

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

一昨年、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陰囊皮膚組織の採取を行った。コントロールとして包茎の包皮、陰囊水腫の陰囊皮膚組織を行った。

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、一昨年、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

尿道下裂および停留精巣患者の血液を、手術目的に入院した際に、全身検索のための血液検査の際の同時に研究用血液を採取。

尿道下裂の場合、尿道形成術を施行した際の余剰包皮、停留精巣の場合、精巣固定術を施行した際の陰囊切開部をトリミングした際に得られた余剰陰囊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 100 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（龟头型、陰茎型）から遠位型（陰囊型）、停留精巣の腹腔内精巣、鼠経部停留精巣、陰囊上部停留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、包皮および陰囊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あき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

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.

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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
10. Kojima Y, Lambert SM, Steixner BL, Laryngaski N, Casale P. Multiple metachronous fibroepithelial polyps in children. *J Urol.* in press.
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.
12. Nishio H, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Kohri K, Hayashi Y. Laparoscopic nephrectomy for pelvic multicystic dysplastic kidney. *Urology*. in press.
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.
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.
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.
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.
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.
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

1. Kubota Y, Hashitani H, Kojima Y, Sasaki S, Hayase M, Suzuki H, Kohri K: Altered distribution of interstitial cells in the guinea pig bladder following bladder outlet obstruction. The 6th International Symposium on ICC, 2010.2.8–10, Miyazaki
2. Iwatsuki S, Sasaki S, Umemoto Y, Kubota H, Mizuno K, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K: Microdissection testicular sperm extraction for patients with a history of undescended testis. The 4th Greatwall International Andrology Forum, 2010.3.18–21, Shenzhen (China)
3. Umemoto Y, Sasaki S, Iwatsuki S, Mizuno K, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K: WNT5A is the mRNA carried by sperm,

- and may take part in spermatogenesis. The 4th Greatwall International Andrology Forum, 2010.3.18-21, Shenzhen (China)
4. Nakane A, Nishinakamura R, Mizuno K, Kojima Y, Maruyama T, Hayashi Y, Kohri K: PAX2 overexpression in embryoid bodies induces upregulation of Integrin $\alpha 8$ and aquaporin-1 involved in kidney development. AUA 2010 Annual Meeting, 2010.5.29-6.3, San Francisco, USA
5. Kubota Y, Kojima Y, Hayase M, Sasaki S, Kohri K: A kit ligand, stem cell factor as a possible mediator inducing overactive bladder. AUA 2010 Annual Meeting, 2010.5.29-6.3, San Francisco, USA
6. Kurokawa S, Kojima Y, Mizuno K, Kamisawa H, Nakane A, Hayashi Y, Kohri K: Prolactin-Induced Protein(PIP) gene associated with the prepuce development of hypospadias. AUA 2010 Annual Meeting, 2010.5.29-6.3, San Francisco, USA
7. Kojima Y, Sasaki S, Kubota Y, Hayashi Y, Kohri K: Correlation between expression of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtype mRNA and severity of lower urinary tract symptoms or bladder outlet obstruction in benign prostatic hyperplasia patients. AUA 2010 Annual Meeting, 2010.5.29-6.3, San Francisco, USA
8. Kojima Y, Sasaki S, Imura M, Hayashi Y, Kohri K: Change of expression levels of $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes by administration of subtype-selective $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonist tamsulosin in benign prostatic hyperplasia patients. AUA 2010 Annual Meeting, 2010.5.29-6.3, San Francisco, USA
9. Sasaki S, Kojima Y, Okada S, Shibata Y, Imura M, Hayase M, Kubota Y: Attenuation of the bladder overactivity in kit(WS/WS) mutant rats. AUA 2010 Annual Meeting, 2010.5.29-6.3, San Francisco, USA
10. Kato T, Kojima Y, Kamisawa H, Mizuno K, Kohri K, Hahashi Y: Effective use of abdominal ultrasound and MRI for the preoperative diagnosis of nonpalpable testes in the different locations. 1st World Congress of Pediatric Urology, 2010.5.27-5.30, San Francisco, USA
11. Iwatsuki S, Kojima Y, Mizuno K, Umemoto Y, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K: Testicular dysgenesis syndrome of children — Prediction of testicular function of pubertal boys with the history of cryptorchidism and/or hypospadias. 1st World Congress of Pediatric Urology, 2010.5.27-5.30, San Francisco, USA
12. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Iwatsuki S, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K: The impact of the genes associated with differential expression in the testis of 46,XX testicular DSD on spermatogenesis. 1st World Congress of Pediatric Urology, 2010.5.27-5.30, San Francisco, USA
13. Kojima Y, Shibata Y, Imura M, Hayase 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. Annual Meeting of the International Continence Society, 2010.8.23-27, Toronto(Canada)
14. Sasaki S, Kojima Y, Kubota Y, Okada S, Imura M, Hayase M, Shibata Y, Hamakawa T, Kohri K: Attenuation of bladder overactivity in kit (WS/ WS)mutant rats. Annual Meeting of the International Continence Society, 2010.8.23-27, Toronto(Canada)
15. Shibata Y, Kojima Y, Hamakawa T, Imura M, Hayase M, Kubota Y, Ueda T, Sasaki S, Ugawa S, Kohri K: Convergence of bladder and skin primary sensory neuron expressing TRPM8. Annual Meeting of the International Continence Society, 2010.8.23-27, Toronto(Canada)
16. Kojima Y: Laparoscopic management of nonpalpable testis: Benefits new treatment strategy. 28th World Congress on Endourology and SWL, 2010.8.31-9.4, Chicago (USA)
17. Hayashi Y, Mizuno K, Nishio H, Kamisawa H, Kojima Y, Kohri K: Characterization of the urethral plate and the underlying tissue in hypospadias with transmission electron microscopy and expression of collagen subtypes. 23rd International Symposium on Paediatric Surgical Research, 2010.9.12-14, Tokyo
18. Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K: Disturbance of testicular development during testicular tubule formation causes vanishing testis. 23rd

