

200941009A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：
個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学 研究

平成21年度 総括・分担報告書

研究代表者 緒方 勤

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：
個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学調査

平成21年度 総括・分担報告書

研究代表者 緒方 勤

平成22（2010）年 3月

目 次

I 総括研究報告書

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学調査	1
---	---

研究代表者 国立成育医療センター研究所 緒方勤

II 分担研究報告書

1 性ホルモン効果関連遺伝子群のハプロタイプ相関解析とメチル化パターン解析	9
東京大学 大迫誠一郎	
2 成育コホート研究における外陰部異常者の胎児期環境評価に関する研究	12
国立成育医療センター 大矢 幸弘	
3 内・外性器の手術検体採取と患者臨床像解析	14
名古屋市立大学 小島祥敬	
4 ダイオキシン関連遺伝子群の網羅的相関解析とバイオインフォマティクスによる影響化学物質の推定解析に関する研究	20
国立環境研究所 曾根秀子	
5 ヒトハプロタイプブロックを対象とするイントロンノックインマウスの作製と解析	24
国立医薬品食品衛生研究所 安彦行人	
6 各種化学物質の測定と曝露レベルの推定に関する研究	26
東京大学 吉永 淳	
7 エストロゲン受容体遺伝子における化学物質感受性ハプロタイプの構造および機能解析	29
国立成育医療センター研究所 緒方 勤	

III 研究成果の刊行一覧表	33
----------------	----

IV 研究成果の刊行物・別刷り	39
-----------------	----

總 括 研 究 報 告

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質：
個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学研究

研究代表者：緒方 勤 国立成育医療センター研究所 部長

研究要旨

本研究の目的は、男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質の関連性を個体感受性と暴露量の両者の観点から解明することである。その必要性は、その因果関係の解明が環境リスク評価上の重要課題となっていることにある。特に、小児など脆弱な集団を保護する必要性が国際化学物質管理会議で再確認され、個体感受性を勘案した評価スキームの構築が急務となっている。

当該年度（2008-2009年）においては、下記の成果が得られた。(1) エストロゲン受容体 α 遺伝子（ESR1）における外陰部異常症感受性ハプロタイプの解析：この感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す2,244 bpの微小欠失の同定（この微小欠失こそが、感受性亢進を招く本質であることを示唆する）、同一ハプロタイプとイタリヤ人男児における外陰部異常症発症の関連性の同定（人種を超えた普遍性を意味する）、外陰部皮膚繊維芽細胞を用いた発現解析の開始、この欠失部位周辺の約7 kbをノックインしたキメラマウスの作製を行った。(2) ESR1における外陰部異常症感受性ハプロタイプの世代間解析：健常者におけるリスクハプロタイプ保有頻度が有意に成人年代に多いことから、環境化学物質の暴露量増加が疾患発症に関与することが示唆される。(3) エストロゲン受容体 β 遺伝子（ESR2）における精子形成障害感受性ハプロタイプの同定：ESR2に約60 kbのハプロタイプブロックが存在し、その中の特定ハプロタイプが感受性因子として作用することを世界で初めて見いだした。(4) 化学物質応答遺伝子群の網羅的解析：96個のSNP解析から、感受性SNPがダイオキシシンシグナル伝達関連遺伝子のAhRで2個とArnt2で1個、bisphenol A受容体遺伝子とされるNR1I2で3個、男性ホルモン産生酵素遺伝子であるCYP11A1で4個とCYP17A1で3個検出された。(5) 標的組織におけるメチル化解析：尿道下裂患者25例の外陰部皮膚組織を用いて種々の遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析を行い、5 α 還元酵素2型において高メチル化の存在を見だし、同時に、マウス胎仔のダイオキシシン暴露実験を行い、精巣サンプルのメチル化解析を開始した。(6) 化学物質濃度測定：妊婦の尿を用いてフタル酸エステル類や芳香族炭化水素類など環境化学物質測定を開始した。(7) 成育コホート集団の検討：妊娠中の食事内容の分析による胎児期暴露量の推定と、5歳児を対象とする採血を開始し、環境化学物質測定のための血清保存を開始した。

これらのデータは、男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質の関連性を、個体感受性と暴露量の観点から解明する上で重要な情報を与えるものである。

A. 研究目的

本研究の目的は、男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質の関連性を個体感受性と暴露量の両者の観点から解明することである。上記の関連性は、動物実験データから示唆されるものの、ヒトにおける疫学データに乏しく、その因果関係の解明は環境リスク評価上の重要課題となっている。特に、小児など脆弱な集団を保護する必要性が国際化学物質管理会議で再確認され、個体感受性を勘案した評価スキームの構築が急務となっている。本研究では、この課題の克服を目指す。

B. 研究方法

1. エストロゲン受容体 α 遺伝子（ESR1）における外陰部異常症感受性ハプロタイプの解析：

多くの環境化学物質は、エストロゲン受容体を介してエストロゲン様効果を発揮することで男性化障害を生じる。われわれは、同遺伝子に約35 kbのハプロタイプブロックが存在し、特定ハプロタイプのホモ接合体が顕著な外陰部異常発症感受性（オッズ比：尿道下裂13.75、停留精巣9.0）を有することを世界で初めて見いだした。これは、エストロゲン受容

体を介する化学物質の効果が男性性機能低下を招くことを示す内容で、2008年度初めの読売新聞朝刊や日経産業新聞で大きく扱われている。

本研究期間では、ハプロタイプブロック全体の塩基配列解析による感受性ハプロタイプ特有のゲノム変化の同定、感受性および非感受性ハプロタイプホモ接合体の手術検体を用いた化学物質負荷後のESR1発現量比較、ハプロタイプブロックノックインマウスの作製と化学物質負荷後のEsr1発現量変化と表現型の検討を行う。

2. ESR1における外陰部異常症感受性ハプロタイプの世代間解析：

同じリスク因子を有する個体における疾患発症は暴露量に依存すると考えられる。そして、化学物質生産量が漸増していることから、現在の小児は成人世代よりも大きなリスクを有すると推測される。この可能性を異なる世代の健康男児・男性における欠失頻度の比較により検討する。なお、背景として、この欠失が感受性因子であり、それを保有しても必ずしも疾患を発症するわけではなく、健康である個体は多く存在すること、また、成人世代においては

疾患を有する個体の同定は極めて困難であるが、健常者の解析は容易であることが挙げられる。

3. エストロゲン受容体β遺伝子 (ESR2)における精子形成障害感受性ハプロタイプの同定：

生殖細胞では、ESR1ではなくESR2が発現していることから、ESR2の特定多型・ハプロタイプが精子形成障害の感受性因子であるか否かを遺伝的関連解析により検討する。

4. 化学物質応答遺伝子群の網羅的解析：

男児外陰部異常症において、男性ホルモン産生経路とダイオキシシンシグナル伝達関連を含む網羅的関連解析を、国際HapMap計画の成果を応用し、タグSNPを用いた相関解析を用いて実施する。その後、手術検体を用いた発現量解析や機能解析を行う。

5. 標的組織におけるメチル化解析：

環境化学物質は、標的組織におけるメチル化異常とそれに起因する男性ホルモン効果の低下を介して疾患表現型を招く可能性がある。このため、尿道下裂患者の検体を用いて外陰部で発現している遺伝子のメチル化状態を検討する。また、精巣の細胞はヒトでは入手できないため、マウスにおける暴露実験を行い、われわれが発見した尿道下裂責任遺伝子MAMLD1などのメチル化解析を行う。

6. 化学物質濃度測定：

患者・母親血液、臍帯血、臍帯、胎盤におけるダイオキシシン類、PCB、有機塩素系農薬、ビスフェノールA、フタル酸エステル類を質量分析ガスクロマトグラフおよび質量分析液体クロマトグラフで分析し、これら化学物質の暴露量を推定する。

