

22. Hayashi Y, Kojima Y. Current concepts in hypospadias surgery. *Int J Urol*. 15: 651-664, 2008.
  23. 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.
  24. 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](http://www.urotodayinternationaljournal.com) Accessed March 11, 2009.
  25. Kojima Y, Mizuno K, Kohri K, Hayashi Y. Advances in molecular genetics of cryptorchidism. *Urology*. 74:571-578, 2009.
  26. Casale P, Kojima Y. Robotic-assisted laparoscopic surgery in pediatric urology: An update. *Scand J Surg*. 98:110-119, 2009.
  27. 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.
  28. Hayashi Y, Kojima Y, Kamisawa H, Imura M, Mizuno K, Kohri K. Is antibiotic prophylaxis effective in preventing UTIs in patients with VUR? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 8:51-58, 2010.
  29. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kamisawa H, Maruyama T, Kohri K. A Japanese view on circumcision; non-operative management of normal and abnormal prepuce. *Urology*. in press.
  30. Kojima Y, Kohri K, Hayashi Y. Genetic pathway of external genitalia formation and molecular etiology of hypospadias. *J Pediatr Urol*. in press.
  31. Casale P, Kojima Y. Pediatric Robotic Urology. *AUA Update Series*. in press.
2. 学会発表
  1. Umemoto Y, Sasaki S, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K: The role of the mRNA that sperm carry. 9th International Congress of Andrology, 2009.3.7-10, Barcelona(Spain)
  2. Mizuno K, Kojima Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K: The impact of the genes associated with differential expression in the XX male testis on spermatogenesis. 9th International Congress of Andrology, 2009.3.7-10, Barcelona(Spain)
  3. Kojima Y, Steixner B, Sehgal S, Lambert S, Casale P: Multiple metachronous fibroepithelial polyps in children: an emerging phenotype? *AUA 2009 Annual Meeting*, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
  4. Nakane A, Hayashi Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Makoto I, Kentaro M, Kato T, Kojima Y, Maruyama Tetsuji, Kohri Kenjiro: Satisfaction with voiding, appearance, and sexual function in adolescents after hypospadias repair during childhood. *AUA 2009 Annual Meeting*, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
  5. Hayashi Y, Kojima Y, Mizuno K, Kurokawa S, Nakane A, Kohri K: Disturbance of testicular development during testicular tubule formation causes vanishing testis. *AUA 2009 Annual Meeting*, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
  6. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Iwatsuki S, Kamisawa H, Shibata Y, Maruyama T, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K: Relationship between testicular location and the genetic characteristics of germ cells in cryptorchidism. *AUA 2009 Annual Meeting*, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
  7. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Iwatsuki S, Kamisawa H, Shibata Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K: Expression of the estrogen receptor alpha is decreased in the cryptorchid rat testes. *AUA 2009 Annual Meeting*, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
  8. Kato T, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K: The new findings of signal intensity on T2-weighted-MR imaging may enable preoperative diagnosis of vanishing testes. *AUA 2009 Annual Meeting*, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
  9. Kojima Y, Sasaki S, Oda N, Hayase, Kubota Y, Hayashi Y, Kiniwa M, Kohri K: Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. *AUA 2009*

- Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
10. Okada S, Kojima Y, Hamamoto S, Mizuno K, Kubota Y, Sasaki S, Tsugaya M, Kohri K: Dietary soy isoflavone replacement improves detrusor overactivity of ovariectomized rats with alteration of connexin-43 expression in the urinary bladder. AUA 2009 Annual Meeting, 2009.4.25-30, Chicago(USA)
11. Kojima Y: Subtypes of  $\alpha 1$ -adrenoceptors in BPH: future prospects for personalized medicine. The 1st International Symposium on Advanced Urogenital Disease Research, 6.12, Seoul (Korea).
12. Kojima Y: Subtypes of  $\alpha 1$ -adrenoceptors in BPH: future prospects for personalized medicine. 6.12, Yonsei Univ. Seoul (Korea).
13. Sasaki S, Kojima Y, Umemoto Y, Iwatsuki S, Hayashi Y, Shinoura H, Tsujimoto G, Kohri K: Expression of alpha-adrenoceptor subtypes mRNAs as a predictor of the efficacy of subtype-selective alpha1-adrenoceptor antagonists in the management of benign prostatic hyperplasia. APSSAM, 2009.10.15-18, Osaka
14. Kojima Y: Translational pharmacology in benign prostatic hyperplasia-New insights into alpha1-adrenoceptor subtypes-. Expertise Meeting in Urology 2009, 2009.12.5, Jeju-do (Korea).
15. 林 祐太郎、水野 健太郎、黒川 覚史、小島 祥敬、郡 健二郎: 埋没陰茎に対する手術治療アルゴリズムの作成と治療成績。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
16. 梅本 幸裕、佐々木 昌一、小島 祥敬、水野 健太郎、岩月 正一郎、金子 朋功、神谷 浩行、窪田 裕樹、窪田 泰江、池内 隆人、林 祐太郎、郡 健二郎: 精子に存在する mRNA の機能解析。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
17. 水野 健太郎、小島 祥敬、黒川 覚史、岩月 正一郎、神澤 英幸、柴田 泰宏、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎: 停留精巣における精巣位置と精子形成細胞の特性との関連性。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
18. 早瀬 麻沙、橋谷 光、窪田 泰江、小島 祥敬、加藤 誠、佐々木 昌一、鈴木 光、郡 健二郎: マウス膀胱平滑筋の自発活動制御における K channel の役割。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
19. 加藤 利基、小島 祥敬、水野 健太郎、黒川 覚史、神澤 英幸、林 祐太郎、郡 健二郎: 退縮精巣の診断における MRI T2 信号強度の有用性。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
20. 井村 誠、林 祐太郎、黒川 覚史、水野 健太郎、小島 祥敬、最上 徹、郡 健二郎: 近位型尿道下裂に対する術後排尿機能評価一尿流測定による小柳法と小柳変法の比較一。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
21. 神沢 英幸、林 祐太郎、水野 健太郎、小島 祥敬、黒川 覚史、加藤 利基、井村 誠、丸山 哲史、岡村 武彦、佐々木 昌一、郡 健二郎: 停留精巣モデルラットを用いた Fowler-Stephens 法術後の造精機能の検討。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
22. 中根 明宏、林 祐太郎、丸山 哲史、水野 健太郎、小島 祥敬、黒川 覚史、井村 誠、郡 健二郎: 膀胱尿管逆流症における排尿状態の検討。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
23. 黒川 覚史、林 祐太郎、水野 健太郎、小島 祥敬、新美 和寛、岩月 正一郎、柴田 泰宏、佐々木 昌一、郡 健二郎: 二分脊椎症患児における清潔間欠導入(CIC)早期開始の効果。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
24. 岡田 真介、小島 祥敬、濱川 隆、伊藤 尊一郎、柴田 泰宏、井村 誠、早瀬 麻沙、窪田 泰江、佐々木 昌一、津ヶ谷 正行、郡 健二郎: cyclophosphamide 誘発膀胱炎モデルラットにおける KIT 陽性間質細胞の役割。第 97 回日本泌尿器科学会総会、2009.4.16-19、岡山市
25. 中根 明宏、水野 健太郎、小島 祥敬、丸山 哲史、林 祐太郎、郡 健二郎、西中村 隆一: 遺伝子導入 ES 細胞からの腎構成細胞の分化をめざして。第 6 回泌尿器科再建再生研究会、2009.6.6、神戸市
26. 中岡 和徳、戸澤 啓一、岩月 正一郎、藤井 泰普、神澤 英幸、広瀬 真仁、岡田 淳志、小島 祥敬、安井 孝周、林 祐太郎、郡 健二郎: 前立腺生検を契機に前立腺結核と診断された 1 例。第 244 回日本泌尿器科学会東海地方会、2009.6.13、名古屋
27. 梅本 幸裕、佐々木 昌一、小島 祥敬、水野 健太

