

201035004A・B

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22年度 総括・分担報告書

平成20年度～平成22年度総合研究報告書

研究代表者 緒方 勤

平成23（2011）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研究

平成22年度 総括・分担報告書  
平成20年度～平成22年度総合研究報告書

研究代表者 緒方 勤

平成23（2011）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研究 . . . . . 1

研究代表者 国立成育医療研究センター研究所 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 . . . . . 14

国立成育医療研究センター 大矢 幸弘

3 内・外性器の手術検体採取と患者臨床像解析 . . . . . 16

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 . . . . . 27

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 . . . . . 31

国立成育医療センター研究所 緒方 勤

## III 総合研究報告書

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研究 . . . . . 37

研究代表者 国立成育医療研究センター研究所 緒方勤

IV 研究成果の刊行一覧表	.....	45
V 研究成果の刊行物・別刷り	.....	59



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 国立成育医療研究センター研究所 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(2010年)においては、下記の成果が得られた。(1) ダイオキシン暴露と外陰部異常症の関連の解析:尿道下裂責任遺伝子 MAMLD1 がテストステロン産生に関与すること、MAMLD1 が CYP17A1 発現を特異的に調節すること、MAMLD1 がダイオキシンによるテストステロン産生低下に関与することを示すもので、ダイオキシン暴露による外陰部異常症発症機序の解明へと繋がるものと期待される。(2) 尿道下裂患者の包皮組織 mRNA 発現と DNA メチル化解析:エピジェネティック修飾の観点から暴露レベルと尿道下裂発症との関連性がより明瞭になると思われる。(3) 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:多数のダイオキシンシグナル伝達関連分子の多型と外陰部異常症発症の関連が示された。(4) エストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子上の内分泌攪乱化学物質感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す微小欠失ノックアウトマウス:これにより、ヒトで見いだされたエストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子の外陰部異常症感受性ハプロタイプの機能解析が可能となってきた。(5) 各種化学物質の測定と曝露レベルの推定に関する研究: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定量が可能となり、これらの物質が、妊婦の尿から検出されたことは、既に、内分泌攪乱化学物質への胎児期曝露が実際に生じていることが示された。(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曝露量の推定と、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。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。

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

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

### ● ダイオキシン暴露と外陰部異常症の関連の解析（MAMLD1/Mamld1 遺伝子解析）：

MAMLD1/Mamld1 遺伝子は、その変異が尿道下裂を招くこと、性分化臨界期の胎児期精巣において一過性に男性ホルモン（テストステロン）産生ライディッヒ細胞で発現していることから、本研究における重要なテーマである尿道下裂発症機序の解明において極めて有用な遺伝子である。われわれは、siRNA を用いた Mamld1 ノックダウン実験をマウスライディッヒ細胞腫瘍細胞を用いて行い、Mamld1 遺伝子ノックダウンでテストステロンが低下すること、そして、そのホルモン低下が 17 $\alpha$  水酸化酵素の活性低下によることが示された。さらに、テストステロン産生酵素遺伝子群の発現量解析から、ノックダウンにより、17 $\alpha$  水酸化酵素をコードする CYP17A1 の発現低下を生じていることを示した。次いで、In silico 解析により、MAMLD1 遺伝子プロモーター領域には、エピジェネティック修飾の代表であるメチル化の標的となる CpG アイランドが存在すること、また、その周辺にダイオキシン受容体であるアリアルハイドロカーボン受容体反応性エレメントが存在することを示した。さらに、mamld1 ノックアウトマウスの作製に成功し、胎児期ダイオキシン暴露実験を野生型マウスとノックアウトマウスで行い、Mamld1 の有無によりダイオキシン暴露の影響が異なるか否かを解析中である。

### ● 尿道下裂患者の包皮組織 mRNA 発現と DNA メチル化解析：

SRD5A2、CYP1A1、CYP1B1、ならびに AR の解析を行った。mRNA は CP mRNA レベルで補正することで、その発現レベルとした。尿道下裂患者（1-2yr, n=18）内で SRD5A2 の mRNA レベルと CYP1A1 および CYP1B1 の間に強い正の相関関係が認められた。一方 AR の発現との間に相関性はなかった。2 才以上の患者（N=5）、あるいは埋没陰茎患者（N=7）を含めた解析では相関関係は弱くなった。

SRD5A2 の転写開始点上流 -500~-150 には Sp1 サイトや AP4 サイトなどのエレメントが存在し、その転写の活性化に関与していることが知られている。今回調べた CpG アイランドにも Sp1 サイトが存在している。この領域内にある 19 個の CpG について解析可能だった全サンプル（n=30）でメチル化状態を調べたところ、平均メチル化頻度は 17.08%（解析した全 pGEM クローン内の 15,903 CpG 中、2717 CpG がメチル化）であった。一方、尿道下裂患者 9 サンプルと埋没陰茎患者 3 サンプルにおける CYP1A1 のプロモーター領域（-765~-311、2 つのダイ

オキシン応答配列 XRE を含む合計 36 個の CpG）に存在する CpG メチル化も調べたがほとんど非メチルであった。また、同一サンプルの AR のプロモーター領域（-1160~-853、-837~-431、合計 55 個の CpG）ならびにエクソン 1 の一部（+937~+1137、19 個の CpG）も調べたがほぼ非メチルであった。

