

低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を合併した
X連鎖性先天性副腎低形成症症例での
DAX-1 遺伝子異常の同定と
LHB 遺伝子プロモーターによる変異 DAX-1 の機能解析
学位論文内容の要旨

緒言

DAX-1(Dosage-sensitive sex reversal-AHC critical region on the X, gene 1)は核ホルモンレセプター・スーパーファミリーに属するオーファン・レセプターで、DAX-1 遺伝子異常はヒト男性においてX連鎖性先天性副腎低形成症(AHC)と低ゴナドトロピン性性腺機能低下症(HHG)を来すことが知られている。DAX-1は、副腎皮質、性腺、視床下部、下垂体前葉に発現が認められており、視床下部—下垂体—副腎系および視床下部—下垂体—性腺系の正常な発達や機能維持に関与していると考えられる。このことからHHGの原因として視床下部と下垂体の両レベルでのDAX-1の機能障害が関与しているものと推定されているが、その詳細なメカニズムに関してはいまだ明らかにされていない。今回新たに同定した2つの変異を含め、HHGを発症したAHC5症例の病因DAX-1遺伝子異常について、下垂体ゴナドトロピン産生細胞、視床下部神経細胞における個々の変異DAX-1の機能をLHB遺伝子プロモーター、GnRHレセプター遺伝子プロモーター、GnRH遺伝子プロモーターを用いて*in vitro*で解析し、遺伝子型、臨床型との相関を含めて検討した。

方法・結果

対象は思春期年齢に達しHHGが明らかとなったAHC症例5例で、全例新生児期から小児期にかけて塩類喪失を伴う副腎機能不全を発症している。この内4症例は自然な二次性徴を認めず、内分泌学的検査でLH、FSHの分泌低下を伴う典型的なHHGを認めたが、残る1例は一過性かつ不完全ではあったが自然な思春期の発来を認め、HHGは不全型と考えられた。自然な二次性徴を認めなかった4例の中の1例はhCG/HMG療法によって二次性徴の獲得に成功したが、精子形成は得られなかった。精巣生検ではライディヒ細胞の過形成とセルトリ細胞の低形成を認めた。これら症例のうち3症例はこれまでに病因と考えられるDAX-1遺伝子変異(Y271X, Q395X)とDAX-1遺伝子の欠失を確認済みである。残る2例について個々の症例の末梢血白血球から分離したゲノミックDNAを用いてPCR直接シーケンス法によるDAX-1遺伝子の解析を行い、新たなDAX-1遺伝子変異(V269D, L278R)を同定した。これら変異DAX-1のラットLHB、ヒトGnRHレセプター、ヒトGnRH遺伝子プロモーターに対する機能を、下垂体ゴナドトロピン産生細胞αT3-1、視床下部神経細胞GT1-7を用いてルシフェラーゼ・レポーター・アッセイで解析した。下垂体ゴナドトロピン産生細胞においてDAX-1は、転写因子であるSF-1とEgr-1によるLHB遺伝子プ

ロモーターの活性化を抑制するが、各種変異 DAX-1 ではこの抑制効果が著明に減弱していた。減弱の程度と遺伝子型、臨床型との間には明らかな相関を認めなかった。一方同じく下垂体ゴナドトロプ産生細胞において *GnRH* レセプター遺伝子プロモーターもまた *in vitro* で SF-1 と cAMP による転写調節を受けるが、これに対して DAX-1 は *LHβ* 遺伝子プロモーターにおいて見られたような抑制効果を示さず、変異による影響も認めなかった。また視床下部神経細胞に発現する *GnRH* 遺伝子のプロモーター活性は *in vitro* で SF-1 により抑制を受けるが、これに対しても DAX-1 は明らかな影響を示さなかった。