- 郎、岩月 正一郎、金子 朋功、神谷 浩行、窪田 裕樹、池内 隆人、林 祐太郎、郡 健二郎：精索静脈瘤術後における造精機能改善の予測因子の検討。第28回日本アンドロロジー学会学術総会、2009.7.3-4、富山市
28. 岩月 正一郎、佐々木 昌一、小島 祥敬、水野 憲太郎、金子 朋功、神谷 浩行、窪田 裕樹、梅本 幸裕、池内 隆人、林 祐太郎、郡 健二郎：生活習慣因子がMD-TESEにおける採精率に及ぼす影響。第28回日本アンドロロジー学会学術総会、2009.7.3-4、富山市
29. 早瀬 麻沙、橋谷 光、山田 健司、窪田 泰江、小島 祥敬、伊藤 恭典、佐々木 昌一、郡 健二郎、鈴木 光：マウス膀胱平滑筋の自発活動制御におけるK channelの役割。第51回日本平滑筋学会総会、2009.7.22-23、名古屋市
30. 窪田 泰江、小島 祥敬、早瀬 麻沙、佐々木 昌一、橋谷 光、鈴木 光、郡 健二郎：過活動膀胱におけるKit陽性間質細胞の役割。第51回日本平滑筋学会総会、2009.7.22-23、名古屋市
31. 佐々木 昌一、窪田 泰江、伊藤 恭典、早瀬 麻沙、小島 祥敬、郡 健二郎：ヒト尿管における部位別に見た収縮力と $\alpha$ 1-アドレナリン受容体遮断薬の効果。第51回日本平滑筋学会総会、2009.7.22-23、名古屋市
32. 早瀬 麻沙、橋谷 光、柴田 泰宏、井村 誠、窪田 泰江、小島 祥敬、伊藤 恭典、佐々木 昌一、鈴木 光、郡 健二郎：マウス膀胱平滑筋の自発活動におけるK channelの役割。第16回日本排尿機能学会、2009.9.10-12、福岡市
33. 広瀬 真仁、水野 健太郎、小島 祥敬、岩月 正一郎、井村 誠、神澤 英幸、小林 隆宏、梅本 幸裕、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎：滑膜肉腫との鑑別に遺伝子診断を用いた腎明細胞肉腫の1例。第245回日本泌尿器科学会東海地方会、2009.9.12、名古屋市
34. 小島 祥敬、林 祐太郎、水野 健太郎、梅本 幸裕、安井 孝周、戸澤 啓一、郡 健二郎：小児尿管異所開口に対する腹腔鏡下上半腎摘除術および腎摘除術。第18回日本小児泌尿器科学会、2009.9.30-10.2、淡路市
35. 加藤 利基、小島 祥敬、守時 良演、神澤 英幸、黒川 覚史、水野 健太郎、中根 明宏、林 祐太郎、岡村 武彦、郡 健二郎：非触知精巣に対する腹部超音波検査とMRI検査の術前診断における有用性。第18回日本小児泌尿器科学会、2009.9.30-10.2、淡路市
36. 岩月 正一郎、小島 祥敬、柴田 泰宏、井村 誠、神澤 英幸、黒川 覚史、中根 明宏、加藤 利基、水野 健太郎、丸山 哲史、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎：小児精巣発育不全症候群－思春期ホルモン値からみた精巣機能の予測－。第18回日本小児泌尿器科学会、2009.9.30-10.2、淡路市
37. 中根 明宏、黒川 覚史、水野 健太郎、小島 祥敬、丸山 哲史、林 祐太郎、郡 健二郎、西中村 隆一：Pax2遺伝子導入ES細胞からの尿細管細胞分化の検討。第18回日本小児泌尿器科学会、2009.9.30-10.2、淡路市
38. 小島 祥敬、井村 誠、神澤 英幸、水野 健太郎、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎：Glomerulationを伴い膀胱水圧拡張術が有効であった小児屋間遺尿症。第59回日本泌尿器科学会中部総会、2009.10.29-31、金沢市
39. 中根 明宏、林 祐太郎、黒川 覚史、水野 健太郎、小島 祥敬、丸山 哲史、郡 健二郎：Pax2遺伝子導入ES細胞からの尿細管細胞分化の基礎研究。第59回日本泌尿器科学会中部総会、2009.10.29-31、金沢市
40. 小島 祥敬、林 祐太郎、水野健太郎、岡田 淳志、梅本 幸裕、安井 孝周、橋本 良博、戸澤 啓一、郡 健二郎：小児腎盂尿管移行部通過障害に対する体腔鏡下腎盂形成術。第23回日本Endourology・ESWL学会総会、2009.11.11-13、東京都
41. 安井 孝周、橋本 良博、梅本 幸裕、小島 祥敬、伊藤 恭典、山田 泰之、戸澤 啓一、郡 健二郎：腹腔鏡下前立腺全摘除術におけるlateral fascia温存による術後尿禁制への工夫。第23回日本Endourology・ESWL学会総会、2009.11.11-13、東京都
42. 梅本 幸裕、戸澤 啓一、橋本 良博、小島 祥敬、安井 孝周、伊藤 恭典、永田 大介、河合 憲彦、林 祐太郎、郡 健二郎：腹腔鏡下前立腺全摘除術後の尿失禁に関する検討。第23回日本Endourology・ESWL学会総会、2009.11.11-13、東京都
43. 林 祐太郎、小島 祥敬、水野 健太郎、丸山 哲史、梅本 幸裕、橋本 良博、安井 孝周、戸澤 啓一、郡 健二郎：腹腔鏡と鼠径部アプローチを組み合わせた片側非触知精巣75例の治療経験。第23回日本