7. 成育コホート集団の検討：

成育医療センターで実施中の成育コホート集団（現在約1,700名）における胎児期暴露量を、詳細に聴取した食事内容や生活様式に基づいて推定する。また、5歳時に予定されている採血時にも環境化学物質測定を行う。

倫理面への配慮

ヒト検体を使用する際には、文部科学・厚生労働・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して研究を実施する。ヒト検体を採取する際には、試料等提供者のプライバシーの保護、検体提供の任意性、研究参加者の利益および不利益、提供を受けた検体の取り扱い方、得られる研究成果の医学的貢献度等について、試料等提供者ないしはその保護者に充分説明したうえで、文書により同意を得る。また、試料等の提供を求める際に、説明文書を用いて分かりやすく、かつ十分に説明し、必要に応じて遺伝カウンセリングを行う。なお、本研究に関連する内容は、全て倫理委員会の承認済あるいは申請中である。

動物実験については、すべて「国立医薬品食品衛

生研究所・動物実験の適正な実施に関する規定（平成19年4月1日改正）」に基づいて審査が行われ、許可が与えられた上で実施されている。

倫理委員会承認済課題

国立成育医療センター：「性分化・成熟異常症および生殖機能障害における疾患感受性遺伝子多型および薬剤応答性遺伝子多型の探索」、「性分化異常症における原因遺伝子の検索」、「生殖機能障害の遺伝子解析」、「胎児期における化学物質被曝と軽度発達障害との関連性の解明に向けての検討」、「子宮内胎児発育異常の遺伝子・ゲノム解析」

独立行政法人国立環境研究所：「性分化・成熟異常症および生殖機能障害における疾患感受性遺伝子多型および薬剤応答性遺伝子多型の探索」のサブ課題「性分化・成熟異常症および生殖機能障害における薬剤応答性遺伝子多型の解析」

名古屋市立大学：「泌尿器科疾患ゲノム解析プロジェクト」（承認済み）、「性分化異常症・外生殖器異常疾患に関わる遺伝子発現・多型・変異に関する研究」

C. 研究結果

1. エストロゲン受容体α遺伝子 (ESR1) における外陰部異常症感受性ハプロタイプの解析：

以下の大きな進展が得られた。(1) この感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す2,244 bpの微小欠失を同定した。絶対連鎖不平衡という現象は、極めて稀にしか認められないものであり、これは、この微小欠失こそが、感受性亢進を招く本質であることを示唆する強力なデータである。(2) イタリア人男児を対象とする解析により、同じ欠失が人種を超えて外陰部異常症発症のリスク因子であることを見いだした (P=0.0066、オッズ比4.48)。これは、この欠失の重要性を決定づけるデータである。(3) ESR1が通常解析しえる末梢血においてほとんど発現していないため、この欠失をホモで保有する患者と非保有者患者において、尿道下裂術時に外陰部皮膚繊維芽細胞を樹立し、発現解析に着手した。そして、基礎発現量が外陰部皮膚においても乏しいことから、エストロゲン負荷による発現誘導を行うことで、この欠失がESR1発現に与える影響を、スプライスバリエントやmRNAの安定性の観点から解析を行っている。(4) マウスEsr1遺伝子の当該部位に、この欠失部位周辺の約7 kbをノックインしたES細胞を樹立し、キメラマウスを作製した。このようなノックインマウス作製の成功例は世界的にも初めてである。これにより、この微小欠失の効果をin vivoで解析できるシステムが整備された。最終年度、エストロゲン暴露実験を行う予定である。

2. ESR1における外陰部異常症感受性ハプロタイプの世代間解析：

健常成人男性432例と健常小児72例の解析から、健常者におけるリスクハプロタイプ保有頻度が有意に成人年代に多いことが確認された (P=0.034、オッズ比1.53)。これは、環境化学物質の暴露量増加が疾

患発症に関与することを示唆する。

3. エストロゲン受容体β遺伝子 (ESR2)における精子形成障害感受性ハプロタイプの同定：

精子形成障害患者 125 例と妊孕性正常男性 119 例の解析から、ESR2 に約 60 kb のハプロタイプブロックが存在し、その中の特定ハプロタイプが感受性因子として作用することを世界で初めて見いだした ($P=0.0028$, オッズ比 1.77, 95%信頼区間 1.21-2.61)。これは、精子形成障害における遺伝的感受性の存在を明確とするものである。

4. 化学物質応答遺伝子群の網羅的解析：

日本人とイタリア人の男児外陰部異常症患者と対照者において、アンドロゲン効果関連遺伝子群 (AR, SRD5A2, CYP15A1, CYP17A1, 3βHSD-I, 17βHSD など) およびダイオキシン効果関連遺伝子群 (AHR, AHRR, ARNT, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP17A1, CYP19A1, CYP2B6, CYP3A4 など) を含む 96 個の SNP 解析を行い、両人種に共通する感受性 SNP がダイオキシンシグナル伝達関連遺伝子の AhR で 2 個と Arnt2 で 1 個、bisphenolA 受容体遺伝子とされる NR1I2 で 3 個検出された。さらに、日本人特有の感受性 SNP が男性ホルモン産生酵素である CYP11A1 で 4 個と CYP17A1 で 3 個検出された。このデータは、多様な感受性因子の存在を示唆するデータである。

5. 標的組織におけるメチル化解析：

尿道下裂患者 25 例の外陰部皮膚組織を用いて種々の遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析を行い、5α還元酵素 2 型において高メチル化の存在を見いだした。これは、発現低下を介する尿道下裂発症機序の存在を示唆する。第二に、われわれが同定し尿道下裂発症責任遺伝子 MAMLD1 のプロモーターにダイオキシン反応部位と CpG アイランドが存在することから、マウス胎仔のダイオキシン暴露実験を行い、精巣サンプルのメチル化解析を開始した。

6. 化学物質濃度測定：

妊婦の尿を用いた環境化学物質測定を開始した。これにより、胎児期早期の器官形成期を含む種々の段階における環境化学物質暴露の評価が可能となると考えられる。今後、フタル酸エステル類や芳香族炭化水素類などのデータと男性生殖器形成異常の早期指標としての肛門性器間距離の関連を検討する。

7. 成育コホート集団の検討：

胎児期暴露量の推定を実施している。また、5 歳児を対象とする採血を開始し、環境化学物質測定のための血清保存を開始した。

D. 考察

上記のデータは、男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質の関連性を、個体感受性と暴露量の観点から解明する上で重要な情報を与えるものである。

第一に、患者解析により、従来の毒性解析や動物実験では検討しえなかった感受性因子の存在が明らかとなってきている。例えば、エストロゲン受容体α遺伝子 (ESR1) における外陰部異常症感受性ハプロタイプの解析では、世界で初めて遺伝的感受性の本態が明らかになりつつある。同様に、エストロゲン受容体β遺伝子 (ESR2) における精子形成障害感受性の存在が世界で初めて明確となってきている。さらに、多数の感受性多型の解析は、遺伝子間相互作用の同定につながるものである。さらに、上記の成果は、環境化学物質の影響のみならず、骨粗しょう症、乳がん、初老期うつ病など、多くのエストロゲン依存性疾患発症の解明などにつながることを期待される。第二に、ESR1 感受性因子の頻度を異なる世代間で比較したデータは、感受因子と暴露量が相互作用することを明確としつつある。第三に、従来少数の動物実験でのみ報告されていた環境化学物質とメチル化異常の関係が明らかとなりつつある。これは、遺伝的感受性と異なり、全ての個体に生じうると考えられ、より普遍性を持つ内容となる可能性がある。第四に、成育コホート研究との連動を含めて、環境化学物質暴露量の測定と検体保管体制が整備されつつある。これは、今後の長期におよぶ同様の研究を支える基盤となると期待される。以上、本研究は、当初の目標を十分に達成していると考えられる。

E. 結論

男児外陰部異常症および生殖機能障害と化学物質の関連性を、個体感受性と暴露量の観点から解明する上で重要な進展が見られた。

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

緒方勤：研究代表者

1. Muroya K, Mochizuki T, Fukami M, Iso M, Fujita K, Ogata T. Diabetes mellitus in a Japanese girl with HDR syndrome and *GATA3* mutation. *Endocrine Journal* (in press).
2. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T. Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary phenotype. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (in press).
3. Fukami M, Maruyama T, Yoshimura Y, Ogata T. Isolated hypogonadotropic hypogonadism in a female with tachykinin receptor 3 gene mutations. *Hormone Research* (in press).
4. Dateki S, Hizukuri K, Tanaka T, Katsumata N, Katavetin P, Ogata T. An immunologically anomalous but considerably bioactive growth hormone produced by a novel *GHI* mutation (p.D116E). *European Journal of Endocrinology* 161 (2): 301–306, 2009.

