*, *PROKR2*, *SEMA3A*, *SOX9*, *SRD5A2*, *SPRY4*, *SRY*, *STAR*, *TAC3*, *TAC3R*, *WDR11*, *WT1*) のエクソン領域を選択的に捕捉するための相補的 RNA 群 (ベイト) をデザインした。このベイトを含む、Agilent 社の標的 DNA 配列濃縮キット (SureSelect XT Custom Kit) を用いて、試料の調製を行った。調製したサンプルは 12 検体分をプールし、ベンチトップ型次世代シーケンサー MiSeq (Illumina) で解析した (150 塩基、ペアエンドモード)。出力された配列データは、Burrows-Wheeler Aligner プログラムを用いて二次解析を、Picard、Genome Analysis

Toolkit、snpEff、ANNOVAR を用いて三次解析を、それぞれ行った。

(倫理面への配慮)

本研究は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を得た。研究の参加に関しては、本人あるいは家族から書面で同意を得た。

C. 研究結果

本年度の解析対象はおよそ 230 例であった。

D. 考察

本研究により性分化・性成熟領域 15 疾患の高速かつ包括的な既知責任遺伝子の解析が可能となった。

現在、変異陽性例および陰性例と臨床情報との関連性を検討中である。

E. 結論

性分化・性成熟領域 15 疾患をベンチトップ型次世代シーケンサーを用いて高速かつ包括的に遺伝子解析する系を立ち上げ、運用を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takagi M, Narumi S, Asakura Y, Muroya K,

- Hasegawa Y, Adachi M, Hasegawa T. A novel mutation in *SOX2* causes hypogonadotropic hypogonadism with mild ocular malformation. *Hor Res Paediatr* 81:133-138,2014
- 2) Matsuo N, Ishii T, Takayama JI, Miwa M, Hasegawa T. Reference standard of penile size and prevalence of buried penis in Japanese newborn male infants. *Endocrine J* 61:849-853 2014
- 3) Koyama Y, Homma K, Hasegawa T. Urinary steroid profiling: A powerful method for the diagnosis of abnormal steroidogenesis. *Exp Rev Endocrinol Metab* (2014, in press)
- 4) Ueda K, Usui T, Watanabe T, Kaneko K, Nakatani R, Kakita-Kobayashi M, Tanase-Nakao K, Nanba K, Tsuiki M, Tagami T, Naruse M, Toyoda Y, Homma K, Hasegawa T, Shimatsu A. Elevated levels of plasma immunoassayable aldosterone in a mild form of 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency diagnosed at the age of 50. *Endocrine Practice* (in press)
- 5) Ishii T, Matsuo N, Inokuchi M, Hasegawa T. A cross-sectional growth reference and chart of stretched penile length for Japanese boys aged 0-7 years. *Hor Res Paediatr* 82:388-393, 2014
2. 学会発表
- 1) 室谷浩二、花川純子、大戸佑二、朝倉由美、白柳慶之、山崎雄一郎、鳴海覚志、長谷川奉延、安達昌功。SRY 遺伝子変異を同定した高度尿道下裂の父息子例 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 2) 石井智弘、松尾宣武、John Takayama、三輪雅之、長谷川奉延。日本人新生児の陰茎長:基準値と人種差比較 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 3) 河野智敬、鈴木秀一、小澤綾子、会津克哉、清水健司、大橋博文、鳴海覚志、長谷川奉延、望月弘。線維性骨異形成のみを呈する児におけるGNAS1解析の意義 -McCune-Albright症候群早期発見の可能性- 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 4) 永井純子、田實麻智子、福井彩子、梅村臣吾、村瀬正敏、山川文子、山田努、山家由子、村瀬孝司、長谷川奉延、本間桂子。巨大副腎骨髄脂肪腫を21-水酸化酵素欠損症(21-OHD)の一例 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 5) 大戸佑二、室谷浩二、花川純子、朝倉由美、白柳慶之、山崎雄一郎、田中祐吉、林美恵、長谷川奉延、安達昌功。Denys-Drash症候群の3例:遺伝子型と表現型の相関 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 6) 岩橋めぐみ、清水美佳、本間桂子、林美恵、天野直子、長谷川奉延、宮田市郎。単径ヘルニアを契機に診断に至った17 α 水酸化酵素欠損症の1例 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 7) 佐藤直子、田中敏章、長谷川奉延、長谷川行洋、雨宮伸、大藪恵一、菊池透、田中弘之、原田正平、宮田市郎、有阪治。男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の成人身長と精液検査に関するアンケート調査 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 8) 前田英昭、山田英二郎、下田容子、長谷川奉延、本間桂子、佐藤哲郎、岡田秀一、山田正信。尿中ステロイドプロファイルが診断に有用であった成人先天性副腎皮質過形成の一例第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 9) 羽二生邦彦、堀川玲子、田中敏章、長谷川奉延、藤田敬之助、横谷進。成人ターナー症候群の核型、合併症およびQOLに関するアンケート調査 第87回日本内分泌学会学術総会 2014年4月24日-26日
- 10) 佐藤直子、長谷川奉延、長谷川行洋、田中敏章。小児期における男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の治療現状と男性ホルモンとゴナドトロピン補充療法の治療プロトコール 第2回MHH治療研究会 2014年5月24日

