

課題名 C-0905 小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備

課題代表者名 緒方 勤 (浜松医科大学医学部小児科 教授、
独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
分子内分泌研究部 客員部長)

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 47,599千円(うち23年度 15,299千円)
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) バイオマーカーの開発に関する研究((独)国立成育医療研究センター研究所、(独)国立環境研究所、
浜松医科大学大学)
- (2) 臍帯血・胎盤バンクシステムに関する研究
((独)国立成育医療研究センター研究所、(独)国立環境研究所、
浜松医科大学大学)

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

近年、停留精巣や尿道下裂などの先天奇形が増加しているという疫学的データが日本や欧米諸国から報告され、大きな社会的問題となっている。同様の現象は、成人における精子形成障害や精巣腫瘍、および、多くの野生動物でも観察されている。そして、これらの現象に共通する原因として、内分泌攪乱物質の影響が推測されている。特に、大部分の内分泌攪乱化学物質が有する女性ホルモン効果は、このような男性化障害を生じる重要な原因の1つであると推測される。さらに、内分泌攪乱物質として作用する環境化学物質の生産量・排出量は、近年増加している。したがって近年の小児は、暴露量の観点から、成人よりも高いリスクに曝されていると推測される。

われわれは、このような先天異常の発症が、内分泌攪乱物質の暴露量や暴露時期の他に、個体の遺伝的感受性にも支配されるという作業仮説のもとに、研究を行っており、最も重要な成果は、エストロゲン受容体 α 遺伝子(ESR1)のハプロタイプ解析で得られた。遺伝因子と環境因子の相互作用で出現する表現型を適切に解析するためには、同一集団において両者を解析することが重要である。

以上のことから、小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備には、バイオマーカーの開発と臍帯血・胎盤バンクシステムの構築が重要であると考えられる。

2. 研究開発目的

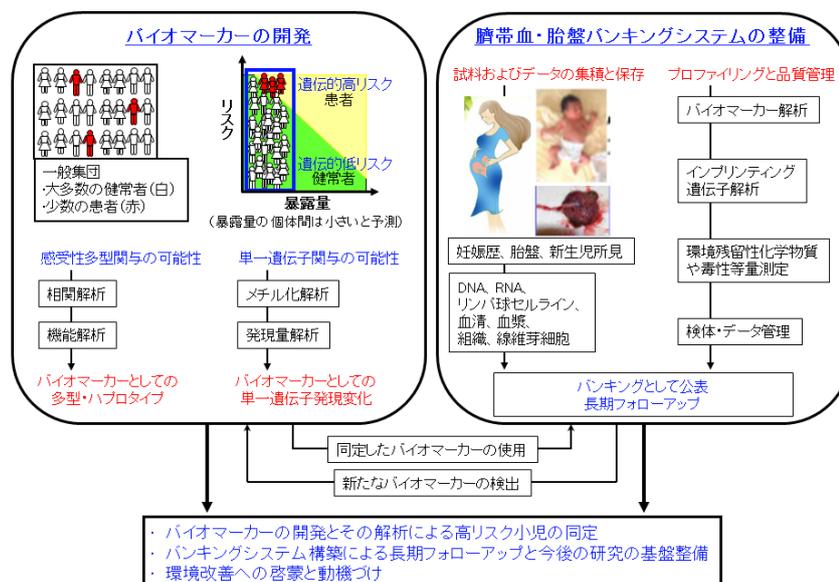


図1 小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備の背景

本研究は、尿道下裂などの小児先天奇形発症を対象とする環境リスク評価法の基盤整備を行うことを目的とする。このために、評価法の指標となるバイオマーカーの開発、および、環境リスク研究に広く貢献できる臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備を行う。バイオマーカーとしては、相関解析および機能解析で有意と判定された遺伝子多型・ハプロタイプ、および、疾患責任遺伝子のメチル化パターンや発現量を用いる。臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備では、分子生物学的解析試料と暴露量測定試料の両者を対象とする。そして、連結可能匿名化の臨床情報を採取、またバイオマーカーとして使用する多型・ハプロタイプの頻度や疾患責任遺伝子の発現量などのプロファイリングを行った後に試料をバンキングし、長期フォローアップを可能とすると共に、今後の遺伝-環境相互作用や遺伝子間相互作用の研究のために役立てることを目標とする。

3. 研究開発の方法

(1) バイオマーカーの開発に関する研究

1) エストロゲン受容体 α 遺伝子(ESR1)に関する研究

ESR1遺伝子における微小欠失がエストロゲン効果を増強する機序を解明する。このため、この欠失が、同領域に存在する抑制型マイクロRNAを消失させている可能性、スプライスの量的変化により正常エストロゲン受容体を多く産生している可能性、メッセンジャーRNAの安定化を招いている可能性について解析する。この微小欠失の*in vivo*機能解析を進めるため、ノックインマウスの作製に着手する。

2) エストロゲン受容体 β 遺伝子(ESR2)に関する研究

対象は、日本人精子形成障害患者および妊よう性の確認された日本人成人男性とした。症例は、正常男性核型、非閉塞性無精子症、生殖器および生殖器外の合併奇形なし、Y染色体長腕の微小欠失なし、特別な環境要因なし、という条件を満足した。

SNP解析は、全120 kb(ESR2遺伝子プロモーター領域50 kbを含む)に、8.2kbから17.7kb間隔で分布する9つをTaqMan法で解析する。解析対象SNPは、データベースに登録されているSNPから、tag SNPを含み、ESR2遺伝子上にほぼ等間隔に分布するSNPのうち、日本人におけるマイナーアレル頻度が15%以上のものを選択する。

3) 男児生殖器疾患における環境化学物質感受性バイオマーカーの開発に関する研究

数理的および作用機序から男児外陰部異常症発症に関連しうる遺伝子を網羅的にピックアップし、HapMapプロジェクトを基にSNPおよびハプロタイプ関連解析を行う。また、見いだされた多型・ハプロタイプの機能解析、異なる人種間における比較を行う。また、外陰部皮膚線維芽細胞を用いた*in vitro*におけるbisphenol-A (BPA)、estradioil (E2)、TCDDの暴露実験を行う。

4) 単一遺伝子におけるメチル化パターンと発現量変化の同定に関する研究

環境化学物質はエピジェネティック修飾を介して遺伝子発現を抑制し、疾患発症を招く可能性がある。これは、当該遺伝子が発現し、作用している組織を用いなければ解析できない。本研究では、男児外陰部異常症(停留精巣や尿道下裂患者の手術時外陰部皮膚検体)の治療目的で手術を受けた患者から組織を入手し、メチル化パターンと発現量を解析する。

また、ヒトでは臨床的に容易に採取できない性腺を用いて、環境化学物質暴露効果の指標となるバイオマーカーを同定するために、TCDDをマウスに暴露して解析を行う。妊娠マウス(妊娠12.5日目)にTCDDを投与し、出生翌日の精巣における遺伝子発現量の変動を調べる。

5) 口蓋裂発症因子に関する研究

口蓋裂は、環境化学物質暴露との関係が危惧される疾患の一つである。この研究体制の構築ならびに検体集積を行う。

6) ESR1陽性細胞株を用いたバイオマーカーの探索に関する研究

ESR1陽性ヒト乳癌細胞株(MCF-7細胞)、ESR1陽性ヒト卵巣癌細胞株(BG1Luc4E2細胞)およびERs-陰性ヒト前立腺癌細胞株(LNCaP細胞)を用いた*in vitro*におけるBPA、BBP、o, p'-DDTとE2の暴露実験を行う。

(2) 臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備に関する研究

1) 試料およびデータの集積と保存に関する研究

分子生物学的な解析試料として、臍帯血・胎盤からDNA採取、RNA採取、不死化リンパ球作製を行う。また、可能な限り、母親あるいは両親の末梢血からDNA採取、RNA採取、不死化リンパ球作製を行う。暴露量

測定試料を用いて、ビスフェノールやダイオキシンなど代表的化学物質を測定すると共に、残りを凍結保存する。臨床情報として、食事内容、生活環境など詳細な妊娠歴を成育コホート方式に従い記録し、ある程度の暴露量を把握する。また、出生後の新生児所見、臍帯・胎盤所見を連結可能匿名化で記録する。これにより、下記のプロファイリングデータおよび将来のデータとの対応、および、長期フォローアップを可能とする。

2) 保存試料のプロファイリングと品質管理に関する研究

バイオマーカーとして使用する多型・ハプロタイプの頻度や疾患責任遺伝子の発現量などのプロファイリングを行い、データベースとして保存し、今後の遺伝-環境相互作用や遺伝子間相互作用の研究のために公開する。さらに、品質管理は、インプリンティング遺伝子のメチル化パターンと発現量を解析することで実施する。また、環境残留性化学物質の測定やエストロゲン活性およびアリアルハイドロカーボン活性などを指標にした毒性等量の測定を行う。

3) 少量サンプル解析のパイロットスタディに関する研究

特殊血液保存用紙(カード)であるFTA Elute(GE Healthcare)とFTA(GE Healthcare)を用いて血液を保存する。その後、FTA EluteカードからゲノムDNAを抽出してPCRを行い、ゲノムDNA回収量およびPCR産物の濃度より増幅効率を算出する。さらに、これらのサンプルが、SNP解析に利用できるかを検討する。

4. 結果及び考察

(1) バイオマーカーの開発に関する研究

1) エストロゲン受容体 α 遺伝子(ESR1)に関する研究

ESR1の特定ハプロタイプが停留精巣と尿道下裂の強い感受性因子であり、その本態が感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す2,244 bpの微細欠失であることを見いだした。

詳細は、ESR1ハプロタイプ解析の結果、ESR1遺伝子の3'領域に約50 kbの連鎖不平衡領域のAGATA特定ハプロタイプが存在し、このブロック内のAGATA特定ハプロタイプが、停留精巣と尿道下裂の強い感受性因子であることを明らかにしたことである。さらに、近年の暴露量増加を反映して、この感受性因子を有する男児が成人男性よりも高リスクにあることを見いだした。また、このデータがイタリア人においても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。さらに、世代間の頻度解析から、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。ESR1の発現は外陰部皮膚由来の線維芽細胞および血液由来の不活化リンパ球細胞で低いため、この微小欠失の相同領域ノックインマウスを作製し、*in vivo*における機能解析を進めた。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。

2) エストロゲン受容体 β 遺伝子(ESR2)に関する研究

日本人精子形成障害患者と妊よう性陽性男性におけるハプロタイプ関連解析から、ESR2遺伝子の中央から3'領域に存在する約40 kbの連鎖不平衡領域のTGTAGA特定ハプロタイプが、精子形成障害の感受性であることを見いだした。

3) 男児生殖器疾患における環境化学物質感受性バイオマーカーの開発に関する研究

これまでの研究から、AHR、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1、および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る。日本人について患者248名(停留精巣116名、尿道下裂98名およびマイクロペニス34名)および正常者141名について、前記の5遺伝子とその関連性を調べた。

その結果、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およびARNT2 rs5000770を検出したが、尿道下裂では、CYP1A2 rs2069521およびARNT2 rs2278705、rs5000770が検出され、CYP17A1のSNPは検出されなかった。さらに、ARNT2 rs5000770は、停留精巣においても検出された。

日本人およびイタリア人男児集団において、HapMapデータをもとに、男性ホルモン効果関連遺伝子群やダイオキシン関連遺伝子を主とする96個のtag SNPの相関解析を行った。その結果、男性ホルモン産生酵素であるCYP17A1、ダイオキシンシグナル伝達に関わるAHRとARNT2、bisphenol-A受容体とされるNR1I2における多型が、男児外陰部異常症と関連していることを見いだした。さらに、日本人とイタリア人に共通する感受性SNPがAHRで2個、ARNT2で2個、NR1I2で4個検出された。

さらに、外陰部皮膚線維芽細胞を用いた*in vitro*におけるbisphenol-A (BPA)、estradiol (E2)、TCDD暴露実験は、DMSO暴露を比較対照として行い、各群1.2倍以上の発現変化が見られた遺伝子の抽出を行った。その結果、BPA暴露では71遺伝子(42発現減少と29発現上昇)、E2暴露では814遺伝子(371発現減少と443発現上昇)、TCDD暴露では824遺伝子(344発現減少と480発現上昇)の発現変化を見いだした。これ

らについて、さらに化学物質に特異的、あるいは共通の遺伝子を調べると、BPA特異的応答は43遺伝子、E2と共通な遺伝子は17個、TCDDと共通な遺伝子は10個であった。