International Symposium on Paediatric Surgical Research,

2010.9.12-14, Tokyo

19. Hayashi Y, Imura M, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y,
Kohri K: Evaluation of long-term functional outcome with
uroflowmetry after proximal hypospadias repair; Original
Koyanagi repair vs modified Koyanagi repair. 23rd
International Symposium on Paediatric Surgical Research,
2010.9.12-14, Tokyo

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 独立行政法人 国立環境研究所 主任研究員 曾根秀子

研究要旨

昨年度に引き続き、日本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 248 名、正常者 141 名の 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。疾患と正常者における SNP 頻度について関連解析を行った結果、最も有意な差（ $P < 0.01$ ）が認められたのは、停留精巣では ARNT2 と CYP17A1 であり、尿道下裂では ARNT2 と CYP1A2 であり、マイクロペニスでは CYP1A2 のみであった。これらの疾患による遺伝子の多型の違いは、病態の進展時期との関連性があるものと示唆される。

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（表 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。本年度は、日本人を追加してこれまでのデータと統合し、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。

C. 研究結果

χ^2 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。

D. 考察

今年度は、日本人サンプルを増やして、SNP解析を行った。特に、停留精巣116名と尿道下裂98名は、100名前後となり、正常者141名と比較して、統計解析の信頼性が増したものと考えられた。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。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。

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。

今後、緒方らが発見したESR1及びESR2ハプロタイプとの関連解析を行い、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1SNPとの協働で化学物質の感受性が変化するかどうか確かめる必要があると考えられる。

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、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1の3個の遺伝子が疾患の発症や病態の進展に深く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. Sone H, Akanuma H, Fukuda T. Oxygenomics in environmental stress. Redox Rep. 2010;15(3):98-114.
2. Mitsuhashi 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.
3. 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.

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

○4. 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.

○5. 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.

6. 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.

○7. 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.

○8. 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.

9. 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.

○10. 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.