- 11)相野谷慶子、竹本淳、坂井清英、長谷川奉延。新生児・乳児期に診断に至らず、思春期に急激な男性化を認めた 5α リダクターゼ欠損症例 第 23 回日本小児泌尿器科学会学術集会 2014 年 7 月 9 日—11 日
- 12)杉澤千穂、佐藤武志、鳴海覚志、谷山松雄、長谷川奉延。嗅覚正常視床下部性性腺機能低下症の 1 男児例:両アリアル性 *PROKR2* 変異の本邦初発例 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 13)石井智弘、松尾宣武、井ノ口美香子、長谷川奉延。LMS 法による日本人小児 (0-7 歳) 陰莖長の横断的成長曲線の作成:人種間比較と世代間比較 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 14)小山雄平、本間桂子、猪瀬美帆子、林美恵、石井智弘、涌井昌俊、村田満、長谷川奉延。日齢 90 未満の 5α リダクターゼ欠損症診断における尿ステロイドプロファイルの有用性と限界 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 15)佐藤直子、長谷川奉延、長谷川行洋、田中敏章。小児期早期に診断された男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の治療指針の提案 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 16)柴田浩憲、堀尚明、佐々木悟郎、石井智弘、上牧務、安藏慎、玉井伸哉、佐藤清二、松尾宣武、長谷川奉延。男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症におけるテストステロン治療の有効性および造精能への影響 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 17)本間桂子、木村昭彦、水落建輝、大竹明、保科隆之、井原健二、武井一、入戸野博、猪瀬美帆子、小山雄平、清水長子、涌井昌俊、村田満、石井智弘、長谷川奉延。尿ステロイドプロファイルによる 5β-還元酵素欠損症スクリーニングの可能性 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 18)古谷曜子、松尾公美浩、長屋建、棚橋祐典、東寛、平澤雅敏、宮本和俊、吉藤和久、本間桂子、長谷川奉延。P450 オキシドレダクターゼ (POR) 異常症の 2 例 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 19)濱田淳平、平井洋生、西村謙一、勢井友香、竹本幸司、三井俊賢、長谷川奉延、石井榮一。外性器異常、成長障害に高度のインスリン抵抗性を認めた 9p24 欠失,16q23-24 重複の 1 男児例 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014 年 9 月 25 日-27 日
- 20)佐藤直子、長谷川奉延、長谷川行洋、田中敏章。小児期早期に診断された男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症の治療指針の提案 日本人類遺伝学会第 59 回大会 2014 年 11 月 19 日—22 日
- 21)岩崎泰幸、福岡秀規、中島進介、井口元三、本間桂子、長谷川奉延、小川渉、高橋裕。Turner 症候群と CAH の合併を認めた副腎偶発腫の一例 第 24 回臨床内分泌代謝 Update 2014 年 11 月 28 日—29 日
- 22)仁科範子、福澤龍二、石井智弘、長谷川奉延、長谷川行洋。46,XX/46,XY の核型を持つ性分化疾患の性染色体と性腺組織の関連 第 24 回臨床内分泌代謝 Update 2014 年 11 月 28 日—29 日
- 23)西澤衝、福岡秀規、井口元三、吉田健一、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、豊田有子、本間桂子、長谷川奉延、臼井健、小川渉、高橋裕。補充療法で多血症が改善した 21 水酸化酵素欠損症の一男性例 第 24 回臨床内分泌代謝 Update 2014 年 11 月 28 日—29 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

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

マッシュューン・オルブライト症候群

ゴナドトロピン非依存性思春期早発症(マッシュューン・オルブライト症候群を除く)

カルマン症候群

低ゴナドトロピン性性腺機能低下症(カルマン症候群を除く)

精巣形成不全(症候群)

ライディッヒ細胞低形成症

屈曲肢異形成症 (campomelic dysplasia)

X連鎖滑脳症外性器異常症候群

5alpha-還元酵素欠損症

17beta-ヒドロキシステロイド脱水素酵素欠損症

アンドロゲン不応症

リポイド過形成症

3beta-ヒドロキシステロイド脱水素酵素欠損症

17alpha-水酸化酵素欠損症

P450 酸化還元酵素欠損症

臨床検体・臨床情報の集積とデータ解析

研究分担者 堀川玲子 国立成育医療研究センター内分泌代謝科医長

研究要旨

性分化疾患の新生児においては、社会的性決定のために迅速かつ十分な病態の検討が必要である。性分化疾患の新生児例のうち、診断と方針決定に難渋した症例について、診療の手引きを用いた診断と社会的性を判定する過程における問題点を抽出し、短期予後を検討した。

症例は、高度小陰茎、会陰部尿道下裂を呈した新生児。染色体検査にて 47,XXY (Klinefelter 核型)だが、外性器の男性化障害が強く、染色体性性分化疾患として典型的ではないと考え、性分化疾患に関わる遺伝子検査を行った結果、アンドロゲン受容体遺伝子に、既報部位の新規アミノ酸置換を認めるミスセンス変異をヘテロに認めた。外性器の男性化障害の原因としてアンドロゲン受容体遺伝子変異が関与した可能性が考えられたが、本症例では X 染色体が 2 本あるため、不活化アレルと変異を有する遺伝子の局在を検討する必要が考えられた。社会的性判定に際し、DSD 専門家のネットワークを利用して複数施設の意見を集約した。DSD において、遺伝学的背景を検討することは、病態を理解し社会的性選択を含めた予後を考える上で重要である。また、複数の専門家の意見を聴取する過程の必要性が示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、性分化・性成熟疾患における遺伝学的な病因診断に基づいた診療の確立と均てん化である。特に性分化疾患の新生児においては、社会的性決定のために迅速かつ十分な病態の検討が必要である。診断の分子基盤を確立するために、分担研究として性分化・性成熟疾患患者の DNA 検体を収集すると共に、臨床診断への応用を検討した。