4) 単一遺伝子におけるメチル化パターンと発現量変化の同定に関する研究

停留精巣や尿道下裂患者の手術時外陰部皮膚検体を用いて解析した。外陰部男性化に必須であるジドロテストステロン産生を担い、外陰部皮膚組織において発現していることが知られているARとSRD5A2遺伝子について解析を行った。ARおよびSRD5A2の遺伝子は、内部標準としてCP遺伝子の発現量で補正を行い、それぞれの遺伝子の発現量とした。外陰部皮膚で発現しているARとSRD5A2のプロモーター領域において、過剰メチル化が少数の患者で認められた。尿道下裂患者のSRD5A2遺伝子のメチル化頻度とSRD5A2遺伝子発現量との相関関係をみたところ、有意に逆相関($P=0.0085$)することが示された。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遺伝子発現量との間には、各々有意な負の相関関係があることを見いだした。

つぎに、尿道下裂患者の外陰部皮膚検体を用いて、埋没陰茎の外陰部皮膚検体を比較対照とし、1.2倍以上の発現変化が見られた遺伝子の抽出を行った。その結果、尿道下裂患者の外陰部皮膚検体は、埋没陰茎の外陰部皮膚検体に比べて、1,066遺伝子(370発現減少と696発現上昇)の発現変化を見いだした。

ヒトでは臨床的に容易に採取できない性腺を用いて、環境化学物質暴露効果の指標となるバイオマーカーを同定するために、TCDDをマウスに暴露して解析を行った。妊娠マウス(妊娠12.5日目)にTCDDを1回投与し、出生翌日の精巣を摘出した。摘出した精巣からtotal RNAを抽出後、リアルタイムRT-PCRにより遺伝子発現を解析した。その結果、男性ホルモン産生酵素であるCyp17a1遺伝子の発現減少など、多数の遺伝子発現量に変動していることが明らかとなった。

5) 口蓋裂発症因子に関する研究

口蓋裂は、単一遺伝子疾患としても発症するが、多因子疾患としても発症する。特に、近年種々の感受性因子が同定され、さらに、TCDD暴露が口蓋裂発症を招くことがマウス暴露実験から知られている。したがって、TCDD感受性が高い個体において、口蓋裂が発症しやすいことが推測される。また、外陰部異常症と同様、口蓋組織におけるメチル化(エピジェネティック修飾)が口蓋裂の発症に関与している可能性が推測される。

われわれは、この仮説を検討するため、口蓋裂患者の血液および手術時の口蓋組織(皮膚線維芽細胞)の集積を開始し、現在、60例の検体を集積した。感受性因子については、45例以上集積できれば、SNPのみならずハプロタイプを用いた関連解析が可能であり、さらにエピジェネティック解析について随時進めている。これにより、口蓋裂発症と環境化学物質の関連性を解明したいと考えている。

6) ESR1陽性細胞株を用いたバイオマーカーの探索に関する研究

ESR1陽性および陰性のヒト細胞株を用いて、ARNT2遺伝子の発現がESR1に依存しているかどうかを調べた。ESR1陽性ヒト乳癌細胞株(MCF-7細胞)、ヒト卵巣癌細胞株(BG1Luc4E2細胞)およびERs-陰性ヒト前立腺癌細胞株(LNCaP細胞)を用いて、BPA、BBP、o, p'-DDTとE2の暴露実験を行い、リアルタイムRT-PCRによりARNT2遺伝子の発現を解析した。その結果、BPA、BBPおよびo, p'-DDTの暴露は、ESR1陽性株(MCF-7およびBG1Luc4E2E2細胞)において、有意にかつ用量依存的にARNT2遺伝子の発現を抑制し、ERs-陰性株(LNCaP細胞)においてARNT2遺伝子の発現に影響を与えなかった。

(2) 臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備に関する研究

1) 試料およびデータの集積と保存に関する研究

正常児における臍帯血・胎盤の使用およびバンキングを行った。

これまでに、DNA・リンパ球セルライン検体として、臍帯血1,200、胎盤67、精子形成障害患者150、尿道下裂・停留精巣患者350、早発性卵巣機能不全患者120、口蓋裂患者60例分を集積した。また、組織検体として、胎盤67、尿道下裂・停留精巣患者の外陰部皮膚350、口蓋裂患者の口腔粘膜60例分を集積した。

2) 保存試料のプロファイリングと品質管理に関する研究

胎盤・臍帯血を用いた発現解析やメチル化解析を種々の遺伝子やインプリンティング遺伝子を対象として行った。その結果、新鮮な胎盤では、種々の遺伝子やインプリンティング遺伝子を対象とする遺伝子発現解析やメチル化解析などの様々な解析が可能であること、また、ホルマリン処理したパラフィンブロック中に保存された胎盤をもちいた場合でも、200 bp以下のPCR産物は比較的容易に得られ、メチル化解析も可能であることが判明した。

3) 少量サンプル解析のパイロットスタディに関する研究

FTA Eluteカードを用いて保存した血液からDNA抽出方法を検討したところ、ボルテックスやピペティングの作業を追加することにより、ゲノムDNAの回収量が増加した。

FTAカードで保存した血液から、Protenase K処理の工程を加えて抽出した1.6 ngのゲノムDNAを用いた場合、SNP解析成功率は98 %であった。また、FTA Eluteカードで保存した血液から、Protenase K処理の工程を加えて抽出した5.4 ngのゲノムDNAを用いた場合、SNP解析成功率は100 %であった。カードで保存した微量な血液は、Protenase K処理の工程を加えてゲノムDNAを抽出する方法を用いた場合、SNP解析に使用できるゲノムDNAを得ることが可能な検体であることが明らかとなった。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究は、内分泌攪乱化学物質にたいして遺伝的に脆弱な個体が存在すること、また、高感受性個体が先天奇形を発症するリスクが暴露量と比例して増加することを示している内容である。したがって、小児などの化学物質に脆弱な集団にたいする保護の必要性を再確認した国際化学物質管理会議の趣旨に沿い、2020年までに化学物質の健康や環境への影響を最小限にするという目標を実現化に寄与するものである。このような成果は、一般集団の啓蒙や法令を作成する上においても、重要な役割を果たすと期待され、最終的に高リスク個体(感受性因子陽性小児)を保護する暴露量の推定に結びつくと思われる。

また、本研究は、先天奇形のなかでも尿道下裂など、生殖と密接に関連する領域の研究であり、少子化対策の観点から、強いインパクトを持つと考えられる。内因性疾患感受性研究の促進では、エストロゲン受容体における感受性因子の同定は、内分泌攪乱物質反応性のみならず、思春期成長障害、骨そしょう症、更年期うつ病、乳癌、高血圧など、内因性エストロゲン効果関連疾患の発症機序解明に貢献する。他の環境化学物質関連疾患の感受性因子同定の促進では、精神発達障害、発癌性、催奇形性など、環境化学物質との関連が危惧される疾患の発症機序解明を促進する。

さらに、本研究は、大きな社会的および学術的関心を呼び、高いインパクトファクターの雑誌における掲載や高いサイテーションインデックスを獲得すると期待される。

(2) 環境政策への貢献

1) バイオマーカーの開発に関する研究

本研究により同定される感受性多型・ハプロタイプは、小児の環境化学物質感受性を評価するバイオマーカーとなる。そして、健常者における感受性因子の頻度を、暴露量が異なると考えられる世代間で比較することで、現在の小児集団が成人集団よりも、暴露量の観点から先天奇形症発症に関してより高いリスクを持つことを認識させる効果を持つと期待される。

2) 臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備に関する研究

本研究の環境リスク研究に広く貢献できる臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備は、先天奇形のなかでも尿道下裂など、生殖と密接に関連する領域の研究において、遺伝因子と環境因子の相互作用で出現する先天奇形の表現型の適切な解析を可能とする。尿道下裂など生殖と密接に関連する領域の研究は、少子化対策の観点から、強いインパクトを持つと考えられる。また、バンキングシステムの整備により、精神発達障害、発癌性、催奇形性など、環境化学物質との関連が危惧される疾患の発症機序解明にも貢献する。

6. 研究成果の主な発表状況(別添.作成要領参照)

(1) 主な誌上発表

< 査読付き論文 >

- 1) MS. Alam, S. Ohsako, T. Matsuwaki, X.B. Zhu, N. Tsunekawa, Y. Kanai, H. Sone, C. Tohyama and M. Kurohmaru: *Reproduction*, 139, 2, 427–437 (2010)
“Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate.”
- 2) X.Y. Qin, F. Wei, J. Yoshinaga, J. Yonemoto, M. Tanokura and H. Sone: *FEBS Lett.* 585, 20, 3310–3315 (2011)
“siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells.”
- 3) T. Ogata* et al.: *J. Hum. Genet.*,
“Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure: Implications for genetic susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors.” (accepted).

<査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可)
特に記載すべき事項はない。

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) T. Ogata: The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.
“MAMALD1 for hypospadias and 46,XY disorders of sex development.”
- 2) T. Ogata: The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.
“Backdoor pathway to dihydrotestosterone identified in POR deficiency.”
- 3) T. Ogata: The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.
“ESR1 and cryptorchidism/hypospadias (the susceptibility to environmental disruptors).”
- 4) T. Ogata: The Seminar for Department of Physiology, Development & Neuroscience, Cambridge, England, 2009.
“(Epi)genetic mechanisms leading to the development of upd(14)pat/mat phenotypes.”
- 5) T. Ogata: The 9th International Congress of Andrology, Barcelona, Spain, 2009.
“Hypospadias.”
- 6) T. Ogata: The Seminar for Human Molecular Genetics, Prince Henry's Institute of Medical Research, Monash Medical Centre, Melbourne, Australia, 2009.
“Genetic mechanisms involved in hypospadias.”
- 7) T. Ogata: Disorders of sex development: underlying molecular causes, clinical management and future strategies, Melbourne, Australia, 2009.
“Clinical and molecular studies on Japanese patients with DSD.”
- 8) T. Ogata: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
“Genetic causes of hypospadias. Symposium of syndromic DSD.”
- 9) T. Ogata: The 14th Annual Scientific Meeting of Korean Society for Pediatric Endocrinology, Seoul, Korea, 2009.
“Silver-Russell syndrome as a human imprinting disorder. Prenary Lecutre.”
- 10) T. Ogata: The 14th Annual Scientific Meeting of Korean Society for Pediatric Endocrinology, Seoul, Korea, 2009.
“SHOX haploinsufficiency: lessons from clinical studies. Special Lecutre.”
- 11) T. Ogata: The International Ovarian Conference 2009, Tokyo, Japan, 2009.
“Pathogenesis of POF.”
- 12) M. Kagami, M. Fukami, M. O'Sullivan, A. Green, S. Takada, F. Kato, A. Ferguson-Smith and T. Ogata: The 24th Naito Conference, Sapporo, Japan, 2009.
“Essential role of the *MEG3*-DMR in the regulation of the maternally inherited human chromosome 14q32.2 imprinting region.”
- 13) MP. Brandão, M. Fukami, BB. Mendonca, M. Gerdulo, S. Domenice, IJP. Arnhold, T. Ogata and EMF. Costa: The Endocrine Society's 91st Annual Meeting, Washington, USA, 2009.
“A Novel Gain of function Mutation in the *MAMLD1* gene in patients with Undetermined 46,XY Disorders of Sex Development.”
- 14) MP. Brandão, EMF. Costa, M. Fukami, MG. Santos, NP. Pereira, S. Domenice, T. Ogata and BB. Mendonca: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
“*MAMLD1* Homozygous gain-of-function missense mutation causing 46,XX disorder of sex development in a virilized female.”
- 15) S. Dateki, K. Kosaka, K. Hasegawa, M. Fukami, K. Muroya, M. Adachi, K. Motomura, N. Azuma, H. Tanaka, T. Tajima, H. Moriuchi and T. Ogata: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
“Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary hormone deficiency.”
- 16) K. Matsuo, S. Suzuki, M. Maimaiti, T. Mulai, T. Hamajima, K. Motomura, Y. Naiki, T. Ogata, T. Tajima, T. Hasegawa and K. Fujieda: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
“Evaluation of sensitive detection methods for somatic mosaicism of *GNAS1* mutation in patients with McCune-Albright syndrome.”