Endourology・ESWL 学会総会、2009.11.11-13、東京都

44. 柴田 泰宏、小島 祥敬、佐々木 昌一、植田 高史、  
鶴川 眞也、郡 健二郎：膀胱と皮膚を二重同時支配す  
る神経の形態学的証明とその神経細胞体上の TRPM8  
の発見。第 60 回名古屋市立大学医学会総会、2009.12.6、  
名古屋市

45. 小島 祥敬： $\alpha 1d$  受容体-前立腺肥大症の病態生理  
における役割と意義-。わかしゃち泌尿器科フォーラム、  
2009.12.9、名古屋市

46. 小林 大地、橋本 良博、岩月 正一郎、井村  
誠、神沢 英幸、小林 隆宏、広瀬 真仁、梅本 幸裕、  
小島 祥敬、佐々木 昌一、林 祐太郎、郡 健二郎：異  
なる症状を主訴とした両側精巣腫瘍の 1 例。第 246 回日  
本泌尿器科学会東海地方会、2009.12.13、名古屋市

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

特記すべきことなし

##### 2. 実用新案登録

特記すべきことなし

##### 3. その他

特記すべきことなし

## 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

研究分担者 曾根秀子 独立行政法人国立環境研究所 主任研究員

### 研究要旨

昨年度に引き続き、日本人及びイタリア人の男児の正常及び男児外陰部異常症（停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニス）患者の DNA サンプルを用いて、ダイオキシン関連遺伝子 AhR、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1、NR1I2 の一塩基多型（SNP）を解析した。その結果、各遺伝子の SNP25 個に関して、患群と正常群の間で統計的に有意な差 ( $P < 0.05$ ) が認められ、これらの遺伝子の多型の違いが、男児外性器障害の疾患発症や病態の進展に関与する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニスなどの男児外陰部異常症および生殖機能障害の疾患要因には、胎児期のエストロゲン様物質の曝露がそれら疾患の発症の誘引や進展に関与しているとの懸念がある。過去 10 年にわたり、環境中に存在する化学物質のうち、ポリ塩化ダイオキシン、ポリ塩化ビフェニルの類縁体及びビスフェノール A などに、エストロゲン様作用や抗エストロゲン様作用のあることが報告されてきた。したがって、これら化学物質が、男児外陰部異常症の発症や進展に関与していると最も強く疑う必要があると思われる。そこで、我々は、これまでに、インフォマティクスなアプローチによりエストロゲン受容体と相互作用のある核内受容体、それらのアゴニスト及びアゴニストが応答する遺伝子群（以下、ダイオキシン関連遺伝子群）を選定した（図 1）。このダイオキシン関連遺伝子群の発現変化や異常分子種の発現などが、男児外陰部異常症の発症や病態の進展に関与することが明らかになれば、母体や新生児、乳児の化学物質の影響リスクに関する管理に役立つものと考えられる。

そのために、本研究課題では、選定したダイオキシン関連遺伝子群の遺伝子多型と停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニスの疾患頻度との関係について、昨年に引き続き、例数を増やして検討した。

### B. 研究方法

これまでの研究から、AHR、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1、及び NR1I2 (PXR) の 5 遺伝子の多型が男児外陰部異常症の発症と関連することが示唆されていたので、本年度は、日本人 126 人及びイタリア人 11 人を追加して、これまでのデータと統合し、その関連性を調べた。最終的に解析に用いた検体の内訳は、日本人は、正常検体が、141、疾患の検体数が 184（内訳：停留精巣 77、尿道下裂 53、マイクロペニス 34）その他早期閉経 31 例であった。イタリア人は、正常検体が、129 及び疾患検体が 69（内訳：停留精巣 58、尿道下裂 11）であった。塩基の型は、イルミナのゴールデンゲートアレイを用いて測定した。多型解析には、Haploview 及び SAS (version 9.0) を用いた。統計的有意差は、トレンド解析 (Fischer 及び Armitage) 及びカイ 2 乗によって検出した。さらに、統計的有意差のあった SNP に関しては、化学物質の応答性及び選択的 RNA スプライシングを調べるために、LNcap 細胞を用いて、SNP を含む配列での RNA 発現を調べた。

### C. 研究結果

$\chi^2$  乗検定による症例対対照の二群比較で、 $P$  値 0.05 で有意差が認められた SNP を含む遺伝子 AHR、ARNT2、CYP17A1、CYP1A2、NR1I2 の 5 遺伝子について、合計 25 個の SNP について、さらに、トレンド解析及びオッズ比を求めた。トレンド解析で  $P$  値が 0.001

より小さい値を示した SNP は、AHR 遺伝子に関しては、rs3757824 が日本人の停留精巣および尿道下裂であった。ARNT2 遺伝子では、rs10431813、rs5000770 及び rs10851935 の日本人停留精巣で、rs1374213 と rs8024819 は、停留精巣及び尿道下裂で有意な差が認められた。NR1I2 では、rs2461823 及び rs2472680 の日本人尿道下裂で、CYP1A2 では、rs2069522 の日本人停留精巣及び尿道下裂で、CYP17A1 では、rs6163 の日本人停留精巣で有意な差が認められた。イタリア人では、どの SNP も 0.001 より小さい P 値は検出されなかった。しかし、P 値が 0.01 より小さい値を示したものは、AHR 遺伝子では、rs3757824 と rs2158041 の停留精巣であり、ARNT2 遺伝子では、rs1020397 の停留精巣で、NR1I2 では、rs2472682 及び rs6784598 の尿道下裂であった。CYP1A2 及び CYP17A1 では、どの SNP においても有意な差は認められなかった。

次に、Haploview によりハプロタイプブロックを検出した。その中で、同一ハプロタイプブロック内に日本人もしくは、イタリア人であつ P 値が 0.05 以下で有意のあつた SNP は、AHR では、rs2158041 及び rs7811989 が、ARNT2 では、rs10431813、rs5000770、rs1020397、rs4778790 が、NR1I2 では、rs2461823 と rs13059232 であつた。

