

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

「尿ステロイドプロファイルによる21水酸化酵素欠損症（古典型および非古典型）と
P450酸化還元酵素欠損症の鑑別」

研究分担者 長谷川奉延 慶應義塾大学医学部小児科教室 教授

研究要旨

21水酸化酵素欠損症（古典型および非古典型）とP450酸化還元酵素欠損症を生化学的に鑑別可能か検討した。古典型21水酸化酵素欠損症55例、非古典型21水酸化酵素欠損症9例、P450酸化還元酵素欠損症16例の尿中ステロイド代謝物をガスクロマトグラフ質量分析法を用いた尿ステロイドプロファイルにより一斉分析した。11 β -hydroxyandrostenedioneの尿中代謝物11 β -hydroxyandrosterone (11OHAn)とpregnenoloneの尿中代謝物pregnenediol (PD5)の比(11OHAn/PD5)は、cutoff 1.0により21水酸化酵素欠損症（古典型および非古典型）とP450酸化還元酵素欠損症を感度特異度100%で鑑別した。

研究連携者

本間桂子 慶應義塾大学病院中央臨床検査部
小山雄平 三菱化学メディエンス株式会社

A. 研究目的

本研究では性ステロイド産生異常疾患群のうち、21水酸化酵素欠損症(21OHD)とP450酸化還元酵素欠損症(PORD)に注目した。21OHDとPORDは共通の臨床症状（46,XX個体における外陰部男性化など）を有するため、鑑別に苦慮することが少なくないからである。

すでに、古典型21OHD(N21OHD)とPORDを、11 β -hydroxyandrostenedione (11OHAD4)の尿中代謝物11 β -hydroxyandrosterone (11OHAn, 図1参照)により感度特異度100%で生化学的に診断出来ることを報告した(Two-step biochemical differential diagnosis of classical 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants using urinary pregnanetriolone / tetrahydrocortisone ratio and 11 β -hydroxyandrosterone by gas chromatography · mass spectrometry. Clin Chem 58:741-747, 2012.)

本研究の目的は非古典型(NC)も含む21OHD (C+NC21OHD)とPORDを生化学的に鑑別可能か検討することである。

B. 研究方法

研究対象は日本人 C21OHD 55 例（在胎 35-41 週、生下時体重 1,658-4,174g）、NC21OHD 9 例

（在胎 37-40 週、生下時体重 2,704-3,408g）、PORD 16 例（在胎 34-41 週、生下時体重 1,018-3,418g）、採尿時の日齢は 0-180 日である。全例 CYP21A2 あるいは POR 遺伝子解析により診断を確定した。なお NC21OHD はマススクリーニング陽性症例のみである。尿中ステロイド代謝物をガスクロマトグラフ質量分析法を用いた尿ステロイドプロファイルにより一斉分析した (Reference values for urinary steroids in Japanese newborn infants: gas chromatography/mass spectrometry in selected ion monitoring. Endocr J 50:783-792, 2003)。

（倫理面への配慮）

本研究は慶應義塾大学医学部および慶應義塾大学病院 IRB の承認のもとに行った。またヘルシンキ宣言、ヒトを対象とする医学系研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に準拠した。

C. 研究結果

尿中ステロイド代謝物を(mg/g creatinine)で表記した。

尿中ステロイド代謝物のうち、過去にC21OHDとPORDの鑑別に用いた11OHAnは、NC21OHDとPORDにオーバーラップを認めた(0.16-22 vs.

0.007-0.22)。一方、11OHA_nとpregnenoloneの尿中代謝物pregnenediol (PD5, 図1参照)の比(11OHA_n/PD5)は、cutoff 1.0によりC+NC21OHDとPORDを感度特異度100%で鑑別可能であった(図2参照 1.8-160 vs. 0.005-0.32)

D. 考察

マススクリーニング陽性のNCを含む21OHDとPORDを生化学的に鑑別診断可能であった。PORDでのみ障害されるCYP17の基質と生成物の尿中代謝物比である11OHA_n/PD5は、11OHA_n単独よりもCYP17活性障害を鋭敏に反映したと考える。

E. 結論

尿ステロイドプロフィールによりマススクリーニング陽性のNCを含む21OHDとPORDを生化学的に鑑別診断可能である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Koyama Y, Homma K, Fukami M, Miwa M, Ikeda K, Ogata T, Murata M, Hasegawa T. Classic and non-classic 21-hydroxylase deficiency can be discriminated from P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants by urinary steroid metabolites. Clin Pediatr Endocrinol (2016, in press)

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

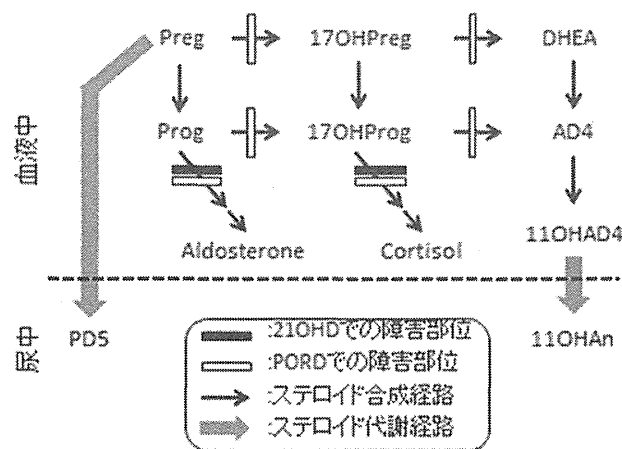
2. 実用新案登録

なし

3. その他

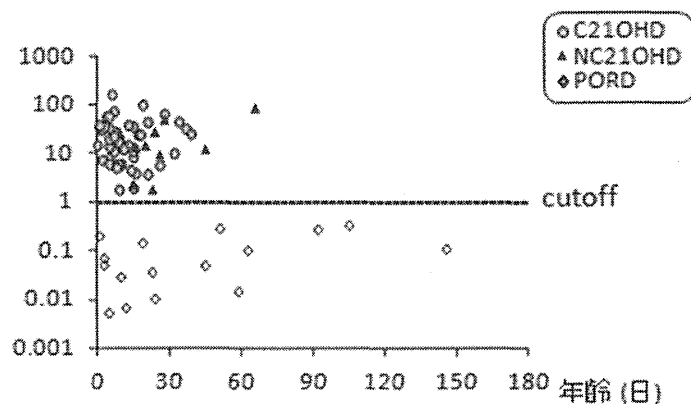
なし

図1 ステロイド合成・代謝経路マップ



*Preg: pregnenolone, Prog: progesterone, AD4: androstenedione, 11OHAD4: 11β-hydroxyandrostenedione, PD5: pregnenediol, 11OHA_n: 11β-hydroxyandrostosterone

図2 11OHA_n/PD5



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

「陰嚢型・会陰型尿道下裂に対する一期的形成術の妥当性」

研究分担者 氏名 中井秀郎
所属・職位 自治医科大学・小児泌尿器科教授

研究要旨

性分化疾患における男性化手術の中核をなす会陰型・陰嚢型尿道下裂形成術の術式について、様々な議論がある中で、一期的に行うべきか二期的に行うべきかの治療選択は、最も重要な問題のひとつである。一期的手術の治療成績が向上すれば、患児・家族の身体的、経済的、精神的負担が軽減するが、現在はその不十分な成績から、二期手術を選択すべきとの意見も多い。本研究では、周術期管理としての尿ドレナージ方法を換えることで一期的手術の成績が向上するかどうか検討した。