- 17) MP. Brandão, M. Fukami, BB. Mendonca, MG. Santos, S. Domenice, IJP. Arnhold, T. Ogata and EMF. Costa: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
 “A gain of function mutation in the MAMLD1 discloses a new pathway in the etiology of 46,XY disorders of sex development.”
- 18) K. Nakabayashi, W. Yoshida, K. Yamazawa, M. Kusumi, T. Ogata and K. Hata: The 47th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Baltimore, USA, 2009.
 “MeDIP-chip detection and quantitative DNA methylation analysis of differentially methylated regions in imprinted loci.”
- 19) X. Qin, H. Zaha, R. Nagano, J. Yonemoto, H. Sone and J. Yoshinaga: 第12回日本内分泌攪乱化学物質学会 研究発表会 (2009)
 “Estrogenic activities of endocrine-disrupting chemicals and their effects on male genital disorders related genes expression.”
- 20) H. Sone, L. Yang, T. Fukuda, H. Akanuma, R. Nagano and H. Zaha: 21st Cent. Adv. Mol. Toxicol. Environ. Chem. Pathog. Dis., Tokyo, Japan, 2009.
 “The effect of low dose BPA on cell proliferation and senescence in human mammary epithelial cells.”
- 21) H. Sone, S. Imanishi, M. Okura, H. Zaha, H. Shiraishi and H. Fujimaki: PPTOX II: Role of environmental stressors in the developmental origins of disease, Miami, USA, 2009.
 “Prenatal exposure to permethrin inhibits brain development via disruption of vascular development in mice.”
- 22) X. Qin, H. Zaha, J. Yoshinaga, J. Yonemoto and H. Sone: 29th Int. Symp. Halogenat. Persistent Org. Pollut.-DIOXIN, Beijing, China, 2009.
 “Association of AHR and ESR1-responsive gene variations with susceptibility to endocrinedisrupting chemicals in risk of male genital disorders.”
- 23) A. Anami, S. Hayashi, Y. Sugo and H. Sone: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “The characterization of ultrasound examination to predict twin one fetal demise in monochorionic diamniotic twin pregnancies.”
- 24) S. Hayashi, K. Ishii, N. Kato, Y. Takahashi, M. Nakata, J. Murotuki, T. Murakoshi, Y. Nanba, Y. Ito and H. Sago: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “Perinatal outcome of monochorionic twin pregnancies complicated by amniotic fluid discordance without twin-twin transfusion syndrome.”
- 25) S. Hayashi, H. Sago, M. Hanaoka, M. Horiya, A. Anami, T. Nakamura, Y. Ito, T. Chiba, M. Kitagawa and M. Natori: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “Postnatal outcome in twin reversed arterial perfusion treated with radiofrequency ablation.”
- 26) H. Sago, S. Hayashi, N. Kato, Y. Nanba, Y. Ito, H. Hasegawa, H. Kawamoto, M. Saito, J. Murotsuki, Y. Takahashi, M. Nakata, K. Ishii and T. Murakoshi: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “Risks and the outcome of twin-to-twin transfusion syndrome after fetoscopic laser surgery.”
- 27) M. Hanaoka, S. Hayashi, M. Horiya, A. Anami, R. Oi and H. Sago: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “The human chorionic gonadotropin and fetoscopic laser photocoagulation for twin-twin transfusion syndrome.”
- 28) H. Sago: 11th Korea – Japan Joint Conference of Obstetrics and Gynecology, Seoul, Korea, 2009.
 “The Current State of Fetal Therapy in Japan.”
- 29) T. Ogata: The 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, 2010.
 “Disorders of sex development: Shrinking black box. In: Disorders in gonadal differentiation and development.”
- 30) T. Ogata, R. Yoshida and F. Massart: The 49th Annual Meeting of European Society for Paediatric Endocrinology, Prague, Czech Republic, 2010.
 “Haplotype analysis of the estrogen receptor alpha gene in precocious puberty.”

- 31) T. Ogata: The 6th Biennial Scientific Meeting of The Asia Pacific Paediatric Endocrinology, Xi'an, China, 2010.
 “Endocrine Disruptors – the environment and its impact on paediatric endocrinology. In: Hot Topic Session.”
- 32) 緒方 勤: 松葉のダイオキシン調査2010実行委員会(2010)
 「子どもの健康と環境ホルモン」
- 33) 緒方 勤: 10th Asahikawa Winter Conference on Molecular Medicine (2010)
 「性分化疾患における最近の臨床的・分子遺伝学的進歩」
- 34) 緒方 勤: 第249回日本小児科学会東海地方会特別講演(2010)
 「性分化疾患の発症機序: 遺伝-環境相互作用の観点から」
- 35) 緒方 勤: 日本アンドロロジー学会第29回学術大会・第16回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会特別講演(2010)
 「性分化疾患研究の最前線」
- 36) T. Ogata: 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors (COW 2011), Copenhagen, Denmark, 2011.
 “Genetic susceptibility to endocrine disruptors: Estrogen receptor polymorphisms.”
- 37) T. Ogata and M. Fukami: The 13th European Congress of Endocrinology (ECE 2011), Rotterdam, Netherlands, 2011.
 “Disorders of Sex Development: Recent Progress.”
- 38) T. Ogata: Hamamatsu DOHaD Conference, Hamamatsu, Japan, 2011.
 “Genetic susceptibility to endocrine disruptors: Estrogen receptor polymorphisms.”
- 39) J. Yonemoto, J. Kawahara, H. Sone, T. Hattori, T. Matsumura, Y. Ohya and S. Sugama: 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Brussels, Belgium, 2011.
 “Prenatal Exposure to OH-PCBs in Relation to Body Weight and Neurodevelopment.”
- 40) 宮戸真美: 第3回領域会議 性差構築の分子基盤(2011)
 「Mam1d1遺伝子の胎仔精巣における機能解析」
- 41) 宮戸真美、中村美智子、宮戸健二、緒方 勤、深見真紀: 第45回日本小児内分泌学会(2011)
 「精巣におけるMam1d1の機能解析」
- 42) 鏡雅代、松岡健太郎、加藤芙弥子、宮戸真美、松原圭子、深見真紀、山中美智子、鈴木伸宏、永井敏郎、緒方 勤: 第45回日本小児内分泌学会(2011)
 「RTL1遺伝子の胎盤における機能の解明: 胎盤発育不全、子宮内胎児発育遅延の原因解明をめざして」
- 43) 五十嵐麻希、加藤芙弥子、辻克和、緒方 勤、深見真紀: 第56回日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会 共同大会(2011)
 「アンドロゲン受容体遺伝子サイレント変異を有する不完全型アンドロゲン不応症の1例」
- 44) 秦咸陽、小島祥敬、水野健太郎、上岡克彦、吉永淳、米元純三、林祐太郎、群健二郎、緒方 勤、曾根秀子: 第14回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会(2011)
 「尿道下裂男児の皮膚細胞を用いた環境内分泌かく乱化学物質の目的遺伝子の解明」
- 45) 米元純三、河原純子、曾根秀子、服部達也、松村徹、大矢幸弘、洲鎌盛一: 第14回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会(2011)
 「保存臍帯中OH-PCB濃度と2歳児の体重、軽度発達障害との関係」
- 46) 宮戸真美、中村美智子、宮戸健二、緒方 勤、深見真紀: 第34回日本分子生物学会(2011)
 “Mam1d1 regulates expression of steroidogenic enzyme genes in mouse fetal testes.”
- 47) 五十嵐麻希、加藤芙弥子、辻克和、緒方 勤、深見真紀: 第34回日本分子生物学会(2011)
 「アンドロゲン受容体遺伝子サイレント変異を有する不完全型アンドロゲン不応症の1例」
- 48) 須郷慶信、林聡、大石由利子、堀谷まどか、加藤有美、青木宏明、高橋宏典、三浦裕美子、三原慶子、佐々木愛子、左合治彦、名取道也: 第62回日本産婦人科学会学術講演会(2011)
 「当センターにおける妊娠30週の胎児超音波スクリーニング検査の検討」
- 49) 佐々木愛子、小澤伸晃、林 聡、澤井英明、増崎英明、平原史樹、左合治彦: 第62回日本産婦人科学会学術講演会(2011)
 「日本における出生前診断の動向(2003~2008年)」

7. 研究者略歴

課題代表者: 緒方 勤

1956年生まれ、慶応義塾大学医学部卒業、医学博士、現在、浜松医科大学医学部小児科教授、

独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部 客員部長

研究参画者

(1): 緒方 勤 (同上)

(2)1): 曾根 秀子

1958生まれ、東邦大学薬学部大学院修了、薬学博士、現在、独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 健康リスク評価研究室 主任研究員

2): 深見 真紀

1965生まれ、慶應義塾大学医学部大学院修了、医学博士、現在、独立行政法人国立成育医療研究センター研究所 分子内分泌研究部 部長

C-0905 小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備に関する研究
(1) バイオマーカーの開発に関する研究

浜松医科大学医学部小児科 / (独) 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部 緒方 勤

(独) 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部 深見真紀

(独) 国立環境研究所環境リスク研究センター健康リスク研究室 曾根秀子

<研究協力者>

(独) 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部 吉田理恵・宮戸真美

(独) 国立成育医療研究センター病院周産期センター 左合治彦・中村知夫

(独) 国立環境研究所環境リスク研究センター環境リスク研究推進室 青木康展

平成21～23年度累計予算額：44,277千円（うち、平成23年度予算額：14,095千円）

予算額には、間接経費を含む。

【要旨】 本研究は、尿道下裂などの小児先天奇形発症を対象とする環境リスク評価法の基盤整備を行うことを目的とする。このために、評価法の指標となるバイオマーカーの開発を行う。バイオマーカーとしては、相関解析および機能解析で有意と判定された遺伝子多型・ハプロタイプ、および、疾患責任遺伝子のメチル化パターンや発現量を用いる。そして、連結可能匿名化の臨床情報採取とバイオマーカーとして使用しうる多型・ハプロタイプの頻度や疾患責任遺伝子の発現量などのプロファイリングを行い、今後の遺伝—環境相互作用や遺伝子間相互作用の研究のために役立てることを目標とする。

これまでに、バイオマーカーとしての多型・ハプロタイプの解析を行い、エストロゲン受容体 α 遺伝子 (ESR1) の外陰部異常症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、これが、日本人およびイタリヤ人においても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。また、近年、発症頻度の増加が報告されている精子形成障害について、日本人精子形成障害患者と妊よう性陽性男性におけるハプロタイプ関連解析から、ESR2遺伝子の中央から3'領域に存在する約40 kbの連鎖不平衡領域のTG TAGA特定ハプロタイプが、精子形成障害の感受性であることを見いだした。さらに、化学物質応答遺伝子群の網羅的解析として、96個のSNP解析を行った結果、外陰部異常症発症感受性因子をダイオキシンシグナル伝達関連遺伝子のAHRで2個とARNT2で1個、ビスフェノールA受容体遺伝子とされるNR1I2で3個検出し、CYP1A1で4個と男性ホルモン産生酵素であるCYP17A1で3個検出した。バイオマーカーとしての単一遺伝子メチル化パターンと発現量変化の同定を行い、尿道下裂患者のSRD5A2遺伝子のメチル化頻度と発現量との相関関係をみたところ、有意に逆相関することがわかった。さらに、口蓋裂は環境化学物質暴露との関係が危惧される疾患の一つであり、外陰部異常症と同様、口蓋組織におけるメチル化は口蓋裂の発症に関与している可能性が推測される。

【キーワード】 小児先天奇形、環境リスク評価、バイオマーカー、エストロゲン受容体 α 遺伝子 (ESR1)、メチル化パターン

1. はじめに

近年、停留精巣や尿道下裂などの先天奇形が増加しているという疫学的データが日本や欧米諸国から報告され、大きな社会的問題となっている。同様の現象は、成人における精子形成障害や精巣腫瘍、および、多くの野生動物でも観察されている。そして、これらの現象に共通する原因として、内分泌攪乱物質の影響が推測されている。特に、大部分の内分泌攪乱化学物質が有する女性ホルモン効果は、このような男性化障害を生じる重要な原因の一つであると推測される。さらに、内分泌攪乱物質として作用する環境化学物質の生産量・排出量は、近年増加している。したがって近年の小児は、暴露量の観点から、成人よりも高いリスクに曝されていると推測される。

われわれは、このような先天異常の発症が、内分泌攪乱物質の暴露量や暴露時期の他に、個体の遺伝的感受性にも支配されるという作業仮説のもとに、研究を行ってきた。そして、最も重要な成果は、エストロゲン受容体 α 遺伝子 (ESR1) のハプロタイプ解析で得られた^{1, 2)}。これは、大部分の内分泌攪乱物質がエストロゲン受容体を介して女性ホルモン様効果を発揮することから、エストロゲン受容体遺伝子多型が遺伝的感受性に強く関与すると考えられることに一致する。さらに、感受性ハプロタイプ領域の構造解析を行い、ESR1遺伝子イントロン内微小欠失は感受性亢進を招く構造変化であることを示唆する結果が得られた。しかし、これらの多型・ハプロタイプをバイオマーカーとして使用するには、機能解析の裏付けが必要である。また、解析された遺伝子多型・ハプロタイプが少数にとどまるために、他の大きな影響を持つ因子が同定されていない可能性がある。