B. 研究方法

性分化疾患の新生児例のうち、診断と方針決定に難渋した症例について、診療の手引きを用いた診断と社会的性を判定する過程における問題点を抽出し、短期予後を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における医療行為は、保険診療の範囲で施行し、一部保険未収載検査については保護者の同意を得て行った。遺伝情報解析については、倫理指針に則り機関内倫理委員会にて審査・承認を得た。

C. 研究結果

【症例】排卵誘発法にて妊娠し妊娠経過異常なし。妊娠41週1日体重2948g、自然経膣分娩にて出生。出生時に外性器異常に気付かれた。(以下、男児として記載)7×7mmの矮小陰茎、会陰部尿道下裂、二分陰囊、外陰部色素沈着を認め、性腺は両側陰囊内に1ml触知した。その他の外表異常なし。日齢11に社会的性判定目的で当院に入院。染色体検査再検で47,XXY、FISHでSRYP陽性。内分泌検査・尿ステロイドプロファイルで副腎系に異常はなく、LH、FSH基礎値はそれぞれ0.77、0.54 mIU/ml、LHRH試験頂値7.89、1.54 mIU/ml。hCG 負荷試験でテストステロン(T)は1.01 から3.44 ng/mlに上昇、T/DHT、アンドロステンジオン/Tは正常。AMH 266ng/mlは男児として正常。画像検査で子宮・卵巣様構造はなく、陰囊内に精巣と考えられる性腺を認め、(男性)膣を有すると判明した。以上の所見、および胎生期に脳がandrogen showerを受けた可能性を有することから、社会的性として男児を選択した。KSとしては外性器男性化障害が高度であったため、アンドロゲン受容体

(AR) 遺伝子解析を行ったところ、CAGリピート数は正常であったが、p.P905L変異がヘテロ接合性に同定された。P905のミスセンス変異はAISで既報であるが、本アミノ酸置換は新規である。両親にこの変異を認めずde novo変異であった。X不活化は1:2でほぼ正常であるが、本変異がどちらのアリルにあるか等も含め、両親の解析と共に病的意義を解析中である。

D. 考察

Klinefelter 症候群 1人/500-1000の頻度で認め、性染色体異常症の中で最も頻度が高い疾患と報告されている。Klinefelter 症候群の疾患の特徴として小陰茎、小精巣を認める。実際、37人の前思春期男性(2.0-9.9歳)のKlinefelter 症候群では、陰茎長 $4.0 \pm 0.7\text{cm}(-1.7 \pm 0.6\text{SD})$ 、精巣容積 $1.2 \pm 0.4\text{cm}(-1.2 \pm 1.2\text{SD})$ と報告される¹⁾。しかしながら、外性器に本症例と同程度の高度な男性化障害を認める症例の報告はほとんどないため、本症例が非典型的な外性器所見をとる原因について、Klinefelter 症候群の遺伝子を有することのみで説明することが困難と考えられた。本症例のAR遺伝子にヘテロ接合性のp.P905L遺伝子変異を認めるが、児のアンドロゲン受容体遺伝子の異常が相加的または相乗的に作用し、結果としてデヒドロテストステロン作用が低下した可能性があると考えられた。このように、遺伝学的背景を検討することは、病態を理解し予後を考える上で重要である。

Klinefelter 核型とアンドロゲン受容体遺伝子異常の合併例の報告は他にも認めており、AndrewらはKlinefelter 症候群の症例の中で、小陰茎の程度が強い症例ほど、androgen receptor CAGn repeat数が多いことを報告した²⁾。また、GirardinらはKlinefelter 症候群と完全型アンドロゲン不応症が合併し、外性器の表現型が女性型であった症例の報告をした³⁾。

本症例にアンドロゲン受容体遺伝子異常がないとの立場をとった場合、社会的性を男児とした場合のデメリットとして、小陰茎の程度が強いため、陰茎形成が困難となる可能性が考えられる。女兒を

選択した場合のデメリットとして、外性器の形成は男性と比較すると容易であるが、子宮がないため月経が起こせないこと、gender identityの障害が出てくる可能性を認めた。

本症例の社会的性選択判定については、日本小児内分泌学会の性分化委員会が施行している多施設共同カンファレンスを利用し、複数施設(6施設)の専門家と意見を交換して判定を行った。全施設一致して、男性の選択を家族に提案することとなり、家族の希望とも一致した。今後、予想された脳の性分化や外陰形成の予後について、注意深く観察していく必要がある。特に本症例のようにKlinefelter 症候群にさらに別の因子が加わった可能性がある場合、より詳細な検討が必要と考えられる。

- 1) Martha PD, et al. J Pediatr 2008;152:716-722
- 2) Andrew R, et al. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:5041-5046
- 3) Girardin,CM et al. J Pediatr 2009;155: 439-443