考察

一部症例で自然な二次性徴の発来を認めるなど DAX-1 異常症における HHG には臨床的な多様性が認められた。また hCG/HMG 療法によって二次性徴の獲得に成功した症例においてもセルトリ細胞は低形成であり精子形成が得られなかったことから、DAX-1 がセルトリ細胞の機能維持や精子形成に直接関与している可能性が示唆された。今回同定した二つの新しいミスセンス変異は DAX-1 の機能に重要と考えられている C 端側に位置し、また変異の起こっているアミノ酸はいずれも核内受容体の E1 領域において種を越えて高度に保存されていることから、各症例の病因となる変異と考えられた。不全型の HHG を呈した軽症例が比較的近位のナンセンス変異 (Y271X) を有していたのに対し、完全型の HHG を示した症例でそれより遠位のナンセンス変異 Q395X やミスセンス変異 L278R を有するなど、多様な臨床型と遺伝子型との間には明らかな相関を認めなかった。また *LHβ* 遺伝子プロモーターを用いた *in vitro* での変異 DAX-1 の機能解析においても軽症例である Y271X 変異は他の変異との間で転写抑制能に明らかな差を認めず、臨床型を反映した部分的な機能喪失を示さなかった。これらの結果より *DAX-1* 遺伝子異常症において遺伝子型や *in vitro* での残存転写抑制能では必ずしも臨床像の多様性を説明できず、多様な臨床像の形成には何らかの後天的要因や他の転写因子の作用など未知の機構による修飾が複雑に関与している可能性が示唆された。DAX-1 は SF-1 による標的遺伝子の転写調節に対して抑制的に作用することが知られているが、視床下部—下垂体—性腺系に発現し *in vitro* で SF-1 による転写調節を受ける遺伝子の中で、*LHβ* 遺伝子の転写調節に対しては DAX-1 は抑制効果を示したが、*GnRH* レセプター遺伝子、*GnRH* 遺伝子の転写調節に対しては有意な効果を及ぼさなかった。*DAX-1* 遺伝子異常による HHG は視床下部、下垂体の両方が障害されて発症すると推測されているが、DAX-1 の異常がそれぞれの部位の障害にどのように関与しているかについては更なる研究が必要と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦

副 査 教 授 佐々木 文 章

副 査 教 授 櫻 木 範 明

学 位 論 文 題 名

低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を合併した

X連鎖性先天性副腎低形成症症例での

DAX-1 遺伝子異常の同定と

LHB 遺伝子プロモーターによる変異 DAX-1 の機能解析

DAX-1(Dosage-sensitive sex reversal-AHC critical region on the X, gene 1)は核ホルモンレセプター・スーパーファミリーに属するオーファン・レセプターで、DAX-1 遺伝子異常はヒト男性においてX連鎖性先天性副腎低形成症(AHC)と低ゴナドトロピン性性腺機能低下症(HHG)を来たすことが知られている。DAX-1は、副腎皮質、性腺、視床下部、下垂体前葉に発現が認められており、視床下部—下垂体—副腎系および視床下部—下垂体—性腺系の正常な発達や機能維持に関与していると考えられる。このことからHHGの原因として視床下部と下垂体の両レベルでのDAX-1の機能障害が関与しているものと推定されているが、その詳細なメカニズムに関してはいまだ明らかにされていない。今回新たに同定した2つの変異を含め、HHGを発症したAHC 5症例の病因DAX-1 遺伝子異常について、下垂体ゴナドトロピン産生細胞、視床下部神経細胞における個々の変異DAX-1の機能をLHB 遺伝子プロモーター、GnRHレセプター遺伝子プロモーター、GnRH 遺伝子プロモーターを用いて*in vitro*で解析し、遺伝子型、臨床型との相関を含めて検討した。

対象は思春期年齢に達しHHGが明らかとなったAHC 症例5例で、全例新生児期から小児期にかけて塩類喪失を伴う副腎機能不全を発症している。この内4症例は自然な二次性徴を認めず、内分泌学的検査でLH、FSHの分泌低下を伴う典型的なHHGを認めたが、残る1例は一過性かつ不完全ではあったが自然な思春期の発来を認め、HHGは不全型と考えられた。自然な二次性徴を認めなかった4例の内1例はhCG/HMG療法によって二次性徴の獲得に成功したが、精子形成は得られなかった。精巣生検ではライディヒ細胞の過形成とセルトリ細胞の低形成を認めた。これら症例のうち3症例はこれまでに病因と考えられるDAX-1 遺伝子変異(Y271X, Q395X)とDAX-1 遺伝子の欠失を確認済みである。残る2例について個々の症例の末梢血白血球から分離したgenomic DNAを用いてPCR直接シーケンス法により、新たなDAX-1 遺伝子変異(V269D, L278R)を同定した。これら