さらに、これらのうち、有意な SNP が転写バリエーションの産生に影響を及ぼすかどうかを調べるために、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1 の RT-PCR 用のプローブを設計し、LNCaP 細胞で RT-PCR による mRNA の発現を確認した。

#### D. 考察

以上の結果より、AHR 及び ARNT2 は、日本人及びイタリア人の停留精巣において、統計的に有意な SNP が多く認められ、疾患の発症や進展にダイオキシン類の曝露などの感受性要因が関わっている可能性が示唆された。NR1I2 は、PXR であり、ビスフェノール A がこの受容体のリガンドである可能性が考えられている。NR1I2 は、両人種とも停留精巣よりむしろ、尿道下裂に有意な差が多く認められた。一方、CYP1A2 及び CYP17A1 については、イタリア人でもどの SNP にも有意な差が認められなかった。このことから、両遺伝子

は、日本人に特徴のある多型と考えられた。特に、CYP1A2 は、マイクロペニスで有意な SNP が多く検出され、この遺伝子との関連が強く示唆された。また、CYP1A2 のたんぱく質は、血中で、エストロゲン輸送たんぱく質として働き、さらに、エストラジールやテストステロンの水酸化を担うので、興味深い。

現在、統計的に有意な差の大きかつた SNP を含む遺伝子 (ARNT2、CYP1A2 及び CYP17A1) について、選択的 RNA の有無や化学物質感受性について検討している。

#### E. 結論

ダイオキシン関連遺伝子群の遺伝子多型と停留精巣、尿道下裂及びマイクロペニスの疾患頻度との関係について検討した。その結果、Ahr、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1、NR1I2 の 5 個の遺伝子が疾患の発症や病態の進展に関与する可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1: Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, Sone H. High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol.* 2009;577:55-65.
- 2: Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C, 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.* 2010 Feb;139(2):427-37.
- 3: Ohsako S, Fukuzawa N, Ishimura R, Kawakami T, Wu Q, Nagano R, Zaha H, Sone H, Yonemoto J, 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.

4: Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S, Yonemoto J. Profiles of Chemical Effects on Cells (pCEC): a toxicogenomics database with a toxicoinformatics system for risk evaluation and toxicity prediction of environmental chemicals. J Toxicol Sci. 2010;35(1):115-23.

2. 学会発表

1. Sone H., Okura M., Zaha H., Nagano R., Akanuma h., Yonemoto J. Construction of the basic system to establish an approach for risk evaluation and toxicity prediction of chemicals using informatics 第18回環境化学討論会 (2009, 6. つくば).
2. 曾根秀子, 黄倉雅広, 座波ひろ子. 化学物質の毒性予測及びリスク評価手法確立のための基盤システムの構築 第36回日本トキシコロジー学会学術年会 (2009, 6.岩手).
3. Sone H., Fukuda T., Yang L. BPA は、p53 を介して発がん物質に対する HMEC 細胞の感受性を上昇する. 第68回日本癌学会学術総会(2009, 9. 横浜).
4. 曾根秀子. 発達期曝露を模倣したモデル細胞系による小児神経発達疾患発症メカニズムの研究. 第17回生殖・発生毒性学東京セミナー (2009, 10.東京).
5. 曾根秀子, 座波ひろ子, 黄倉雅広, 永野麗子, 赤沼宏美. 化学物質の生体影響に関する類型化システムを用いた毒性予測に関する研究 第53回日本薬学会関東支部会 (2009, 10. 坂戸).
6. Sone H., Imanishi S., Okura M., Zaha H., Shiraishi H., Fujimaki H. Prenatal Exposure to Permethrin Inhibits Brain Development via Disruption of Vascular Development in Mice. PPTOX II : Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease (2009, 12. Miami).

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし  
ダイオキシン関連遺伝子群

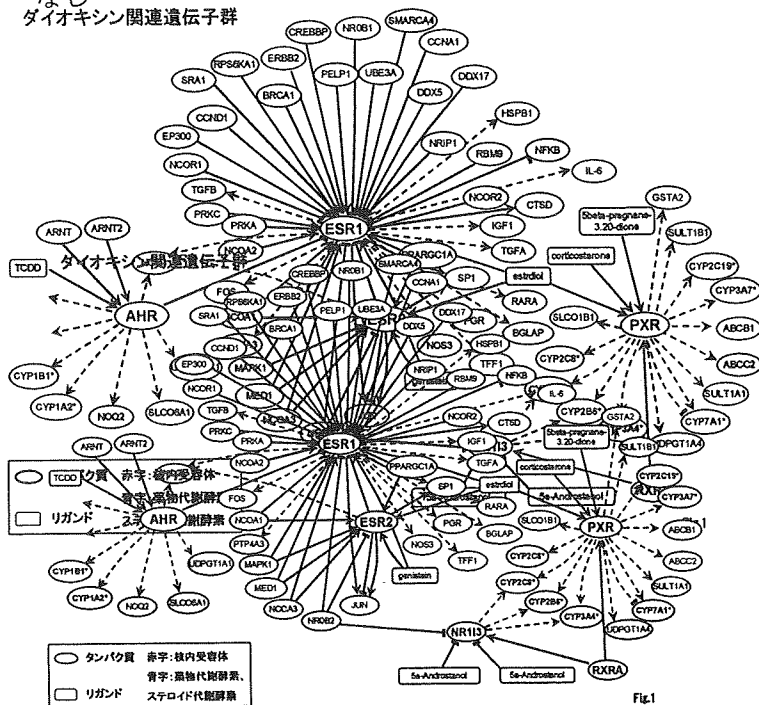


図1 ESR1 とダイオキシン関連遺伝子群との相関図

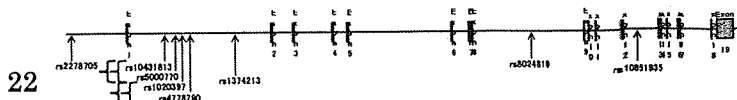
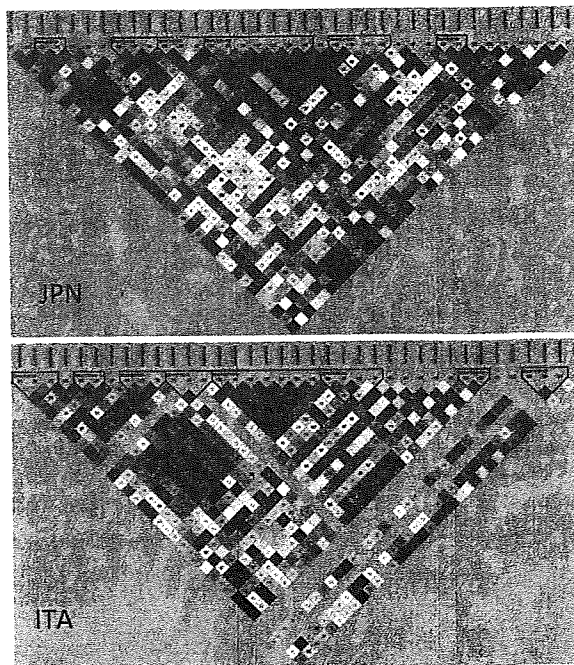