5. Wada Y, Nishimura G, Nagai T, Sawai H, Yishikata M, Miyagawa S, Hanita T, Sato S, Hasegawa T, Ishikawa S, Ogata T. Mutation analysis of *SOX9* and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with campomelic dysplasia or acampomelic campomelic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics A* (accepted).
6. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saitoh S. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *Journal of Pediatrics* 155 (6): 900–903, 2009.
7. ○Ogata T, Laporte J, Fukami M. *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene involved in hypospadias. *Hormone Research* 71 (5): 245–252, 2009.
8. Sim SC, Miller WL, Zhong X-B, Arlt W, Ogata T, Ding X, Wolf R, Fluck CE, Pandey AV, Henderson CJ, Porter TD, Daly AK, Nebert DW, Ingelman-Sundberg M. Nomenclature for alleles of the cytochrome P450 oxidoreductase gene. *Pharmacogenetics and Genomics* 19 (7): 565–566, 2009.
9. Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T, Hanaki K, Uematsu A, Ishii T, Numakura C, Sawada H, Nakacho M, Kowase T, Motomura K, Haruna H, Nakamura M, Ohishi A, Adachi M, Tajima T, Hasegawa Y, Hasegawa T, Horikawa R, Fujieda K, Ogata T. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94; (5): 1723–1731, 2009.
10. Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, Ogata T, Hata K, Sotomaru Y, Kono T. Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics* 93; (5): 461–472, 2009.
11. Hayakawa K, Katsumata N, Abe K, Hirano M, Yoshikawa K, Ogata T, Horikawa R, Nagamine T. Wide range of biotin (vitamin H) content in the foodstuffs and powdered milks as assessed by the high-performance affinity chromatography. *Clinical Pediatric Endocrinology* 18 (1): 41–49, 2009.
12. Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, Crowley WF Jr, Hoefsloot LH. *CHD7* mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome - the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 75 (1): 65–71, 2009.
13. Sugawa F, Wada Y, Maruyama T, Uchida H, Ishizuka B, Ogata T. Premature ovarian failure and androgen receptor gene CAG repeat lengths weighted by X chromosome inactivation patterns. *Fertility and Sterility* 91 (2): 649–652, 2009.
14. ○緒方勤. 小児疾患と環境化学物質：遺伝—環境相互作用の観点から. 科学. 岩波書店 79 (9): 982–983, 2009.
15. ○緒方勤. 小児疾患と環境化学物質. 化学物質と環境. エコケミストリー研究会会報 No. 96. 1–5, 2009.
16. Yoshida R, Ogata T. A novel A461S mutation of *PTPN11* in a female with LEOPARD syndrome. *Clinical Pediatric Endocrinology* 17 (4): 121–122, 2008.
17. Yamazawa K, Kagami M, Fukami M, Matsubara K, Ogata T. Monozygotic female twins discordant for Silver-Russell syndrome and hypomethylation of the *H19*-DMR. *Journal of Human Genetics* 53 (10): 950–955, 2008.
18. Kagami M, Yamazawa K, Matsubara K, Matsuo N, Ogata T. Placentomegaly in paternal uniparental disomy for human chromosome 14. *Placenta* 29 (8): 760–761, 2008.
19. Dateki S, Fukami M, Sato N, Muroya K, Adachi M, Ogata T. *OTX2* Mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial growth hormone (GH) deficiency: functional studies using the *IRBP*, *HESX1*, and *POU1F1* promoters. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 93 (10): 3697–702, 2008.
20. Yamazawa K, Kagami M, Nagai T, Kondoh T, Onigata K, Maeyama K, Hasegawa T, Hasegawa Y, Yamazaki T, Mizuno S, Miyoshi Y, Miyagawa S, Horikawa R, Matsuoka K, Ogata T. Molecular and clinical findings and their correlations in Silver-Russell syndrome: implications for a positive role of *IGF2* in growth determination and differential imprinting regulation of the *IGF2-H19* domain in bodies and placentas. *Journal of Molecular Medicine* 86 (10): 1171–1181, 2008.
21. Iso M, Fumami M, Horikawa R, Azuma N, Kawashiro N, Ogata T. *SOX10* Mutation in Waardenburg Syndrome Type II. *American Journal of Medical Genetics* 146A (16): 2162–2163, 2008.
22. Hosoki K, Ogata T, Kagami M, Tanaka T, Saitoh S. Epimutation (hypomethylation) affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region in a girl with upd(14)mat-like phenotype. *European Journal of Human Genetics* 16 (8): 1019–1023, 2008.
23. Fukami M, Dateki S, Kato F, Hasegawa Y, Mochizuki H, Horikawa R, Ogata T. Identification and characterization of cryptic *SHOX* intragenic deletions in three Japanese patients with Leri-Weill dyschondrosteosis. *Journal of Human Genetics* 53 (5): 454–459, 2008.
24. Yoshida R, Ogata T, Masawa N, Nagai T. Hepatoblastoma in a Noonan syndrome patient with a *PTPN11* mutation. *Pediatric Blood & Cancer* 50 (6): 1274–1276, 2008.
25. ○Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F, Katsumata N, Baba T, Morohashi K, Laporte J, Kitagawa M, Ogata T. Mastermind-like domain-containing 1 (*MAMLD1* or *CXorf6*) transactivates the *Hes3* promoter, augments testosterone production, and contains the *SFI* target sequence. *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5525–5532, 2008.
26. Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Kohda

