

(別紙1)

## 総括研究報告書

課題番号：29-21

課題名：小児疾患発症に関与する NR5A1 を介した分子機構の解明

宮戸 真美 (所属施設) 国立成育医療研究センター  
(所属・職名) 分子内分泌研究部・上級研究員

(研究成果の要約) 成育疾患の一つである性分化疾患の発症機序の解明は、性分化疾患の診断法の確立および治療法の開発において重要である。申請者らの研究から、副腎と性腺の発生・分化に必須な因子である NR5A1 が、46,XX 精巣性/卵精巣性性分化疾患の新たな原因遺伝子であることが明らかになった。p.R92W は特異な機能を有する NR5A1 変異体を形成すると推測される。

そこで、本研究の目的は、性腺形成異常を呈する性分化疾患患者の遺伝子配列の解析および遺伝子相互作用の解析を通して、性分化疾患の発症機序を解明することである。

これまでに、胎生 13.5~17.5 日胚の変異導入ホモマウスの性腺において太い血管を認めており、性腺の一部が精巣へと分化している可能性を見出している。性腺をもちいた遺伝子発現解析から、XY および XX とともに変異ホモ導入性腺では性分化メカニズムが乱れていることを示唆する所見が得られている。さらに、これまでに集積した性分化疾患患者検体の一部をもちいて、NR5A1 遺伝子の塩基配列解析を行ったが、新たな変異は同定されなかった。今後、新たな変異が同定されたのち、得られる成果を性分化疾患などの内分泌関連疾患の発症機序の解明と新規治療法の開発へと結び付けて、性腺の発生・分化における新たな遺伝子相互作用の解明につなげていきたい。

### 1. 研究目的

本研究の目的は、性腺形成異常を呈する性分化疾患患者の遺伝子配列の解析および遺伝子相互作用の解析を通して、性分化疾患の発症機序を解明することである。

申請者らは、NR5A1 p.R92W 変異を有する XY の表現型がヒトおよびマウスともに性腺形成不全を呈し、XX の表現型がヒトとマウスで異なっていることを見出している (Miyado M et al., 2016; Igarashi M et al., 2017)。そのため、NR5A1 p.R92W XY 変異導入マウスをもちいた解析を行うことで、XY 性腺の形成異常を招く分子機構を明らかにすることが可能である。しかし、NR5A1 p.R92W 変異は不完全浸透であること (Baetens D et al., 2017)、NR5A1 遺伝子の変異は幅広い表現型を呈すること (Domenice S et al., 2016) が報告されている。したがって、XX 変異導入マウスの性腺が精巣に誘導されていないことを断言するためには、十分な個体数について解析を行う必要がある。

### 2. 研究組織

研究者 所属施設  
宮戸 真美 国立成育医療研究センター

内木 康博 国立成育医療研究センター

### 3. 研究成果

本年度の研究では、次に挙げる項目について検討を行い、その結果、成果をあげることができた。

(1) NR5A1 p.R92W 変異導入ホモマウスの胎生期性腺の解析

(イ) 変異導入マウス性腺のサンプリングを行った。

これまで数個体の XY および XX 変異導入ホモマウスの性腺をもちいて、組織学的な解析を行っていたが、それらの性腺に精細管を認めていない。十分な数の XX 変異導入マウスの性腺の解析を行うため、新たにサンプリングを行った。

性腺の分化状態を明らかにするため、胎生 13.5~18.5 日胚の変異導入ホモマウスのサンプリングを行い、XY 変異導入ホモマウスを 64 個体、XX 変異導入ホモマウスを 74 個体まで増やした。