図2 HaplotypeView によるイタリア人 SNP のケースコントロール解析-ARNT2 の場合



## 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

研究分担者 安彦 行人 国立医薬品食品衛生研究所毒性部 主任研究官

### 研究要旨

ヒト ESR1 遺伝子のエストロゲン感受性をもたらすと予想されるゲノム上の塩基配列を、in vivo で機能解析することを目的に、ヒト感受性ハプロタイプ領域をマウスの該当領域にノックインしたマウスの作製を進めている。ターゲティングベクターを完成し、ES 細胞に対する遺伝子導入に成功、その ES 細胞株由来のキメラマウス個体を得ることに成功した。

### A. 研究目的

ヒト ESR1 遺伝子のエストロゲン感受性をもたらすと予想されるゲノム上の塩基配列を、マウスゲノムの該当領域にノックインしたマウスを樹立し、その機能を in vivo で解析することを目的とする。

### B. 研究方法

ヒトおよびマウスゲノムから ESR 遺伝子を含む断片を取得し、遺伝子ターゲティングのためのベクターを構築する。具体的には、ヒト野生型およびエストロゲン感受性ハプロタイプそれぞれの配列を、マウスの該当領域に隣接する配列で挟んだ組換え DNA を作製し、ターゲティングベクターとする。

完成したターゲティングベクターをエレクトロポレーション法によりマウス ES 細胞に導入し、相同組み換え体を選別後、キメラマウスの作製を経て目的の遺伝子組み換えマウス個体を得る。

#### （倫理面への配慮）

遺伝子組み換え実験に関しては、導入遺伝子の文献調査などにより安全性を逐一検討するとともに、遺伝子改変生物の逃亡防止など管理を厳格に行っている。また関係機関に対して必要とされる手続きを随時、遅滞なく行い、法令遵守に万全を期している。

### C. 研究結果

ターゲティングベクターとしては、ヒト ESR1 遺伝子第6イントロンの一部（野生型：約12kb、高感受性ハプロタイ

プ：約10kb）を、相同組み換えのためのアーム領域としてマウス Esr1 配列（上流側約7kb、下流側約1kb）で挟んだものを構築した。相同組換えESクローン選別のための薬剤耐性マーカーとしてネオマイシン耐性遺伝子を挿入した。薬剤耐性マーカーはFRT酵素により事後に除去できるようにした。

ヒト ESR1 遺伝子の目的断片は市販の大腸菌人工染色体ヒトゲノムライブラリーから取得した。高感受性ハプロタイプで見られる欠失については、欠失を含む断片をPCR法で作製し、シーケンスを確認の上で導入した。

相同組み換えのためのアーム領域も市販の大腸菌人工染色体マウスゲノムライブラリーから取得を試みたが、一部断片の取得・組み立てにおいて困難が生じたため、PCR法によりアーム領域を作製し、シーケンスを確認の上で用いた。

得られたターゲティングベクターを、エレクトロポレーション法によりマウス ES 細胞 TT2 株に導入した。まず、高感受性ハプロタイプ (hESR1int6delKI) について導入を行った。ノックインすべきゲノム断片が10kb以上とかなり大きいため、相同組み換えの頻度が低下する等、困難も予想されたが、138個の薬剤耐性ESクローンのうち1個が相同組み換え体であることが確認され、目的断片のノックインに成功した。

得られた相同組換えESクローンを、野生型マウス8細胞期胚と融合させ、キメラマウスを作製した。現在のところキメラ率 (ES由来細胞の比率) が30-50%とやや低いが、キメラマウスの作製に成功した。ES細胞由来の次世代個体を得るため、このマウスを野生型マウスと交配し、

観察を続けている。また、よりキメラ率が高くES細胞由来の次世代個体が得られる確率の高いキメラマウスを得るため、8細胞期胚との融合実験を繰り返している。

相同組換えESクローンが1個しか得られていないため、より多くの組み換え体を得られるよう、エレクトロポレーションを再度行った。これに伴いターゲティングベクターに、アーム領域を若干延長する改良を加えた。その結果、90個の薬剤耐性ESクローンのうち2個が相同組換え体であることが確認され、相同組換えESクローンを計3個へ増加させることができた。

目的のノックインマウスは、イントロン領域とはいえ比較的長い配列がヒト由来のものに置き換わっているため、表現型を野生型マウスと直接比較することが妥当か否か、判断に困難も伴う。そのため、感受性ハプロタイプではないと考えられる、欠損を伴わないヒト由来配列を導入したマウスを作製し、比較に供することを予定している。そのためのターゲティングベクターは完成しており、可及的速やかにエレクトロポレーションによるES細胞への導入、キメラマウスの作製を行う予定である。

## E. 結論

ヒト由来の大きな遺伝子断片をマウス ES 細胞に導入し、相同組み換えによりノックインすることに成功した。この ES 細胞に由来するキメラマウスも作製できた。現在、ノックインマウス個体を得るための交配を続けている。

## F. 健康危険情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

該当無し

### 2. 学会発表

2-1. Segmentation and rostro-caudal patterning of somites is not essential for vertebral body segmentation

Yu Takahashi, Yukuto Yasuhiko, Yumiko Saga and Jun Kanno

第32回日本分子生物学会年会(横浜市)