また、精子形成障害は、男児外陰部異常症と同様、発症頻度の増加が報告されており、その原因としてエストロゲン様作用を有する環境化学物質との関連性が示唆されている。さらに、口蓋裂も環境化学物質の影響が危惧されている疾患の一つである。環境化学物質はエピジェネティック修飾を介して遺伝子発現を抑制し、疾患発症を招くことが示唆されている。このことを明らかにするためには、当該遺伝子が発現および作用している組織を用いて解析を行わなければならない。そこで、臨床的に採取可能な末梢血や外陰部皮膚組織、あるいは、臨床的に採取できない性腺などはモデル動物（マウス暴露実験等）の検体を用いて解析をすることが必要である。

以上のことから、小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備には、バイオマーカーの開発が重要であると考えられる（図(1)-1）。

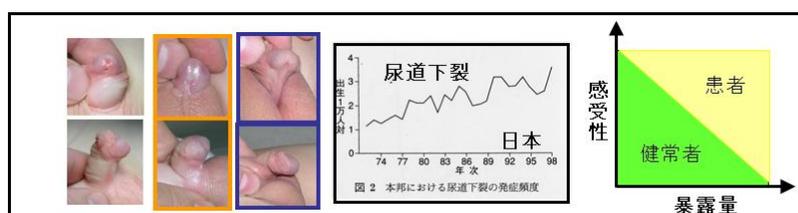
サブテーマ1: バイオマーカーの開発

1. バイオマーカーとしての多型・ハプロタイプの同定

- ① 既報告の感受性遺伝子多型・ハプロタイプの機能解析
- ② 未知の感受性因子の同定-関連解析、機能解析
- ③ 感受性因子の世代間頻度解析

2. バイオマーカーとしての単一遺伝子におけるメチル化パターンと発現量変化の同定

- ① 臨床検体(末梢血や外陰部皮膚組織)の解析
- ② マウス暴露実験



図(1)-1 サブテーマ 1

2. 研究開発目的

本研究は、尿道下裂などの小児先天奇形発症を対象とする環境リスク評価法の基盤整備を行うことを目的とする。このために、評価法の指標となるバイオマーカーの開発を行う。バイオマーカーとしては、関連解析および機能解析で有意と判定された遺伝子多型・ハプロタイプ、および、疾患責任遺伝子のメチル化パターンや発現量を用いる。そして、連結可能匿名化の臨床情報採取とバイオマーカーとして使用しうる多型・ハプロタイプの頻度や疾患責任遺伝子の発現量などのプロファイリングを行い、今後の遺伝-環境相互作用や遺伝子間相互作用の研究のために役立てることを目標とする。

3. 研究開発方法

(1) エストロゲン受容体 α 遺伝子 (ESR1) に関する研究

1) ESR1遺伝子内の特定ハプロタイプに関する研究

日本人男性性機能障害患者（停留精巣患者、尿道下裂患者、小陰茎患者、精子形成障害患者）および日本人正常男性（正常男児、正常成人男性）、さらにイタリア人外陰部異常症男児と正常男児において、ESR1ハプロタイプ解析を行う。

また、感受性ハプロタイプブロックを直接シークエンス法で解析、両者の配列を比較し、感受性ハプロタイプ領域の構造解析を行う。微小欠失の5'側、内側、3'側に設計した3種類のプライマーを用いてPCR反応を行う。微小欠失のないアレルは、260 bpのPCR産物（微小欠失の5'側および内側に設計したプライマーによる）が得られ、2,493 bpのPCR産物（微小欠失の5'側および3'側に設計したプライマーによる）は得られない。微小欠失のあるアレルは、239 bpのPCR産物（微小欠失の5'側および内側に設計したプライマーによる）が得られる。PCR産物サイズをフ

ラグメント解析にて測定する。

2) ESR1遺伝子における微小欠失の*in vivo*機能解析に関する研究

ESR1遺伝子における微小欠失がエストロゲン効果を増強する機序を解明する。この欠失が、同領域に存在する抑制型マイクロRNAを消失させている可能性、スプライスの量的変化により正常エストロゲン受容体を多く産生している可能性、メッセンジャーRNAの安定化を招いている可能性について解析する。この微小欠失の*in vivo*機能解析を進めるため、ノックインマウスを作製する。

(2) エストロゲン受容体β遺伝子 (ESR2) に関する研究

1) ESR2遺伝子内の特定ハプロタイプに関する研究

対象は、日本人精子形成障害患者および妊よう性の確認された日本人成人男性とした。症例は、正常男性核型、非閉塞性無精子症、生殖器および生殖器外の合併奇形なし、Y染色体長腕の微小欠失なし、特別な環境要因なし、という条件を満足した。

SNP解析は、全120 kb (ESR2遺伝子プロモーター領域50 kbを含む) に、8.2 kbから17.7 kb間隔で分布する9つをTaqMan法で解析する。解析対象SNPは、データベースに登録されているSNPから、tag SNPを含み、ESR2遺伝子上にほぼ等間隔に分布するSNPのうち、日本人におけるマイナーアレル頻度が15 %以上のものを選択する。ハプロタイプ解析は、PENHAPLOを用いて連鎖不平衡係数 $|D'|$ を推定し、LD mapを作成し、LD blockにおけるハプロタイプ頻度を推定する。

(3) 男児生殖器疾患における環境化学物質感受性バイオマーカーの開発に関する研究

1) 男児外陰部異常症発症と関連する遺伝子の網羅的関連解析に関する研究

数理的および作用機序から男児外陰部異常症発症に関連する遺伝子を網羅的にピックアップし、HapMapプロジェクトを基にSNPおよびハプロタイプ関連解析を行う。また、見いだされた多型・ハプロタイプの機能解析、異なる人種間における比較を行う。

2) 外陰部皮膚線維芽細胞を用いた暴露実験に関する研究

外陰部皮膚線維芽細胞を用いた*in vitro*におけるbisphenol-A (BPA)、estradioil (E2)、TCDDの暴露実験を行う。ヒト外陰部皮膚線維芽細胞は、10 % 牛胎児血 (FBS) を含んだDMEM/Ham's F-12培地で37°C、5 % CO₂のインキュベーター内で培養する。化学物質曝露の実験時は、ステロイドフリー条件下で培養するために、曝露48時間前に5 % charcoal/dextran-treated FBSを含むphenol red-free DMEM/Ham's F-12に培地を交換する。化学物質の曝露は、24時間行う。

(4) 単一遺伝子におけるメチル化パターンと発現量変化の同定に関する研究

1) 男児外陰部異常症検体 (手術時外陰部皮膚) を用いた解析に関する研究

環境化学物質はエピジェネティック修飾を介して遺伝子発現を抑制し、疾患発症を招く可能性がある。これは、当該遺伝子が発現し、作用している組織を用いなければ解析できない。本研究では、男児外陰部異常症 (停留精巣や尿道下裂患者の手術時外陰部皮膚検体) の治療目的で手術を受けた患者から組織を入手し、メチル化パターンと発現量を解析する (図(1)-2)。

患者検体：尿道下裂患者の包皮組織
 手術年齢：1歳2ヶ月～1歳11ヶ月齢
 検体情報：705～723（5検体）、305～678（16検体）
 451（停留精巢を伴う）

コントロール検体：埋没陰茎の包皮組織
 手術年齢：1歳0ヶ月～1歳10ヶ月齢
 検体情報：116～896（13検体）

サンプリング方法：液体窒素投下にて凍結、RNAlater試薬中にて保存
 検体提供元：主に名古屋市立大学

図(1)-2 男児外陰部異常症検体（手術時外陰部皮膚）情報

2) ダイオキシン（TCDD）暴露マウスの精巢を用いた解析に関する研究

ヒトでは臨床的に容易に採取できない性腺を用いて、環境化学物質暴露効果の指標となるバイオマーカーを同定するために、TCDDをマウスに暴露して解析を行う。妊娠マウス（妊娠12.5日目）にTCDDを1回投与し、出生翌日の精巢を摘出する（図(1)-3）。つぎに、精巢からtotal RNAを抽出後、リアルタイムRT-PCRにより遺伝子の発現を定量する。

動物：妊娠マウス C57BL/6Jcl(日本クレア)
 投与化合物：2,3,7,8-TCDD (CIL)
 用量：3ug/kg mother body weight
 経路：単回経口(胃ゾンデ)
 投与時期：胎生12.5日
 Vehicle：4% nonane/corn oil
 サンプリング時期：PND1
 組織：精巢(両側)
 サンプリング方法：液体窒素投下にて凍結
 投与実施場所：東京大学

図(1)-3 マウスへのTCDD暴露方法

(5) 口蓋裂発症因子に関する研究

口蓋裂は、環境化学物質暴露との関係が危惧される疾患の一つである。口蓋裂は、単一遺伝子疾患としても発症するが、多因子疾患としても発症する。特に、近年種々の感受性因子が同定され、さらに、TCDD暴露が口蓋裂発症を招くことがマウス暴露実験から知られている。したがって、TCDD感受性が高い個体において、口蓋裂が発症しやすいことが推測される。この研究体制の構築ならびに検体集積を行う。

(6) ESR1陽性細胞株を用いたバイオマーカーの探索に関する研究

ESR1陽性ヒト乳癌細胞株（MCF-7細胞）、ESR1陽性ヒト卵巣癌細胞株（BG1Luc4E2細胞）およびERs-陰性ヒト前立腺癌細胞株（LNCaP細胞）を用いた*in vitro*におけるBPA、BBP、o,p'-DDTとE2の暴露実験を行う。化学物質の曝露は24時間行い、total RNAを抽出後、リアルタイムRT-PCRにより遺伝子の発現を定量する。ESR1の特異的拮抗剤として、1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinylethoxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride

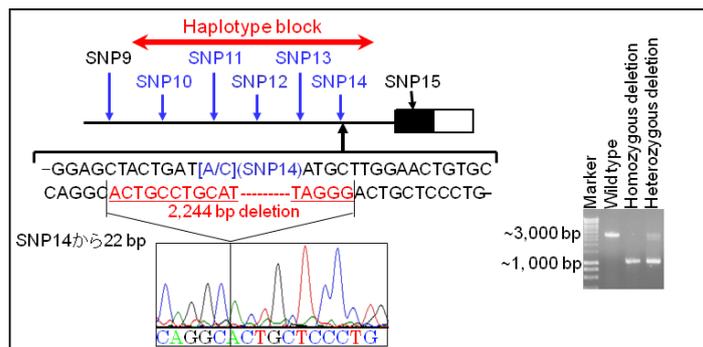
(MPP) を使用する。

4. 結果及び考察

(1) エストロゲン受容体 α 遺伝子 (ESR1) に関する研究

1) ESR1遺伝子内の特定ハプロタイプに関する研究

ESR1の特定ハプロタイプが停留精巣と尿道下裂の強い感受性因子であり、その本態が感受性ハプロタイプと絶対連鎖不平衡を示す2,244 bpの微小欠失であることを見いだした (図(1)-4)。



- 感受性ハプロタイプは、必ずこの微小欠失を伴う
- 非感受性ハプロタイプは、必ずこの微小欠失を伴わない

この微小欠失が感受性の本態であることを強く示唆する

図(1)-4 ESR1感受性ハプロタイプに絶対連鎖する微小欠失の同定

詳細を次に示す。ESR1ハプロタイプ解析の結果、ESR1遺伝子の3'領域に約50 kbの連鎖不平衡領域のAGATA特定ハプロタイプが存在し、このブロック内のAGATA特定ハプロタイプが、停留精巣と尿道下裂の強い感受性因子であることを明らかにした。すなわち、疾患発症との関連は、この特定ハプロタイプが劣性効果を有すると仮定したときに、停留精巣において $P = 0.0029$ (オッズ比 7.6)、尿道下裂において $P = 0.000073$ (オッズ比 13.8)であることを明らかにした。

また、微小欠失の5'側、内側、3'側に設計した3種類のプライマーを用いてPCR反応を行った結果、ESR1感受性ハプロタイプホモ接合体において、複数のSNP、イントロン内反復配列における数bpの欠失および挿入のほか、イントロン6でSNP14から3'側、22 bp下流に2,244 bpの微小欠失が同定された (図(1)-4)。他のマイナーな構造変化の機能は不明であるが、最も大きい構造変化であったこの微小欠失が機能と関係する可能性が高いと考えられる。PCR産物サイズのフラグメント解析の結果、すべての患者および対照において、微小欠失の有無と感受性ハプロタイプの有無が一致した。このことから、日本人において微小欠失と感受性ハプロタイプが絶対連鎖不平衡状態であることが示唆される。