E. 結論

47,XXY(Klinefelter 核型)だが、外性器の男性化障害が強く、染色体性性分化疾患として典型的ではない稀な症例を認めた。外性器の男性化障害の原因としてアンドロゲン受容体遺伝子変異が関与した可能性を認めた。DSDにおいて、遺伝学的背景を検討することは、病態を理解し社会的性選択を含めた予後を考える上で重要である。また、複数の専門家の意見を聴取する過程の必要性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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. 2014; 80(5): 706-713
- 2) Kappelgaard AM, Kiyomi F, Horikawa R, Yokoya S, Tanaka T. The impact of long-term growth hormone treatment on metabolic parameters in Japanese patients with short stature born small for gestational age. 2014; 81(4): 272-279
- 3) Yoshizawa-Ogasawara A, Katsumata N, Horikawa R, Satoh M, Urakami T, Tanaka T. Third-generation Aromatase Inhibitor improved Adult Height in a Japanese Boy with Testotoxicosis. Clin Pediatr Endocrinol. 2014; 23(2): 53-58
- 4) 堀川玲子, 田中敏章, 横谷進, 清野佳紀, 小川憲久, 清見文明, Anne-Marie kappelgaard. SGA性低身長症に対する成長ホルモン投与における△身長SDS及び△IGF-I SDSの相関関係ホルモンと臨床 2013; 60(12): 小児内分泌学の進歩2013 1011-1014
- 5) 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 Oct 2 [Epub ahead of print]
- 6) Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarasi 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. 2014; 102(4): 1130-1136
- 【総説・著書】
- 1) 堀川玲子: 性分化疾患診療ガイドライン 小児内科 46(7):864-872;2014
- 2) 堀川玲子: 低血糖・代謝異常を疑う子どもの観察と評価 小児看護ベストプラクティス フィジカルアセスメントと救急対応 (及川郁子監修 西海真理・伊藤龍子責任編集) 中山書店 (2014.2.28 pp86-87)
- 3) 堀川玲子: ささまざまな症状や検査異常への対応と診断、治療 非典型的な外性器(外性器異常) ビギナーのための小児内分泌診療ガイド (有阪治編集) 中山書店 (2014.3.31 pp140-149)
2. 学会発表
- 1) 思春期早発症臨床の実際 堀川玲子 第 117 回日本小児科学会(名古屋、2014年4月12日)
- 2) 胎生環境と内分泌代謝予後 堀川玲子 第 117 回日本小児科学会(名古屋、2014年4月13日)
- 3) 成人ターナー症候群の核型、合併症および QOL に関するアンケート調査 羽二生邦彦, 堀川玲子, 田中敏章, 長谷川奉延, 藤田敬之助, 横谷進 第 87 回日本内分泌学会(福岡, 2014年4月26日)
- 4) ゴナドトロピン補充療法に対する先天性中枢性男性性腺機能低下症患者の長期治療成績と治療効果 佐藤直子, 細川彰子, 勝又規行, 内木康博, 堀川玲子, 緒方勤, 田中敏章 第 87 回日本内分泌学会(福岡, 2014年4月25日)
- 5) 本邦における性分化異常症(DSD)診療の現状把握のための全国アンケート調査結果 濱島崇, 都研一, 向井徳男, 石井智弘, 位田忍, 有阪治, 緒方勤, 堀川玲子 第 87 回日本内分泌学会(福岡, 2014年4月24日)
- 6) 内木康博, 堀川玲子, 勝又規行, 小野寺雅史, 深見真紀: 先天性副腎皮質過形成における副腎皮質外への遺伝子導入による遺伝子治療の試み. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 浜松, 2014.9.26
- 7) 中村明枝, 堀川玲子, 内木康博, 畑郁江, 松原圭子, 佐野伸一郎, 緒方勤;原因不明の SGA 性低身長症例に対する包括的メチル化解析. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 浜松, 2014.9.26
- 8) 田中康子, 吉田朋子, 田中裕之, 菅原大輔, 中尾佳奈子, 内田登, 高橋千恵, 山本晶子, 内

木康博, 勝又規行, 品川隆, 堀川玲子: 非古典型 CYP21A2 欠損症 3 例における遺伝子型・表現型の検討. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 浜松, 2014.9.27

9) 山本晶子, 内田登, 高橋千恵, 菅原大輔, 田中裕之, 田中康子, 中尾佳奈子, 吉田朋子, 内木康博, 勝又規行, 堀川玲子: 先天性リポイド副腎過形成症 (CLAH) の長期経過. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 浜松, 2014.9.27

10) 望月貴博, 伊藤純子, 神崎晋, 島津章, 高野幸路, 田島敏弘, 田中弘之, 棚橋祐典, 寺本明, 永井敏郎, 羽二生邦彦, 東尚弘, 堀川玲子, 横谷進, 依藤亨, 長谷川奉延, 田中敏章: ターナー症候群における成長ホルモン治療中の身長経過: エストロゲン療法を開始基準を満たす年齢の検討. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 浜松, 2014.9.27

11) 佐藤直子, 内木康博, 堀川玲子, 田中敏章: 自然に性腺機能低下症が回復した複合型下垂体機能低下症の 2 例. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 浜松, 2014.9.26

12) 中尾佳奈子, 田中裕之, 田中康子, 吉田朋子, 菅原大輔, 内田登, 山本晶子, 高橋千恵, 内木康博, 堀川玲子: Turner 症候群における染色体核型と糖尿病発症リスクの検討. 第 48 回日本小児内分泌学会学術集会, 浜松, 2014.9.26

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

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

臨床検体・臨床情報の集積とデータ解析

研究分担者 長谷川行洋 東京都立小児総合医療センター 内分泌・代謝科部門長

研究要旨

性分化疾患、性成熟疾患の検体集積を行った。特記すべき成果として、NR5A1 遺伝子 LBD 領域に E304K 変異をもつ家系例を経験した。この家系例では父が遺伝子異常を持ちながら、2 回の挙児をみている。この父の様に遺伝子異常を持ちながら妊孕性をもつ 46,XY が過去3例報告されているが、その機能解析は行われていない。本研究では、E304K 変異の機能解析を行い、残存する機能を確認した。