研究協力者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

A. 研究目的

性分化疾患（以下DSD）に対する泌尿器科アプローチの中で、女児外陰腫形成術（保険未収載）と尿道下裂形成術は、それぞれ女性化手術、男性化手術として、外科的治療の双璧である。

DSDに対する尿道下裂形成術は、必然的に外尿道口が会陰部や陰嚢部に開口する高度なタイプを対象とすることが多く、高度な技術を要する。治療成績の安定化のために最近では積極的に二期的な手術を行うことを奨励する意見が多い。しかし、われわれは、入院回数の減少、トータルな入院期間の短縮、医療費の軽減を可能ならしめる一期的手術については、治療成績を安定させるために、術式や術後管理を工夫する余地がまだ残されていると考え、自験例の工夫と結果を回顧的に検討した。

B. 研究方法

Yoke法を用いた一期的尿道下裂形成術の連続した自験6例を、平成27年4月を境に、術後尿道留置カテーテルを用いて管理したA群（平成27年3月以前）と膀胱瘻カテーテルを用いて管理したB群（同年4月以後）に分け、それぞれの手術成績を検討した。手術方法、合併症、長期予後については、保護者のインフォームドコンセントを十分得た上で、術後経過の説明、合併症への対応と見通しについて、倫理面に配慮した説明を行った。

C. 研究結果

A群3例、手術時年齢（1歳、2歳2ヶ月、2歳2ヶ月）、形成尿道長（35,48,48mm）、手術時間（3hr57min, 4hr17min, 3hr44min）、入院期間（16,19,17days）で、3例ともに術後合併症を認めた。（遠位形成尿道離開3例、瘻孔1例）

B群3例、手術時年齢（1歳2ヶ月、2歳6ヶ月、3歳8ヶ月）、形成尿道長（50,45,55mm）、手術時間（3hr6min, 3hr42min, 4hr20min）、入院期間（16,16,18days）で、3例ともに術後合併症を認めなかった。

D. 考察

形成尿道が長い高度尿道下裂の形成術の術後管理では、十分に尿道縫合部が治癒するまでの期間、尿道カテーテル留置が必須であるが、形成尿道に異物（カテーテル）が接していることにより創汚染の機会が増加する。術後早期から通常2週間にわたり、形成尿道に異物が接触することを回避し、異物フリーな状態に置くことは、縫合部の創傷治癒能力を高め、特に高度の尿道下裂形成術の成功率を高めると考えられる。膀胱瘻カテーテルによる2週間程度の術後尿ドレナージは、経皮的留置操作の手間が増えるものの、非常に有用であることが示唆された。

E. 結論

対象症例数が少ないため確定的ではないが、男性化手術、すなわち高度尿道下裂の一次的形成術の成績向上のためには、膀胱瘻カテーテルの術後積極利用などの工夫が有益である。

3. その他

F. 研究発表

1. 論文発表 本年度の当該テーマに関する発表なし
2. 学会発表 同上

G. 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

健康危険情報があるようでしたら記載ください。
研究代表者の方でまとめて総括報告書に記載いたします。

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等政策研究事業)
分担研究報告書

「ガイドライン作成に必要とされる遺伝子診断および症例登録・検体保存」

研究分担者 深見真紀

国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部・部長

研究要旨

本研究の目的は、患者の遺伝子診断と臨床検体と情報集積の面から、性分化・性成熟疾患診療ガイドライン作成に貢献することである。本年度は第1に、性分化疾患と性成熟疾患の全既知疾患責任遺伝子を搭載した次世代シーケンサー疾患遺伝子パネルを作成し、合計147の患者検体の変異スクリーニングを行った。また、ゲノムコピー数解析を行い、疾患発症に関与する染色体微細構造異常の同定を行った。これによって、日本人患者における既知責任遺伝子変異パターンが明らかとなり、新たな疾患発症機序が解明された。さらに、既知遺伝子異常症の新たな表現型と遺伝子型—表現型関連が明らかとなった。第2に、国内外の医療機関から合計303の性分化・性成熟疾患患者の臨床検体を集積し、バンキングした。また、患者の臨床情報と遺伝子解析結果をデータベースに登録し、一部をホームページ上に公開した。これらは、今後の性分化・性成熟疾患研究の基盤となる。

研究協力者:五十嵐麻希・国立成育医療研究センター分子内分泌研究部 研究員、福井由宇子・国立成育医療研究センター分子内分泌研究部 特任研究員

A. 研究目的

本研究の目的は、性分化・性成熟疾患患者の遺伝子診断を行い、個々の患者の遺伝学的データと臨床情報を集積することによって、診療ガイドライン作成に貢献することである。さらに本研究では、症例登録と検体保存について検討する。

平成27年度においては、①われわれの先行研究で行われた遺伝学的情報の整理と文献的検討による性分化・性成熟疾患群の効率的遺伝子診断システムの構築と運営、②ガイドライン作成に必要とされる遺伝子診断の実施、③臨床検体の遺伝子解析結果に基づく新規発症機序と臨床スペクトラムの解明、④成育希少疾患データベースおよびナショナルセンターバイオバンク事業を活用して症例登録および検体保存を行った。

B. 研究方法

①遺伝子診断法の検討:われわれの先行研究で得られたデータおよび文献的考察を行い、性分化・性成熟疾患群に対する効率的遺伝子診断システムを構築した。さらに、日本人患者の解析結果を集積し、結果の再現性の確認、精度の向上、解析手技簡略化、解析コスト削減などについて検討した。本研究は、日本医療研究開発機構 難治性疾患実用化

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」研究班(代表研究者:深見真紀、分担研究者:緒方勤)および「小児科・産科領域疾患の大規模遺伝子解析ネットワークとエピゲノム解析拠点整備」研究班(代表研究者:松原洋一、分担研究者:深見真紀・緒方勤)と連携して行った。

②遺伝子診断の実施:上記によって構築した解析システムを用いて、合計147件の臨床検体の遺伝子診断を行った。本年度は主として、既知疾患責任遺伝子を搭載した次世代シーケンサー疾患遺伝子パネルを用いた網羅的変異スクリーニングおよび multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) およびアレイ comparative genomic hybridization (CGH) を用いたゲノムコピー数解析と染色体微細構造解析を行った。

③症例情報登録および検体保存:研究開発法人国立成育医療研究センターに構築済みの成育希少疾患症例登録システムを活用し、性分化・性成熟疾患患者の臨床情報と遺伝学的データの登録を行った。さらに6ナショナルセンターバイオバンク事業と連携し、サンプルのバンキングを開始した。

(倫理面への配慮)

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 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。本研

究課題に関して、国立成育医療研究センター倫理委員会において、下記の課題が承認されている。すべての検体は、本人もしくは両親のインフォームドコンセントを得たのち集積された。

- 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.先天奇形症候群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 518)
- 3.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)
- 4.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)

C. 研究結果

①遺伝子診断法の検討と実施:本研究期間では、147の検体の遺伝子診断を行った。第1に、性分化疾患と性成熟疾患の全疾患責任遺伝子を搭載した時差大シーケンサー遺伝子パネルを作成し、変異スクリーニングを行った。これらの疾患患者における既知遺伝子変異陽性者の割合および変異パターンを明らかとした。本年度における代表的成果として、NR5A1遺伝子およびSOX10遺伝子変異陽性患者の新たな臨床像の同定、性分化疾患を招く新規MAMLD1スプライス変異の同定と機能解析が挙げられる。とくに重要な点として、SOX9遺伝子内機能低下変異が骨変形を伴わない46,XY性分化疾患の原因となることを初めて明らかとした。