(ロ) 変異導入マウス性腺の解剖学的・組織学的な解析を行った。

新たにサンプリングした XX 変異導入マウ

スの性腺を含めて、解剖学および組織学的な解析を行い、NR5A1 p.R92W 変異マウスの性腺の分化状態を明らかにした。

変異導入ホモマウス 138 個体すべての性腺において、精細管は認められなかった。精巣の特徴として、精細管の他にも精巣表面に頭尾軸に沿って走る太い血管が存在することが知られている。胎生 18.5 日胚の変異導入ホモマウス性腺では、精細管と同様に太い血管も認められなかった。組織学な解析の結果、胎生 18.5 日胚の性腺内部は卵巣様に分化していることが明らかになった。しかし、胎生 13.5 ~17.5 日胚の変異導入ホモマウスの性腺では、精巣の特長の一つである太い血管が認められた。このことから、胎生期の途中まで性腺の一部は精巣へと分化していることが明らかになった。

これまでに解剖学的な解析を行った変異導入ホモマウスの性腺 (138 個体) において、精巣分化の状態を示す精細管は認められなかった。このことから、ヒトと異なり、マウスでは NR5A1 p.R92W 変異は、胎生期において性腺の精巣への完全な分化を誘導しないことが明らかになった。しかし、胎生 13.5~17.5 日胚の変異導入ホモマウスの性腺において認められた太い血管は、胎生期において性腺外部が精巣に分化誘導されていることを示唆する所見である。

(ハ) 変異導入マウス性腺をもちいて遺伝子発現解析を行った。

胎生 13.5 日胚の性腺をもちいて、マウス性腺の雄性化、雌性化に関与することが知られている遺伝子について、qPCR による遺伝子発現解析を行った。XY と XX ともに変異ホモ導入性腺における *Sox9*、*Foxl2*、*Wtl* の発現量は、野生型 XX における発現量に近かった。また、*Wnt4* の発現量は野生型 XY における発現量に近いことを見出した。このことから、変異ホモ導入性腺では、XY と XX ともに性分化メカニズムが乱れていることが示唆される。

(2) NR5A1 p.R92W 変異導入ホモマウスの胎生期脳の解析

脳のパターン形成は性ホルモンの影響を受けること、*Nr5a1* 欠損ホモマウスでは性腺と視床下部腹内側核の欠損が報告されているが、変異導入ホモマウスでは性腺の欠損は認められない。このことから、これらのマウスでは

脳に欠損領域はなく、脳のパターン形成について解析が可能であると予想している。そこで、視床下部腹内側核の解析が可能であると予想し、変異導入ホモマウス頭部のサンプリングを行った。

解剖学的な解析の結果、野生型マウスと比べて、変異導入ホモマウスの脳に違いは認められなかった。しかし、組織学的な解析を行い、野生型マウスと変異導入ホモマウスの脳における違いの有無を明らかにする必要がある。

(3) 性分化疾患患者を対象とした NR5A1 遺伝子変異の検索

これまでに 840 例以上の 46,XY 性分化疾患患者の検体と臨床情報を集積し、30 例以上の 46,XX 性分化疾患患者の臨床サンプルを集積した。一部の検体をもちいて、NR5A1 遺伝子の塩基配列解析を行ったが、新たな変異は同定されなかった。

これまでの解析の結果、新たな NR5A1 遺伝子変異は同定されなかった。未解析の検体がまだ多数残されているため、解析にもちいる検体数を増やすことで、新たな変異が同定されるかもしれない。

(4) NR5A1 は副腎と性腺の発生・分化に必須な因子であり、NR5A1 遺伝子の変異が 46,XY 患者で精巣形成不全および 46,XX 患者で卵巣機能低下を招くことが報告されている。

2016 年の夏以降、申請者らと国外 2 つの独立した 3 つの研究グループにより、SR Y 陰性 46,XX 精巣性/卵精巣性性分化疾患患者 10 例において、同一のヘテロ接合性 NR5A1 ミスセンス変異 (c.1045C>G, p.R92W) が同定され

(Bashamboo A et al., 2016; Baetens D et al., 2017; Igarashi M et al., 2017)、NR5A1 が 46,XX 精巣性/卵精巣性性分化疾患の新たな原因遺伝子であることが明らかになった。さらに、同変異は 46,XY 性分化疾患患者でも同定されており (Bashamboo A et al., 2016)、p.R92W は特異な機能を有する NR5A1 変異体を形成すると推測される。さらに、46,XX 卵精巣性性分化疾患患者において、同じ 92 番目のアルギニンがグルタミンに変化した p.R92Q 変異が報告された (Swartz JM et al., 2017)。このことから、NR5A1 の 92 番目のアミノ酸変化は、性分化疾患の発症に大きく寄与することが明らかになった。