- T, Ogura A, Ogata T, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F. Role of retrotransposon-derived imprinted gene, *Rtl1*, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nature Genetics* 40 (2): 243–248, 2008.
27. Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Tanaka Y, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaki K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nature Genetics* 40 (2): 237–242, 2008.
28. Yamazawa K, Kagami M, Ogawa M, Horikawa R, Ogata T. Placental hypoplasia in maternal uniparental disomy for chromosome 7. *American Journal of Medical Genetics A* 146 (4): 514–516, 2008.
29. Suzuki K, Haraguchi R, Ogata T, Barbieri O, Alegria O, Vieux-Rochas M, Nakagata N, Ito M, Mills AA, Kurita T, Levi G, Yamada G. Abnormal urethra formation in mouse models of split-hand/split-foot malformation type 1 and type 4. *European Journal of Human Genetics* 16 (1): 36–44, 2008.
30. Wada Y, Fukami M, Ogata T. *MAMLD1*: a new gene for hypospadias. *Journal of Japan Society of Reproductive Endocrinology* 13: 37–42, 2008.
31. Ogata T, Kagami M. Molecular mechanisms leading to the phenotypic development in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Clinical Pediatric Endocrinology* 17 (4): 103–111, 2008.
32. Ogata T, Fukami M, Wada Y. *MAMLD1 (CXorf6)* is a new gene for hypospadias. *Clinical Pediatric Endocrinology* 17 (4): 87–93, 2008.
33. Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC. Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics* 3 (4): 181–187, 2008.
34. Ogata T, Wada Y, Fukami M. *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene for hypospadias. *Sexual Development* 2 (4-5): 244–250, 2008.
35. Ogata T. Progress in analysing disorders of sexual development: Preface. *Sexual Development* 2 (4-5): 171, 2008.
36. da Rocha ST, Edwards CA, Ito M, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting at the mammalian *Dlk1-Dio3* domain. *Trends in Genetics* 24 (6): 306–16, 2008.
37. 緒方勤. 男児外陰部異常症および精子形成障害と内分泌攪乱化学物質感受性：エストロゲン受容体 α 遺伝子のハプロタイプ解析. *医学のあゆみ* 25 (9): 954–959, 2008.
38. 緒方勤. エストロゲン様内分泌攪乱化学物質と男性性機能低下：疫学データと個体感受性解析. *日本小児泌尿器科学会雑誌* 16 (2): 8–13, 2008.
- hydrocarbon receptor gene to perinatal stage development and dioxin-induced toxicity between the urogenital complex and testis in the mouse. *Biol Reprod*, in press.
2. Alam MS., Ohsako S., Matsuwaki T., Zhu XB., Tsunekawa N., Kanai Y., Sone H., Tohyama C., and Kurohmaru M. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction*, in press.
3. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S, and Yonemoto J. pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxicol Sci*, in press.
4. Ishihara K, Ohsako S, Tasaka K, Harayama H, Miyake M, Warita K, Tanida T, Mitsuhashi T, Nanmori T, Tabuchi Y, Yokoyama T, Kitagawa H, and Hoshi N. When does the sex ratio of offspring of the paternal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure decrease: In the spermatozoa stage or at fertilization? *Reprod Toxicol*, in press.
5. 大迫誠一郎. プログラムされる“病”の新たな仮説—環境化学物質による代謝系遺伝子の次世代エピゲノム変化. *科学*, 79, 984-988, 2009.
6. Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, and Tohyama C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochemical Pharmacol*, 77, 660-669, 2009.
7. Kawakami T, Ito T, Ohsako S, Shiizakia K, Murakami Y, Hirowatarid K, Sato M, and Tohyama C. Possible Involvement of arylhydrocarbon receptor variants in TCDD-induced thymic atrophy and XRE-dependent transcriptional activity in Wistar Hannover GALAS rats. *J Toxicol Sci*, 34, 209-220, 2009.
8. Wu Q., Suzuki J.S., Zaha H., Lin T-M., Peterson R.E., Tohyama C., and Ohsako S. Differences in gene expression and benzo[a]pyrene-induced DNA adduct formation in the liver of three strains of female mice with identical AhRb2 genotype treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and/or benzo[a]pyrene. *J Applied Toxicol*, 28, 724-733, 2009.
9. Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, and Yagi T. Omeprazole alleviates benzo[a]pyrene cytotoxicity by inhibition of CYP1A1 activity in human and mouse hepatoma cells. *Basic Clinical Pharmacol Toxicol*, 103, 468-475, 2008.

曾根秀子：研究分担者

1. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, et al. pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Tox Sci*, 2009, in press.
2. Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C and Kurohmaru M. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate Authors. *Reproduction*, in press.
3. Sone H., Miyabara Y., Fukuda T., Okura M., Ohsako S., and Yonemoto J. Dose maternal exposure to 2,3,7,8-

大迫誠一郎：研究分担者

1. Ohsako S., Fukuzawa N., Ishimura R., Kawakami T., Wu Q., Nagano R., Zaha H., Sone H., Yonemoto J., and Tohyama C. Comparative contribution of the aryl

tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induce glutathione S-transferase-positive hepatic foci in adult rats? In "Persistent organic pollutants (POPS) research in Asia edited by Morita M (2008).

4. ○Kakeyama M, Sone H, and Tohyama C. Perinatal exposure of female rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces central precocious puberty in the offspring. *J Endocrinol.* 197, 351-358, 2008.

安彦行人：研究分担者

1. ○Yukuto Yasuhiko, Satoshi Kitajima, Yu Takahashi, Masayuki Oginuma, Harumi Kagiwada, Jun Kanno, and Yumiko Saga Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of *Mesp2*. *Development.* 135(21): 3511-3519, 2008.

吉永淳：研究分担者

1. ○M. Niwa, Y. Suzuki, J. Yoshinaga, C. Watanabe, Y. Mizumoto: Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbon and birth outcomes. *Int J Environ Health Res* (in press).
2. M. Matsumoto, J. Yoshinaga: Isotope ratios of lead in Japanese women's hair of the twentieth century. *Environ Sci Pollut Res* (in press).
3. 高木麻衣、吉永淳：日本人小児のハウスダストを介した化学物質曝露のリスク評価。室内環境 (in press).
4. I. Mori, M. Ukachi, K. Nagano, H. Ito, J. Yoshinaga, M. Nishikawa: Characterization of NIES CRM No. 23 Tea Leaves II for the determination of multielements. *Anal Bioanal Chem* (in press)
5. ○Y. Suzuki, M. Niwa, J. Yoshinaga, C. Watanabe, Y. Mizumoto, S. Serizawa, H. Shiraishi: Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis. *Environ. Health Prevent. Med.* (14): 180-187, 2009.
6. 峽戸孝也、高木麻衣、吉永淳、田中敦、瀬山春彦、柴田康行：ハウスダスト中元素濃度の変動要因。環境化学 (19): 87-94, 2009.
7. ○森拓哉、吉永淳、河原純子、溝井美穂、安達修一：日本人小児の多環芳香族炭化水素類曝露評価。日本衛生学雑誌 (64): 817-823, 2009.
8. Y. Kato, N. Shinohara, J. Yoshinaga, M. Uchida, A. Matsuda, M. Yoneda, Y. Shibata: Determination of $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ of acetaldehyde in indoor air by compound specific radiocarbon analysis. *Atmos. Environ.* (42): 1049-1056, 2008.
9. 田宮さやか、吉永淳：ポリアミノカルボン酸型キレート樹脂固定相抽出剤を前処理に用いた誘導結合プラズマ質量分析法による生体試料中の鉛同位体比分析。分析化学 (57): 99-104, 2008.
10. Y. Nakamura, T. Narukawa, J. Yoshinaga: Cancer risk to Japanese from the consumption of inorganic arsenic in cooked Hijiki. *J. Agric. Food Chem.* (56): 2536-2540, 2008.
11. 中村有希、高木麻衣、吉永淳、田中敦、瀬山春彦、柴田康行：日本の室内塵の元素組成と鉛の起源。室内環境 (11):11-20, 2008.

12. Y. Ishibashi, J. Yoshinaga, A. Tanaka, H. Seyama, Y. Shibata: Lead and cadmium in indoor dust in Japanese houses --- Relationship with outdoor sources. *室内環境* (11): 93-101, 2008.

13. 高木麻衣、田宮さやか、吉永淳、宇田川弘勝、田中敦、瀬山春彦、柴田康行、上松あゆみ、加治正行：同位体分析に基づく日本人小児の鉛曝露源解析。環境化学(18): 521-531, 2008.

14. ○K. Suzuki, J. Yoshinaga: Inhalation and dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary 1-hydroxypyrene in non-smoking university students. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* (81): 115-121, 2008.