第2に、MLPAおよびアレイCGHを用いてゲノムコピー数解析を行った。これによって、性分化疾患もしくは性成熟疾患を招く染色体微細構造異常を同定した。特記すべき成果として、性成熟異常と副腎機能不全を呈する男児における新規染色体複雑構造異常の同定、生殖機能障害に関与する新規性染色体微細重複の同定、46,XY性腺形成不全を招くSOX9上流微細欠失の同定などが挙げられる。また、従来46,XX性分化疾患の原因として知られているSOX3重複が、単独では疾患発症原因とはならないことを明確とした。

②症例登録および検体保存:本研究期間では、国内外の医療機関から303の臨床検体を集積し、バンクした。これには、末梢血、ゲノムDNAのほか、尿道下裂患者の包皮などが含まれる。さらに、患者の臨床情報と遺伝子解析結果をデータベースに登録した。多数の患者の情報が得られた疾患に関する情報は、ホームページ上に公開した。

D. 考察

①遺伝子診断法の検討と実施:本研究で確立した遺伝子診断システムを用いて、多数の患者の診断

を行った。本研究によって、日本人患者における既知遺伝子変異変異パターンが明らかとなった。例えば、出生時に外性器異常を伴う46,XY患者においては、高頻度にAR、NR5A1、もしくはSRD5A2遺伝子機能低下変異が同定されることが見出された。出生時の外性器異常は、社会的緊急性を有する状態である。今後、本年度の成果をもとに、multiplex PCRを用いた迅速スクリーニングなどより再現性が高く簡便な手法の確立を目指す。また、コストの削減について検討する。さらに、本研究で明らかとなった個々の遺伝子異常症の臨床スペクトラムに関する情報発信を行う。同時に、臨床遺伝子診断の倫理基盤、経済的基盤の整備を行い、継続的に遺伝子診断技術を提供するための体制を構築する。

②症例登録および検体保存:本研究では、性分化疾患と性成熟疾患の臨床検体と情報の集積を行った。これらは希少疾患であるため、個々の医療機関で把握されている患者は少数にとどまる。全国レベルでの症例登録を行い、追跡調査をすることによって、より良いガイドラインの策定が可能となる。また、バンクされた検体は、将来の我が国における性分化疾患と性成熟疾患研究に活用可能である。

E. 結論

性分化疾患と性成熟疾患のガイドライン策定の基盤となる遺伝子診断を行った。今後、本年度の成果に基づき、継続的に臨床遺伝子診断を行うための体制整備を行う。また継続して症例登録、検体バンク、データ集積を行い、今後の研究に活用する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*. 49(2): 553–556, 2015
2. 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(3): 130–135 2015
3. 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(3): 125–129, 2015
4. 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.* 144(4): 285–289, 2015
5. 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.* 9(2): 80–85 2015
 6. 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(3): 289–295, 2015
 7. Okuno M, Ogata T, Nakabayashi K, Urakami T, Fukami M, Nagasaki K. Endocrinopathies in a Boy with Cryptic Copy-number Variations on 4q, 7q, and Xp. *Hum Genome Variat.* [Epub ahead of print]
 8. Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nagasaki K, Horikawa R, Nagai T, Tsuchiya T, Suzuki E, Miyado M, Hata K, Nakabayashi K, Hayashi K, Matsubara 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 Genom Med.* 3(6): 550–557, 2015
 9. Miyado M, Miyado K, Katsumi M, Saito K, Nakamura A, Shihara D, Ogata T, Fukami M. Parturition failure in mice lacking Mamld1. *Sci Rep.* 5:14705, 2015
 10. Matsubara K, Murakami N, Fukami M, Kagami M, Nagai T, Ogata T. Risk assessment of medically assisted reproduction and advanced maternal ages in the development of Prader-Willi syndrome due to UPD(15)mat. *Clin Genet.* [Epub ahead of print]
 11. 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 or SRY Are Not Associated with the Risk of Hypospadias. *Sex Dev.* [Epub ahead of print]
 12. Kon M, Fukami M. Submicroscopic copy-number variations associated with 46,XY disorders of sex development. *Mol Cell Pediatr.* 2(1):7, 2015
 13. 深見真紀 停留精巣とホルモン環境 小児外科 47(8): 793–795, 2015
 14. 五十嵐麻希, 宮戸真美, 和田友香, 中村美智子, 緒方勤, 深見真紀: MAMLD1 遺伝子異常と尿道下裂. ホルモンと臨床 特集 小児内分泌学の進歩 2014 医学の世界社, 59–63, 2015
 15. 宮戸真美, 宮戸健二, 緒方勤, 深見真紀: MAMLD1:胎生期精巣におけるステロイドホルモン産生の新規調節因子. 日本生殖内分泌学会雑誌 20:19–23, 2015
 16. 深見真紀:Sohval-Soffer 症候群 小児科診療増刊号 79 小児の症候群 診断と治療社 2015
 17. 深見真紀:Turner 症候群 小児疾患診療のための病態生理 2
2. 学会発表
 1. 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, Hawaii, 2015.4.15
 2. 深見真紀: 性分化疾患の遺伝子診断. 第 88 回日本内分泌学会学術集会 シンポジウム, 東京, 2015.4.25
 3. 五十嵐麻希, 今雅史, 泉陽子, 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, 東京, 2015.4.25
 4. 深見真紀: 性分化疾患の遺伝子診断と遺伝カウンセリング. 第 68 回福井臨床遺伝研究会, 福井, 2015.7.27
 5. 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 精巣性性分化疾患患者 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, 東京, 2015.10.8
 6. 鈴木江莉奈, 泉陽子, 千葉悠太, 堀川玲子, 緒方勤, 内木康博, 深見真紀: 難聴と虹彩色素脱出を伴う Kallmann 症候群患者における SOX10 機能喪失変異の同定. 第 49 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2015.10.8
 7. 勝見桃理, 石川博通, 田中葉子, 齊藤和毅, 小堀善友, 岡田弘, 中林一彦, 緒方勤, 深見真紀, 宮戸真美: 精子無力症 1 例における azoospermia factor a 領域重複の同定. 第 49 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2015.10.8
 8. 深見真紀: Year Book 性分化疾患. 第 49 回日本小児内分泌学会学術集会, 東京, 2015.10.9
 9. 齊藤和毅, 松崎利也, 勝見桃理, 宮戸真美, 苛原稔, 齊藤英和, 久保田俊郎, 緒方勤, 深見真紀: 多嚢胞性卵巣症候群のアンドロゲン

過剰には、複数のステロイド産生経路が寄与する。第49回日本小児内分泌学会学術集会，東京，2015.10.9

10. 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，東京，2015.10.15
11. 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：無精子症・乏精子症リスクに関与するAzoospermia Factor領域コピー数多型の同定。日本人類遺伝学会第60回大会，東京，2015.10.16

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書 籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
緒方勤	こどもの病気 遺 伝について聞かれ たら	松原洋一、 呉繁夫、左 合治彦(編)	性分化疾患	診断と治 療社		2015	88-89
中島信一、 緒方勤	アンドロゲン不応 症(精巣性女性化症)	吉川史隆、 倉智智久、 平松祐司 (編)	産婦人科疾患 最新の治療	南江堂		2016	347-348
堀川玲子	思春期早発症	五十嵐隆	小児科診療ガ イドライン第3 版	総合医学 社	東京	2016	442-446