NR5A1 p.R92W が哺乳類の性分化に与える効果を明らかにするため、申請者らは CRISPR/Cas9 システムをもちいて変異導入マウスを作製し (Inui M et al., 2014)、系統維持を行っている。さらに、変異導入ホモマウスの外陰部が遺伝型に無関係に雌型を呈すること、XY 変異導入マウスの性腺が野生型マウスに比べて低形成であり、XX 変異導入マウスの性腺に明らかな異常が見られないことを報告している (Miyado M et al., 2016)。

(5) 本研究の成果は、性分化疾患などの内分泌関連疾患の発症機序の解明と新規治療法の開発に結び付き、ヒトを含む哺乳類の性腺の発生・分化における新たな遺伝子相互作用の解明につながると期待される。NR5A1 p.R92W 変異は XY において性腺形成不全を、XX において性腺の雄性化を招く。そこで、男女における性分化機構の相違に着目して、疾患の発症機序の解明に取り組むことが重要である。本研究では、NR5A1 p.R92W 変異が性腺形成関連遺伝子との相互作用に及ぼす影響を解析する。

(イ) 単一遺伝子の機能低下により引き起こされる疾患の発症機序の解明に貢献する。

NR5A1 遺伝子の変異は、幅広い表現型を呈することが報告されている。また、NR5A1 遺伝子の変異による表現型は、Nr5a1 欠損ホモマウスと必ずしも一致しない。したがって、NR5A1 機能低下による遺伝子効果は、ヒトとマウスでは必ずしも同じではないと言える。種間の性分化機構の相違を意識して、疾患の発症機序解明に取り組む必要がある。

(ロ) 哺乳類の性腺の発生・分化における新たな遺伝子相互作用を明らかにする。

性腺の分化過程における NR5A1 p.R92W、NR0B1、SOX9、FOXL2 の関係を明らかにする。XY と XX とともに変異ホモ導入性腺における Sox9、Foxl2 の発現量は、野生型 XX における発現量に近いことを見出した。このことから、変異ホモ導入性腺では、雄性化のシグナルよりも雌性化のシグナルが優位に機能していると推測される。また、ヒト患者と変異導入 XX マウスの表現型の差異は、胎生期卵巣における NR5A1/Nr5a1 発現量の差によると推測されている。

(ハ) 無精子症・乏精子症などの造精機能障

害を起こす疾患の研究に発展させることができる。

p.R92W が患者の父 (乏精子症罹患) に認められた。この乏精子症には、NR5A1 機能低下による精巣形成不全が関与している可能性がある。このことから、本研究により得られた成果は、小児疾患発症に関与する NR5A1 を介した分子機構の解明のみならず、無精子症・乏精子症などの造精機能障害を起こす疾患の発症解明に貢献できる。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究は、ヒト遺伝子解析研究、遺伝子組換え DNA 実験、動物実験が含まれる。本研究を実施するために必要な倫理委員会における承認は既に得ている。倫理指針に則って、研究参加者への説明、同意の撤回、結果の通知について適切に対処した。資料の管理は倫理指針及び倫理委員会の指示に従って適切に行った。

##### 【ヒト遺伝子解析研究】

「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。国立成育医療研究センター倫理委員会において、研究課題「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)」が承認されている。

##### 【遺伝子組換え DNA 実験】

「カルタヘナ法 (遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律)」を厳守して行った。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、承認を受けている (承認番号 07-7: 代表 深見真紀)。

##### 【動物実験】

「国立成育医療研究センターにおける動物実験に関する指針」に準拠した。当センター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 2009-002, 2016-002)。実験者は管理者と協力し、適切な環境のもと飼育管理を行った。