各患者の SRD5A2 遺伝子のメチル化頻度と SRD5A2 mRNA の発現レベルとの相関関係をみたところ、有意に逆相関（P=0.0085）することがわかった。この領域に存在する XRE の CpG メチル化頻度との間には相関関係は認められなかったが、Sp1 サイトの CpG メチル化頻度との間には強い相関（P=0.0004）があった。さらに、SRD5A2 遺伝子プロモーターのトータル CpG メチル化頻度と CYP1A1 および CYP1B1 mRNA レベルとの間に各々有意な負の相関関係あることがわかった（図 1G, H）。AR mRNA との間には相関関係は認められなかった。2 才以上の患者（N=5）、あるいは埋没陰茎患者（N=7）を含め解析すると相関関係は弱くなった。

### ● 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：

これまでの研究から、AHR、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1、及び N1R12（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。日本人について患者 248 名（停留精巣 116 名、尿道下裂 98 名及びマイクロペニス 34 名）及び正常者 141 名について、前記の 5 遺伝子とその関連性を調べた。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、SAS（version9.0）及び Genespring を用いた。統計的有意差は、トレンド解析（Fischer 及び Armitage）、カイ2乗及びオッズ比によって検出した。

$\chi^2$  乗検定による症例対対照の二群比較で、いずれかの疾患において P 値 0.05 で有意差が認められた SNP を含む 5 遺伝子 AHR、ARNT2、CYP17A1、CYP1A2、NR1I2 の合計 32 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 0.01 以下の P 値を示した SNP は、停留精巣では、CYP17A1 rs4919686（P=0.011）及び ARNT2 rs5000770（P=0.00073）であった。尿道下裂では、CYP1A2 rs2069521（P=2.29E-6）及び ARNT2 rs2278705（P=0.00039）、rs5000770 に有意な差が認められた。マイクロペニスでは、CYP1A2 rs2069522（P=0.014）、rs2069526（P=0.014）、rs762551（P=0.012）、rs4646425（P=0.00557）、rs4646427（P=0.00443）、ARNT2 rs5000770（P=0.012）に有意差が認められた。オッズ比の解析では、2.0 以上の値が認められたものは、停留精巣においては、NR1I2 rs1403526、rs2472680、CYP17A1 rs4919686、rs6163、rs2278705、ARNT2 rs2278705、rs5000770、rs7183507、rs7178949、rs11072922 であった。尿道下裂では、NR1I2 rs2461823、CYP17A1 rs17115149、CYP1A2 rs2069521、rs2069522、ARNT2 rs2278705、rs5000770、rs1107922 及びマイクロペニスでは、CYP1A2 rs2069521、rs2069522、rs2069526、rs762551、rs4646425、rs4646427、ARNT2 rs4778597、rs7183507、rs7178949、rs11072922 であっ



た。

● エストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子上の内分泌攪乱化学物質感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す微小欠失ノックアウトマウス

われわれは、エストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子の特定ハプロタイプが外陰部異常発症感受性に関与すること、感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す微小欠失が存在することを見いだしていた。しかし、微小欠失の相同領域はマウスには存在しないため、ノックインマウスの作製に着手していた。本年度、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、観察を続けたが、ES細胞由来の個体は現在のところ得られていない。また、よりキメラ率が高くES細胞由来の次世代個体を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たが、キメラ率が50%を超えるキメラマウスは得られていない。

● 各種化学物質の測定と曝露レベルの推定に関する研究

男児生殖器に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尿中の代謝産物19物質～フタル酸モノメチル、フタル酸モノエチル、フタル酸モノブチル、フタル酸モノベンジル、フタル酸モノイソノル、フタル酸モノオクチル、フタル酸モノ-2-エチルヘキシル、フタル酸モノ(2-エチル-5-ヒドロキシヘキシル)、フタル酸モノ(2-エチル-5-オキソヘキシル)、3-フェキシ安息香酸、1-OHP、1-ヒドロキシピレンPAH(ピレン)代謝産物、パラヒドロキシ安息香酸(パラベン代謝産物)など～をLC/MS/MSあるいはGC/MSにより定量する方法を樹立した。そして、保存されていた妊婦尿サンプル(149試料)の分析を行い、フタル酸エステルは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。

● 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

国立成育医療研究センターでは、6年前から出生コホート研究を実施している。最終的に1701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、最初の組が昨年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、対象者の約7割であり、来年度には1000名近くに達するものと予想される。また、5歳児を対象とする採血を開始した。

D. 考察

● ダイオキシン曝露と外陰部異常症の関連の解析(MAMLD1/Mamld1 遺伝子解析):

われわれが同定した尿道下裂責任遺伝子MAMLD1がテストステロン産生に関与すること、MAMLD1がCYP17A1発現を特異的に調節すること、MAMLD1がダイオキシンによるテストステロン産生低下に関与することを示すものである。したがって、本研究は、ダイオキシン曝露による外陰部異常症発症機序の解明へと繋がるものと期待される。このようなデータは、世界で初めてであり、貴重なものと考えられる。

● 尿道下裂患者の包皮組織mRNA発現とDNAメチル化解析:

今回我々の解析でヒトの外陰部皮膚におけるSRD5A2遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度はその発現基底レベルと相関することが示唆された。さらに、CYP1ファミリー発現レベルとの相関もあることから、化学物質曝露とSRD5A2のプロモーター領域のメチル化も関連性があることが示唆された。尿道下裂発症に化学物質曝露が関与するかをさらに検討するためには、正常個体との比較解析が必要だろう。今回補足的に調べた埋没陰茎のサンプルではその検証に適しているか定かでないが、同一年令の集団の解析をさらに加算することで曝露レベルと尿道下裂発症との関連性がより明瞭になるかも知れない。

● 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:

今回の解析結果から、疾患によって異なる遺伝子のSNPを検出した。日本人における停留精巣において、CYP17A1 rs4919686及びARNT2 rs5000770を検出したが、尿道下裂では、CYP1A2 rs2069521及びARNT2 rs2278705、rs5000770が検出され、CYP17A1のSNPは検出されなかった。ARNT2 rs5000770は、停留精巣においても検出された。マイクロペニスでは、CYP1A2が5SNP、ARNT2が1SNPの検出が示され、停留精巣と尿道下裂のマイクロペニスの病態の進展には、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。NR112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。NR112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。

これらのCYP1A2及びARNT2は、いずれも15q24.1の位置にある。最近の論文で、この領域の微小欠失がダウン症様の発達遅延に関係していることが示唆されてお



り、今回の疾患患者における SNP 頻度の差は、病態の進展に関与していることが示唆された。一方、以前のイタリア人の結果からは、CYP1A2 及び CYP17A1 については、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。

#### ● エストロゲン受容体 $\alpha$ 遺伝子上の内分分泌攪乱化学物質感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す微小欠失ノックアウトマウス

キメラ率が50%を超えるキメラマウスは得られていない。何らかの機構により、ヒト感受性ハプロタイプイントロンを組み込まれた細胞は正常なマウス個体発生に関与できない等の可能性が考えられる。

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。感受性イントロンと同じ相同組換えアームを利用してターゲティングベクターを作製し、エレクトロポレーションによりES細胞への導入、キメラマウスの作製を行った。ESにおける相同組換えの確認に成功し、比較的キメラ率の高い(80%)キメラマウスが得られたが、ES細胞由来の子マウスは現在のところ得られていない。当該イントロンの改変自体が、マウス個体の正常な発生を妨げる等の可能性も考えられる。

#### ● 各種化学物質の測定と曝露レベルの推定に関する研究

本研究により、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19物質をLC/MS/MSあるいはGC/MSにより定量することが可能となった。また、これらの物質が、妊婦の尿から検出されたことは、既に、内分分泌攪乱化学物質への胎児期曝露が実際に生じていることを示すものである。今後、妊婦における尿中内分分泌攪乱化学物質の経時的評価と、出生時の外陰部発達状況(膺-肛門管距離など)との関連性を検討することで、内分分泌攪乱化学物質曝露の影響を正確に評価できるようになると期待される。

#### ● 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

今コホート研究は、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。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曝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

当該年度(2010年)においては、下記の成果が得られた。(1) ダイオキシン曝露と外陰部異常症の関連の解析:尿道下裂責任遺伝子 MAMLD1 がテストステロン産生に関与すること、MAMLD1 が CYP17A1 発現を特異的に調節すること、MAMLD1 がダイオキシンによるテストステロン産生低下に関与することを示すもので、ダイオキシン曝露による外陰部異常症発症機序の解明へと繋がるものと期待される(2) 尿道下裂患者の包皮組織 mRNA 発現と DNA メチル化解析:エピジェネティック修飾の観点から曝露レベルと尿道下裂発症との関連性がより明瞭になると思われる。(3) ダイオキシン関連遺伝子群の網羅的相関解析とパ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:多数のダイオキシンシグナル伝達関連分子の多型と外陰部異常症発症の関連が示された。(4) エストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子上の内分分泌攪乱化学物質感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す微小欠失ノックアウトマウス:これにより、ヒトで見いだされたエストロゲン受容体  $\alpha$  遺伝子の外陰部異常症感受性ハプロタイプの機能解析が可能となってきた。(5) 各種化学物質の測定と曝露レベルの推定に関する研究: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定量が可能となり、これらの物質が、妊婦の尿から検出されたことは、既に、内分分泌攪乱化学物質への胎児期曝露が実際に生じていることが示された。(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曝露量の推定と、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。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。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 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. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (2): 756-764, 2010. (IF = 6.202)
2. Fukami M, Maruyama T, Dateki S, Sato N, Yoshimura Y, Ogata T\*. Hypothalamic dysfunction in a female with isolated hypogonadotropic hypogonadism and compound heterozygous *TACR3* mutations and clinical manifestation in her heterozygous mother. *Horm Res Peediatr* 73 (6): 477-481, 2010. (IF = 1.730)
3. Muroya K, Mochizuki T, Fukami M, Iso M, Fujita K, Ogata T\*. Diabetes mellitus in a Japanese girl with