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nomura R, Miyai K, Okada M, Kajiwara M, Ono M, <u>Ogata T</u> , et al.	A 45,X/46,XY DSD (Disorder of Sexual Development) case with an extremely uneven distribution of 46,XY cells between lymphocytes and gonads.	<i>Clin Pediatr Endocrinol</i>	24 (1)	11-14	2015
Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T, Fukami M, <u>Ogata T</u> *	Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype.	<i>Eur J Hum Genet</i>	23 (11)	1488-1498	2015
Nakashima S, Kato F, Kosho T, Nagasaki K, Kikuchi T, Kagami M, Fukami M, <u>Ogata T</u> *	Silver-Russell syndrome without body asymmetry in three patients with duplications of maternally derived chromosome 11p15 involving CDKN1C.	<i>J Hum Genet</i>	60 (2)	91-95,	2015
Miyatake S, Koshimizu E, Fujita A, Fukai R, Imagawa E, Ohba C, Kuki I, Makita Y, <u>Ogata T</u> , et al.	Detecting copy number variations in whole exome sequencing data using exome hidden markov model - an expectation of “exome-first” approach.	<i>J Hum Genet</i>	60 (4)	175-182	2015

Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, <u>Ogata T*</u>	Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami-Ogata syndrome).	<i>Eur J Hum Genet</i>	23 (11)	1488–1498	2015
Fujisawa Y, Napoli E, Wong S, Song G, Yamaguchi R, Matsui T, Nagasaki K, <u>Ogata T</u> , Giulivi C	Impact of a novel homozygous mutation in nicotinamide nucleotide transhydrogenase on mitochondrial DNA integrity in a case of familial glucocorticoid deficiency.	<i>BBA Clinical</i>	1 (3)	70–78	2015
Sano S, Iwata H, Matsubara K, Fukami M, Kagami M, <u>Ogata T</u>	Growth hormone deficiency in monozygotic twins with autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b.	<i>Endocr J</i>	62 (6)	523–529	2015
Choi JH, Balasubramanian R, Lee PH, Shaw ND, Hall JE, Plummer L, Buck CL, Kottler ML, Jarzabek K, Wołczynski S, Quinton R, Latronico AC, Dode C, <u>Ogata T</u> , et al.	Expanding the Spectrum of Founder Mutations Causing Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	100 (10)	E1378–1385	2015
Nagata E, Haga N, Ohtaka K, Fujisawa Y, Fukami M, Nishimura G, <u>Ogata T*</u>	Femoral-Tibial-Digital Malformations in a Boy with the Japanese Founder Triplication of <i>BHLHA9</i> .	<i>Am J Med Genet A</i>	167 (12)	3226–3228	2015
Ishii T, Matsuo N, Amano N, Hori N, Inokuchi M, Sasaki G, Kamimaki T, Anzo M, Tamai S, <u>Ogata T</u> , et al.	Human chorionic gonadotropin stimulation test in prepubertal children with micropenis can accurately predict Leydig cell function in pubertal or postpubertal adolescents.	<i>Horm Res Paediatr</i>	84 (5)	305–310	2015
Matsubara K, Kagami M, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, <u>Ogata T</u> , Yamazawa K*	Exploration of hydroxymethylation in Kagami-Ogata syndrome caused by hypermethylation of imprinting control regions.	<i>Clin Epigenet</i>	7(1)	90	2015
Matsubara K, Murakami N, Fukami M, Kagami M, Nagai T, <u>Ogata T*</u>	Risk assessment of medically assisted reproduction and advanced maternal ages in the development of Prader-Willi syndrome due to UPD(15)mat.	<i>Clin Genet</i>	89 (5)	614–619	2016

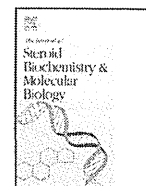
Matsushita R, Isojima T, Takaya R, Satake E, Yamaguchi R, Kitsuda K, Nagata E, Sano S, Nakanishi T, Nakagawa Y, Ohzeki T, <u>Ogata T</u> , Fujisawa Y*	Development of waist circumference percentiles for Japanese children and an examination of their screening utility for childhood metabolic syndrome.	<i>BMC Public Health</i>	15	1121	2015
Yaoita M, Niihori T, Mizuno S, Okamoto N, Hayashi S, Watanabe A, Yokozawa M, Santos F, Garcia S, <u>Ogata T</u> , Aoki Y*, et al	Spectrum of mutations and genotype-phenotype analysis in Noonan syndrome patients with <i>RIT1</i> mutations.	<i>Hum Genet</i>	135 (2)	209–222	2016
Saito K, Matsuzaki T, Iwasa T, Miyado M, Saito H, Hasegawa T, Homma K, Inoue E, Kubota T, Irahara M, <u>Ogata T</u> , Fukami M*	Multiple Androgen Biosynthesis Pathways Are Operating in Women with Polycystic Ovary Syndrome.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	158	31–37	2016
Fujisawa Y, Sakaguchi K, Ono H, Yamaguchi R, Kato F, Kagami M, Fukami M, <u>Ogata T</u> *	Combined steroidogenic characters of fetal adrenal and Leydig cells in childhood adrenocortical carcinoma.	<i>J Steroid Biochem Mol Biol</i>	159	86–93	2016
Saito K, Matsuzaki T, Iwasa T, Miyado M, Saito H, Kubota T, Irahara M, <u>Ogata T</u> , Fukami M*	Blood allopregnanolone levels in women with polycystic ovary syndrome.	<i>Clin Endocrinol</i>	(accepted)		
Miyamichi D, Asahina M, Nakajima J, Sato M, Hosono K, Nomura T, Negishi T, Miyake N, Hotta Y, <u>Ogata T</u> , Matsumoto N*	Novel <i>HPS6</i> mutations identified by whole-exome sequencing in two Japanese sisters with suspected ocular albinism.	<i>J Hum Genet</i>	(accepted)		
Luk H-M, Lo F-M I, Sano S, Matsbara K, Nakamura A, <u>Ogata T</u> *, Kagami M*	Silver-Russell syndrome in a patient with somatic mosaicism for upd(11)mat identified by buccal cell analysis.	<i>Am J Med Genet A</i>	(accepted)		
Sano S, Nagasaki K, Kikuchi T, Nakabayashi K, Hata K, Fukami M, Kagami M, <u>Ogata T</u> *	Beckwith-Wiedemann syndrome and pseudohypoparathyroidism type 1b in a patient with multilocus methylation defects: a female-dominant phenomenon?	<i>J Hum Genet</i>	(accepted)		
<u>Ogata T</u> *, Kagami M	Kagami-Ogata syndrome: a clinically recognizable upd(14)pat and related disorder affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region.	<i>J Hum Genet</i>	61 (2)	87–94	2016
Fukami M*. Seki A, <u>Ogata T</u>	<i>SHOX</i> Haploinsufficiency as a Cause of Syndromic and Non-Syndromic Short Stature.	<i>Mol Syndromol</i>	(accepted)		