2. 学会発表

1. 赤沼宏美、永野麗子、座波ひろ子、大迫誠一郎、曾根秀子。胎生プログラミング異常を検出するためのマルチプロファイリング技術の確立（第13回環境ホルモン学会 12月、東京）
2. 大迫 誠一郎、永野 麗子、何 小明、今西 哲、藤 渕 航、赤沼 宏美、曾根 秀子。マウスおよびヒト ES 細胞を用いた神経分化培養系におけるメチル水銀の毒性影響評価（第13回環境ホルモン学会 12月、東京）
3. Hideko Sone, Hiromi Akanuma, Masahiro Okura, Hiroko Zaha, Wataru Fujibuchi, Takeaki Taniguchi, Rieko Nagano, Seiichiroh Ohsako. Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and phenotype information by using Bayesian networks. (CBI2010, 9月、東京)
4. Hiromi Akanuma, Hideko Sone, Masahiro Okura, Hiroko Zaha, Wataru Fujibuchi, Takeaki Taniguchi. Multi-profiling analysis of chemical effects with gene expression and toxicity information by using O-PLS (CBRC2010, 9月、東京)
5. 何小明、永野麗子、赤沼宏美、座波ひろ子、遠山千春、曾根秀子、大迫誠一郎。マウス ES 細胞を用いた神経分化系におけるメチル水銀の毒性影響評価（第37回日本トキシコロジー学会、6月、沖縄）
6. 永野麗子、何小明、横山雅美、赤沼宏美、座波ひろ子、末盛博文、大迫誠一郎、曾根秀子。マウスおよびヒト ES 細胞の神経分化系を用いたサリドマイドの影響についての研究（第37回日本トキシコロジー学会、6月、沖縄）
7. 秦成陽、座波ひろ子、永野麗子、吉永淳、米元純三、曾根秀子。男児生殖疾患感受性遺伝子 ARNT2 とエストロゲン様内分泌かく乱物質との関連（第80回日本衛生学会学術総会 5月、仙台）

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

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

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 今回測定した SNP の遺伝子の一覧

遺伝子通称	遺伝子名	染色体位置	配列ID	測定SNP数	測定tgSNP数
AHR	aryl hydrocarbon receptor	7p15	L19872, NM_001621	17	10
ARNT2	aryl- hydrocarbon receptor nuclear translocator	15q24	AB002305	69	32
CYP17A1	cytochrome P450, family 17, sub family A, polypeptide 1	10q24.3	M19489, NM_000102	18	4
CYP1A2	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	15q24.1	AF182274, NM_000761	10	2
NR1I2 (PXR)	nuclear receptor sub family 1, group 1, member 2	3q12-q13.3	AF061056	21	14

表2 有意が認められた SNP の P 値 (0.01 以下を記載)

Name	Chr	Gene	停留精巣	尿道下裂	マイクロペニス
rs12242445	10	CYP17A1		0.0407581	
rs4919686	10	CYP17A1	0.01141		
rs2069521	15	CYP1A2		2.29373E-06	0.0315449
rs2069522	15	CYP1A2			0.0138721
rs2069526	15	CYP1A2			0.0138721
rs2278705	15	CYP1A2		0.000392553	
rs4646425	15	CYP1A2			0.00557494
rs4646427	15	CYP1A2		0.0432483	0.00442666
rs5000770	15	ARNT2	0.000731	6.20767E-05	0.0123028
rs762551	15	ARNT2			0.0119836
rs8041826	15	ARNT2		0.00760269	

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行った。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が、組換え ES 細胞由来の子マウスを得るには至らなかった。ヒト感受性ハプロタイプ領域を組み込んだことにより、正常な個体発生ができなくなっている等の可能性が考えられる。

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。

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

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なかった。

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。これらのESクローンを用いてキメラマウスの作製を行ったが、やはりキメラ率が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。

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. BRACHYURY REPRESSES MESP2 EXPRESSION IN MOUSE TAILBUD IN SOMITEGENESIS. Yukuto

Yasuhiko, Jun Kanno and Yumiko Saga

コールドスプリングハーバー研究所学術会議、Mouse Development, Genetics and Genomics. (New York)

2-2. Segmentation and rostro-caudal patterning of somites is not essential for vertebral body segmentation
Yu Takahashi, Yukuto Yasuhiko, Yumiko Saga and Jun Kanno

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同学会(神戸市)

2-3. The presomitic mesoderm (PSM) specific enhancers of *Mesp* genes are divergent in their nucleotide sequences between mouse and fish, but both are regulated by T-box transcription factors. Yukuto Yasuhiko, Jun Kanno and Yumiko Saga

キーストーン学術集会、Evolutionary Developmental Biology. (Tahoe City, USA)