- HDR syndrome and *GATA3* mutation. *Endocr J* 157 (2): 171–174, 2010. (IF = 1.806)
4. Fukami M\*, Nagai T, Mochizuki H, Muroya K, Yamada G, Takitani K, Ogata T. Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Mol Genet Metab* 100 (3): 269–273, 2010. (IF = 2.897)
  5. Ashkenazi-Hoffnung L, Lebenthal Y, Wyatt AW, Ragge NK, Dateki S, Fukami M, Ogata T, Phillip M\*, Gat-Yablonski G. A novel loss of function mutation in *OTX2* is associated with phenotypically variable anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. *Hum Genet* 127 (6): 721–729, 2010. (IF = 4.523)
  6. Iijima K\*, Nozu K, Kamei K, Nakayama M, Ito S, Matsuoka K, Ogata T, Kaito H, Nakanishi K, Mastuo M. Severe Alport syndrome in a young woman caused by a t(X;1)(q22.3;p36.32) balanced translocation. *Pediatr Nephrol* 25 (10): 2165–2170, 2010. (IF = 2.425)
  7. Dateki S, Fukami M, Uematsu A, Kaji M, Iso M, Ono M, Mizota M, Yokoya S, Motomura K, Kinoshita E, 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. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (8): 4043–4047, 2010. (IF = 6.202)
  8. 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 Genet* 6 (6): e1000992, 2010. (IF = 9.532)
  9. Yamazawa K, Nakabayashi K, Kagami M, Sato T, Saitoh S, Horikawa R, Hizuka N, Ogata T\*. Parthenogenetic chimaerism/mosaicism with a Silver-Russell Syndrome-like Phenotype. *J Med Genet* 47 (11): 782–785, 2010. (IF = 5.751)
  10. Kato H, Yoshida R, Tsukamoto K, Suga H, Eto H, Higashino T, Araki J, Ogata T, Yoshimura K\*. Familial cases of atypical clinical features genetically diagnosed as LEOPARD syndrome (multiple lentiginos syndrome). *Int J Dermatol* 49 (10): 1146–1151, 2010. (IF = 1.177)
  11. Hiraoka M\*, Takahashi H, Orimo H, Hiraoka M, Ogata T, Azuma N. Genetic screening of Wnt signaling factors in advanced retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 16 (12): 2572–2577, 2010. (IF = 2.541)
  12. Matsubara K, Iwamoto H, Yoshida A, Ogata T\*. Semen analysis and successful paternity by intracytoplasmic sperm injection in a man with steroid 5 $\alpha$ -reductase-2 deficiency. *Fertil Steril* 94 (7): 2770.e7–2770.e10, 2010. (IF = 3.970)
  13. Suzumori N\*, Ogata T, Mizutani E, Hattori Y, Matsubara K, Kagami M, Suguhara-Ogasawara M. Prenatal diagnosis of paternal uniparental disomy 14: delineation of further patient. *Am J Med Genet A* 152A (12): 3189–3192, 2010. (IF = 2.404)
  14. Inoue H\*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K. Identification and functional analysis of novel human growth hormone-releasing hormone receptor (*GHRHR*) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *Clin Endocrinol* [Epub ahead of print] 2010 Nov 2 doi: 10.1111/j.1365-2265.2010.03911.x. (IF = 3.201)
  15. Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Matsubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T\*. Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. *J Hum Genet* 56 (1): 91–93, 2011. (IF = 2.547)
  16. Inoue H\*, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, Shigematsu Y, Itakura M, Ogata T, Fujieda K. Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (*GHSR*) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 Nov 17. [Epub ahead of print]. (IF = 6.202)
  17. Dateki S, Fukami M, Tanaka Y, Sasaki G, Moriuchi H, Ogata T\*. Identification of chromosome 15q terminal deletion with telomere sequences and its bearing on genotype-phenotype analysis. *Endocr J* (accepted).
  18. Fukami M, Muroya K, Miyake T, Iso M, Yokoi H, Suzuki Y, Tsubouchi K, Nakagomi Y, Kikuchi N, Horikawa R, Ogata T\*. *GATA3* abnormalities in six patients with HDR syndrome. *Endocr J* (accepted).
  19. Miyazaki O\*, Nishimura G, Kagami M, Ogata T. Radiological evaluation of dysmorphic thorax in paternal uniparental disomy for chromosome 14. *Ped Radiol* (accepted).
  20. Stoppa-Vaucher S, Ayabe T, Paquette J, Patey N, Francoeur D, Vuissoz J-M, Deladoëy J, Ogata T, Deal CL. 46, XY gonadal dysgenesis: new point mutation in two siblings and a germ line mosaicism in their father. *J Clin Endocrinol Metab* (submitted).
  21. Fukami, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Binder G, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Horikawa R, Ogata T\*. Identification of novel genetic mechanisms and assessment of phenotypic determinants in aromatase excess syndrome. (submitted).
  22. Kalfa N, Fukami M, Audran F, Philibert P, Pienkowski C, Weill G, Pinto C, Manouvrier S, Ogata T, C Sultan C\*. Screening of *MAMLD1* mutations in 70 children with 46,XY DSD: Identification and functional analysis of 2 new mutations. (submitted).
  23. Matsubara K, Murakami N, Nagai T, Ogata T\*. Maternal age effect on the development of Prader-Willi syndrome resulting from upd(15)mat through meiosis 1 errors. *Hum Reprod* (submitted).
  24. Fukami, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T\*. Aromatase excess syndrome:

- identification of cryptic duplications and deletions leading to gain-of-function of *CYP19A1* and assessment of phenotypic determinants. (accepted).
25. Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado M, Nonomura K, Ogata T\*: *Maml1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS ONE* (submitted).
26. Alam MS., Ohsako S., Tay TW., Tsunekawa N., Kanai N., and Kurohmaru M. Di(n-butyl) phthalate induces vimentin filaments disruption in rat Sertoli cells: A possible relation with spermatogenic cell apoptosis. *Anatomia Histologia Embryologia* 39, 189-193, (2010).
27. 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* 82, 636-643, (2010).
28. 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* 139, 427-437, (2010).
29. Ishihara K, Ohsako S, Tasaka K, Harayama H, Miyake M, Warita K, Tanida T, Mitsushashi 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* 29, 68-73, (2010).
30. Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, and Tohyama C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochemical Pharmacol* 77, 660-669, (2009).
31. 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).
32. 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).
33. 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).
34. 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* 355, 687-692, (2007).
35. Sone H, Akanuma H, Fukuda T. Oxygenomics in environmental stress. *Redox Rep.* 2010;15(3):98-114.
36. Mitsushashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K, Takahashi T. In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Sep 14;107(37):16331-5.
37. 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.* 2010;35(1):115-23.
38. Sone H, Fukuda T, Toyoshiba H, Yamanaka T, Perham F, Portier C. (2010) Importance of CDK7 for G1 re-entry into the mammalian cell cycle and identification of new downstream networks using a computational method. *The Open Cell Signaling Journal* 2: 1-12. 05. Alam MS, Ohsako S, Matsuwaki T, Zhu XB, Tsunekawa N, Kanai Y, Sone H, Tohyama C and Kurohmaru M. (2010) Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate. *Reproduction.* 139: 427-437.
39. Fujibuchi W, Kim H, Okada Y, Taniguchi T, Sone H. (2009) High-performance gene expression module analysis tool and its application to chemical toxicity data. *Methods Mol Biol* 577:55-65.
40. Sone H., Imanishi S., Nagano R., Akanuma H., Fukuda T., Ohsako S. (2009) Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In: *Biophys.Soc.China(BSC)ed. The Roles of Free radicals in Biology and Medicine.* Medimond S.r.l., 45-52.
41. Sone H, Miyabara Y, Fukuda T, Okura M, Ohsako S, Yonemoto J. (2008) Does maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induce glutathione S-transferase-positive hepatic foci in adult rats?, In: Morita M. ed., *Persistent organic Pollutants (POPS) Research in Asia*, 257-261.
42. 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.* 2008, 197, 351-358.
43. Tanaka J, Yonemoto J, Zaha H, Kiyama R and Sone H. (2007) Estrogen-responsive genes newly found to be modified by TCDD exposure in human cell lines and mouse systems. *Mol Cell Endocrinol.* Jun 30; 272(1-2):38-49.
44. 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.
45. X.Y. Qin, H. Zaha, J. Yoshinaga, J. Yonemoto, H. Sone (2009) Association of AHR- and



- ESR1-responsive gene variations with susceptibility to endocrine-disrupting chemicals in risk of male genital disorders. *Organohalogen Compounds* 71: 372-376.
46. Y. Suzuki, M. Niwa, J. Yoshinaga, Y. Mizumoto, S. Serizawa and H. Shiraishi (2010) Prenatal exposure to phthalate esters and PAHs and birth outcomes. *Environ. Int.*, 36: 699-704
47. M. Niwa, Y. Suzuki, J. Yoshinaga, C. Watanabe, Y. Mizumoto (in press) Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and birth outcomes. *Polycyclic Aromatic Compounds*
48. 1. 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*. 76:149-52, 2010.
49. 2. 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*. 76:101-6, 2010.
50. 3. 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*. 76:146-8,2010.
51. 4. Shibata Y, Kojima Y, Mizuno K, Nakane A, Kato T, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Optimal cut-off value of contralateral testis size for the prediction of absent testis in Japanese boys with nonpalpable testis. *Urology*. 76:78-81,2010.
52. 5. Kato T, Kojima Y, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K, Hayashi Y. Findings of MR fat-suppressed T2-weighted and diffusion-weighted imaging in the diagnosis of nonpalpable testes. *BJU int.* in press.
53. 6. Kojima Y, Sasaki S, Imura M, Kubota Y, Hayashi Y, Kohri K. Correlation between expression of alpha1-Adrenoceptor subtype mRNA and severity of lower urinary tract symptoms or bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia patients. *BJU int.* in press.
54. 7. Okada A, Yasui T, Fujii Y, Niimi K, Hamamoto S, Hirose M, Kojima Y, Itoh Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Renal macrophage migration and crystal phagocytosis via inflammatory-related gene expression during kidney stone formation and elimination in mice; detection by association analysis of stone-related gene expression and microstructural observation. *J Bone Miner Res.* in press.
55. 8. Okada S, Kojima Y, Kubota Y, Mizuno K, Sasaki S, Kohri K. Attenuation of bladder overactivity in KIT (Ws /Ws) mutant rats. *BJU int.* in press.
56. 9. Mizuno K, Kojima Y, Kurokawa S, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Altered expression and localization of estrogen receptors alpha and beta in the testes of a cryptorchid rat model. *Urology*. in press.
57. 10. Kojima Y, Lambert SM, Steixner BL, 省略しました。
- Laryngaski N, Casale P. Multiple metachronous fibroepithelial polyps in children. *J Urol.* in press.
58. 11. Kojima Y, Umemoto Y, Mizuno K, Tozawa K, Kohri K, Hayashi Y. Comparison of adults and children in laparoscopic pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction - Lessons learned. *J Urol.* in press.
59. 12. Nishio H, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic nephrectomy for pelvic multicystic dysplastic kidney. *Urology*. in press.
60. 13. Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kato T, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic management of nonpalpable testis: New treatment strategy. *J Endourol.* in press.
61. 14. 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.
62. 15. Kojima Y, Kohri K, Hayashi Y. Genetic pathway of external genitalia formation and molecular etiology of hypospadias. *J Pediatr Urol.* 6:346-354,2010.
63. 16. Kojima Y, Hayase M, Sasaki S, Hayashi S, Kohri K. New pharmacologic horizons in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Curr Drug Ther.* 5:262-270, 2010.
64. 17. 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*. 76:21-4,2010.
65. 18. Kojima Y, Tozawa K, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic reconstructive surgery in pediatric urology: An overview of current options. *Curr Pediatr Rev.* in press.
2. 学会発表  
省略
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得
- 大迫誠一郎、栗田尚佳。「CpGメチル化頻度の変動をゲノムワイドに比較解析するためのDNA試料作成方法」, 米国仮出願(出願番号:61/309971) (2010).
  - 曾根秀子、大迫誠一郎、永野麗子、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  
該当なし
3. その他