緒方勤	インプリンティング疾患発症機序について.	脳と発達	47 (2)	17-22	2015
緒方勤	身長性の性差.	チャイルドヘルス	18 (1)	41-45	2015
緒方勤	性の分化および生殖発生遺伝学	産婦人科の実際	64 (3)	391-396	2015
緒方勤	ヒトインプリンティング異常症発症機序: Kagami-Ogata syndrome / Temple syndrome を主として.	ホルモンと臨床	61 (8)	69-78	2015
緒方勤	生殖補助医療と小児科とのかわり.	小児科臨床	68 (7)	13-20	2015
宮戸真美、宮戸健二、緒方勤、深見真紀	MAMLD1: 胎生期精巣におけるステロイドホルモン産生の新規調節因子	本生殖内分泌学会雑誌	20	19-24	2015
緒方勤、深見真紀	遺伝子解析と遺伝カウンセリング	産婦人科の実際 (いま、性分化とその異常を考える)	64 (10)	1301-1307	2015
小野裕之、緒方勤	軟骨毛髪低形成症	日本臨床	36 (別冊免疫疫症候群、第2版)	228-230	2016
Witchel SF, Oberfield S, Rosenfield RL, Codner E, Bonny A, Ibanez L, Pena A, Horikawa R, Gomez-Lobo V, Joel D, Tfayli H, Arslanian S, Dabadghao P, Garcia Rudaz C, Lee PA.	The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome during Adolescence.	Horm Res Paediatr.	83	376-389	2015
Tanaka T, Igarasi Y, Oaono K, Ohyama K, Ogawa M, Osada H, Onigata K, Kanzaki S, Kohno H, Seino Y, Takahashi H, Tajima T, Tachiana K, Tanaka H, Nishi Y, Hasegawa T, Fujita K, Yorifuji T, Horikawa R, Yokoya S.	Frequencies of spontaneous breast development and spontaneous menarche in Turner syndrome in Japan.	Clin Pediatr Endocrinol.	24(2)	167-173	2015
長谷川真理、位田忍 他 8 名	卵精巣性性分化疾患 12 例の臨床的検討	日本小児科学会雑誌	119	566-572	2015
位田忍	Turner 症候群	小児内科	47	1760-1764	2015

鹿島田健一	Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Tokyo, Japan from 1989 to 2013: a retrospective population-based study.	BMC Pediatrics	15	209.	2015
鹿島田健一	Clinical, biochemical, and genetic features of non-classical 21-hydroxylase deficiency in Japanese children.	Endocr Journal	62	277-82	2015
鹿島田健一	TALEN-Mediated Gene Disruption on Y Chromosome Reveals Critical Role of EIF2S3Y in Mouse Spermatogenesis.	Stem Cells Development.	24	1164-70	2015
鹿島田健一	卵巣発生において卵巣特異的転写因子 FOXL2 は WT1 による Sfl の発現を抑制する	日本生殖内分泌学会雑誌	20	47-51	2015
鹿島田健一	先天性副腎過形成(CAH)精査機関での診断のポイント ～17-OHP 高値をとる CAH の病型診断と遺伝学的検査について～	日本マススクリーニング学会誌	25	251-259	2015
Izumi Y, Mushi I, Suzuki E, Iso M, Jinno T, Horikawa R, Amemiya S, Ogata T, <u>Fukami M</u> , Ohtake A	Hypogonadotropic hypogonadism in a female patient previously diagnosed as having Waardenburg syndrome due to a <i>SOX10</i> mutation.	Endocrine	49(2)	553-556	2015
Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Kohri K, Ogata T, <u>Fukami M</u>	Novel Splice Site Mutation in <i>MAMLD1</i> in a Patient with Hypospadias.	Sex Dev	9(3)	130-135	2015
Igarashi M, Mikami H, Katsumi M, Miyado M, Izumi Y, Ogata T, <u>Fukami M</u>	<i>SOX3</i> Overdosage Permits Normal Sex Development in Females with Random X Inactivation.	Sex Dev	9(3)	125-129	2015
Katsumi M, Ishikawa H, Tanaka Y, Saito K, Kobori Y, Okada H, Saito H, Nakabayashi K, Matsubara Y, Ogata T, <u>Fukami M</u> , Miyado M	Microhomology-Mediated Microduplication in the Y Chromosomal Azoospermia Factor a (AZFa) Region in a Male with Mild Asthenozoospermia.	Cytogenet Genome Res	144(4)	285-289	2015
Ruiz-Arana IL, Hübner A, Cetingdag C, Krude H, Grüters A, <u>Fukami M</u> , Biebermann H, Köhler B	A Novel Hemizygous Mutation of <i>MAMLD1</i> in a Patient with 46,XY Complete Gonadal Dysgenesis.	Sex Dev	9(2)	80-85	2015

Yagi H, Takagi M, Kon M, Igarashi M, <u>Fukami M</u> , Hasegawa Y	Fertility preservation in a family with a novel NR5A1 mutation.	Endocr J	62(3)	289-295	2015
Okuno M, Ogata T, Nakabayashi K, Urakami T, <u>Fukami M</u> , Nagasaki K	Endocrinopathies in a Boy with Cryptic Copy-number Variations on 4q, 7q, and Xp. Hum Genome Variat.	Hum Genome Variat [Epub ahead of print]			
Katoh-Fukui Y, Igarashi M, Nagasaki K, Horikawa R, Nagai T, Tsuchiya T, Suzuki E, Miyado M, Hata K, Nakabayashi K, Hayashi K, Matsubara Y, Baba T, Morohashi K, Igarashi A, Ogata T, Takada S, <u>Fukami M</u>	Testicular Dysgenesis/Regression without Campomelic Dysplasia in Patients Carrying Missense Mutations and Upstream Deletion of SOX9.	Mol Genet Genom Med	3(6)	550-557	2015
Miyado M, Miyado K, Katsumi M, Saito K, Nakamura A, Shihara D, Ogata T, <u>Fukami M</u>	Parturition failure in mice lacking Mamld1.	Sci Rep	5	14705	2015
Kon M, Saito K, Mitsui T, Miyado M, Igarashi M, Moriya K, Nonomura K, Shinohara N, Ogata T, <u>Fukami M</u>	Copy-Number Variations of the Azoospermia Factor Region or SRY Are Not Associated with the Risk of Hypospadias.	Sex Dev [Epub ahead of print]			
Kon M, <u>Fukami M</u>	Submicroscopic copy-number variations associated with 46,XY disorders of sex development.	Mol Cell Pediatr	2(1)	7	2015
<u>深見真紀</u>	停留精巣とホルモン環境	小児外科	47(8)	793-795	2015
五十嵐麻希, 宮戸真美, 和田友香, 中村美智子, 緒方勤, <u>深見真紀</u>	MAMLD1 遺伝子異常と尿道下裂	ホルモンと臨床 特集 小児内分泌学の進歩 2014 医学の世界社	61	59-63	2015
宮戸真美, 宮戸健二, 緒方勤, <u>深見真紀</u>	MAMLD1:胎生期精巣におけるステロイドホルモン産生の新規調節因子	日本生殖内分泌学会雑誌	20	19-23	2015
<u>深見真紀</u>	Sohval-Soffer 症候群	小児科診療増刊号 79 小児の症候群 診断と治療社	79		2015
<u>深見真紀</u>	Turner 症候群	小児疾患診療のための病態生理 2	2		2015

IV. 研究成果の刊行物・別刷



Combined steroidogenic characters of fetal adrenal and Leydig cells in childhood adrenocortical carcinoma



Yasuko Fujisawa^{a,1}, Kimiyoshi Sakaguchi^{a,1}, Hiroyuki Ono^a, Rie Yamaguchi^a,
Fumiko Kato^a, Masayo Kagami^b, Maki Fukami^b, Tsutomu Ogata^{a,*}