(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

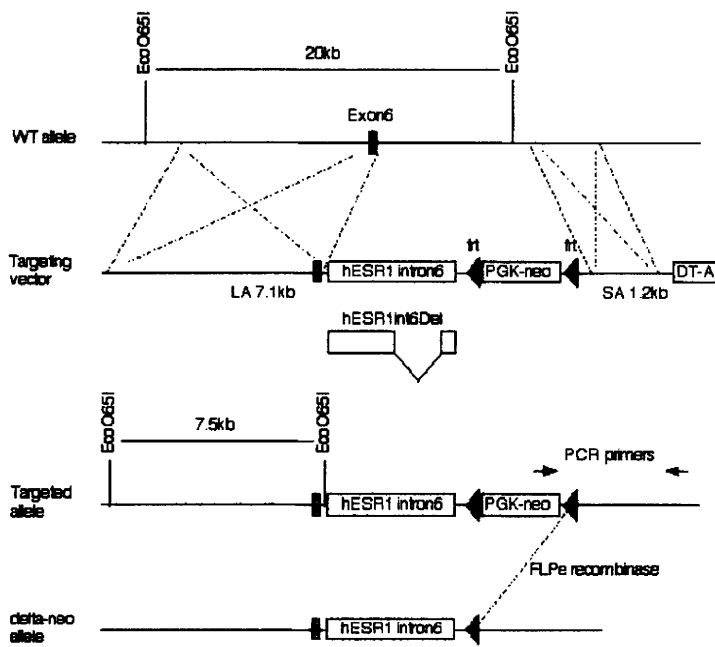
2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

Targeting strategy for hESR1int6 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 東京大学 新領域創成科学研究科 准教授 吉永 淳

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 19 物質の定量方法を確認した。胎児のエストロゲン様物質、抗アンドロゲン物質の曝露評価を、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。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およびそれを疫学研究に適用する際の精度管理について検討を行った。

尿分析は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 Quattro 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-ハイドロキシル)	エストロゲン様?	LC/FL
パラベン	パラベン種類、代謝産物種類	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

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

る物質群である。これらの物質の代謝産物計 19 物質を測定対象として設定した。

これらの測定対象物質について、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	0.022	5.9	95
1-OHP	0.0034	6.1	105±6
メチルパラベン	0.36	6.9	113
エチルパラベン	0.32	6.8	106
プロピルパラベン	0.33	3.8	95
ブチルパラベン	0.28	6.1	113
PHBA	0.36	2.9	96
ダイゼイン	8.2	2.7	92±7
イクォール	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-ブチル; 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-オキシヘキシル)、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(ヒレスロイト)系殺虫剤代謝産物。1-OHP, 1-ヒドロキシピレン PAH(ピレン)代謝産物。PHBA, パラヒドロキシ安息香酸(パラベン)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気中・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否かの検討をした。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。

疫学調査においては対象者数（=尿サンプル数）が多数となるため、長期間にわたる測定が必要となるのが普通である。日々の装置や分析の安定性を担保し、どの日に測定した値もお互いに比較可能であることを示すために、分析の精度管理がきわめて重要である。精度管理には、毎回の測定に常に同じ尿サンプルを分析して、測定値が一定であることを示すことが一般的である。そこで実験室内で共通して測定する「精度管理尿」を、複数人の尿を混合して作成し、その管理限界を決定して、精度管理を行なう手法を確立した。

精度管理尿について予め集約的な分析を行ってそのばらつきから管理限界（±3σ）、警告限界（±2σ）を求める。日常分析に精度管理尿を加え、毎回の測定値が管理/警告限界内に収まることを確認しながら進める、というものである。図 1 に例を示した。

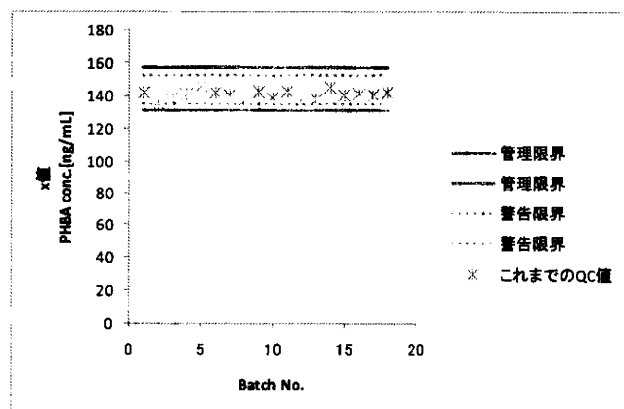


図 1 PHBA の精度管理を示す X 管理図

このように精度について管理をされた状況で、保存されていた妊婦尿サンプル（149 試料）の分析を行った。測定対象としたのは表 2 のうち、ピレスロイド代謝産物とコチニン以外の 17 物質である。

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
メチルパラベン(n=95)	178
エチルパラベン(n=95)	52
プロピルパラベン(n=95)	116
ブチルパラベン(n=95)	5.7
PHBA(n=95)	746
ダイゼイン(n=111)	1140
エクオール(n=111)	160

* 中央値を示した。

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。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 にしめした 19 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

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

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.