大矢幸弘：研究分担者

1. Kondo Y, Nakajima Y, Komatsubara R, Kato M, Hirata N, Matuyama H, Kakami M, Tsuge I, Ohya Y, Urisu A. Short term efficacy of tacrolimus ointment and impact on quality of life. *Pediatric International* (51): 385-389, 2009.
2. ○Jonathan M Batchelor, Yukihiro Ohya. Use of DISCERN Instrument by patients and health professionals to assess information resources on treatment for asthma and atopic dermatitis. *Allergology International* (58):141-145, 2009.
3. Miyake Y, Tanaka K, Sasaki S, Kiyohara C, Ohya Y, Fukushima W, Yokoyama T, Hirota Y. Breast feeding and atopic eczema in Japanese infants: Osaka Maternal and Child Health Study. *Pediatr Allergy Immunolo* (20): 234-241, 2009.
4. Murakami K, Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Ohya Y, Hirota Y. Education, but not occupation or household income, is positively related to favorable dietary intake patterns in pregnant Japanese women: the Osaka Maternal and Child Health Study. *Nutrition Research*, 29: 164-172, 2009.
5. Murakami K, Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Ohya Y, Hirota Y. Monetary diet cost is associated with not only favorable but also unfavorable aspects of diet in pregnant Japanese women: the Osaka Maternal and Child Health Study. *Environmental Health Insight* 2009 in press.
6. Kojima N, Ohya Y, Futamura M, Akashi M, Odajima H, Adachi U, Kobayashi F, Akasawa A. Exercise-induced asthma is associated with impaired quality of life among children with asthma in Japan. *Allergology International* (58):187-192, 2009.
7. Kubota Y, Yoneda K, Nakai K, Katsuura J, Moriue T, Matsuoka Y, Miyamoto I, Ohya Y. Effect of sequential application of topical tacrolimus and topical corticosteroids in the treatment of pediatric atopic dermatitis: An open-label pilot study. *J Am Acad Dermatol* (60):212-217, 2009.
8. ○Kondo-Endo K, Ohashi Y, Nakagawa H, Katsunuma T, Ohya Y, Kamibeppu K, Masuko I. Development and validation of a questionnaire measuring quality of life in primary caregivers of children with atopic dermatitis (QPCAD). *Br J Dermatol.* 2009.
9. ○大矢幸弘 鼻アレルギーへのたばこの影響 *Topics in Atopy* (8), 36-40, 2009.
10. Miyake Y, Arakawa M, Tanaka K, Sasaki S,

- Ohya Y. Tuberculin reactivity and allergic disorders in schoolchildren, Okinawa, Japan. *Clin Exp Allergy*. (38): 486-92, 2008.
11. Murakami K, Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Yokoyama T, Ohya Y, Fukushima W, Kiyohara C, Hirota Y, OMCHS group. Dietary glycemic index and load and the risk of postpartum depression in Japan: the Osaka Maternal and Child Health Study. *J Affective Disorders* (110):174-179, 2008.
12. Matsunaga I, Miyake Y, Yoshida T, Miyamoto S, Ohya Y, Sasaki S, Tanaka K, Oda H, Ishiko O, Hirota Y; Osaka Maternal and Child Health Study Group. Ambient formaldehyde levels and allergic disorders among Japanese pregnant women: baseline data from the Osaka maternal and child health study. *Ann Epidemiol*. 18(1):78-84, 2008.
13. Miyake Y, Sasaki S, Arakawa M, Tanaka K, Murakami K, Ohya Y. Fatty acid intake and asthma symptoms in Japanese children: The Ryukyus Child Health Study. *Clin Exp Allergy*. (38):1644-1650, 2008.
14. Miyake Y, Tanaka K, Sasaki S, Kiyohara C, Ohya Y, Fukushima W, Yokoyama T, Hirota Y, and for the Osaka Maternal & Child Health Study Group. Breast feeding and the risk of wheeze and asthma in Japanese infants: The Osaka Maternal and Child Health Study. *Pediatr Allergy Immunol* (19):490-496, 2008.
15. Miyake Y, Sasaki S, Tanaka K, Ohya Y, Matsunaga I, Yoshida T, Hirota Y, Oda H. Relationship between dietary fat and fish intake and the prevalence of atopic eczema in pregnant Japanese females: baseline data from the Osaka Maternal and Child Health Study. *Asia Pac J Clin Nutr*, (17):612-619, 2008.
16. 大矢幸弘 子どもの心・体と環境を考える 第8回心ある小児医療の実践のために こどもケア 日総研 2008 4・5月号 121-124.
17. 大矢幸弘 MIKU ハウスダストがぜんそくやアトピーの原因に p39 ミク夏号 2008 Benesse
18. 赤澤晃, 小田嶋博, 足立雄一, 大矢幸弘, 明石真幸, 小嶋なみ子 【Year in Review 小児科編】小児気管支喘息の疫学 喘息, (21): 26-34, 2008.
- 小島祥敬：研究分担者
1. Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic orchietomy and subsequent internal ring closure for extra-abdominal testicular nubbin in children. *Urology*. 73:515-519, 2009.
2. Ohya S, Kimura K, Niwa S, Ohno A, Kojima Y, Sasaki S, Kohri K, Imaizumi Y. Malignancy grade-dependent expression of K(+)-channel subtypes in human prostate cancer. *J Pharmacol Sci.*; 109:148-51, 2009.
3. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic diagnosis and treatment of a phenotypic girl with a mosaic 45,XO/46,X,idi(Y) mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg*. 44:e1-3, 2009.
4. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K. Activation of NF-kappaB associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced cryptorchid rat model. *Urology*. 73:389-93, 2009.
5. Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K, Masui S, Nishinakamura R. Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of integrin alpha8 and aquaporin-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 45:62-68, 2009.
6. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Maruyama T, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. *J Urol*. 181:1330-1337, 2009.
7. Iwatsuki S, Kojima Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Detection of ectopic ureteral insertion to vagina with hypoplastic ectopic kidney by computed tomography with three-dimensional imaging. *Urology*. 73:505-506, 2009.
8. Okada S, Kojima Y, Hamamoto S, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K. Dietary soy isoflavone replacement improves detrusor overactivity of ovariectomized rats with alteration of connexin-43 expression in the urinary bladder. *BJU Int*. 103:1429-1435, 2009.
9. Kojima Y, Sasaki S, Mizuno K, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Laparoscopic dismembered pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction in children. *Int J Urol*. 16:472-476, 2009.
10. Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Long-term physical, hormonal and sexual outcome of males with disorders of sex development. *J Pediatr Surg*. 44:1491-1496, 2009.
11. Niimi K, Kojima Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Successful Treatment with hydrodistension in a boy with refractory overactive bladder with glomerulation. *J Pediatr*. 155:597-597.e1., 2009.
12. Kojima Y, Sasaki S, Oda N, Koshimizu T-A, Hayashi Y, Kuniwa M, Tsujimoto G, Kohri K. Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 69:1521-1528, 2009.
13. Kojima Y, Sasaki S, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K. Subtypes of alpha1-adrenoceptors in BPH: future prospects for personalized medicine. *Nature Clin Pract Urol*. 6: 44-53, 2009.
14. Kojima Y, Sasaki S, Shibata Y, Imura M, Hayase M, Okada S, Kubota Y, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K. Beyond the Abstract- Subtypes of alpha(1)-adrenoceptors in BPH: future prospects for personalized medicine. www.urotodayinternationaljournal.com. Accessed March 11, 2009.
15. Kojima Y, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Advances in molecular genetics of cryptorchidism. *Urology*. 74:571-578, 2009.
16. Casale P, Kojima Y. Robotic-assisted laparoscopic surgery in pediatric urology: An update. *Scand J Surg*. 98:110-119, 2009.
17. Kojima Y, Kubota Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Translational Pharmacology in aging men with benign prostatic hyperplasia: molecular and clinical approaches to alpha1-adrenoceptors. *Curr Aging Sci*. 2: 223-239, 2009.
18. Imura M, Sasaki S, Kojima Y, Kamisawa H, Hayashi Y, Kohri K. Squamous cell carcinoma in the meatus of a distal hypospadias. *UroToday Int J*. 2 (6)