^a Department of Pediatrics, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu, Japan

^b Department of Molecular Endocrinology, National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2015

Received in revised form 29 January 2016

Accepted 27 February 2016

Available online 3 March 2016

Keywords:

Adrenocortical carcinoma

Androgen production

Steroidogenesis

Tumorigenesis

TP53

ABSTRACT

Although childhood adrenocortical carcinomas (c-ACCs) with a *TP53* mutation are known to produce androgens, detailed steroidogenic characters have not been clarified. Here, we examined steroid metabolite profiles and expression patterns of steroidogenic genes in a c-ACC removed from the left adrenal position of a 2-year-old Brazilian boy with precocious puberty, using an atrophic left adrenal gland removed at the time of tumorectomy as a control. The c-ACC produced not only abundant dehydroepiandrosterone-sulfate but also a large amount of testosterone via the $\Delta 5$ pathway with $\Delta 5$ -androstenediol rather than $\Delta 4$ -androstenedione as the primary intermediate metabolite. Furthermore, the c-ACC was associated with elevated expressions of *CYP11A1*, *CYP17A1*, *POR*, *HSD17B3*, and *SULT2A1*, a low but similar expression of *CYB5A*, and reduced expressions of *AKR1C3* (*HSD17B5*) and *HSD3B2*. Notably, a Leydig cell marker *INSL3* was expressed at a low but detectable level in the c-ACC. Furthermore, molecular studies revealed a maternally inherited heterozygous germline *TP53* mutation, and several post-zygotic genetic aberrations in the c-ACC including loss of paternally derived chromosome 17 with a wildtype *TP53* and loss of maternally inherited chromosome 11 and resultant marked hyperexpression of paternally expressed growth promoting gene *IGF2* and drastic hypoxpression of maternally expressed growth suppressing gene *CDKN1C*. These results imply the presence of combined steroidogenic properties of fetal adrenal and Leydig cells in this patient's c-ACC with a germline *TP53* mutation and several postzygotic carcinogenic events.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Childhood adrenocortical carcinoma (c-ACC) is highly prevalent in the south Brazilian area including the Paraná state, with an estimated prevalence being 10–15 times higher than that in the rest of the world (3.4–4.2 vs. 0.3 per million children under 15 years of age) [1,2]. The high prevalence is primarily due to the presence of a founder p.R337H mutation at exon 10 of *TP53* encoding tumor protein p53 in this area [2–5]. To date, extensive studies have been

performed for the c-ACCs with the heterozygous germline *TP53* founder mutation, revealing multiple underlying carcinogenic factors such as post-zygotic loss of chromosome 17 with the wildtype *TP53* allele in virtually all c-ACCs [2,5,6], loss of the maternally inherited chromosome 11p15 and resultant hyperexpression of paternally expressed growth-promoting gene *IGF2* and hypoxpression of maternally expressed growth-suppressing gene *CDKN1C* in most c-ACCs [5,7], and other genetic aberrations including loss of chromosome 4q34 and gains of chromosome 9q33–q34 and chromosome 19p13–q13 in a substantial fraction of c-ACCs [6]. By contrast, other genetic aberrations that have frequently been found in ACCs, such as somatic gain-of-function mutations of *CTNNB* encoding β -catenin, potentially disease-causing mutations in *GNAS*, *NF2*, and *RB1*, and copy number alterations of *TERT*, *ZNR3*, and *KREMEN1*, are rarely identified in *TP53* mutation positive c-ACCs [5–8]. Furthermore, the early onset of manifestations, the histological features, and the gene expression profiles including the weak *HSD3B2* expression consistently imply that the *TP53* mutation positive ACCs are of fetal adrenal

Abbreviations: aCGH, array comparative genomic hybridization; CA, control adrenal; c-ACC, childhood adrenocortical carcinoma; $\Delta 5A$ -diol, androstenediol; $\Delta 4A$ -dione, androstenedione; DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEA-S, DHEA-sulfate; DHT, dihydrotestosterone; DMR, differentially methylated region; NR, normal range; P4, progesterone; P5, pregnenolone; 17-OHP4, 17-OH progesterone; 17-OHP5, 17-OH pregnenolone; qPCR, quantitative PCR; T, testosterone; TART, testicular adrenal rest tumor.

* Corresponding author.

E-mail address: tomogata@hama-med.ac.jp (T. Ogata).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.031>

0960-0760/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

origin [7,9,10]. In agreement with this, serum dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate (DHEA-S) are markedly elevated in affected patients, and this would explain at least in part why such c-ACCs are primarily identified in boys with precocious puberty or in girls with virilization [11].

To our knowledge, however, detailed profiles of intratumoral and blood steroid metabolites and expression patterns of steroidogenic genes have not been examined. Thus, while elevated serum testosterone (T) has also been reported in several patients with c-ACCs [11], it remains unknown whether T is actually produced in c-ACCs or converted from DHEA in extratumoral tissue (s). Here, we report combined steroidogenic characters of fetal adrenal and Leydig cells in a *TP53* germline mutation positive c-ACC, as well as detailed post-zygotic carcinogenic factors.

2. Experimental procedures

2.1. Clinical history

A Brazilian boy was born in Japan to non-consanguineous parents at 38 weeks of gestation, with a birth weight of 2.75 kg (-0.6 SD for Japanese). The parents were of the Paraná state origin and, while the parents and the two siblings were clinically normal, three maternal relatives were allegedly afflicted with cancers (Fig. 1A).

At 2 7/12 year of age, he was referred to us because of secondary sexual development and accelerated growth that were noticed from ~ 2 years old. His height was 96.2 cm ($+2.0$ SD), and his weight 19.2 kg ($+4.9$ SD). Physical examination revealed several pubic hairs, large penis (~ 6 cm), and intrascrotal testes of prepubertal size (2 mL). There were no obvious Cushing-like features. Standard radioimmunoassay showed increased serum DHEA-S (870 $\mu\text{g}/\text{dL}$ = 23.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$) (normal range [NR], <40 $\mu\text{g}/\text{dL}$), T (4.3 ng/mL = 15 nmol/L) (NR, <0.05 ng/mL), and dihydrotestosterone (DHT) (0.5 ng/mL = 1.7 nmol/L) (NR, <0.01 ng/mL), and suppressed serum luteinizing hormone (<0.2 IU/L) and follicle-stimulating hormone (<0.2 IU/L). Serum cortisol at 8:00 am was 10.8 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (= 298 nmol/L) (NR, 3–21 $\mu\text{g}/\text{dL}$), and was mildly suppressed to

6.2 $\mu\text{g}/\text{dL}$ (= 171 nmol/L) after a low-dose dexamethasone intake (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.o. at 11 pm of the previous day). Abdominal computed tomography and magnetic resonance imaging delineated a mass of $\sim 4 \times 4 \times 3$ cm at the left adrenal position (Fig. 1B). The mass of 26.4 g was completely removed, together with an atrophic left adrenal gland which was utilized as the control adrenal (CA) in this study. Macroscopic examination at the time of surgery showed no discernible metastatic region or invasion to the surrounding tissues. Histological examinations showed high nuclear atypia, atypical mitotic figures, eosinophilic cytoplasm, sinusoidal invasion, and diffuse architecture; immunohistochemical examinations revealed positive NR5A1 (alias, SF-1) staining characteristic of steroidogenic cells [12], TP53 nuclear staining suggestive of *TP53* mutation [13], increased Ki67 index of 11% indicative of malignancy ($>5\%$ is considered as malignant) [14], and faint HSD3B2 and strong CYP17A1 staining consistent with fetal adrenal [15] (Fig. 1C). His hormone values were normalized shortly after the surgery. Thus, the mass was diagnosed as the stage I c-ACC according to the Weiss criteria and the IPACTR staging [10,16,17]. At present, he is 3 5/12 years old, and is under close follow-up without further treatment, as well as his mother and younger brother who were found to have the *TP53* p.R337H mutation.