さらに、近年の暴露量増加を反映して、この感受性因子を有する男児が成人男性よりも高リスクにあることを見いだした。世代間の頻度解析から、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 (図(1)-5)。

遺伝子型解析結果				
	非欠失ホモ	ヘテロ	欠失ホモ	計
成人男性	201	196	35	432
正常男児	47	33	2	82
欠失頻度の比較				
成人男性 vs 正常男児	P値	OR	95%CI	
	0.034	1.527	1.03-2.26	

リスクハプロタイプは、現在の小児において疾患を発症しやすい
暴露増加の反映



図(1)-5 ESR1感受性ハプロタイプの世代間頻度解析

また、合成エストロゲン製剤であるdiethylstilbestrol (DES) の使用と男児外陰部異常症発症率増加の関係から、暴露量増加のほかにも疾患発症に関与する要因が考えられる。DESは、内因性エストロゲンの代表であるエストラジオールと比べ、エストロゲン受容体にたいして約2倍の結合親和性を有することが知られている。1940年代から1971年までの間、DESが流産防止薬として妊婦に投与され、その結果、尿道下裂を含む男児外陰部異常症発症率が増加した。また、DES投与を受けた妊婦における流早産の増加、DES胎内曝露を受けた女児における膣癌の増加、Wolff管遺残も認められ、DESの妊婦への投与は禁止された。このうち、DES胎内曝露による男児外陰部異常症発症に関しては、DES胎内曝露を受けた男児のうち、妊娠11週以前に曝露した児は妊娠11週以降に曝露した児に比べて、男児外陰部異常症発症率が2倍高かった。これは、DES胎内曝露が男児外陰部異常症発症のリスク要因であり、その作用が曝露時期に影響されることを示しており、環境化学物質の曝露時期が疾患発症に関与することを示唆するものである。

つぎに、ESR1微小欠失頻度は、イタリア人患者においても高いことを見いだした (P = 0.011、オッズ比1.94) (表(1)-1)。これらのデータから、ESR1微小欠失は、イタリア人においても外陰部異常症発症のリスク因子であることが示唆される。

表(1)-1 イタリア人男児外陰部異常症患者および対照男児におけるESR1微小欠失

遺伝子型解析結果	欠失あり			欠失なし
	ヘテロ	ホモ		
尿道下裂患者 (n=13)	7	0		6
停留精巣患者 (n=80)	22	3		55
対照男児 (n=150)	30	1		119

2) ESR1遺伝子における微小欠失の*in vivo*機能解析に関する研究

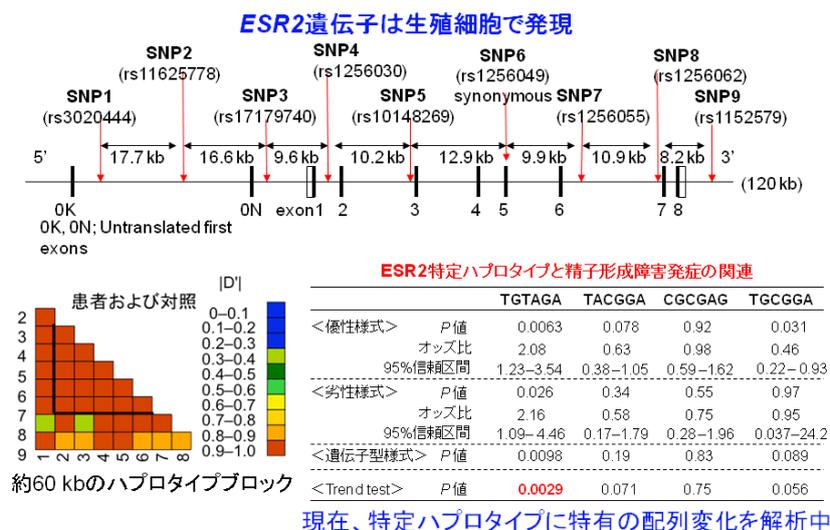
われわれが見いだしたESR1微小欠失の*in vivo*機能解析を行った。ESR1遺伝子の発現は、外陰部皮膚由来の線維芽細胞および血液由来の不死化リンパ球細胞で低いため、これらの細胞を用いた機能解析には限界があることがわかった。そこで、モデル動物を用いた機能解析を行うこ

とにした。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、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。これは、何らかの機構（エストロゲン受容体遺伝子機能喪失など）により、ヒト感受性ハプロタイプを持つ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。そのため、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、判断に困難を伴う。したがって、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、比較に用いる必要がある。のちに、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。これらの結果から、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。

(2) エストロゲン受容体β遺伝子 (ESR2) に関する研究

1) ESR2遺伝子内の特定ハプロタイプに関する研究

精子形成障害は、男児外陰部異常症と同様、近年、発症頻度の増加が報告され、その原因としてエストロゲン様作用を有する内分泌攪乱物質の影響が危惧されている。われわれは、精子形成障害患者におけるエストロゲン受容体β遺伝子 (ESR2) ハプロタイプ解析を行った。日本人精子形成障害患者と妊よう性陽性男性におけるハプロタイプ関連解析から、ESR2遺伝子の中央から3'領域に存在する約40 kbの連鎖不平衡領域のTGTAGA特定ハプロタイプが、精子形成障害の感受性であることを見いだした (図(1)-6)。



図(1)-6 精子形成障害患者におけるESR2ハプロタイプ解析

詳細を次に示す。|D'|>0.9の強固なLD blockが、患者+対照、対照、患者いずれにおいても、SNP2-SNP7を包含する約59.2 kbの領域に見いだされた。上記のLD blockにおけるハプロタイプ頻度を推定した結果、4つの主要なハプロタイプにより構成されていることが明らかとなった。これら4つのハプロタイプ推定頻度の合計は、患者、対照男性ともに99 %以上であった。また、患者、対照者間におけるハプロタイプ頻度比較の結果、TGTAGAハプロタイプ頻度は患者で高かった（P = 0.0028）。このP値は、ボンフェローニ補正後の有意水準（0.05/4 = 0.0125）を下回った。特定ハプロタイプと疾患発症の関連を検討した結果、最も低いP値は、TGTAGAハプロタイプに関するtrend testにおいて得られた。このP値（0.0029）は、ボンフェローニ補正後の有意水準（0.05/16 = 0.003125）を下回った。以上の結果から、TGTAGAハプロタイプは、量的効果を有する精子形成障害発症感受性ハプロタイプであることが示唆される。

（3）男児生殖器疾患における環境化学物質感受性バイオマーカーの開発に関する研究

1）男児外陰部異常症発症と関連する遺伝子の網羅的関連解析に関する研究

これまでの研究から、AHR、ARNT2、CYP1A2、CYP17A1、および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る。日本人における男児外陰部異常症患者（停留精巣患者、尿道下裂患者およびマイクロペニス患者）および正常者について、前記の5遺伝子とその関連性を調べた。塩基の型は、ゴールドゲートアレイ（イルミナ社）を用いて測定した。多型解析には、Haploview、SAS（version9.0）およびGenespringを用いた。統計的有意差は、トレンド解析（FischerおよびArmitage）、カイ2乗およびオッズ比により検出した。カイ2乗検定による患者対対照の二群比較を行い、いずれかの疾患においてP値が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、トレンド解析およびオッズ比を求めた。

トレンド解析の結果、0.01以下のP値を示したSNPは、停留精巣は、CYP17A1 rs4919686（P = 0.011）およびARNT2 rs5000770（P = 0.00073）であった。尿道下裂は、CYP1A2 rs2069521（P = 2.29E-6）および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。

オッズ比の解析の結果、2.0以上の値が認められたものは、停留精巣は、NR1I2 rs1403526、rs2472680、CYP17A1 rs4919686、rs6163、rs2278705、ARNT2 rs2278705、rs5000770、rs7183507、rs7178949、rs11072922であった。尿道下裂は、NR1I2 rs2461823、CYP17A1 rs17115149、CYP1A2 rs2069521、rs2069522、ARNT2 rs2278705、rs5000770、rs11072922であった。マイクロペニスは、CYP1A2 rs2069521、rs2069522、rs2069526、rs762551、rs4646425、rs4646427、ARNT2 rs4778597、rs7183507、rs7178949、rs11072922であった。

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（表(1)-2）。

表(1)-2 男児外陰部異常症の発症と関連するSNP解析

- 日本人とイタリア人の男児外陰部異常症患者と対照者において、アンドロゲン効果関連遺伝子(CYP17A1)およびダイオキシン効果関連遺伝子群 (AHR, AHRR, ARNT, CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP17A1, CYP19A1, CYP2B6, CYP3A4, NR1I2など)を含む96個のSNP解析を行った。
- 両人種に共通する感受性SNPがダイオキシンシグナル伝達関連遺伝子のAHRで2個とARNT2で2個、bisphenolA受容体遺伝子とされるNR1I2で4個検出された。
- 日本人特有の感受性SNPが男性ホルモン産生酵素であるCYP1A2で6個とCYP17A1で3個検出された。

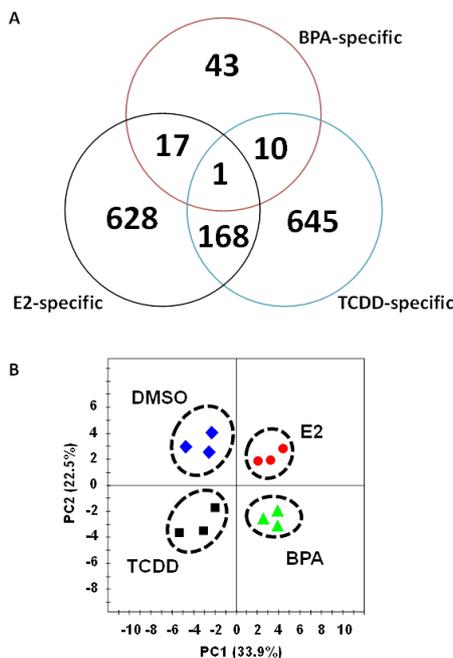
遺伝子	$P < 0.001$	$P < 0.05$	両人種で有意	日本人のみ
AHR	rs3757824	rs2158041	rs3757824, rs2158041	rs7811989
ARNT2	rs1374213, rs8024819, rs10851935	rs2278705,rs1020397	rs8024819, rs10851935	rs10431813,rs5000770, rs1374213
NR1I2(PXR)	rs2461823, rs2472680	rs13059232,rs2472682, rs6784598	rs2461823, rs13059232, rs2472682, rs6784598	rs2472680
CYP1A2	rs2069522	rs2069521,rs2069526, rs762551,rs4646425, rs4646427		rs2069522,rs2069521, rs2069526,rs762551, rs4646425,rs4646427
CYP17A1	rs6163	rs3740397,rs4919686		rs6163,rs3740397, rs4919686

日本人における停留精巣において、CYP17A1 rs4919686およびARNT2 rs5000770を検出したが、尿道下裂では、CYP1A2 rs2069521およびARNT2 rs2278705、rs5000770が検出され、CYP17A1のSNPは検出されなかった。さらに、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で5つのSNP、ARNT2で1つのSNPの検出が示され、停留精巣、尿道下裂やマイクロペニスの疾患の発症や進展に、環境化学物質の曝露などにたいする感受性要因が関わっていることが示唆される。NR1I2は核内受容体の一つであるPXRであり、BPA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、日本人とイタリア人の両人種とも停留精巣より、むしろ尿道下裂において、有意差が多く認められた。また、CYP1A2およびARNT2は、いずれも15q24.1に位置している遺伝子である。最近の論文では、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る。

日本人およびイタリア人男児集団において、HapMapデータをもとに、男性ホルモン効果関連遺伝子群やダイオキシン関連遺伝子を主とする96個のtag SNPの相関解析を行った。その結果、男性ホルモン産生酵素であるCYP17A1、ダイオキシンシグナル伝達に関わるAHRとARNT2、BPA受容体とされるNR1I2における多型が、男児外陰部異常症と関連していることを見いだした。さらに、日本人とイタリア人に共通する感受性SNPがAHRで2個、ARNT2で2個、NR1I2で4個検出された。これらの遺伝子のSNPは、人種間共通のSNPとして、男児外性器障害の疾患発症や病態の進展に関与していることが示唆される。