変異 DAX-1 のラット *LHβ*, ヒト *GnRH* レセプター, ヒト *GnRH* 遺伝子プロモーターに対する機能を, 下垂体ゴナドトロピン産生細胞 α T3-1, 視床下部神経細胞 GT1-7 を用いてルシフェラーゼ・レポーター・アッセイで解析した. 下垂体ゴナドトロピン産生細胞において DAX-1 は, 転写因子である SF-1 と Egr-1 による *LHβ* 遺伝子プロモーターの活性化を抑制するが, 各種変異 DAX-1 ではこの抑制効果が著明に減弱していた. 減弱の程度と遺伝子型, 臨床型との間には明らかな相関を認めなかった. 一方同じく下垂体ゴナドトロピン産生細胞において *GnRH* レセプター遺伝子プロモーターもまた *in vitro* で SF-1 と cAMP による転写調節を受けるが, これに対して DAX-1 は *LHβ* 遺伝子プロモーターにおいて見られたような抑制効果を示さず, 変異による影響も認めなかった. また視床下部神経細胞に発現する *GnRH* 遺伝子のプロモーター活性は *in vitro* で SF-1 により抑制を受けるが, これに対しても DAX-1 は明らかな影響を示さなかった.

一部症例で自然な二次性徴の発来を認めるなど DAX-1 異常症における HHG には臨床的な多様性が認められた. また hCG/HMG 療法によって二次性徴の獲得に成功した症例においてもセルトリ細胞は低形成であり精子形成が得られなかったことから, DAX-1 がセルトリ細胞の機能維持や精子形成に直接関与している可能性が示唆された. 今回同定した二つの新しいミスセンス変異は DAX-1 の機能に重要と考えられている C 末端側に位置し, また変異の起こっているアミノ酸はいずれも核内受容体の E1 領域において種を越えて高度に保存されていることから, 各症例の病因となる変異と考えられた. 不全型の HHG を呈した軽症例が比較的近位のナンセンス変異 (Y271X) を有していたのに対し, 完全型の HHG を示した症例でそれより遠位のナンセンス変異 Q395X やミスセンス変異 L278R を有するなど, 多様な臨床型と遺伝子型との間には明らかな相関を認めなかった. また *LHβ* 遺伝子プロモーターを用いた *in vitro* での変異 DAX-1 の機能解析においても軽症例である Y271X 変異は他の変異との間で転写抑制能に明らかな差を認めず, 臨床型を反映した部分的な機能喪失を示さなかった. これらの結果より DAX-1 遺伝子異常症において遺伝子型や *in vitro* での残存転写抑制能では必ずしも臨床像の多様性を説明できず, 多様な臨床像の形成には何らかの後天的要因や他の転写因子の作用など未知の機構による修飾が複雑に関与している可能性が示唆された. DAX-1 は SF-1 による標的遺伝子の転写調節に対して抑制的に作用することが知られているが, 視床下部—下垂体—性腺系に発現し *in vitro* で SF-1 による転写調節を受ける遺伝子の中で, *LHβ* 遺伝子の転写調節に対しては DAX-1 は抑制効果を示したが, *GnRH* レセプター遺伝子, *GnRH* 遺伝子の転写調節に対しては有意な効果を及ぼさなかった. DAX-1 遺伝子異常による HHG は視床下部, 下垂体の両方が障害されて発症すると推測されているが, DAX-1 の異常がそれぞれの部位の障害にどのように関与しているかについては更なる研究が必要と考えられた.

公開発表に際し, 副査の佐々木教授から, 本症の治療について, 遺伝子変異と phenotype の相関のない理由, 抑制現象の見られなかった実験系の意義について, 副査の櫻木教授から, 本症における精子形成状態について, キャリアー女性の臨床症状や卵巣機能について, 変異 DAX-1 の homozygosity 女性の病態について, 主査の小林教授から, 機能解析法の有用性, 意義と結果の解釈についての質問があったが, 申請者は自らの実験と文献を用い概ね妥当な回答を行った.

本研究は, DAX-1 遺伝子の新しい変異を見出すと共に, 変異遺伝子の機能と臨床像の相関を詳細に検討し, 今後のこの方面の研究の方向性を明らかにした.

審査員一同は, これらの成果を高く評価し, 申請者が博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した.