2.2. Ethical approval

This study was approved by the Institutional Review Board Committee of Hamamatsu University School of Medicine, and performed after obtaining written informed consent.

2.3. Measurements of steroid metabolites

Multiple steroid metabolites were simultaneously measured by the liquid chromatography-tandem mass spectrometry [18], using ~ 100 mg of the c-ACC and the CA homogenates prepared at the time of the operation and ~ 0.3 mL of serum samples obtained before and one month after the operation. We measured steroid metabolites not only on the conventional frontdoor pathway that produces DHT via T but also on the alternative backdoor pathway

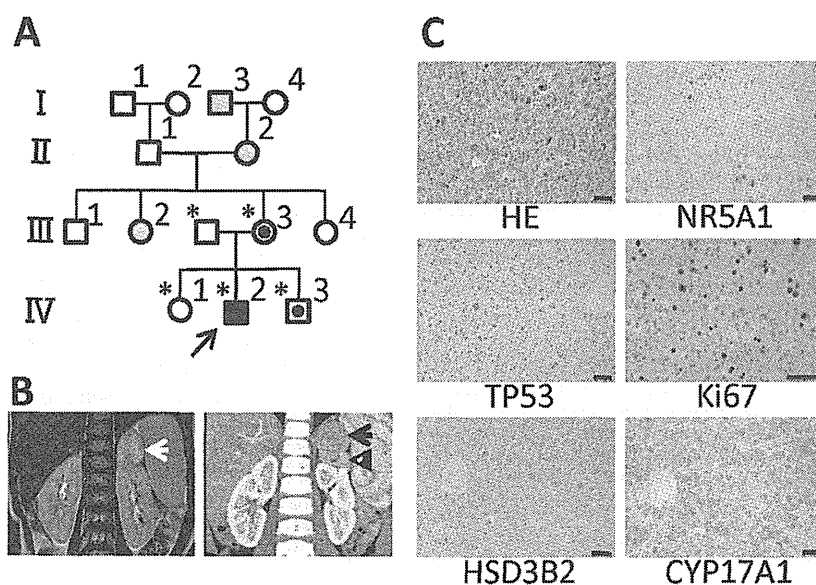


Fig. 1. The family tree and the c-ACC identified in this Brazilian patient. A. The pedigree of this family. *TP53* mutation was examined in the five relatives indicated by asterisks, and was identified in the proband with the c-ACC (IV-2), as well as in the healthy mother (III-3) and the younger brother (IV-3). I-3 and II-2 had gastrointestinal cancers, and III-2 had breast cancer. B. The CT (left) and the MRI (right) scans of the c-ACC (arrows). The arrowhead on the MRI scan denotes an atrophic left adrenal gland. C. Histological and immunohistochemical findings of the c-ACC. HE: hematoxylin-eosin. The black horizontal bars indicate 100 μm .

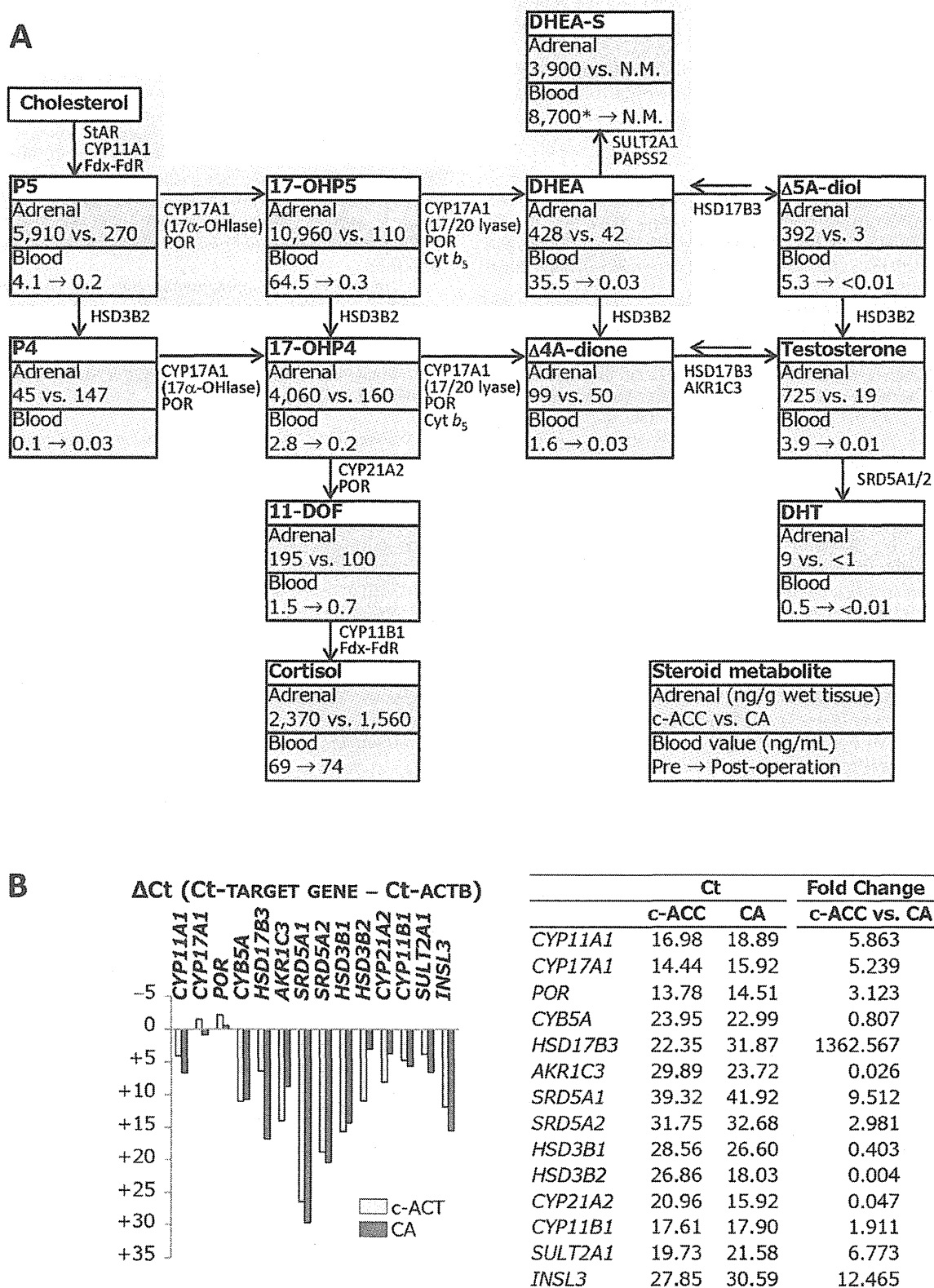


Fig. 2. Steroidogenic characters of the c-ACC in this Brazilian boy. c-ACC: childhood adrenocortical carcinoma; and CA: control adrenal. A. Intratumoral and serum steroid metabolite values. All the metabolites were measured by the liquid chromatography–tandem mass spectrometry, except for serum DHEA-S value that was obtained by the standard radioimmunoassay (indicated by an asterisk). The metabolic pathway common to both fetal adrenal and Leydig cells is highlighted with green, that characteristic of the fetal adrenal cells with blue, and that characteristic of Leydig cells with yellow. For the convenience in the comparison, all the blood steroid metabolites are shown with the same metric unit (ng/mL). B. Expression patterns of genes involved in steroidogenesis and *INSL3*, using *ACTB* (β -actin) as an internal control. Similar results have been obtained when *GAPDH*, *PPIA*, and *18S* were utilized as internal controls. In the left part, minus values represent genes expressed more strongly than *ACTB*.

that yields DHT without T intermediacy [15,19]. The conversion factors from metric units to SI units for blood steroid metabolites are shown in Supplementary Table 1.