- December 2009.
19. Kubota Y, Hashitani H, Shirasawa N, Kojima Y, Sasaki S, Mabuchi Y, Soji T, Suzuki H, Kohri K. Altered distribution of interstitial cells in gunia pig bladder following bladder outlet obstruction. *Neurol Urodyn.* 27:330-40,2008.
 20. Umemoto Y, Sasaki S, Kojima Y, Kaneko T, Yanai Y, Kohri K. A case of azoospermia with Kippel-Feil anomaly. *Int J Urol.* 15:188-9, 2008.
 21. Kojima Y, Hayashi Y, Mizuno K, Sasaki S, Fukui Y, Koopman K, Morohashi K-I, Kohri K. Upregulation of SOX9 in human SRY-negative XX males. *Clin Endocrinol.* 68:791-9, 2008.
 22. Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Kurokawa S, Sasaki S, Kohri K. Early orchiopexy improve the subsequent testicular development and spermatogenesis in the experimental cryptorchid rat model. *J Urol.* 179:1195-9, 2008.
 23. Kojima Y, Sasaki S, Shinoura H, Hayase M, Kubota Y, Hayashi Y, Tsujimoto G, Kohri K. Expression of alpha1-adrenoceptor subtypes mRNAs as a predictor of the efficacy of subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonists in the management of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 179:1040-6, 2008.
 24. Okada S, Watanabe H, Kojima Y, Yanai Y, Sasaki S, Kohri K. Loxoprofen sodium treatment for elderly men with refractory nocturia –Effect on nighttime urine production-. *Int J Urol.* 15:462-4, 2008.
 25. Kojima Y, Hayashi Y, Kurokawa S, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K. No evidence of germline transmission by adenovirus-mediated gene transfer to mouse testes. *Fertil Steril.* 89:1448-54, 2008.
 26. Kaneko T, Sasaki S, Umemoto Y, Kojima Y, Ikeuchi T, Kohri K. Simulated conditions of microgravity increases progesterone production in I-10 cells of Leydig tumor cell line. *Int J Urol.* 15:245-50, 2008.
 27. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Maruyama T, Tozawa K, Kohri K. Modified foreskin reconstruction for distal hypospadias and chordee without hypospadias. *Int J Urol.* 2008 15:646-8, 2008.
 28. Yasui T, Itoh Y, Kojima Y, Umemoto Y, Tozawa K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Impact of microwave tissue coagulation during laparoscopic partial nephrectomy on postoperative renal function. *Int Urol Nephrol.* 40:277-82, 2008.
 29. Kaneko T, Kojima Y, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Usefulness of transcription factors Ad4BP/SF-1 and DAX-1 as immunohistologic markers for diagnosis of advanced adrenocortical carcinoma. *Horm Res.* 70:294-299, 2008.
 30. Kamisawa H, Kojima Y, Hayashi Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K. Evaluation of preoperative testicular volume in Japanese children with unilateral cryptorchidism. *Int Urol Nephrol.* 40: 977-81, 2008.
 31. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Kurokawa S, Nakane A, Kohri k. Achieving a natural glanular meatus for distal hypospadias with a narrow and shallow plate: tubularized incised plate versus modified Barcat repair. *Int J Urol.* 15:616-20, 2008.
 32. Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno K, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Gene transfer to sperm and testis: future prospects of gene therapy for male infertility. *Curr Gene Ther.* 8:121-34, 2008.
 33. Hayashi Y, Kojima Y. Current concepts in hypospadias surgery. *Int J Urol.* 15: 651-664, 2008.

2. 学会発表 省略

H. 知的財産権の出願・登録状況

緒方勤. Estrogen receptor alpha gene, genomic DNA, and diagnosis marker. 米国特許出願 Patent No: US 7,601,828 B2、2009年10月13日
曾根秀子・大迫誠一郎・永野野麗子・今西聡・宮崎航.
特願 2009-81497（識別番号100078662）「胎生プログラミンに対する影響を評価するための方法」、(2008).

分 担 研 究 報 告

男児外陰部異常症および生殖機能障害と内分泌攪乱化学物質：
個体感受性と暴露量に関するゲノム疫学研究

研究分担者 大迫誠一郎 東京大学 准教授

研究要旨

尿道下裂を呈した新生児のゲノムの DNA メチル化解析を行うことにより、疾患の発症原因としてのゲノムメチル化変動の可能性を調査することを目的とした。のべ 13 検体（生後 1 才から 2 才以内）で 5 α 還元化酵素 2 型（SRD5A2）の伝子発現調節領域のメチル化ステータスと mRNA 発現レベルを調べたところ、弱い負の相関が取れることがわかった。環境汚染物質の暴露レベルの指標になりうる CYP1A1 は全てのサンプルで低メチルであり、また mRNA 発現レベルとの相関は取れなかった。

A. 研究目的

胎児期の環境汚染化学物質曝露で、標的器官のゲノムメチル化頻度やメチル化パターンに変動が起き、それが原因となって発癌感受性や形質に変化が生じることが実験動物レベルでは多数報告されている。尿道下裂は近年、小児科臨床上也有意な増加を見せる疾患である。動物実験で証明されている環境汚染物質の胎児期曝露で生じる前立腺萎縮やペニスの発達障害などの現象と同一の機序で発生しているとの仮説が提示されて久しい。しかし、ヒト集団における尿道下裂発症と環境汚染物質の関与、さらにゲノムメチル化変動との関連性に関しては報告がない。本サブテーマでは、尿道下裂患者の包皮のゲノム DNA メチル化レベルを対照群と比較することで検討、さらに包皮 RNA における化学物質曝露マーカーのレベルとの相関を調べることで曝露との関連性を検討することを目的とする。

B. 研究方法

1) 尿道下裂患者の包皮組織 DNA を用いた DNA メチル化解析

尿道下裂の包皮試料は、名古屋市立大学医学部で採取されたもの（1 歳～1 歳 9 月、25 献体）を使用した。ISOGEN で処理し、DNA 分画ならびに RNA 分画を調整した。DNA は定法に従いバイサルファイトゲノミックシーケンス法で 5 α 還元化酵素 2 型

（SRD5A2）、アンドロゲン受容体（AR）ならびにシトクローム P4501A1（CYP1A1）遺伝子プロモーター領域の CpG アイランドを標的に DNA メチル化解析を行った。また、RNA は逆転写後 CYP1A1 mRNA のコピー数をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。

2) 網羅的 DNA メチル化解析手法の開発

微量の DNA サンプルからでもゲノムワイドなメチル化頻度の検索が行えるよう、メチル化感受性制限酵素と PCR による増幅で、特にメチル化されている領域が増幅される手法の開発を行った。

（倫理面への配慮）

使用した包皮サンプルは、名古屋市立大学ならびに国立成育医療センター研究所の医学研究倫理審査委員会承認を得た研究課題において、同意を得た手術時に採取されたものである。

C. 研究結果

1) 尿道下裂患者の包皮組織 DNA を用いた DNA メチル化解析

解析した検体中 13 サンプルで SRD5A2 の十分なメチル化ステータスデータが得られた（昨年度の予備実験でメチル化頻度の高い領域を選定）。これらの検体の SRD5A2 mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR で測定したところ、メチル化頻度と発現レベルに弱い負の

相関があることがわかった。

さらに CYP1A1 遺伝子でもメチル化頻度を調べたが、解析した全てのサンプルでメチル化はほとんど観察されなかった。CYP1A1 はダイオキシン等の AhR 標的化合物の曝露バイオマーカーとなりうるが、その mRNA 発現レベルには、個体間で大きな違いが見られるものの、SRD5A2 メチル化頻度との相関性は取れなかった。また、AR プロモーター領域に関してもほぼ非メチルであることがわかった。

2) 網羅的 DNA メチル化解析手法の開発

メチル化感受性制限酵素と T7 アダプター結合による PCR 増幅を利用したメチル化部位特異的ラベリング法を開発した。すでに頻度の異なることがわかっている 2 つのサンプルを用い、処理後にラベリングして、標的プロモーター配列のオリゴを結合したカスタムアレイで競合ハイブリによる検証をしたところ、十分な蛍光強度差が得られることがわかった。本法はゲノム中のどの部位がメチル化されているのかという判定のみならず、2 サンプル間においてどちらが特定の領域でメチル化頻度が高いかの定量的解析に適していると思われる。現在米国仮出願申請作業中である。

D. 考察

前年度、DNA メチル化の解析できた 3 サンプルにおける CYP1A1 の発現レベルと SRD5A2 プロモーター領域のメチル化レベルに逆相関が示唆されたが、今回の個体数を増やした解析で相関性は取れなかった。したがって、我々がラットの用いた胎児期ダイオキシン曝露実験における前立腺内の SRD5A2 プロモーター領域の低メチル化を指標とする曝露レベルとの関連性は否定された。しかし、SRD5A2 自身の発現とメチル化頻度には弱い相関性が認められたため、尿道下裂発症とこの遺伝子のエピジェネティック変化との関連性が示唆されたと言える。今後、対照群サンプルの解析を進めながらさらに検証していく予定である。