(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

該当無し

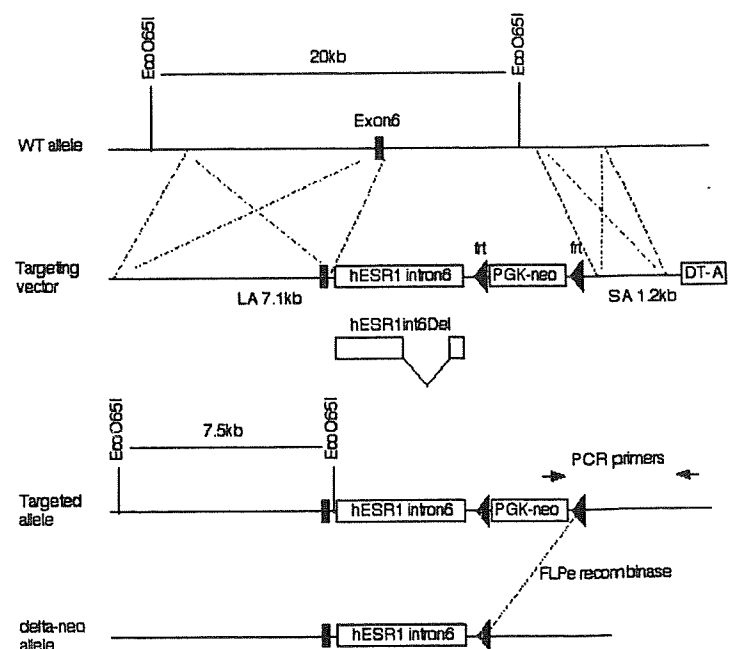
### 2. 実用新案登録

該当無し

### 3. その他

該当無し

## Targeting strategy for hESR1 int6 knock-in mouse



## 各種化学物質の測定と曝露レベルの推定に関する研究

研究分担者 吉永 淳 東京大学新領域創成科学研究科 准教授

### 研究要旨

男児外陰部異常症および生殖機能障害の発症や病態の進展における、化学物質曝露と個体感受性の両者の観点から検討を行う本課題研究において、化学物質曝露評価について主に検討を行った。エストロゲン活性、抗アンドロゲン活性を持つことが知られている化学物質の曝露を表す尿中の代謝産物を LC/MS/MS あるいは GC/MS により定量する基礎的検討を行ない、尿中 22 物質の定量方法を確認した。胎児のフタル酸エステル、イソフラボン、多環芳香族炭化水素類の曝露評価を妊婦尿を用いて予備的に行った。

### A. 研究目的

化学物質曝露による健康影響の評価にあたり、生体側の感受性要因が重要な役割を果たしていることが注目されてきている。しかしながら化学物質曝露の正確な評価が行われることが前提であることは言うまでもない。男児外陰部異常症や生殖機能障害の発症や病態の進展（以下男児生殖影響と略す）における化学物質曝露と個体感受性の両面から検討を行う本課題研究において、とくにこうした疾患との関連性が懸念されている化学物質群への個体レベルの曝露評価のための手法を検討し、化学物質曝露と個体感受性を包括的に扱う疫学調査への適用性を確立することを本分担研究の課題とした。

### B. 研究方法

男児生殖影響の疫学的影響評価の一環として行われる化学物質曝露評価手法として、尿を用いた母親の妊娠期間中化学物質曝露評価が非侵襲性、受容性の点で適切であると考えた。本分担研究では、尿中化学物質あるいはその代謝産物の測定に基づく曝露評価法について検討を行った。

今年度は主に液体クロマトグラフタンデム質量分析法 (LC/MS/MS、Agilent 1100, USA および Micromass Quatro Ultima, UK) およびガスクロマトグラフ質量分析法 (GC/MS、Agilent) などの機器分析法による化学物質測定に関する検討を主に行った。適用性の実

証に用いた尿サンプルは、過去に別研究のために採取・保存してあったものを用いた。

### C. 研究結果

本研究で対象とした化学物質を表 1 に示した。

表 1 対象化学物質、分析対象および測定方法

対象物質	測定対象	主な作用	測定方法
フタル酸エステル類	代謝産物3種類	抗アンドロゲン	LC/MS/MS
ピレスロイド系殺虫剤	代謝産物3種類	抗アンドロゲン	LC/MS/MS
芳香族炭化水素化合物	代謝産物(1-メチルキネリン)	エストロゲン様?	LC/FL
パラベン	パラベン3種類、代謝産物3種類	エストロゲン様	LC/MS/MS
イソフラボン	ダイゼイン、イコール	エストロゲン様	GC/MS
クレアチニン	クレアチニン	尿量補正	吸光光度法
喫煙(能動受動)	コチニン	交絡因子	GC/MS

男児生殖影響を及ぼす可能性のある化学物質として抗アンドロゲン作用、エストロゲン作用をもつことが知られている合成化学物質 3 種類 (フタル酸エステル、ピレスロイド系殺虫剤、パラベン) および有機物燃焼に伴う非意図的生成物 (多環芳香族炭化水素、PAH)、さらに天然の化学物質であるイソフラボンを対象としたほか、疫学的に重要な共変量である能動・受動喫煙のバイオマーカーであるコチニンを対象に加えた。いずれもわが国の一般公衆が日常的に曝露している化学物質であり、男児生殖影響が懸念されてい

る物質群である。これらの物質の代謝産物計 22 物質を測定対象として設定した。

これらの測定対象物質のうち 17 種について、機器分析手法を用いた検出下限、測定再現性、添加回収率などの基本的な分析化学的検討を各物質の標準溶液を用いて行った。その結果を表 2 に一覧した。

表 2 測定対象物質の検出下限、再現性、回収率

測定対象	検出下限 ng/mL	測定再現性 %	添加回収率 %
MMP	0.024	5.7	112
MEP	0.020	3.4	98
MnBP	0.066	3.4	90
MBzP	0.030	5.5	109
MINP	0.035	30.8	71
MnOP	0.017	19.3	93
MEHP	0.022	10.4	107
MEHHP	0.008	3.0	96
MEOHP	0.015	26.1	100
3-PBA	0.047	9.4	NA
<i>cis</i> DCCA	0.74	NA	NA
<i>trans</i> DCCA	0.24	NA	NA
1-OHP	0.0034	6.1	105±6
メチルパラベン	1.9	5.9	NA
ダイゼイン	8.2	2.7	92±7
エクオール	5.3	7.4	91±7
コチニン	0.5	4.9	106±3

MMP, フタル酸モノメチル; MEP, フタル酸モノエチル; MnBP, フタル酸モノ n 正チル; MBzP, フタル酸モノベンジル; MINP, フタル酸モノイソノニル; MnOP, フタル酸モノ n オクチル; MEHP, フタル酸モノ-2-エチルヘキシル; MEHHP, フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル); MEOHP, フタル酸モノ(2-エチル-5-オキソヘキシル)、以上フタル酸エステル代謝産物。3-PBA, 3-フェノキシ安息香酸; DCCA, 3-(2,2-ジクロロピロピロ)-2,2-ジメチルシクロプロパンカルボン酸、以上ピレスロイド系殺虫剤代謝産物。1-OHP, 1-ヒドロキシベン PAH(ピレン)代謝産物