A. 研究目的

性分化疾患、性成熟疾患の発症機序を解明することを目的として、多数の患者の臨床検体を集積した。この中で我々は NR5A1 遺伝子 LBD 領域に E304K 変異をもつ家系例を経験した。この確定診断には、深見らが開発した性分化疾患を網羅的に次世代シーケンス解析により遺伝子解析する方法を用いた。

NR5A1 遺伝子ノックアウトマウスでは副腎、性腺の発生が全く生じない。そのヒト遺伝子異常の典型例では副腎不全を認めないが、性腺異形成を示す。46,XY 症例の性腺異形成の表現型の幅は極めて広いことは今までも知られていたが、我々の経験した症例は临床上異常所見を認めない父、および二人の男児にみられた尿道下裂である。この父の様に遺伝子異常を持ちながら妊孕性をもつ 46,XY については過去3例報告されているが、その機能解析は行われていない。本研究では、E304K 変異の機能解析を行うことを目標とした。

B. 研究方法

- 1) 野生型、変異型 cDNA クローニング; 常法に従って行った。
- 2) 機能解析; COS1, CHO 細胞を用い、蛋白発現レベル、核内移行レベル、DNA 結合能レベル、転写調節レベルの解析を行った。

C. 研究結果

- 1) 症例については、G 研究発表に記載した論文を参考にされたい。
- 2) COS1 細胞を用い、E304K 変異蛋白は発現、核内移行は Wild 蛋白と同様に生じるが、target となる配列への結合能の低下、それに引き続く転写活性化能の低下を生ずることが判明した。

D. 考察

LBD 領域の変異でありながら、DNA 結合能の低下を認める理由は不明であるが、こした変異は少なくとも本遺伝子では他2種類が知られている。

父については、今後も妊孕性が舗装されているわけでない。この E304K 遺伝子変異の機能がある程度は残存するとの結果は、父において現在まで妊孕性が保持されていることと矛盾しない。

E. 結論

今年度は NR5A1 遺伝子 LBD 領域に E304K 変異をもつ家系例の機能解析をおこない、target となる配列への結合能の低下、それに引き続く転写活性化能の低下を生ずることを示した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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 Dec 12. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

深見、長谷川の指導のもと、2014年小児内分泌学会(浜松)にて我々の症例について発表した。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

臨床検体・臨床情報の集積とデータ解析

研究分担者 小島祥敬 福島県立医科大学教授

研究要旨

尿道下裂および停留精巣などの主に性分化疾患の臨床データの収集および血液および手術を行った際に得られた包皮および皮膚組織の採取の取りまとめを行った。

ち行われたものである。

A. 研究目的

尿道下裂および停留精巣は性分化疾患の表現型で最も頻度の多いものとされている。私たちの研究目的は、これら疾患の臨床データの蓄積および遺伝子解析を行うために必要な血液、包皮および皮膚組織を共同研究施設において採取しそれを取りまとめることである。また、各患者の臨床像（尿道口の位置、精巣の位置、合併疾患など）を詳細に検討することである。

B. 研究方法

共同研究施設において手術目的で入院した尿道下裂および停留精巣患者の血液を採取。

手術を施行した際に、尿道下裂であれば尿道形成術を施行した際の余剰包皮、停留精巣であれば精巣固定術を施行した際の陰囊切開部をトリミングした際の余剰皮膚を検体として採取。検体は培養液と RNA later に保存。

採取血液および組織は所定の採血管および培養液に入れ保存。

分担研究者の研究内容は、採取可能共同研究施設の匿名臨床データと検体データの取りまとめである。

（倫理面への配慮）

本研究は共同研究施設の倫理審査委員会に承認されている。また血液、検体採取の際は患者（小児であることが多いため主に家族）より同意を得たの

C. 研究結果

約 50 例の尿道下裂および停留精巣の組織採取データの集積を行った。

D. 考察

性分化疾患の表現型である尿道下裂の近位型から遠位型、停留精巣の腹腔内精巣から遊走精巣まで、各程度の症例のデータが集積されている。遺伝子との関連および疾患の重症度を調べることで、今後その発症要因が明らかになり、性分化疾患の診療ガイドラインの遺伝子診断法の確立が期待される。

E. 結論

尿道下裂および停留精巣の血液、包皮および陰囊皮膚検体組織採取データを集積した。疾患の重症度と遺伝子解析に相関を認めれば、これら疾患の発症要因があきらかになり、性分化疾患の診療ガイドラインの遺伝子診断法の確立が期待されると考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nishio H, Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H,

Mizuno K, Kojima Y, Kohri K. Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes. J Urol. 2014;191(5 Suppl): 1564-72.

2) Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, Nishio H, Nakane A, Kurokawa S, Kohri K, Hayashi Y. Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome wide analyses. J Urol. 2014;192(2):535-41.

3) Moritoki Y, Hayashi Y, Mizuno K, Kamisawa H, Nishio H, Kurokawa S, Ugawa S, Kojima Y, Kohri K. Expression profiling of microRNA in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1. J Urol. 2014 :191(4):1174-80.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

臨床検体・臨床情報の集積とデータ解析

研究分担者 松崎利也 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部産科婦人科学分野准教授

研究要旨

多嚢胞性卵巣症候群患者の臨床データの収集および血液検体の採取を収集し、対象となる正常月経周期女性の血液検体の採取し、データのとりまとめを行った。

A. 研究目的

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)は、月経異常、卵巣の多嚢胞性腫大、とアンドロゲン産生過剰、インスリン抵抗性などの内分泌・代謝異常が集積する卵巣機能不全症である。発症要因として、胎生期のアンドロゲン暴露や遺伝的背景の存在が示唆されているが、原因遺伝子を含め、病因は未だ不明であり、思春期以降に症状が顕在化し、更に数年を経てから診断が可能となるのが現状である。