2) 外陰部皮膚線維芽細胞を用いた暴露実験に関する研究

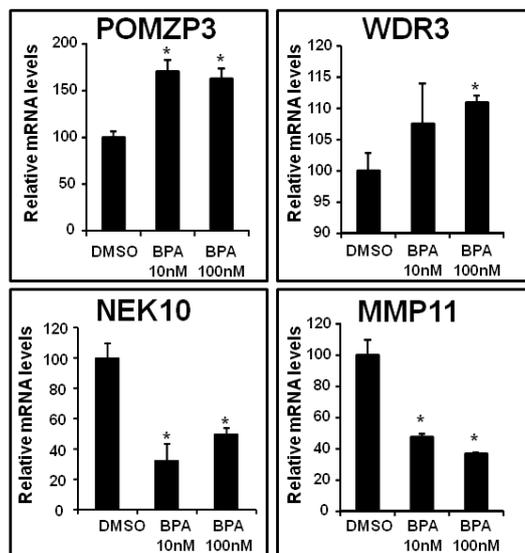
外陰部皮膚線維芽細胞を用いて、*in vitro*におけるBPA、E2、TCDD暴露実験を行った。DMSO暴露を比較対照とし、各群1.2倍以上の発現変化が見られた遺伝子の抽出を行った。その結果、BPA暴露では71遺伝子（42発現減少と29発現上昇）、E2暴露では814遺伝子（371発現減少と443発現上昇）、TCDD暴露では824遺伝子（344発現減少と480発現上昇）の発現変化を見いだした。これらについて、化学物質に特異的、あるいは共通の遺伝子を調べると、BPA特異的応答は43遺伝子、E2と共通な遺伝子は17個、TCDDと共通な遺伝子は10個であった（図(1)-7A）。



図(1)-7 BPA、E2およびTCDD暴露にたいする遺伝子発現プロファイル
 A: BPA、E2およびTCDD暴露にたいして特異的な発現変動をする遺伝子数
 B: 発現変動した遺伝子の主成分分析

つぎに、1.2倍以上発現変動した遺伝子について主成分分析を行った結果、全分散の33.9%を示す第1主成分（PC1）では、DMSOとTCDDが類似し、それらにたいしてBPAとE2が類似して2分した形を示した。一方、全分散の22.5%を示す第2主成分（PC2）では、DMSOとE2が類似し、それらにたいしてBPAとTCDDが類似して2分した形を示した（図(1)-7B）。このことは、BPAを基準に考えた場合、E2とTCDDのそれぞれに共通もしくは発現パターンの類似した遺伝子があることを示唆する。この結果は、われわれの先行研究におけるESR1陽性細胞（BG1Luc4E2 human ovarian cancer cells）におけるBPA曝露によるESR1転写活性化の結果と一致した³⁾。また、BPAとE2曝露による転写活性の違いは、ESR1陽性ヒト細胞で報告されている^{4、5)}。

さらに、BPA曝露により最も発現が変動した遺伝子から、*POMZP3*、*WDR3*、*NEK10*、*MMP11*の4遺伝子を選び、リアルタイムRT-PCRにより遺伝子発現量の変動を解析した。その結果、10 nMおよび100 nMのBPA曝露により、*POMZP3*と*WDR3*の遺伝子発現は有意に上昇し、*NEK10*と*MMP11*の遺伝子発現は有意に減少した（図(1)-8）。



図(1)-8 BPA暴露による遺伝子発現量の変化

これらの結果のうち、“Cell Death, Cellular Growth and Proliferation, Cancer” 生物機能グループに属している*MMP11*遺伝子の発現量が、BPA曝露により用量依存的に減少したことは興味深い。この*MMP11*は、亜鉛依存的なペプチド内部加水分解酵素であるmatrix metalloproteinase (MMPs)ファミリーの一つである。この酵素ファミリーは、細胞外マトリックスを分解する働きを持っており、癌の転移だけでなく発生過程や生殖機能において重要な働きを示すことが知られている。これまでに、男児外陰部異常症の発症と*MMP11*との関連性は報告されていない。*MMP11*の機能を阻害した場合、乳腺上皮細胞のリモデリングや分枝化の間に細胞の遊走、アポトーシスが亢進することが報告されている。尿道下裂発症の要因の一つとして、尿道形成過程における上皮細胞の封着形成の障害が寄与すると考えられている。したがって、今回見いだした*MMP11*遺伝子の発現抑制は、発達中の尿道および外陰部皮膚の細胞接着能の低下に結びつき、尿道下裂を引き起こす可能性、あるいはその病態の進展の促進に関与していることが示唆される。

そこで、最も顕著に、かつ用量依存的に発現変動が認められた*MMP11*遺伝子について、尿道下裂患者(HS) (n=22)と精巣停留(CO) (n=12)の外陰部皮膚線維芽細胞における遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRにより検討した。その結果、*MMP11*遺伝子の発現量は、HSグループで0.0015、COグループで0.0054であり、HSグループが有意に低かった(0.27-fold, P=0.006)。この結果は、*MMP11*遺伝子が尿道下裂の発症に関与するかもしれないという我々の仮説を支持するものである。以上の結果より、*MMP11*は、細胞外マトリックスの制御を介して尿道下裂発症に関与する可能性が考えられ、バイオマーカー因子の候補となり得ることが示唆される。

患者外陰部皮膚より樹立した線維芽細胞を用いて、環境化学物質の濃度依存的に応答する遺伝子を探索を行っており、環境化学物質への応答性が高い遺伝子の発見は、生物学的な男児外陰部異常症の発症との関連性を解明することにつながる。

(4) 単一遺伝子におけるメチル化パターンと発現量変化の同定に関する研究

環境化学物質はエピジェネティック修飾を介して遺伝子発現を抑制し、疾患発症を招く可能性がある。これは、当該遺伝子が発現し、作用している組織を用いなければ解析できない(図(1)-9)。

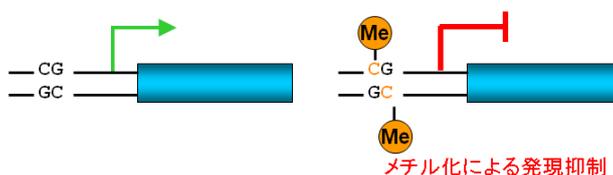
遺伝子の構造は正常であるが、プロモーターのメチル化などのために働きが悪くなる状態:環境化学物質暴露は重要な原因

尿道下裂患者の手術時外陰部皮膚検体を用いたメチル化および発現解析

- 外陰部皮膚で発現している性分化遺伝子SRD5A2 (5α-reductase)とAR (アンドロゲン受容体)を対象

ダイオキシン胎仔期暴露マウスを用いた精巣および外陰部皮膚検体を用いたメチル化および発現解析

- SRD5A2、ARの他に、われわれが発見した尿道下裂責任遺伝子MAMLD1を対象
- 暴露マウスの精巣と外陰部からDNAを抽出し、解析中。



図(1)-9 内分泌攪乱化学物質とエピジェネティック変化

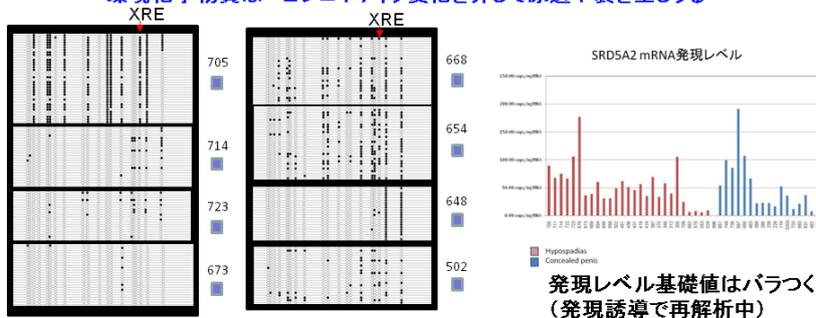
1) 男児外陰部異常症検体(手術時外陰部皮膚)を用いた解析に関する研究

尿道下裂患者の手術時に得られる外陰部皮膚検体を用いて解析を行った。外陰部男性化に必須であるジヒドロテストステロン産生を担い、外陰部皮膚組織において発現していることが知られているARとSRD5A2遺伝子について解析を行った(図(1)-10)。

尿道下裂男児および非尿道下裂男児(埋没陰茎)の外陰部皮膚検体で3種の遺伝子のCpG領域メチル化頻度解析した。
 尿道下裂: Total 33 cases
 非尿道下裂(埋没陰茎): Total 13 cases
 標的遺伝子: SRD5A2, AR, CYP1A1

- AR, CYP1A1の過剰メチル化は認められなかった。
- SRD5A2の過剰メチル化が少数の患者に認められた。

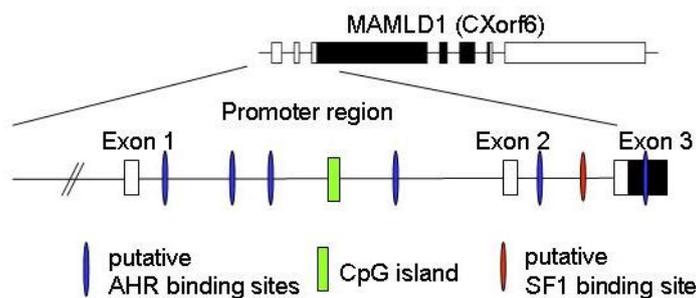
環境化学物質はエピジェネティック変化を介して尿道下裂を生じうる



図(1)-10 尿道下裂患者の外陰部皮膚検体におけるエピジェネティック変化

ARは男性ホルモン受容体であり、SRD5A2は男性ホルモンであるテストステロンをジヒドロテストステロンに変換する酵素である。ARおよびSRD5A2の遺伝子は、内部標準としてCP遺伝子の発現量で補正を行い、それぞれの遺伝子の発現量とした。また、外陰部皮膚で発現しているARとSRD5A2のプロモーター領域において、過剰メチル化が少数の患者で認められた。尿道下裂患者のSRD5A2遺伝子のメチル化頻度とSRD5A2遺伝子発現量との相関関係をみたところ、有意に逆相関 ($P = 0.0085$) することが明らかとなった。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CYP11A1およびCYP11B1遺伝子発現量との間には、各々有意な負の相関関係があることを見いだした。

男児外陰部異常症の発症の要因は、一つの遺伝子に起因するとは限らない。しかし、われわれは、尿道下裂責任遺伝子としてCXorf6 (MAMLD1) を同定しており、これまでにその機能について解析を行った^{6, 7)}。このMAMLD1遺伝子は、RT-PCRによる発現解析により、ヒトのほとんどの組織で発現していることを確認している。さらに、そのプロモーターにはダイオキシン反応性リピートとCpG islandが存在する (図(1)-11)。



図(1)-11 CXorf6 (MAMLD1) プロモーター領域のダイオキシン反応性リピートとCpG island

環境化学物質の暴露が様々な遺伝子のメチル化パターンや発現量の異常を招きうることから、MAMLD1遺伝子は単一遺伝子効果と環境化学物質の関連を検討する上でよい候補因子となる。また、マウス相同遺伝子 (Mamld1) は、胎生期精巣の男性ホルモン産生細胞において強く発現している。われわれは、既にMamld1遺伝子欠損マウスを作製している。Mamld1遺伝子欠損マウスは、環境化学物質のMAMLD1/Mamld1遺伝子にたいする影響を評価する上でよいコントロールとなる。

つぎに、尿道下裂患者の外陰部皮膚検体を用いて、埋没陰茎の外陰部皮膚検体を比較対照とし、1.2倍以上の発現変化が見られた遺伝子の抽出を行った。その結果、尿道下裂患者の外陰部皮膚検体は、埋没陰茎の外陰部皮膚検体に比べて、1,066遺伝子 (370発現減少と696発現上昇) の発現変化を見いだした (表(1)-3)。

表(1)-3 尿道下裂患者の外陰部皮膚検体における遺伝子発現変化

尿道下裂男児と埋没陰莖の外陰部皮膚検体で遺伝子発現量を比較

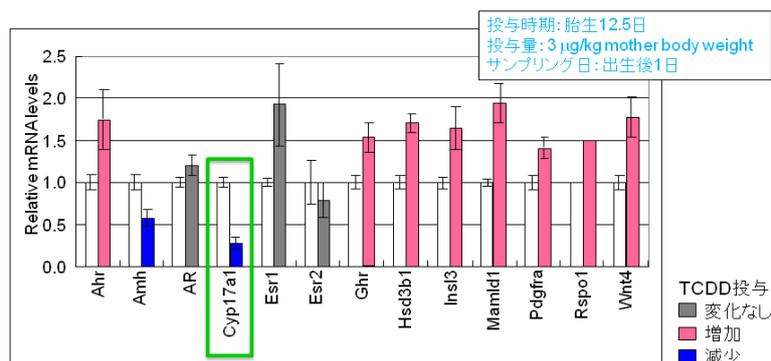
尿道下裂群では、埋没陰莖群に比べて、370遺伝子の発現が減少し、696遺伝子の発現が上昇した(Fold Change 2.0以上)