検討した分析方法は、感度、精度、真度の点から十分なものであることが明らかとなった。

また、実際に妊婦から採尿してこれらの化学物質代謝産物を測定することを想定した場合、採尿過程にお

ける空气中・採尿容器などからの汚染がないことが必要である。とくにフタル酸エステル類はプラスチック製品からの汚染がありうるので、懸念がある。採尿カップおよび尿保存用容器のうち、ごく一般的に利用されているものを用い、尿の代わりにメタノールを 20mL 入れて、採尿時と同じ作業（トイレで採尿カップに採取、そのまま保管容器に移す）をして汚染が起こるかどうかの検討をした。その結果、表 2 のどの物質についても検出されなかった。

以上より、妊婦から産婦人科で尿カップに採尿し、プラスチック製容器にうつし、-20℃で保管する方法で尿サンプルを保管することとした。

保存されていた妊婦尿サンプル（149 試料）にこの分析法を適用した。測定対象としたのは表 2 のうち、フタル酸エステル類代謝産物 9 種および PAH 代謝産物、およびダイゼイン、エクオールである。

表 3 予備的に測定した日本人妊婦尿中化学物質濃度

	尿中濃度 $\mu\text{g/g cre}^*$
MMP(n=149)	8.1
MEP	7.7
MnBP	52
MBzP	4.7
MINP	0.023
MnOP	0.019
MEHP	5.8
MEHHP	10
MEOHP	11
1-OHP(n=128)	0.12
ダイゼイン(n=53)	1.4
エクオール(n=53)	0.3

\* 中央値を示した。

フタル酸エステルについては MINP、MnOP を除くとほぼ全員から検出され、われわれ日本人がフタル酸エステルの曝露を日常的に受けていることが浮き彫りとなった。PAH の曝露バイオマーカーである 1-OHP も測定した全員から検出された。天然のエストロゲン様物質であるダイゼインは全員から、その腸内細菌代謝

産物であるエクオールは約半数の対象者から検出された。これら妊婦の曝露レベルは胎児の曝露レベルと相関するものと考えられる。

#### D. 考察

化学物質曝露による男児生殖影響の量-反応関係を明らかにするためには、胎児期の化学物質曝露レベルと個体感受性を包括的に評価することが必須である。化学物質曝露についていえば、胎児期のある一回の曝露ではなく、胎児期期間あるいはcritical window期間を通じての中長期的な曝露が影響を及ぼすと考えられる。したがって、曝露評価も一回ではなく、複数回にわたる可能性がある。ところで従来、胎児の化学物質曝露評価は、妊娠中の母親の血液、母乳、臍帯血などが用いられることが多かったが、上記のような胎児期化学物質曝露評価を目的とした場合、妊娠期間中母親から複数回採血することになるため、これは侵襲性、受容性の点から困難である。

その点、本研究で企図しているような尿分析に基づく曝露評価には大きな利点がある。採尿自体は被験者本人で行うので簡便で、妊娠期間中の定期検診時に蛋白・糖などのスクリーニング検査に使用した残りの尿をもらうので十分である。本結果で示したように、LC/MS/MSやGC/MSを使用することで、感度・精度・選択性の点で効果的な分析が可能で、20mLの尿があれば表1に示した22種の化学物質濃度を測定することができる。また、検診毎に採取することができれば、一人の妊婦から複数の尿サンプルを得ることができるので、妊娠期間を通じた曝露評価も可能となる。

今後、妊婦コホートを設定し、妊娠中に採尿して尿試料を保管しておき、出生後、男児外陰部異常等が見られた場合、コホート内の対照児童とマッチング後、感受性因子の比較とともに、保管されていた尿試料を分析することで、男児生殖影響に関する化学物質曝露と個体感受性を包括的に評価するコホート内患者-対照研究へと発展させることができる。

#### E. 結論

本研究で検討・確立した尿分析法を用いることで、男児生殖影響に関する化学物質曝露と個体感受性を

包括的に評価するコホート内患者-対照研究へと発展させることができる。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Y. Suzuki, M. Niwa, J. Yoshinaga, C. Watanabe, Y. Mizumoto, S. Serizawa, H. Shiraishi (2009) Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis. Environ. Health Prev. Med., 14: 180-187.

森拓哉, 吉永淳, 河原純子, 溝井美穂, 安達修一(2009) 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.

##### 2. 学会発表

鈴木弥生, 吉永淳, 水本賀文, 芹沢滋子, 白石寛明「胎児期フタル酸エステル類曝露による男児生殖器系への影響」第79回日本衛生学会総会、2009年3月29日-4月1日、東京

森拓哉, 吉永淳, 鈴木慧, 溝井美穂, 安達修一, 河原純子, 葛西順, 全衛東, 河井一明, 葛西宏「日本人小児におけるPAHs曝露と生体内酸化ストレスとの関連」第79回日本衛生学会総会、2009年3月29日-4月1日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

## 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

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 $\alpha$ 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）がなされ、外陰部皮膚繊維芽細胞を用いた発現解析が開始された。(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 $\beta$ 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。(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 $\alpha$ 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。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。

### 共同研究者

吉田理恵、宮戸真美、中村美智子  
(国立成育医療センター研究所)

### A. 研究目的

近年、男児外陰部異常症および生殖機能障害の増加が疫学的調査により明らかとなりつつあり、その原因として環境化学物質の影響が危惧されている。特に、大部分の環境化学物質が有するとされているエストロゲン用効果は、男性化障害を招くことが知られている。そして、このエストロゲン用効果が、主に環境化学物質がエストロゲン受容体に結合することで発揮されることから、エストロゲン受容体は環境化学物質作用の影響を担う中核的因子と推測される。本研究の目的は、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を行うことで、男児外陰部異常症および生殖機能障害における化学物質への個体感受性の本態を解明することである。

### B. 研究方法

#### 1. エストロゲン受容体 $\alpha$ 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35kb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 $\beta$ 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. 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。

#### 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。

#### C. 研究結果

##### 1. エストロゲン受容体 $\alpha$ 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：

健康成人男性 432 例と健康小児 72 例の解析から、健康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 $\beta$ 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。

##### 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 $\alpha$ 還元化酵素 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。