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.

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

M. Niwa, Y. Suzuki, J. Yoshinaga, C. Watanabe, Y. Mizumoto (in press) Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and birth outcomes. *Polycyclic Aromatic Compounds*

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

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およびイソフラボン曝露による男児生殖器系への影響」第80回日本衛生学会総会、2010年5月9-11日、仙台

Yayoi Suzuki, Jun Yoshinaga, Yoshifumi Mizumoto, Shigeko Serizawa, Hiroaki Shiraishi "Effect of fetal exposure to phthalate esters on the development of human male reproductive system" Third International WHO Conference on Children's Health and the Environment, 7-10 June 2009, Korea

Yayoi Suzuki, Jun Yoshinaga, Yoshifumi Mizumoto, Shigeko Serizawa, Hiroaki Shiraishi "Prenatal exposure to phthalate esters and isoflavones in human male newborns" Gordon Research Conference on Environmental Endocrine Disruptors, 30 May - 4 June, 2010 Switzerland

Yayoi Suzuki, Jun Yoshinaga, Yoshifumi Mizumoto, Shigeko Serizawa, Hiroaki Shiraishi "Prenatal exposure to soy isoflavones and anogenital distance in male newborns" 2010 Joint Conference of International Society of Exposure Science & International Society for Environmental Epidemiology, 28 August - 1 September 2010 Korea

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

研究分担者 緒方勤 国立成育医療研究センター研究所 部長

研究要旨

われわれは、ヒト尿道下裂発症責任遺伝子 MAMLD1 のノックダウン実験および in silico 解析から、MAMLD1 がダイオキシン暴露と男性ホルモン産生低下をリンクさせる分子であることを世界で初めて見いだした。そして、胎児期ダイオキシン暴露実験を野生型マウスと MAMLD1 ノックアウトマウスで行い、その解析を開始した。

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。われわれは、内分泌攪乱化学物質にたいする感受性解析を行い、エストロゲン受容体遺伝子や男性ホルモン産生関連遺伝子と共に、研究分担者の曽根と共同でダイオキシン関連遺伝子においても有意な感受性多型・ハプロタイプを同定してきた。そして、研究班においてその機能解析を進めている。

もう一つの重要なアプローチは、内分泌攪乱化学物質の暴露により、実際に標的遺伝子の発現が変動するか否か、および、メチル化などのエピジェネティックな変化が生じているか否かの解析である。このためには、当該標的遺伝子が発現している組織を用いた発現解析やエピジェネティック解析が必要となる。しかし、ヒトにおいては、外陰部皮膚については手術時に入手かのであるものの、精巣組織の入手は現実的に不可能である。

このためには、マウスを用いた胎児期暴露実験が有効である。われわれは、このために、われわれが2006年に発見したヒト尿道下裂発症責任遺伝子 MAMLD1 およびそのマウスホモログに着目して解析を行った。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。

B. 研究方法

（倫理面への配慮）

ヒトを対象とする研究においては、全例、倫理委員会承認の下に、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、書面による同意を得た後に実施した。動物実験については、国立成育医療研究センターの規定に従って実施した。

C. 研究結果

1) Mamld1 遺伝子ノックダウン実験：
MAMLD1/Mamld1 が想定されるようにテストステロン産生に関わるか否かを明らかにするために、siRNAを用いた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った。その結果、Mamld1 遺伝子ノックダウンにより、テストステロンが低下し、そのホルモン低下が17 α 水酸化酵素の活性低下によることが示された(図1)。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 α 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が示された(図2)。

2) MAMLD1 遺伝子プロモーター領域の解析：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ー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が示された(図3)。

3) 胎児期ダイオキシン暴露マウスの作成: 研究分担者の大迫と共同で、これを行い、精巢のサンプリングを終了し、Mam1d1 ならびにテストステロン産生酵素遺伝子の発現量とメチル化解析を開始している。

4) Mam1d1 遺伝子ノックアウトマウスの作製と解析: われわれは、このマウスの作製に成功し、本年度5世代目となり、解析可能な状態となった。その結果、ヒトと異なり、ノックアウトマウスは外陰部異常所見を呈さなかった(図4)。しかし、精巢は有意に小さかった。現在、上記の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、Mam1d1 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。

D. 考察

以上の成績は、以下のことを示唆するものである。1) われわれが同定した尿道下裂責任遺伝子 MAMLD1 は、テストステロン産生に関与する。2) MAMLD1 は、CYP17A1 発現を特異的調節する。3) MAMLD1 は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。したがって、本研究は、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。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。