Gene Symbol	Fold Change	発現変動	遺伝子の詳細	3検体とも変動
FLG	8.97	↓	filaggrin 表皮の角化に必要、遺伝子変異はアトピー性皮膚炎の発症に関与	
MSMB	8.09	↓	microseminoprotein, beta 前立腺癌のバイオマーカー(血中に高濃度で存在する)	○
ACTG2	4.73	↓	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric 平滑筋アクチン	
SPRR3	23.87	↑	small proline-rich protein 3 表皮バリアーの形成に関与	○
SOX2	14.48	↑	SRY (sex determining region Y)-box 2 遺伝子変異は無眼球症と低ゴナドトロピン性性腺機能低下症に関与、iPS細胞作製に必要な因子の一つ、in vitroにてfilaggrinの発現を抑制	○
KRT4	9.71	↑	keratin 4 粘膜に発現、遺伝子変異は白色海綿状母斑(口腔)の発症に関与	

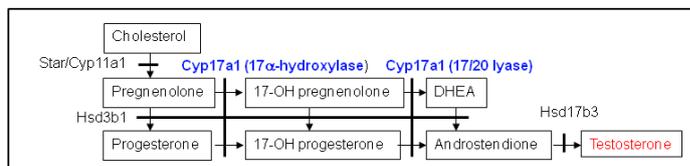
手術時に得られる外陰部皮膚は間質がない状態である。そこで、これらの検体を用いた解析は、間質のARが男性ホルモンのシグナルを受け、その後の上皮へのシグナルがどうなっているかを見ることになる。これまでに、マウスを用いた実験では、外生殖器の雄性化過程で男性ホルモンシグナルの下流にWnt/ β -cateninシグナルが位置することが示唆されている。そのため、Wnt/ β -cateninシグナルは、今後、患者の外陰部皮膚検体で検討していく候補因子となり得る。また、患者の外陰部皮膚検体を用いた網羅的遺伝子発現解析では、疾患発症の直接の原因となる遺伝子を探索することは難しい。しかし、疾患を発症した患者の検体を用いた解析により、変動する共通の遺伝子の存在が確認されれば、バイオマーカーの候補を絞る上での参考になると考えられる。さらに、発現解析を行った後には、樹状図を用いたアプローチを含むデータへの様々な解析法を用いることが必要である。

2) ダイオキシシン (TCDD) 暴露マウスの精巣を用いた解析に関する研究

ヒトでは臨床的に容易に採取できない性腺を用いて、環境化学物質暴露効果の指標となるバイオマーカーを同定するために、TCDDをマウスに暴露して解析を行った。妊娠マウス(妊娠12.5日目)にTCDDを1回投与し、出生翌日の精巣を摘出した。摘出した精巣からtotal RNAを抽出後、リアルタイムRT-PCRにより遺伝子発現を解析した。その結果、男性ホルモン産生酵素であるCyp17a1遺伝子の発現減少など、多数の遺伝子発現量が変動していることが明らかとなった(図(1)-12)。



CYP17A1におけるSNPのアリル頻度は、外陰部異常症患者と正常男児で有意に異なる(前述の相関解析データ)



図(1)-12 胎仔期TCDD暴露マウスの精巣における遺伝子発現変化

また、*Ahr*、*Mamld1*、*Hsd3b1*、*Wnt4*の遺伝子発現の上昇、および*Amh*の遺伝子発現の減少が認められた。TCDDは、ダイオキシン類の中でも、受容体型転写因子であるaryl hydrocarbon receptor (Ahr) との結合能が最も高く、アゴニストとして遺伝子の発現を修飾することにより、催奇形性などの毒性を示すことが知られている。*Ahr*遺伝子欠損マウスへのTCDD暴露により、これらの毒性のほとんどが見られなくなることから、AHRはTCDDの毒性発現に必須のタンパク質であると考えられている。さらに、TCDD暴露により、*Ahr*、*Cyp1a1*、*Cyp1a2*遺伝子の発現が誘導されることが知られている。今回、われわれはTCDD暴露により出生翌日の精巣において、*Ahr*、*Cyp1a1*、*Cyp1a2*遺伝子の発現が誘導されたことを認めており、これらの結果は実験系がうまく機能していることを示している。しかし、遺伝子の発現量に変動があった遺伝子をバイオマーカーとして確立するためには、遺伝子の発現量の変動のみならず、タンパク質レベルでの変動も確認することが必要である。これまでに、それぞれの遺伝子およびタンパク質について、精巣における発現および局在部位を確認している。今後は、遺伝子発現量の変動の再現性と発現部位の検討およびタンパク質の変動を検討していく。

(5) 口蓋裂発症因子に関する研究

口蓋裂は、単一遺伝子疾患としても発症するが、多因子疾患としても発症する。特に、近年種々の感受性因子が同定され、さらに、TCDD暴露が口蓋裂発症を招くことがマウス暴露実験から知られている。したがって、TCDD感受性が高い個体において、口蓋裂が発症しやすいことが推測される。また、外陰部異常症と同様、口蓋組織におけるメチル化(エピジェネティック修飾)が口蓋裂の発症に関与している可能性が推測される。

われわれは、この仮説を検証するため、口蓋裂患者の血液および手術時の口蓋組織(皮膚線維芽細胞)の集積を開始し、現在、60例の検体を集積した。感受性因子については、45例以上

集積できれば、SNPのみならずハプロタイプを用いた関連解析が可能であり、さらにエピジェネティック解析について随時進めている。これにより、口蓋裂発症と環境化学物質の関連性を解明したいと考えている。

(6) ESR1陽性細胞株を用いたバイオマーカーの探索に関する研究

近年、新たな遺伝子間相互作用検出のための手法が提唱されており、multifactor dimensionality reduction (MDR) は代表的な手法の一つである⁸⁾。これは複数の因子間の相互作用を二元化して捉えるアルゴリズムであり、複数のSNP間で生じる複雑な相互作用が、比較的少数のデータにおいて検出可能であるなど、その有効性が注目されている。

尿道下裂患者 (HS) と精巣停留 (CO) の発症リスクに関与する環境化学物質の感受性遺伝子の同定を目的とした先行研究において、有意差が認められていたARNT2、CYP17A1およびCYP1A2のSNPについて、MDRによる遺伝子間相互作用解析を行った。その結果、ARNT2 rs2278705、rs5000770およびCYP1A2 rs2069521が、最も疾患リスクに関与していることを見いだした (表(1)-4)。

表(1)-4 尿道下裂患者 (HS) と精巣停留 (CO) におけるSNPのMDR法による多因子解析

疾患	最適モデル SNPID (遺伝子名)	TBA	CVC	P-value
CO ^a	rs5000770 (ARNT2)	0.5318	7/10	0.377
	rs4919686 (CYP17A1)	0.5999	8/10	0.055
	rs5000770 (ARNT2)			
	rs2472680 (NR1I2)	0.6281	10/10	0.011
	rs4919686 (CYP17A1)			
rs5000770 (ARNT2)				
HS ^b	rs2069521 (CYP1A2)	0.6958	10/10	0.001
	rs2069521 (CYP1A2)	0.6998	9/10	0.001
	rs2278705 (ARNT2)			
	rs2069521 (CYP1A2)	0.6576	10/10	0.001
	rs2278705 (ARNT2)			
rs5000770 (ARNT2)				

TBAは testing balanced accuracy, CVCはcross validation consistency.
^a検体数= 236 (141 対照 及び 95 CO). ^b検体数= 239 (141対照 及び 98 HS)。

つぎに、ESR1陽性および陰性のヒト細胞株を用いて、ARNT2遺伝子の発現がESR1に依存しているかどうかを調べた。ESR1陽性ヒト乳癌細胞株 (MCF-7細胞)、ヒト卵巣癌細胞株 (BG1Luc4E2細胞) およびERs-陰性ヒト前立腺癌細胞株 (LNCaP細胞) を用いて、BPA、BBP、o, p'-DDTとE2の暴露実験を行い、リアルタイムRT-PCRによりARNT2遺伝子の発現を解析した。その結果、BPA、BBPおよびo, p'-DDTの暴露は、ESR1陽性株 (MCF-7およびBG1Luc4E2E2細胞) において、有意にかつ用量依存的にARNT2遺伝子の発現を抑制し、ERs-陰性株 (LNCaP細胞) においてARNT2遺伝子の発現に影響を与えなかった。また、ESR1の特異的拮抗剤であるMPPで前処置を行うと、BPA、BBP、o, p'-DDT暴露によるARNT2遺伝子の発現抑制作用は消失した。さらに、ESR1シグナリングで特異的に発現上昇することが知られているPDZ domain containing 1 (PDZK1)

遺伝子の発現はMPPで抑制された。これらの結果から、BPA、BBPおよびo, p'-DDTの暴露は、ESR1を介して、ARNT2遺伝子の発現を抑制することが示唆される。

また、ARNT2遺伝子の特異的阻害プローブであるsiRNAを用いて、同じファミリーでありアーレル炭化水素受容体（AHR）とヘテロ二量体を形成することが知られているARNT遺伝子の発現に影響を及ぼすかどうかを調べた。その結果、ARNT2遺伝子の発現は用量依存的に減少することが認められ、実験系がうまく機能していることは証明された。しかし、その時にARNT遺伝子の発現変動は認められなかった。これまでに、ARNTはAHRとヘテロ二量体を形成すること、ARNT2は低酸素シグナル伝達の転写因子であるHIF1 α とヘテロ二量体を形成し、生体影響に関わる様々な遺伝子の転写活性化を引き起こすことが知られている。そこで、ESR1遺伝子の発現が高いヒト細胞株（MCF7）において、ARNT2遺伝子の発現を抑制した場合、HIF1 α のシグナル伝達に影響を及ぼすかどうかを調べた。その結果、最も大きな発現変動が確認された遺伝子は、MMP1（matrix metalloproteinase 1）、SAG（S-antigen; retina and pineal gland (arrestin)）、VHL（von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase）であった。これらの遺伝子は、細胞外マトリックスの接着や、ホルモン刺激、細胞増殖シグナルに関与する因子であることが知られている。これらの結果から、環境化学物質の暴露が、ESR1を介して、ARNT2遺伝子とHIF1 α シグナル伝達系に影響を与えていることが示唆される。今後、さらに外陰部皮膚線維芽細胞を用いて、これらの遺伝子の役割や機能解明に関する研究を行い、化学物質応答に関する指標の有用なバイオマーカーになり得るかの確認を行う必要がある。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究は、内分泌攪乱化学物質にたいして遺伝的に脆弱な個体が存在すること、また、高感受性個体が先天奇形を発症するリスクが暴露量と比例して増加することを示しうる内容である。したがって、小児などの化学物質に脆弱な集団にたいする保護の必要性を再確認した国際化学物質管理会議の趣旨に沿い、2020年までに化学物質の健康や環境への影響を最小限にするという目標の実現化に寄与するものである。

現在まで、単一遺伝子のメチル化パターンや発現量の観点から、バイオマーカーを開発しようとする試みはなく、環境化学物質が単一遺伝子の作用を妨げることが確認できたとき、これは、新しい視点からのバイオマーカー開発となる。そして、特定の感受性多型やハプロタイプを持たない個人にたいしても環境化学物質悪影響を及ぼすことを認識させる効果を持つ。

(2) 環境政策への貢献

本研究により同定される感受性多型・ハプロタイプは、小児の環境化学物質感受性を評価するバイオマーカーとなる。そして、健常者における感受性因子の頻度を、暴露量が異なると考えられる世代間で比較することで、現在の小児集団が成人集団よりも、暴露量の観点から先天奇形症発症に関してより高いリスクを持つことを認識させる効果を持つと期待される。

このような成果は、一般集団の啓蒙や法令を作成する上においても、重要な役割を果たすと期待され、最終的に高リスク個体（感受性因子陽性小児）を保護しうる暴露量の推定に結びつ

くと思われる。

6. 国際共同研究等の状況

国際共同研究計画名：

重金属及びダイオキシン類の曝露量と口蓋口唇裂の発生頻度との関連性に関する研究

カウンターパート氏名・所属・国名：

賈 光・北京大学医学部公衆衛生学研究室・中国

参加・連携状況：

張 濟主任医師（済南市疾病予防控制中心）や顧依群主任医師（北京市海淀区妇幼保健院）と連携して、検体を収集し、ヒト組織における重金属及びダイオキシン類の負荷量を調べる。また、重金属及びダイオキシン応答遺伝子に着目し、口蓋口唇裂の発生頻度と曝露量との関係を調べる。

7. 研究成果の発表状況

（1）誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) MS. Alam, S. Ohsako, T. Matsuwaki, XB. Zhu, N. Tsunekawa, Y. Kanai, H. Sone, C. Tohyama and M. Kurohmaru: *Reproduction*, 139, 2, 427–437 (2010)

“Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate.”