本研究では、(PCOS)患者の病因を解明することを最終目的とし、遺伝子と血中ホルモンを解析するために血液検体を収集する。

B. 研究方法

徳島大学病院を受診した卵巣機能不全患者の内、臨床所見、超音波卵巣所見、内分泌所見によりPCOSの診断基準を満たす者を抽出し、説明と同意の下で血液検体と臨床データを集積した。PCOSは肥満例、非肥満例に分類した。また、対照となる正常月経周期女性の検体も同様に収集した。

(倫理面への配慮)

本研究は徳島大学の倫理審査委員会に承認されている。また血液、尿検体採取の際は患者より書面にて同意を得たうえで、氏名は番号に置き換えてデータの管理をしている。

C. 研究結果

PCOS患者37名、正常月経周期女性54名の血

液検体、身体計測値、臨床データの集積を行い、PCOS患者検体については一部のホルモン測定を実施した。

D. 考察

PCOS家族内での集積が報告され、また、月経異常は初経時から慢性的に持続する特徴を持つ。発症要因として、胎生期のアンドロゲン暴露や遺伝的背景の存在が示唆されているが、原因遺伝子を含め、病因は未だ不明である。本研究の今後の遺伝子解析により遺伝的背景が解明され、早期診断に寄与することが期待される。

E. 結論

多嚢胞性卵巣症候群患者および対照となる正常月経周期女性の血液検体と臨床データを集積した。今後の遺伝子解析により、多嚢胞性卵巣症候群発症の遺伝的背景が解明され、性分化疾患・性成熟疾患の診療ガイドラインの遺伝子診断法の確立に寄与することが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuzaki T, Iwasa T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Yamamoto Y, Kato T, Kuwahara

- A, Yasui T, Irahara M. Developmental changes in hypothalamic oxytocin and oxytocin receptor mRNA expression and their sensitivity to fasting in male and female rats. *Int J Dev Neurosci.* 2015;41C:105-109
2. Matsuzaki T, Iwasa T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Yamasaki M, Murakami M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. The responses of hypothalamic NPY and OBRb mRNA expression to food deprivation develop during the neonatal-prepubertal period and exhibit gender differences in rats. *Int J Dev Neurosci.* 2015 3;41C:63-67.
 3. Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Yamasaki M, Murakami M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Developmental changes in hypothalamic toll-like-receptor 4 mRNA expression and the effects of lipopolysaccharide on such changes in female rats. *Int J Dev Neurosci.* 2015;40:12-4.
 4. Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Effects of ovariectomy on the inflammatory responses of female rats to the central injection of lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* 2014;277(1-2):50-56.
 5. Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Yamasaki M, Murakami M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Changes in the responsiveness of hypothalamic PK2 and PKR1 gene expression to fasting in developing male rats. *Int J Dev Neurosci.* 2014;38:87-90.
 6. Iwasa T, Matsuzaki T, Matsui S, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. The effects of LPS-induced endotoxemia on the expression of adiponectin and its receptors in female rats. *Endocr J.* 2014;61(9):891-900.
 7. Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, Munkhzaya M, Kawami T, Niki H, Kato T, Kuwahara A, Uemura H, Yasui T, Irahara M. Hypothalamic Kiss1 and RFRP gene expressions are changed by a high dose of lipopolysaccharide in female rats. *Horm Behav.* 2014;66(2):309-316.
 8. Iwasa T, Matsuzaki T, Gereltsetseg G, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Murakami M, Yamasaki M, Yamamoto Y, Kuwahara A, Kato T, Yasui T, Irahara M. Site-specific changes in cytokine response to septic dose of lipopolysaccharide in ovariectomized female rats. *J Endocrinol Invest.* 2014;37(8):721-727.
 9. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Changes in leptin production/secretion induced in response to septic doses of lipopolysaccharides in gonadally intact and ovariectomized female rats. *J Reprod Immunol.* 2014;104-105:92-95.
 10. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Prenatal exposure to glucocorticoids affects body weight, serum leptin levels, and hypothalamic neuropeptide-Y expression in pre-pubertal female rat offspring. *Int J Dev Neurosci.* 2014;36:1-4.
 11. Niki H, Matsuzaki T, Kinouchi R, Iwasa T, Kawami T, Kato T, Kuwahara A, Irahara M. Improvement in diagnostic performance of the revised total testosterone measuring system in Japanese women with polycystic ovary syndrome. *J Med Invest.* 2014;61(1-2):65-71.
 12. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Pre-pubertal serum leptin levels

and sensitivity to central leptin injection of prenatally undernourished female rats. *Int J Dev Neurosci.* 2014;35:52-54.

13. Iwasa T, Matsuzaki T, Munkhzaya M, Tungalagsuvd A, Kawami T, Murakami M, Yamasaki M, Kato T, Kuwahara A, Yasui T, Irahara M. Changes in the responsiveness of hypothalamic prokineticin 2 mRNA expression to food deprivation in developing female rats. *Int J Dev Neurosci.* 2014;34:76-78.