E. 結論

われわれは、ヒト尿道下裂発症責任遺伝子 MAMLD1 のノックダウン実験および in silico 解析から、MAMLD1 がダイオキシン暴露と男性ホルモン産生低下をリンクさせる分子であることを世界で初めて見いだした。そして、胎児期ダイオキシン暴露実験を野生型マウスと MAMLD1 ノックアウトマウスで行い、その解析を開始した。

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 α -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*: *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS ONE* (submitted).
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
該当なし

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

2. 実用新案登録
該当なし
3. その他

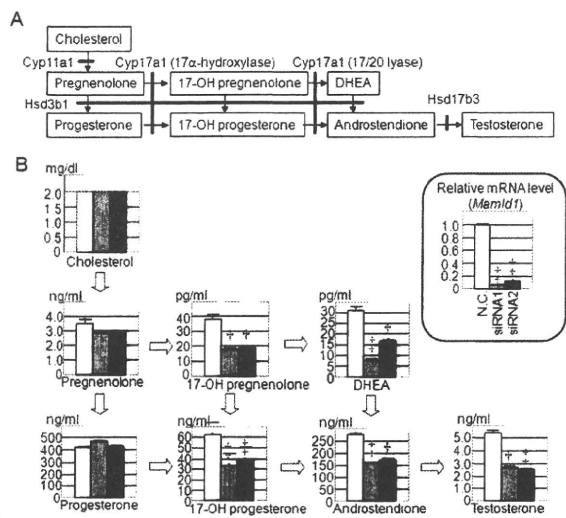


図 1. MAMLD1 ノックダウン時の男性ホルモン産生経路の中間代謝産物濃度

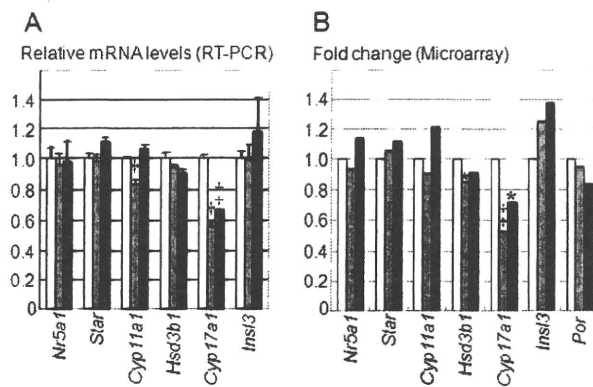


図 2. MAMLD1 ノックダウン時の男性ホルモン産生酵素遺伝子の発現量

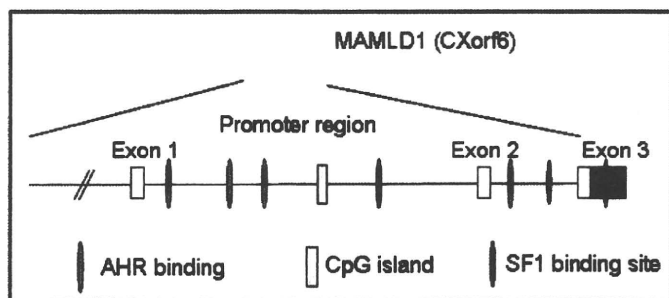


図 3. MAMLD1 プロモーター領域の構造。

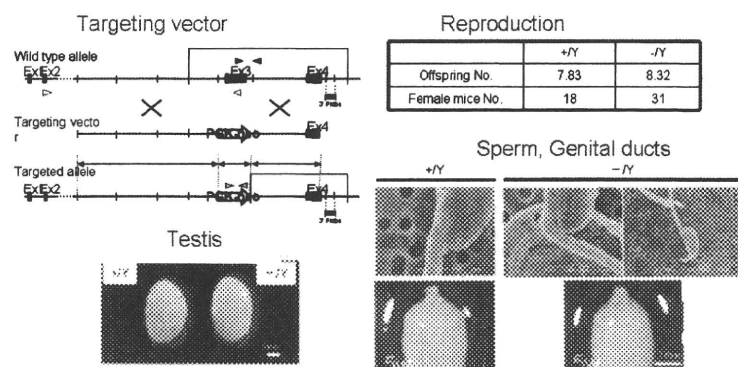


図 4. Mamald1 ノックアウトマウスの作製と表現型解析。