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

尿道下裂を含む男児生殖器奇形の増加が環境汚染物質によって引き起こされているとの指摘がある。しかし、患部組織を用いた報告が無いため、遺伝子発現を含めた生理的変化と暴露レベルとの関係性の根拠がないため信憑性は定かでない。本研究では尿道下裂患者皮膚組織を用いて、環境汚染物質の暴露指標となる CYP ファミリー（CYPs）発現と男性ホルモン合成系遺伝子発現の相関ならびに、各遺伝子についてエピジェネティックな調節機構である DNA メチル化ステータスを調べた。尿道下裂患者（n=23）と埋没陰茎患者（n=7）の皮膚組織の RNA と DNA を回収した。ステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素 2 型（SRD5A2）と CYPs 発現を定量 PCR で、SRD5A2 プロモーターのメチル化をバイサルファイト法で測定し各々相関解析を行った。1-2 歳児の尿道下裂患者内で SRD5A2 と CYPs の発現に強い相関関係（ $P < 0.001$ ）が認められた。SRD5A2 のプロモーターメチル化と SRD5A2 mRNA 発現には負の相関が認められ（ $P = 0.009$ ）。CYPs mRNA 発現レベルとの間にも負の相関関係（ $P < 0.05$ ）が認められた。これらの結果より、尿道下裂患者における SRD5A2 の発現レベルは有機塩素系化合物や難分解性芳香族炭化水素等の環境汚染化学物質の暴露レベルを反映していると思われる。雄の外生殖器異常を呈するダイオキシンの胎児期授乳期暴露の動物実験で前立腺内の SRD5A2 発現が上昇することが報告されていることから、ヒトの尿道下裂患者集団においても化学物質暴露レベルと疾患発症との関連性が示唆された。

### A. 研究目的

前世紀後半における調査において、尿道下裂が先進国（ヨーロッパやアメリカ）で増加しているとの報告がある。さらに、農薬を高濃度で使用する集団に発症率が高いとする結果から、この増加には内分泌攪乱化学物質等の環境化学物質の暴露が原因でないかとの指摘がある。胎児期の環境汚染化学物質暴露で、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。ヒトにおける尿道下裂の増加も動物実験で証明されている環境汚染物質の胎児期暴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ついては報告がない。

本研究では尿道下裂患者皮膚サンプルを用いて、有機塩素系化合物や難分解性芳香族炭化水素等の環境汚染化学物質の暴露指標として用いられるシトクローム P450（CYP）ファミリーの発現レベルと、動物実験でダイオキシンにより変動の報告されたステロイド 5 $\alpha$ 還元酵素 2 型（SRD5A2）の発現レベルならびに各遺伝子プロモーター領域の CpG メチル化頻度を測定した。それにより暴露レベルと男児生殖器異常との関連性をヒト集団において検討した。

### 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～14歳、45献体）を使用した。Trizolで処理し、トータルRNAならびにDNAを調整した。RNAは逆転写後CYP1A1、CYP1B1、SRD5A2、アンドロゲン受容体（AR）、サイクロフィリン（CP）のmRNAコピー数をリアルタイムRT-PCR法で測定した。また、DNAは定法に従いバイサルファイトゲノミックシーケンシング法でSRD5A2、ARならびにCYP1A1遺伝子プロモーター領域のCpGアイランドを標的にDNAメチル化頻度解析を行った。

## 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で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mRNA発現とDNAメチル化解析

SRD5A2、CYP1A1、CYP1B1、ならびにARのmRNAはCP mRNAレベルで補正することで、その発現レベルとした。尿道下裂患者（1-2yr, n=18）内でSRD5A2のmRNAレベルとCYP1A1およびCYP1B1の間に強い正の相関関係が認められた（図1A,B）。一方ARの発現との間に相関性はなかった（図1C）。2才以上の患者（N=5）、あるいは埋没陰茎患者（N=7）を含めた解析では相関関係は弱くなった。

SRD5A2の転写開始点上流-500~-150にはSp1サイトやAP4サイトなどのエレメントが存在し、その転写の活性化に関与していることが知られている。今回調べたCpGアイランドにもSp1サイトが存在している。この領域内にある19個のCpGについて解析可能だった全サンプル（n=30）でメチル化状態を調べたところ、平均メチル化頻度は17.08%（解析した全pGEMクローン内の15,903CpG中、2717CpGがメチル化）

であった。一方、尿道下裂患者9サンプルと埋没陰茎患者3サンプルにおけるCYP1A1のプロモーター領域（-765~-311、2つのダイオキシン応答配列XREを含む合計36個のCpG）に存在するCpGメチル化も調べたがほとんど非メチルであった。また、同一サンプルのARのプロモーター領域（-1160~-853、-837~-431、合計55個のCpG）ならびにエクソン1の一部（+937~+1137、19個のCpG）も調べたがほぼ非メチルであった。

各患者のSRD5A2遺伝子のメチル化頻度とSRD5A2 mRNAの発現レベルとの相関関係をみたところ、有意に逆相関（ $P=0.0085$ ）することがわかった（図1D）。この領域に存在するXREのCpGメチル化頻度との間には相関関係は認められなかったが（図1E）、Sp1サイトのCpGメチル化頻度との間には強い相関（ $P=0.0004$ ）があった（図1F）。さらに、SRD5A2遺伝子プロモーターのトータルのCpGメチル化頻度とCYP1A1およびCYP1B1 mRNAレベルとの間に各々有意な負の相関関係あることがわかった（図1G,H）。AR mRNAとの間には相関関係は認められなかった。2才以上の患者（N=5）、あるいは埋没陰茎患者（N=7）を含め解析すると相関関係は弱くなった。