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

2.学会発表

1. 松崎利也 「排卵誘発の現状と将来」 クリニカルカンファレンス「排卵誘発 Update」第 66 回日本産科婦人科学会学術講演会 平成 26 年 4 月 18-20 日、東京
2. 松崎利也〈学会賞受賞講演〉Fasting reduces the kiss1 mRNA levels in the caudal hypothalamus of gonadally intact adult female rats. 第 67 回中国四国産科婦人科学会総会ならびに学術講演会 平成 26 年 9 月 13-14 日、宇部
3. 松崎利也 PCOS に対する排卵誘発 産婦人科臨床懇話会セミナー「不妊治療 2014」平成 26 年 8 月 16-17 日、横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

疾患モデルの作成と解析

研究分担者 諸橋 憲一郎 九州大学教授

研究要旨

ヒト胎児やマウス胎仔の精巣には、成人（成獣）型ライディッチ細胞とは異なる胎仔型ライディッチ細胞が分化する。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。本研究では、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。

A. 研究目的

脊椎動物の精巣間質にはライディッチ細胞が存在し、テストステロン合成を通じ、精子形成ならびに身体の雄化に重要な役割を担っている。興味深いことに、ヒトを含む哺乳類の胎児精巣と成人精巣には、発生学的起源が異なる胎児型ライディッチ細胞と成人型ライディッチ細胞が存在する。ヒト性分化異常症にはライディッチ細胞の機能障害を認める症例があるが、その原因が胎児型ライディッチ細胞の障害によるものか、また成人型ライディッチ細胞の障害によるものかについては不明の症例も残されている。そこで、本研究では、胎児型ライディッチ細胞の前駆細胞を同定することで、胎児型ライディッチ細胞の成熟過程を明らかにすることを目的とする。本研究によって得られる成果は、ライディッチ細胞に異常を認めるヒト疾患の理解には不可欠である。

B. 研究方法

核内受容体型転写因子 Ad4BP/SF-1 は生殖腺や副腎に発現し、これらの組織の形成に必須である。我々はこれまで、本遺伝子の組織特異的エンハンサーとして、胎仔副腎皮質、脳下垂体性腺刺激ホルモン分泌細胞、視床下部腹内側核、ならびに胎仔ライディッチ細胞特異的エンハンサーを同

定してきた。既に胎仔ライディッチ細胞特異的エンハンサーを用い、胎仔ライディッチ細胞を GFP でラベルしたマウスを作成した。このマウスの胎仔精巣（胎齢 16.5 日）より調製した細胞を FACS にて分離したところ、GFP 強陽性細胞（S-GFP 細胞）と GFP 弱陽性細胞（W-GFP 細胞）が分離された。また、同時期のセルトリ細胞をコントロールに用いるため、Sox9-GFP マウスより（岐阜大学医学部 秋山治彦教授より供与）、FACS にてセルトリ細胞を調製した。

これらの細胞に発現する mRNA を次世代シーケンサーにて決定し、興味深い遺伝子の発現については qRT-PCR にて定量した。GFP、HSD3b6（抗 HSD3b6 抗体は京都大学薬学部、岡村均教授、土居雅夫准教授より供与）、HSD17b3 の発現は免疫染色にて確認した。

（倫理面への配慮）

マウスを使用する実験に関する審査は学内の規定に則って進めている。ヒトサンプルを用いる実験は行っていない。

C. 研究結果

1、S-GFP 細胞と W-GFP 細胞の mRNA シークエンスプロファイル

S-GFP 細胞と W-GFP 細胞より total RNA を調製

し、次世代シーケンサーによる解析を行った。両者を比較したところ、S-GFP 細胞における発現が W-GFP 細胞の2倍以上に上昇している遺伝子が 823、逆に W-GFP 細胞における発現が S-GFP 細胞の2倍以上に上昇している遺伝子が 1066 存在した。S-GFP 細胞で発現増加が認められた遺伝子はステロイドホルモン合成に関与する遺伝子 (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b1*) や胎仔ライディッヒ細胞のマーカー遺伝子 (*Insl3*, *Lhcgr*, *Crhr 1*, *Gramp1b*) であった。これらの遺伝子発現は S-GFP 細胞が胎仔ライディッヒ細胞であることを強く示唆した。一方、W-GFP 細胞で高い発現が認められたものは、細胞外基質を構築する遺伝子 (*Colla1*, *Colla5*, *Dcn*, *Col6a3*, *Coll6a1*, *Mfap4*) であった。

2、それぞれの細胞で活性化されている生物学的経路

上記の 823 ならびに 1066 遺伝子について、Gene Ontology (GO) と KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes) 解析を行った。その結果、S-GFP 細胞で活性化されている経路として、ステロイド代謝、脂肪酸代謝、エネルギー代謝などが検出された。例えば、エネルギー代謝に重要な TCA サイクルに着目すれば、TCA サイクルを構成する全ての遺伝子発現が S-GFP 細胞で上昇していた。これらの結果から、S-GFP 細胞においては各種代謝系が活性化されていることが示唆された。一方、W-GFP 細胞では細胞外マトリックス、細胞間の接着・結合や細胞周期などの経路が活性化されると推測された。

3、W-GFP 細胞の由来

上記の解析結果は S-GFP 細胞が胎仔ライディッヒ細胞の集団であることを示すものであった。一方で、W-GFP 細胞がどのような細胞に由来するかは不明であったが、セルトリ細胞や生殖細胞ではないことから、これらの細胞が精巣間質に由来すると推測した。そこで、精巣間質細胞のマーカー遺伝子発現を検討した。これまでの結果から、Dhh の受

容体がライディッヒ前駆細胞に発現すると考えられた。実際に、Notch1、Notch 2、Notch 3 の発現は W-GFP 細胞に高かった。また、PDGF 受容体の発現は間質細胞に発現が認められていたが、W-GFP 細胞に高い発現を示した。さらに、胎仔ライディッヒ細胞の分化に関与することが示唆されている *Tcf1/Pod1*, *Arx* の発現も高い値を示した。興味深いことに、これらのマーカー遺伝子に加え、成獣ライディッヒ細胞の幹細胞に発現すると考えられている *Nr2f2* (Coup-tfII) と *Nes* (nestin) 遺伝子の発現も高い値を示した。以上の結果は、W-GFP 細胞には胎仔ライディッヒ細胞と成獣ライディッヒ細胞の前駆細胞が存在することを示唆するものであった。