#### 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になってきている。例えば、エストロゲン受容体  $\alpha$  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  $\beta$  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、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と期待される。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。

#### 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

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T, Hanaki K, Uematsu A, Tishii 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.
6. Sim SC, W 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
7. 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.
8. 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* 149A (12): 2882–2885, 2009.
9. 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.
10. Ogata T, Laporte J, Fukami M. *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene involved in hypospadias. *Hormone Research* 71 (5): 245–252, 2009.
11. 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* 95 (2): 756–764, 2010.
12. 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* 157 (2): 171–174, 2010.
13. Fukami M, Maruyama T, Yoshimura Y, Ogata T. Isolated hypogonadotropic hypogonadism in a female with tachykinin receptor 3 gene mutations. *Hormone Research* (in press).
14. Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T. The IG-DMR and the *MEG3*-DMR at Human Chromosome 14q32.2: Hierarchical Interaction and Distinct Functional Properties as Imprinting Control Centers. *PLoS Genetics* (in press).
15. Kato H, Yoshida R, Tsukamoto K, Suga H, Aoi N, Eto H, Higashino T, Araki J, Ogata T, Yoshimura K. Familial cases of atypical clinical features genetically diagnosed as multiple lentiginos syndrome (LEOPARD syndrome). *International Journal of Dermatology* (in press).
16. Ashkenazi-Hoffnung L, Leberthal Y, Wyatt AW, Ragge NK, Dateki S, Fukami M, Ogata T, Phillipm, Gat-Yablonski G. A novel loss of function mutation in *OTX2* is associated with phenotypically variable anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. *Human Genetics* (in press)
17. Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Hiroyuki Moriuchi H, Ogata T. Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with *LHX4* deletion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (in press).

#### 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 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)。



## 研究成果の刊行一覧表

## 別紙4

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
1. 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 Sterilit	91 (2)	649-652,	2009.
Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, <u>Ogata T</u> , Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, Crowley WF Jr, Hoefsloot LH.	<i>CHD7</i> mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome – the clinical overlap with CHARGE syndrome.	<i>Clinical Genetics</i>	75 (1)	): 65-71	2009
Hayakawa K, Katsumata N, Abe K, Hirano M, Yoshikawa K, <u>Ogata T</u> , Horikawa R, Nagamine T	C Wide range of biotin (vitamin H) content in the foodstuffs and powdered milks as assessed by the high-performance affinity chromatography.	<i>Clinical Pediatric Endocrinology</i>	18 (1)	41-49	2009
Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, <u>Ogata T</u> , Hata K, Sotomaru Y, Kono T	Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene <i>Zdbf2</i> on chromosome 1 and its imprinted human homolog <i>ZDBF2</i> on chromosome 2	<i>Genomics</i>	93; (5)	461-472	2009
Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T, Hanaki K, Uematsu A, Tishii 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, <u>Ogata T</u> .	Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients.	<i>Journal of Clinical Endocrinology &amp; Metabolism</i>	94; (5)	1723-1731	2009
Sim SC, W Miller WL, Zhong X-B, Arlt W, <u>Ogata T</u> , 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	<i>Pharmacogenetics and Genomics</i>	19 (7)	565-566	2009
Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, <u>Ogata T</u> , Saitoh S	Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype	<i>Journal of Pediatrics</i>	155 (6):	900-903	2009

## 別紙4

Wada Y, Nishimura G, Nagai T, Sawai H, Yshikata M, Miyagawa S, Hanita T, Sato S, Hasegawa T, Ishikawa S, <u>Ogata T</u>	Mutation analysis of <i>SOX9</i> and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with campomelic dysplasia or acampomelic campomelic dysplasia.	<i>American Journal of Medical Genetics A</i>	49A (12)	2882-2885	2009
Dateki S, Hizukuri K, Tanaka T, Katsumata N, Katavetin P, <u>Ogata T</u>	An immunologically anomalous but considerably bioactive growth hormone produced by a novel <i>GHI</i> mutation (p.D116E).	<i>European Journal of Endocrinology</i>	161 (2)	301-306	2009
<u>Ogata T</u> , Laporte J, Fukami M	<i>MAMLD1 (CXorf6)</i> : a new gene involved in hypospadias	<i>Hormone Research</i>	71 (5)	245-252	2009
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, <u>Ogata T</u> .	Heterozygous <i>OTX2</i> mutations are associated with variable pituitary phenotype	<i>Journal of Clinical Endocrinology &amp; Metabolism</i>	95 (2)	756-764	2010
Muroya K, Mochizuki T, Fukami M, Iso M, Fujita K, <u>Ogata T</u>	Diabetes mellitus in a Japanese girl with HDR syndrome and <i>GATA3</i> mutation.	<i>Endocrine Journal</i>	157 (2):	171-174	2010
Fukami M, Maruyama T, Yoshimura Y, <u>Ogata T</u> .	Isolated hypogonadotropic hypogonadism in a female with tachykinin receptor 3 gene mutations	<i>Hormone Research</i>			in press
Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, <u>Ogata T</u>	The IG-DMR and the <i>MEG3</i> -DMR at Human Chromosome 14q32.2: Hierarchical Interaction and Distinct Functional Properties as Imprinting Control Centers	<i>PLoS Genetics</i>			in press
Kato H, Yoshida R, Tsukamoto K, Suga H, Aoi N, Eto H, Higashino T, Araki J, <u>Ogata T</u> , Yoshimura K.	Familial cases of atypical clinical features genetically diagnosed as multiple lentigines syndrome (LEOPARD syndrome)	<i>International Journal of Dermatology</i>			in press
Ashkenazi-Hoffnung L, Lebenthal Y, Wyatt AW, Ragge NK, Dateki S, Fukami M, <u>Ogata T</u> ,	PhillipM, Gat-Yablonski G. A novel loss of function mutation in <i>OTX2</i> is associated with phenotypically variable anophthalmia and isolated growth hormone deficiency.	<i>Human Genetics</i>			in press

## 別紙4

Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, Hiroyuki Moriuchi H, <u>Ogata T</u>	Mutation and gene copy number analyses of six pituitary transcription factor genes in 71 patients with combined pituitary hormone deficiency: identification of a single patient with <i>LHX4</i> deletion.	<i>Journal of Clinical Endocrinology &amp; Metabolism</i>				in press
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		2010
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		2010
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 Toxcol Sci		in press		2010
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		2010
Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, and Tohyama C.	Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta.	Biochemical Pharmacol	77	660-669		2009
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
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		2008
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