### 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。2010年米国仮出願を行った。

## D. 考察

昨年度までのDNAメチル化解析できたサンプルにおける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相関性は取れなかったが、今回の18サンプルでは有意な負の相関があることが

示された。

ダイオキシンの胎児期曝露で見られる外陰部発育異常では前立腺内 SRD5A2 が発現上昇する (Theobald *et al.*, *Toxicol Sci*, 58, 324, 2000; Ohsako *et al.*, *Toxicol Sci*, 60, 132, 2001)。これらの動物では前立腺内の CYP1A1 レベルも高く、したがって胎児期に暴露されたダイオキシン量と SRD5A2 ならびに CYP1A1 発現レベルの間には正の相関関係が成立する。したがってヒトにおける研究でも前立腺を標的とした調査が妥当と思われるが、男児外陰部奇形で成体サンプルが利用可能なのは、血液以外、手術時に微量採取できる今回の極めて貴重な皮膚組織のみである。SRD5A2 は外陰部の雄性化に関与し、その遺伝子変異は雄性化の異常、マイクロペニスや尿道下裂を引き起こすことが知られている。またその遺伝子多型は尿道下裂との関連性が示唆されている (Thai *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 6695, 2005)。さらに、ヒト胎児陰茎の包皮皮膚いわゆる性器皮膚 (genital skin) には SRD5A2 も高発現しているため、今回解析対象とすることにした。

SRD5A2 はテストステロンによって誘導されるため、1歳から8歳まで血中テストステロンレベルに呼応する形でヒトの包皮皮膚では徐々に活性が下がっていく (Theintz *et al.*, *Horm Res*, 32, 124, 1989)。今回確かに1-2yrのほうが2歳児以上より SRD5A2 レベルは高かった (6.14, 1-2yr, hypospadias; 0.29, 2-14yr, hypospadias; 11.97, 1-2yr, concealed penis; 0.47, 2-14yr, concealed penis)。

ダイオキシンの成熟後の直接暴露では精巣内ステロイド合成阻害作用によりテストステロン減少が起きるため、SRD5A2 発現レベルは下がる。上述のように、胎児期にダイオキシン暴露された実験動物では生後の前立腺内 SRD5A2 が対照群より高くなるが、これはテストステロンの上昇によるものではなく、なんらかの他の機構で発現基底レベルが上昇することによる。ダイオキシンの胎児期曝露は前立腺やペニスなどの男性生殖器の発達を阻害するため、この SRD5A2 の基底レベル上昇は代償的反応と推測される。このような変化はエピジェネティック記憶の変化によることが予想される。今回の我々の解析結果は SRD5A2 遺伝子の変化と尿道下裂発症との関連性について考察できないものの、この遺伝子がヒトの皮膚でも化学

物質によるエピジェネティックな変化を受けるかもしれないことを示唆している。

## E. 結論

今回我々の解析でヒトの外陰部皮膚における SRD5A2 遺伝子プロモーター領域のメチル化頻度はその発現基底レベルと相関することが示唆された。さらに、CYP1 ファミリー発現レベルとの相関もあることから、化学物質暴露と SRD5A2 のプロモーター領域のメチル化も関連性があることが示唆された。尿道下裂発症に化学物質暴露が関与するかをさらに検討するためには、正常個体との比較解析が必要だろう。今回補足的に調べた埋没陰茎のサンプルではその検証に適しているか定かでないが、同一年令の集団の解析をさらに加算することで暴露レベルと尿道下裂発症との関連性がより明瞭になるかも知れない。

## F. 健康危険情報

該当無し。妥当

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Alam MS., Ohsako S., Tay TW., Tsunekawa N., Kanai N., and Kurohmaru M. Di(n-butyl) phthalate induces vimentin filaments disruption in rat Sertoli cells: A possible relation with spermatogenic cell apoptosis. *Anatomia Histologia Embryologia* 39, 189-193, (2010).
2. 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* 82, 636-643, (2010).
3. 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* 139, 427-437, (2010).
4. Sone H, Okura M, Zaha H, Fujibuchi W, Taniguchi T, Akanuma H, Nagano R, Ohsako S, and 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* 35, 115-123, (2010).
5. Ishihara K, Ohsako S, Tasaka K, Harayama H, Miyake M, Warita K, Tanida T, Mitsunashi 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* 29, 68-73, (2010).
  6. 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.
  7. Sone H, Imanishi S, Akanuma H, Nagano R, Fukuda T, Ohsako S. Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders. In “The roles of free radicals in biology and medicine”, MEDIMOND SRL Publ., 45-52, (2009).
  8. Ishimura R, Kawakami T, Ohsako S, and Tohyama C. Dioxin-induced toxicity on vascular remodeling of the placenta. *Biochemical Pharmacol* 77, 660-669, (2009).
  9. 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).
  10. Sone H, Miyabara Y, Fukuda T, Okura M, Ohsako S, Yonemoto J. Does maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induce glutathione S-transferase-positive hepatic foci in adult rats?, In: Morita M. ed., Persistent organic Pollutants (POPS) Research in Asia, 257-261, (2008).
  11. 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).
  12. 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).
  13. 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* 355, 687-692, (2007).