4、W-GFP 細胞から S-GFP 細胞への分化

そこで、W-GFP 細胞がライディッヒ細胞に分化するかを検討するため、これらの細胞を成獣精巣に移植した。移植後、6週と8週に調べたところ、移植した W-GFP 細胞が強い GFP 陽性細胞 (S-GFP 細胞) に変化しており、同時にライディッヒ細胞のマーカー遺伝子の発現を開始していることが明らかになった。予備的な結果では、S-GFP 細胞には成獣ライディッヒ細胞のマーカー (*HSD3b6*, *HSD17b1*) を発現している細胞と発現していない細胞があり、W-GFP 細胞集団には胎仔ライディッヒ細胞と成獣ライディッヒ細胞の前駆細胞が存在すると推測された。

D. 考察

本研究は当研究室で作成したトランスジェニックマウスを用いて行ってきた。このマウスでは胎仔ライディッヒ細胞特異的エンハンサーによって EGFP の発現が誘導されることから、胎仔ライディッヒ細胞は EGFP 陽性細胞となる。ところが、このマウス胎仔精巣の細胞を FACS によって分離したところ、この EGFP 陽性細胞 (S-GFP 細胞) 以外に EGFP を弱く発現する細胞 (W-GFP 細胞) が認められた。我々は、この細胞が間質に由来し、胎仔ライディッヒ細胞の前駆細胞を含んでいるのではないかと推測し、トランスクリプトーム解析をおこなった。その結果、上

記の推測を支持する結果が得られた。特に、胎仔ライディッヒ細胞の分化に関与する遺伝子の発現が W-GFP 細胞に高いことは、このことを強く支持した。また、この推測は W-GFP 細胞を成獣精巣に移植することによって確認された。興味深い点としては、W-GFP 細胞から胎仔ライディッヒ細胞と成獣ライディッヒ細胞が分化することで、W-GFP 細胞が両者の前駆細胞を含むことを示唆する。また同時に、この結果は成獣精巣が成獣ライディッヒ細胞のみならず、胎仔ライディッヒ細胞の分化をサポートする環境を有していることである。残念ながら胎仔精巣への移植実験を試みたが、この実験系が機能していないようで、現在 *in vitro* の実験系を構築することで胎仔ライディッヒ細胞の分化を再構築しつつある。この実験系と成獣精巣を比較することで胎仔ライディッヒ細胞と成獣ライディッヒ細胞の分化を支持する環境の差異(必要な遺伝子など)を明らかにすることができると思われる。

E. 結論

- 1、胎仔精巣より胎仔ライディッヒ細胞とその前駆細胞集団を単離した。
- 2、遺伝子発現解析の結果より、前駆細胞集団に比べ、胎仔ライディッヒ細胞ではステロイドホルモン合成を含む各種代謝系が活性化されていることが示唆された。
- 3、ライディッヒ前駆細胞集団では細胞外、細胞間接着、細胞周期関連の遺伝子が活性化されていた。
- 4、W-GFP 細胞を成獣精巣に移植したところ、ライディッヒ細胞に分化したことから、W-GFP 細胞にはライディッヒ前駆細胞が含まれることが示された。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. T Baba, H Otake, T Sato, K Miyabayashi, Y Shishido, C-Y Wang, Y Shima, H Kimura, M Yagi, Y Ishihara, S Hino, H Ogawa, M Nakao, T Yamazaki, D Kang, Y Ohkawa, M Suyama, B-C Chung, K Morohashi. *Nature Commun* **5**, 3634, doi: 10.1038/ncomms4634, 2014
- 2) Identification of Myt1 as a Subunit of the Neural Cell Type-specific LSD1 Complex A Yokoyama, K Igarashi, T Sato, K Takagi, Y Shishido, T Baba, R Ito, J Kanno, Y Ohkawa, K Morohashi and A Sugawara. *J Biol Chem* **289**, 18152-18162, 2014

2. 学会発表

招待講演

- 1) 20th International Symposium on Microsomal and Drug Oxidations. May 18-22, 2014, Stuttgart, Germany
Dual Roles of Ad4BP/SF-1 in Steroidogenesis and Glycolysis. Takashi Baba and Ken-ichirou Morohashi
- 2) 16th Conference on the adrenal cortex, Adrenal 2014, June 19-22, Chcago, UAS. The function of Ad4BP/SF-1 in adrenocortical metabolism. Takashi Baba and Ken-ichirou Morohashi
- 3) 39th Annual meeting of Japan Society for Comparative Endocrinology, 8th International Symposium on Amphibian and Reptile Endocrinology and Neurobiology, Nov 7-9, Okazaki, Japan. Dual Roles of Ad4BP/SF-1 in Steroidogenesis and Glycolysis. Takashi Baba, Hiroyuki Otake, Kanako Miyabayashi, Yurina Shishido, Bing Li, Miki Inoue, Yuichi Shima, and Ken-ichirou Morohashi
- 4) 第 87 回日本内分泌学会 福岡 4 月 24-26 日
Regulation of energy metabolism by nuclear receptors. Takashi Baba, Ken-ichirou Morohashi
- 5) 第 32 回内分泌代謝学サマーセミナー 7 月