E. 結論

尿道下裂患者の包皮サンプルから、化学物質の胎児期曝露により変動が生じることが報告されている遺

伝子のエピジェネティックな解析が可能であることがわかった。メチル化頻度の変化と疾患の関係が示唆されたが、化学物質の曝露レベルとの関連性は明らかにならなかった。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ohsako S., Fukuzawa N., Ishimura R., Kawakami T., Wu Q., Nagano R., Zaha H., Sone H., Yonemoto J., and Tohyama C. Comparative contribution of the aryl hydrocarbon receptor gene to perinatal stage development and dioxin-induced toxicity between the urogenital complex and testis in the mouse. *Biol Reprod*, in press.
- Alam MS., Ohsako S., Matsuwaki T., Zhu XB., Tsunekawa N., Kanai Y., Sone H., Tohyama C., and Kurohmaru M. Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reproduction*, in press.
- Sone H., Okura M., Zaha H., Fujibuchi W., Taniguchi T., Akanuma H., Nagano R., Ohsako S., and Yonemoto J. pCEC: a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. *J Toxicol Sci*, in press.
- Ishihara K., Ohsako S., Tasaka K., Harayama H., Miyake M., Warita K., Tanida T., Mitsuhashi T., Nanmori T., Tabuchi Y., Yokoyama T., Kitagawa H., and Hoshi N. When does the sex ratio of offspring of the paternal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) exposure decrease: In the spermatozoa stage or at fertilization? *Reprod Toxicol*, in press.
- 大迫誠一郎. プログラムされる“病”の新たな仮説—環境化学物質による代謝系遺伝子の次世代エピゲノム変化. *科学*, (2009), 79, 984-988.
- Ishimura R., Kawakami T., Ohsako S., and Tohyama C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochemical Pharmacol*, (2009), 77, 660-669.
- Kawakami T., Ito T., Ohsako S., Shiizakia K., Murakami Y., Hirowatarid K., Sato M., and Tohyama C. Possible Involvement of arylhydrocarbon receptor variants in TCDD-induced thymic atrophy and XRE-dependent transcriptional activity in Wistar Hannover GALAS rats. *J Toxicol Sci*, (2009), 34, 209-220.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

9. Wu Q., Suzuki J.S., Zaha H., Lin T-M., Peterson R.E., Tohyama C., and Ohsako S. Differences in gene expression and benzo[a]pyrene-induced DNA adduct formation in the liver of three strains of female mice with identical AhRb2 genotype treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and/or benzo[a]pyrene. *J Applied Toxicol*, (2008), 28, 724-733.
11. Shiizaki K, Ohsako S, Kawanishi M, and Yagi T. Omeprazole alleviates benzo[a]pyrene cytotoxicity by inhibition of CYP1A1 activity in human and mouse hepatoma cells. *Basic Clinical Pharmacol Toxicol*, (2008), 103, 468-475.
12. Sakata Y., Yoshioka W., Tohyama C., and Ohsako S. Internal genomic sequence of human CYP1A1 gene is involved in superinduction of dioxin-induced CYP1A1 transcription by cycloheximide. *Biochem Biophys Res Comm*, (2007), 355, 687-692.
- 曾根秀子、大迫誠一郎、永野野麗子、今西聡、宮崎航.
特願 2009-81497 (識別番号 1 0 0 0 7 8 6 6 2) 「胎生
プログラミングに対する影響を評価するための方法」,
(2008).

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

2. 学会発表

1. 大迫誠一郎. ダイオキシンの胎生期曝露による生後の化学発癌感受性亢進とエピゲノム変化. 第38回日本環境変異原学会、静岡 (2009) 11月
2. Ohsako S. Perinatal exposure to dioxins alters the epigenomic program that influences the susceptibility to carcinogens exposed in adulthood. Horiba Conference/CDBIM Symposium, 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, Tokyo, JAPAN, (2009) Oct 27th
3. 大迫誠一郎. ダイオキシンの胎生期曝露による肝臓エピゲノム変化. 第82回日本生化学会、シンポジウム「化学物質による遺伝子修飾と毒性発現」、神戸 (2009) 10月
4. Ohsako S. and Tohyama C. Reduction of methylation frequency in the matured mouse hepatic CYP1A1 promoter region by perinatal dioxin exposure. The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei, Taiwan, (2009) Sept 11th
5. 大迫誠一郎. 環境汚染物質の胎生期曝露影響は生後の肝臓においてエピジェネティックメモリーとして残る. 第3回日本エピジェネティクス研究会、東京 (2009) 7月
6. 大迫誠一郎. 環境汚染物質の胎児期曝露によるゲノムのエピジェネティックな変化. 第79回日本衛生学会、エピジェネティクス研究会シンポジウム、東京 (2009) 3月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

成育コホート研究における外陰部異常者の胎児期環境評価に関する研究

研究分担者 大矢 幸弘 国立成育医療センター第一専門診療部アレルギー科医長

研究要旨

国立成育医療センターで出産を予定した妊婦を対象に出生コホート研究への参加を依頼し文書にて同意が得られた約 1700 名から実際に出産を行い出産後に継続の意思のあった 1503 名の母親とその児 1549 名を対象にアンケート調査を行っている。今年度は 5 歳時点での健診を計画し、身長や体重などの測定に加えて外陰部や皮膚のチェック開始した。さらに化学物質の測定に向けて血液検体の採取を開始した。

共同研究者

堀川玲子 国立成育医療センター内分泌科医長
内木康博 同上 医員
吉井啓介 同上 レジデント
野田雅裕 同上 レジデント
成田雅美 国立成育医療センターアレルギー科医員
二村昌樹 同上 医員
堀向健太 同上 レジデント
津村由紀 同上 レジデント
佐塚京子 同上 レジデント

内環境など) についても調査し、食事内容については妊娠中の 3 期のそれぞれで BDHQ を用いた調査を行った。リクルートした妊婦から出生し、出生後の調査への同意が得られている母親は 1503 名で児は 1549 名である。本年度は最初にリクルートした母親から生まれた児が 5 歳に達することから、これまでのアンケート調査に加えて 5 歳健診を行うことにした。5 歳健診の内容は、成育コホート参加者にとって最初の採血（保存して将来の解析に備える）、男児の陰茎チェック（陰茎長の測定）、皮膚健診、発達問診、身長・体重・頭囲の測定、などである。

（倫理面への配慮）

参加者の個人情報が入力されたアンケート用紙への記入内容やデータ入力に関しては配慮している。また、ヘルシンキ宣言を遵守した研究計画書に基づき、倫理委員会の審査による許可を経て実行している。今度は、さらに採血による検体収集に関しては、新たに国立成育医療センター倫理委員会の許可を得た。

A. 研究目的

本研究の目的は、成育コホート研究に参加している者の中から男児外陰部異常症の患者をスクリーニングし、妊娠中の母体及び胎児が環境や食事から受ける化学物質に関する暴露要因との関係を調べ、統計的因果推論を導くことを最終目的として、その研究環境の整備とデータの集積を行うことである。

B. 研究方法

国立成育医療センターを受診した妊婦のなかから、出生コホート研究としての本研究への参加協力に同意が得られたものを対象に検診及びアンケート調査を行って長期追跡データを集積する。妊娠中の薬剤使用については電子カルテに記載された処方内容を抽出したデータとアンケート用紙への回答から抽出したデータを構築する。また、その他の環境要因への暴露（電磁場を発生するテレビなどへの暴露時間や家庭