## 2. 学会発表

1. 大迫誠一郎. ダイオキシンの胎生期暴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, 21<sup>st</sup> Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, Tokyo, JAPAN, (2009) Oct 27<sup>th</sup>
3. 大迫誠一郎. ダイオキシンの胎生期暴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 5<sup>th</sup> 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暴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暴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

1. 大迫誠一郎、栗田尚佳. 「CpGメチル化頻度の変動をゲノムワイドに比較解析するためのDNA試料作成方法」、米国仮出願 (出願番号: 61/309971) (2010).
2. 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).

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

無し



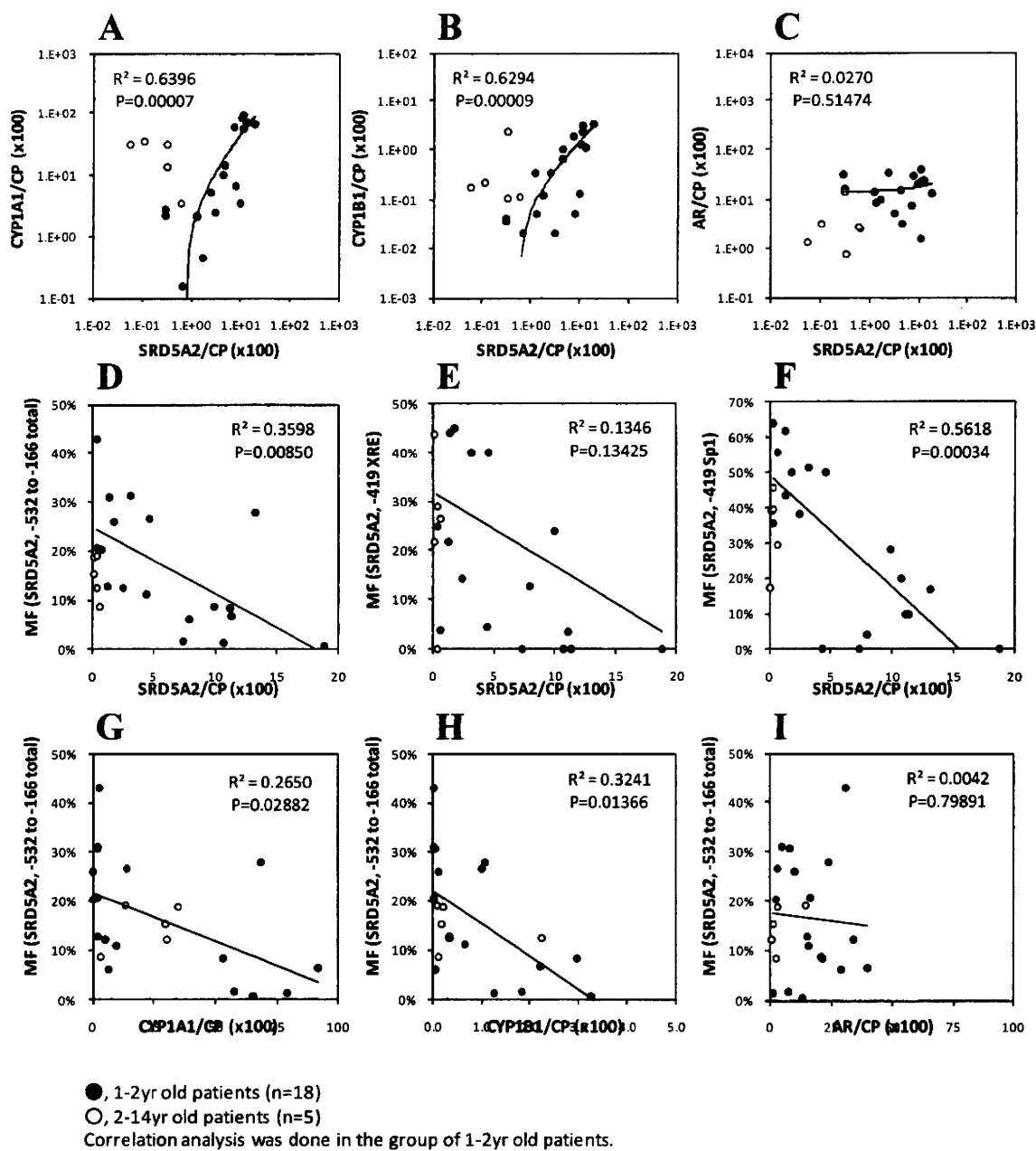


図 1. 尿道下裂患者包皮組織における遺伝子発現と SRD5A2 遺伝子プロモーターのメチル化頻度の相関解析。

## 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 1701 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。今年度は昨年度から開始した 5 歳時点での健診を継続し、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を行い、化学物質の測定のため血液検体を採取した。また、今年度は 6 歳時点の成長発育と健康に関するアンケート調査を開始した。

### 共同研究者

堀川玲子 国立成育医療研究センター内分泌科医長

内木康博 同上 医員

吉井啓介 同上 フェロー

野田雅裕 同上 フェロー

成田雅美 国立成育医療研究センターアレルギー科医員

二村昌樹 同上 医員

津村由紀 同上 フェロー

山本貴和子 同上 フェロー

正田哲雄 同上 フェロー

暴露（電磁場を発するテレビなどへの暴露時間や家庭内環境など）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。本年度は昨年度に引き続き、5 歳児のアンケート調査に加えて 5 歳健診を行った。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。さらに今年度は、6 歳に達した子どもの成長発育と健康疾病に関するアンケート調査も開始した。

### （倫理面への配慮）

参加者の個人情報が入り込まないよう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

### 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 1701 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 1 5 4 8 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。参加した母親は約2年半に亘ってリクルートされており、最初の組が昨年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、対象者の約7割であり、来年度には1000名近くに達するものと予想される。

#### 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