See Excel sheet 1 as supplementary file. Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.031>.

2.4. Molecular studies

mRNA was obtained from the c-ACC and the CA tissues. Genomic DNA was extracted from leukocytes, the c-ACC, and the CA of the patient, and from leukocytes of the siblings, the parents, and a control male. The primers utilized are shown in Supplementary Table 2.

See Excel sheet 1 as supplementary file. Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.031>.

Expression dosage analyses were carried out for genes involved in steroidogenesis and a Leydig marker *INSL3* by quantitative PCR (qPCR) on StepOnePlus system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), using *ACTB*, *GAPDH*, *PPIA*, and *18S* as internal controls. We also performed DNA chip analysis (3D-Gene) (Toray, Tokyo, Japan) including *CTNNB1*, *GNAS*, *ZNRF3*, and *KREMEN1* that are often mutated in ACCs [20].

Direct sequencing and microsatellite genotyping were performed by the standard methods on the ABI 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies). Gene copy number analysis was carried out by qPCR on StepOnePlus system, using *GAPDH* as an internal control. Genomewide array comparative genomic hybridization (aCGH) and SNP array were performed using a catalog human array (SurePrint G3Human CGH + SNP 4 × 180 K format, ID G4890A) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA); aCGH was carried out using leukocyte DNA samples of the patient and a control male, and leukocyte and c-ACC genomic DNA samples of the patient. Methylation analysis was carried out for multiple differentially methylated regions (DMRs) (Supplementary Table 3) by pyrosequencing (PyroMark Q24) (Qiagen, Venlo, Netherlands), using bisulfite-treated genomic DNA samples.

See Excel sheet 1 as supplementary file. Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.031>.

2.5. Experiments using the NCI-H295R cells

The NCI-H295R cells (CRL-2128, American Type Culture Collection) originated from an adrenocortical carcinoma in an adult female [21] are known to have fetal adrenal-like character, as are c-ACCs [22]. Thus, we also examined steroid metabolite profiles and gene expression patterns of the H295R cells. In brief, the H295R cells were seeded into 6-well dishes (1×10^6 cells/well) and were cultured in DMEM/Ham's F-12 medium (Life Technologies) supplemented with 2.5% Nu-Serum (BD Biosciences) and 1% insulin/transferrin/selenium premix (Corning) for 48 h. Subsequently, $\sim 2 \times 10^7$ of pooled cells (~ 80 mg of cell homogenates) and ~ 3 mL of pooled media were utilized to examine the steroidogenic character.

3. Results

3.1. Profiling of steroid metabolites

The results are shown in Fig. 2A. As compared with the CA, pregnenolone (P5), 17-OH pregnenolone (17-OHP5), DHEA, and DHEA-S were obviously elevated in the c-ACC. Notably, androstenediol ($\Delta 5A$ -diol) and T were also markedly high in the c-ACC. The conversion from 17-OHP5 to DHEA was apparently

compromised, as was that from 17-OH progesterone (17-OHP4) to androstenedione ($\Delta 4A$ -dione). The conversion from P5 to progesterone (P4) and that from DHEA to $\Delta 4A$ -dione were also apparently compromised, whereas the conversion from 17-OHP5 to 17-OHP4 was fairly preserved and that from $\Delta 5A$ -diol to T was apparently smooth. DHT was barely produced in the c-ACC, and the backdoor pathway for androgen production was not operating in the c-ACC (Supplementary Fig. 1). Pre-operation steroid metabolite profile was considerably different between the ACT and the serum, including the 17-OHP5/DHEA, 17-OHP4/ $\Delta 4A$ -dione, 17-OHP5/17-OHP4, DHEA/ $\Delta 4A$ -dione, and DHEA/ $\Delta 5A$ -diol ratios. Serum steroid profile was normalized at one month after the operation.

See Excel sheet 1 as supplementary file. Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.031>.

3.2. Expression patterns of genes involved in steroidogenesis and a Leydig marker *INSL3*

The results are shown in Fig. 2B. As compared with the CA, the c-ACC was associated with elevated expressions of *CYP11A1*, *CYP17A1*, *POR*, *HSD17B3*, and *SULT2A1*, a low but similar level of expression of *CYB5A*, and reduced expressions of *AKR1C3* (*HSD17B5*) and *HSD3B2*. In addition, *CYP21A2* and *CYP11B1* were expressed at low and slightly high levels, respectively, and *SRD5A1*, *SRD5A2*, and *HSD3B1* were barely expressed. Notably, *INSL3* was expressed at a low but detectable level in the c-ACC and the CA, with obviously stronger expression in the c-ACC than in the CA. The fold change (the c-ACC vs. the CA) was most remarkable for *HSD17B3*, followed by *INSL3*, *SULT2A1*, *CYP11A1*, and *CYP17A1* (although the fold change was also remarkable for *SRD5A1*, *SRD5A1* was poorly expressed in both tissues).

3.3. Experiments using H295R cells

The results are shown in Supplementary Fig. 2. Steroid metabolite profiling revealed that the H295R cells contained markedly high level of P5, relatively high levels of 17-OHP5, 11-DOF, and DHEA, relatively low levels of 17-OHP4, DHEA-S, and $\Delta 4A$ -dione, obviously low level of P4, and extremely low levels of cortisol, $\Delta 5A$ -diol, T, and DHT. The media contained markedly high level of 11-DOF, relatively high levels of DHEA-S and $\Delta 4A$ -dione, relatively low levels of P5 and 17-OHP5, obviously low levels of cortisol and DHEA, and extremely low levels of P4, 17-OHP4, $\Delta 5A$ -diol, T, and DHT. Gene expression analysis indicated that the H295R cells were associated with relatively high expressions of *CYP11A1*, *CYP17A1*, *POR*, *CYB5A*, *AKR1C3* (*HSD17B5*), *CYP21A2*, and *SULT2A1*, relatively low expressions of *HSD17B3*, *HSD3B1*, *HSD3B2*, and *CYP11B1*, and severely low expressions of *SRD5A1* and *SRD5A2*, as well as *INSL3*.

See Excel sheet 1 as supplementary file. Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.031>.

3.4. Germline *TP53* mutation and post-zygotic genetic rearrangements in the c-ACC

A heterozygous p.R337H mutation of *TP53* was identified in the leukocyte of this boy, the mother, and the younger brother, but not in the father and the elder sister (Fig. 1A and Fig. 3A). In the c-ACC, this mutation was present in an apparently hemizygous condition and, consistent with this, aCGH and SNP array analyses indicated loss of the whole chromosome 17 (Fig. 3A). This was further confirmed by qPCR analysis for *TP53* copy number, and microsatellite analysis for *D17S831* and *D17S949* revealed loss of the