C. 研究結果

妊婦への初回ベースライン調査への回答用紙と本研究への参加同意書を整理照合し不備のあるものは再度取り直し最終的に 1700 名の妊婦が本調査への正式登録者であることを確定した。このうち、国立成育医療センターで出産した記録のある妊婦は 1548 名で、他の 154 名は流産もしくは転出により他施設での分娩等により本センターでの分娩に至らなかったことが判明した。1548 名の母親から出産した子ど

もの数は多胎児を含めて1594名であった。このほかに自宅分娩者や里帰り分娩など他施設での分娩者がいたが、最終的に出生後のコホート研究への参加登録を継続した母親は1503名で、児は1549名であった。参加した母児は約2年半に亘ってリクルートされており、最初の組が本年3月に5歳に達した。5歳健診は平成21年4月から開始し、毎月原則として第4土曜日に国立成育医療センターの2階外来の設備を利用して行っている。これまでの5歳健診への参加者は、平成21年4月は対象者9名中8名、5月13名中11名、6月44名中29名、7月38名中32名、8月35名中33名、9月45名中30名、10月54名中31名、11月42名中39名、12月52名中32名、平成22年1月59名中50名と、合計391名中295名74.4%と高い参加率を維持している。

D. 考察

成育コホート研究は、国立成育医療センターで出産を計画した妊娠初期の妊婦を対象にリクルートを行った一般人口を対象とした出生コホート研究である。参加者や約1500名ほどの規模であり、稀少疾患の補足が難しいという限界はある。しかし、正常者と異常者の胎児期の環境暴露の影響やエピジェネティックな変化を比較することは疫学的因果推論とメカニズム探求にとって非常に重要である。本研究では、臍帯血の確保ができていないため、今回5歳に達した参加者からは初めて血液という生体資料の採取を行った。胎児期における化学物質等の暴露に関してはアンケート調査のデータに頼るしかないが、BDHQを用いた栄養調査も行っているため、何らかの関連物質の推定ができるかもしれない。また、本研究の5歳時点での参加率が約75%と出生コホート研究としてはかなり高い水準に達していることから、今後約2年に亘って収集が続く5歳時点のデータは信頼性の高いものになることが期待される。

E. 結論

出生コホート研究としての成育コホート研究は5歳時点で高い参加率を維持できており、今回初めて血液検体の採取に成功した。また、成長発達のチェック

のなかで男児の陰茎チェックを行うことができ、今後信頼性の高いデータが構築できるものと思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

大矢幸弘 環境変化と小児アレルギー疾患の増加に関する疫学的因果推論 第22回環境ホルモン学会講演会 2010年2月9日 東京（環境ホルモン学会第22回講演会テキストp55-64,2010年）

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

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

内・外性器の手術検体採取と患者臨床象解析

研究分担者 小島祥敬 名古屋市立大学大学院医学研究科腎・泌尿器科学分野

研究要旨

昨年に引き続き、尿道下裂および停留精巣患者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を行った。

A. 研究目的

尿道下裂および停留精巣は先天性男子生殖器疾患の中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、昨年に引き続きこれら疾患の化学物質に対する個体感受性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採取することである。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

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嚢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した。検体は培養液とRNA later に保存した。

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した。

（倫理面への配慮）

本研究は委員会名古屋市立大学大学院医学研究科「ヒト遺伝子解析研究」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）より同意を得たのち行っている。

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を行った。

D. 考察

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、各程度の症例を経験した。化学物質の個体感受性と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ることが期待される。

E. 結論

尿道下裂および停留精巣の血液、包皮および陰嚢皮膚検体組織を採取した。疾患の重症度と化学物質の感受性に相関を認めれば、これら疾患の発症要因が明らかになると考えられた。

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

- Ohya S, Kimura K, Niwa S, Ohno A, Kojima Y, Sasaki S, Kohri K, Imaizumi Y. Malignancy grade-dependent expression of K(+)-channel subtypes in human prostate cancer. *J Pharmacol Sci.*; 109:148-51, 2009.
- Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Mizuno H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic diagnosis and treatment of a phenotypic girl with a mosaic 45,XO/46,X,idi(Y) mixed gonadal dysgenesis. *J Pediatr Surg.* 44:e1-3, 2009.
- Mizuno K, Hayashi Y, Kojima Y, Nakane A, Tozawa K, Kohri K. Activation of NF- κ B associated with germ cell apoptosis in testes of experimentally induced

- cryptorchid rat model. *Urology*. 73:389–93, 2009
4. Nakane A, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K, Masui S, Nishinakamura R. Pax2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of integrin alpha8 and aquaporin-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 45:62–68, 2009.
 5. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Maruyama T, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Identification of differentially expressed genes in human cryptorchid testes using suppression subtractive hybridization. *J Urol*. 181:1330–1337, 2009.
 6. Iwatsuki S, Kojima Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Detection of ectopic ureteral insertion to vagina with hypoplastic ectopic kidney by computed tomography with three-dimensional imaging. *Urology*. 73:505–506, 2009.
 7. Kojima Y, Mizuno K, Imura M, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic orchietomy and subsequent internal ring closure for extra-abdominal testicular nubbin in children. *Urology*. 73:515–519, 2009.
 8. Okada S, Kojima Y, Hamamoto S, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K. Dietary soy isoflavone replacement improves detrusor overactivity of ovariectomized rats with alteration of connexin-43 expression in the urinary bladder. *BJU Int*. 103:1429–1435, 2009.
 9. Kojima Y, Sasaki S, Mizuno K, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Laparoscopic dismembered pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction in children. *Int J Urol*. 16:472–476, 2009.
 10. Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Long-term physical, hormonal and sexual outcome of males with disorders of sex development. *J Pediatr Surg*. 44:1491–1496, 2009.
 11. Niimi K, Kojima Y, Imura M, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Successful Treatment with hydrodistension in a boy with refractory overactive bladder with glomerulation. *J Pediatr*. 155:597–597.e1., 2009
 12. Kojima Y, Sasaki S, Oda N, Koshimizu T-A, Hayashi Y, Kiniwa M, Tsujimoto G, Kohri K. Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 69:1521–1528, 2009.
 13. Mizuno K, Hayashi Y, Tozawa K, Iwatsuki S, Kojima Y, Kohri K. Single-nucleotide polymorphism in WT1 gene in a hyperplastic intralobar nephrogenic rest with botryoid protrusion. *Urology*. in press.
 14. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kurokawa S, Kamisawa H, Maruyama T, Kohri K. Demonstration of postoperative effectiveness in ventral lengthening using a tunica vaginalis flap for severe penile curvature with hypospadias. *Urology*. in press.
 15. Imura M, Sasaki S, Kojima Y, Kamisawa H, Hayashi Y, Kohri K. Squamous cell carcinoma in the meatus of a distal hypospadias. www.urotodayinternationaljournal.com UroToday Int J. 2 (6) December 2009.
 16. Iwatsuki S, Kojima Y, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic management for fibroepithelial polyp causing ureteropelvic junction obstruction in a child. *Urology*. in press.
 17. Kojima Y, Mizuno K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Gene therapy for male infertility; Potential and limitation. Lejeune T and Delvaux (eds). In: *Human spermatozoa: Maturation, Capacitation and Abnormalities*. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, in press.
 18. Kojima Y, Casale P. Pediatric robotic pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction. Ost MC (eds). In: *Laparoscopic reconstructive surgery in children and adults*. Springer, New York, USA, in press.
 19. Kojima Y, Casale P. Robotic Bladder Surgery in Children. Hemal AK and Menon M (eds). In: *Robotic Urologic Surgery*. Springer, New York, USA, in press.
 20. Kojima Y, Sasaki S, Kubota Y, Hayashi S, Kohri K. New Insights into Alpha1-Adrenoceptor Subtypes and Pharmacogenomics of Benign Prostatic Hyperplasia. Morrison EP (eds) In: *Horizons in Cancer Research*. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, in press.
 21. Kojima Y, Mizuno K, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Gene therapy for male infertility. Glantz B and Edquist K (eds). In: *Male and Female Infertility: Genetic Causes, Hormonal Treatments and Health Effects*. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, in press.