- 2) X.Y. Qin, F. Wei, J. Yoshinaga, J. Yonemoto, M. Tanokura and H. Sone: *FEBS Lett.* 585, 20, 3310–3315 (2011)

“siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells.”

- 3) T. Ogata* et al.: *J. Hum. Genet.*,

“Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure: Implications for genetic susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors.” (accepted)

<査読付論文に準ずる成果発表>（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。）
特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) T. Ogata, J. Laporte and M. Fukami: *Hormone Research*, 71, 5, 245–252 (2009)

“*MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene involved in hypospadias.”

- 2) 緒方 勤：小児科診療、72, 1, 39–44 (2009)

「エピジェネティクスと遺伝疾患」

- 3) 緒方 勤：臨床泌尿器科、63, 2, 109–116 (2009)

「男児外陰部異常症」

- 4) 緒方 勤、佐藤直子：ゲノム医学、9, 2, 67–70 (2009)

「中枢性性腺機能不全：Kallmann 症候群を主として」

- 5) 緒方 勤：細胞工学、28, 6, 572-577 (2009)
「先天性疾患のエピジェネティクス：第14染色体ダイソミー表現型発症機序をモデルとして」
- 6) 緒方 勤：小児内科 増刊号（小児疾患診療のための病態生理）、41, 319-321 (2009)
「性腺無形成と性腺異形成」
- 7) 緒方 勤：科学、79, 9, 982-983 (2009)
「小児疾患と環境化学物質：遺伝—環境相互作用の観点から」
- 8) 緒方 勤：小児内科、41, 7, 1079-1084 (2009)
「SHOX遺伝子異常症：臨床症状発症機序の解明」
- 9) 緒方 勤、伊達木澄人、山澤一樹：SGA性低身長症のマネジメント（藤枝憲二 監修）、
メディカルレビュー社、41, 7, 57-68 (2009)
「胎内発育に影響する因子：IUGRの遺伝的要因」
- 10) 緒方 勤：小児内分泌学（日本小児内分泌学会 編集）、診断と治療社、305-309 (2009)
「性の分化機構」
- 11) 緒方 勤：小児内分泌疾患鑑別診断チャート（藤枝憲二 編集）、診断と治療社、74-75
(2009)
「マイクロペニス」
- 12) 緒方 勤：小児内分泌疾患鑑別診断チャート（藤枝憲二 編集）、診断と治療社、80-81
(2009)
「性分化異常」
- 13) 緒方 勤：化学物質と環境、エコケミストリー研究会会報、96, 1-5 (2009)
「小児疾患と環境化学物質」
- 14) 深見真紀、和田友香、緒方 勤：小児科、50, 7, 939-945 (2009)
「小児疾患における臨床遺伝学の進歩(日本人が発見にかかわった遺伝子):尿道下裂 (CXorf6)」
- 15) 吉田理恵、緒方 勤：小児外科、41, 2, 95-97 (2009)
「泌尿器生殖洞の発生分化とその異常」
- 16) H. Sone, S. Imanishi, H. Akanuma, R. Nagano, T. Fukuda, S. Ohsako: The roles of free radicals in
biology and medicine”, MEDIMOND SRL Publ., 45-52 (2009)
“Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders.”
- 17) 左合治彦、林 聡、穴見 愛：産婦人科治療、98, 5, 846-853 (2009)
「胎児超音波スクリーニングの実際」
- 18) 左合治彦、林 聡、穴見 愛：小児外科（出生前診断の倫理と実際）、41, 5, 457-460 (2009)
「出生前診断と胎児治療—産科の立場から」
- 19) 左合治彦：日産婦東京地方部会誌、58, 3, 288-292 (2009)
「一絨毛膜双胎の異常に対する胎児手術」
- 20) 左合治彦、林 聡、青木宏明：周産期医学（アウトカムからみた周産期管理）、39, 10,
1381-1385 (2009)
「胎児治療」
- 21) 緒方 勤：Pediatric Endocrinology Reviews抄訳シリーズ. No. 3. ジャパンメディアアートパ
ブリッシング、2-3 (2010)

- 「内分泌攪乱物質：特に性分化・発達にたいする影響について」
- 22) 緒方 勤: *Horm Front Gynecol* (特集: エピジェネティクス・ゲノムインプリンティング)、17, 12, 361-368 (2010)
「生殖補助医療とインプリンティング異常」
- 23) 深見真紀、伊達木澄人、緒方 勤: *Horm Front Gynecol* (目で見る生殖内分泌疾患の診断と治療)、17, 2, 4-8 (2010)
「中枢性性腺機能低下症」
- 24) 左合治彦、林 聡、杉林里佳、江川真希子、佐々木愛子: *産婦人科治療*、101, 5, 538-543 (2010)
「胎児治療の適応と限界」
- 25) 緒方 勤、位田忍、堀川玲子: *臨床泌尿器科*、65, 12, 897-902 (2011)
「性分化疾患の分類と社会的性の決定について」
- 26) 緒方 勤: *小児内科* (ちょっと気になる症候のみかた考え方)、43, 10, 1795-1799 (2011)
「外性器の異常 (性分化)」
- 27) 緒方 勤: *Fetal & Neonatal Medicine*、3, 3, 101-102 (2011)
「エピジェネティクス・インプリンティングと胎児・胎盤の成長・発達」
- 28) 緒方 勤: *卵子学* (森崇英 総編集)、京都大学学術出版会、88-100 (2011)
「性分化疾患」
- 29) 緒方 勤: *遺伝カウンセリングハンドブック* (福嶋義光 編集)、メディカルドゥ、130-131 (2011)
「性分化疾患における遺伝カウンセリング」
- 30) 緒方 勤: *生殖卵絨学: 臨床への進展* (石塚文平 編集)、医歯薬出版株式会社、17-25 (2011)
「減数分裂: 基礎知識と臨床の進展」
- 31) 緒方 勤: *Pediatric Endocrinology Reviews抄訳シリーズ. No. 26. ジャパンメディアアートパブリッシング*、4-5 (2011)
「多様なヌクレオチド除去修復(NER)とその医学的意義」
- 32) 緒方 勤: *内分泌・糖尿病内科学* (森昌朋 編集)、シュプリンガー・ジャパン、168-170 (2011)
「性腺機能低下症」
- 33) 中村美智子、野々村克也、深見真紀、宮戸真美、須川史啓、緒方 勤: *日本小児泌尿器科学会雑誌*、20, 1, 33-37 (2011)
「*Maml1*は、マウスライディッヒ腫瘍細胞において、ステロイド合成酵素遺伝子 *Cyp17a1* の発現調節を介し、テストステロン産生に関わっている」
- 34) 緒方 勤: *今日の小児治療指針15版*、医学書院、244-245 (2012)
「原発性性腺機能低下症」

(2) 口頭発表 (学会等) 発表年順 (古→新)

- 1) T. Ogata: *The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.*
“MAMALD1 for hypospadias and 46,XY disorders of sex development.”
- 2) T. Ogata: *The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.*
“Backdoor pathway to dihydrotestosterone identified in POR deficiency.”

- 3) T. Ogata: The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.
“ESR1 and cryptorchidiam/hypospadias (the susceptibility to environmental disruptors).”
- 4) T. Ogata: The Seminar for Department of Physiology, Development & Neuroscience, Cambridge, England, 2009.
“(Epi)genetic mechanisms leading to the development of upd(14)pat/mat phenotypes.”
- 5) T. Ogata: The 9th International Congress of Andrology, Barcelona, Spain, 2009.
“Hypospadias.”
- 6) T. Ogata: The Seminar for Human Molecular Genetics, Prince Henry's Institute of Medical Research, Monash Medical Centre, Melbourne, Australia, 2009.
“Gentic mechanisms involved in hypospadias.”
- 7) T. Ogata: Disorders of sex development: underlying molecular causes, clinical management and future strategies, Melbourne, Australia, 2009.
“Clinical and molecular studies on Japanese patients with DSD.”
- 8) T. Ogata: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPE, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
“Gentic causes of hypospadias. Symposium of syndromic DSD.”
- 9) T. Ogata: The 14th Annual Scientific Meeting of Korean Society for Pediatric Endocrinology, Seoul, Korea, 2009.
“Silver-Russell syndrome as a human imprinting disorder. Prenary Lecutre.”
- 10) T. Ogata: The 14th Annual Scientific Meeting of Korean Society for Pediatric Endocrinology, Seoul, Korea, 2009.
“SHOX haploinsufficiency: lessons from clinical studies. Special Lecutre.”
- 11) T. Ogata: The International Ovarian Conference 2009, Tokyo, Japan, 2009.
“Pathogenesis of POF.”
- 12) 緒方 勤: 市民提案の循環型社会をめざす会 (2009)
「化学物質と子どもの体への影響」
- 13) 緒方 勤: 第2回博多シンポジウム (2009)
「性分化異常症 (尿道下裂) と内外因子」
- 14) 緒方 勤: 第18回東海新生児研究会 (2009)
「胎児成長発達とゲノムインプリンティング」
- 15) 緒方 勤: 第14回鹿児島小児内分泌研究会 (2009)
「性分化異常症: 分子基盤と臨床的知見」
- 16) M. Kagami, M. Fukami, M. O'Sullivan, A. Green, S. Takada, F. Kato, A. Ferguson-Smith and T. Ogata: The 24th Naito Conference, Sapporo, Japan, 2009.
“Essential role of the *MEG3*-DMR in the regulation of the maternally inherited human chromosome 14q32.2 imprinting region.”
- 17) MP. Brandão, M. Fukami, BB. Mendonca, M. Gerdulo, S. Domenice, IJP. Arnhold, T. Ogata and EMF. Costa: The Endocrine Society's 91st Annual Meeting, Washington, USA, 2009.
“A Novel Gain of function Mutation in the MAMLD1 gene in patients with Undetermined 46,XY

Disorders of Sex Development.”

- 18) MP. Brandão, EMF. Costa, M. Fukami, MG. Santos, NP. Pereira, S. Domenice, T. Ogata and BB. Mendonca: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
 “MAMLD1 Homozygous gain-of-function missense mutation causing 46,XX disorder of sex development in a virilized female.”
- 19) S. Dateki, K. Kosaka, K. Hasegawa, M. Fukami, K. Muroya, M. Adachi, K. Motomura, N. Azuma, H. Tanaka, T. Tajima, H. Moriuchi and T. Ogata: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
 “Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary hormone deficiency.”
- 20) K. Matsuo, S. Suzuki, M. Maimaiti, T. Mulai, T. Hamajima, K. Motomura, Y. Naiki, T. Ogata, T. Tajima, T. Hasegawa and K. Fujieda: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
 “Evaluation of sensitive detection methods for somatic mosaicism of *GNAS1* mutation in patients with McCune-Albright syndrome.”
- 21) MP. Brandão, M. Fukami, BB. Mendonca, MG. Santos, S. Domenice, IJP. Arnhold, T. Ogata and EMF. Costa: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
 “A gain of function mutation in the *MAMLD1* discloses a new pathway in the etiology of 46,XY disorders of sex development.”
- 22) K. Nakabayashi, W. Yoshida, K. Yamazawa, M. Kusumi, T. Ogata and K. Hata: The 47th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Baltimore, USA, 2009.
 “MeDIP-chip detection and quantitative DNA methylation analysis of differentially methylated regions in imprinted loci.”
- 23) 和田友香、深見真紀、須川史啓、宮戸真美、緒方 勤：第112回日本小児科学会学術集会（2009）
 「*MAMLD1*遺伝子におけるスプライス部位変異（*IVS4-2A>G*）の検討」
- 24) 和田友香、深見真紀、緒方 勤：第54回日本人類遺伝学会（2009）
 「*MAMLD1*遺伝子におけるスプライス部位変異（*IVS4-2A>G*）の検討」
- 25) 宮戸真美、中村美智子、須川史啓、深見真紀、宮戸健二、菊水健史、小川佳宏、緒方 勤：第43回日本小児内分泌学会（2009）
 「*Mamld1*発現異常が引き起こすホルモン産生と摂食調節の解析」
- 26) 加藤芙弥子、深見真紀、和田友香、マイラ ブランダオ、中村美智子、上松あゆみ、長谷川奉延、宮戸真美、緒方 勤：第43回日本小児内分泌学会（2009）
 「*MAMLD1*異常症：新規遺伝子変異の同定と変異陽性患者の表現型」
- 27) M. Fukami, G. Nishimura, K. Homma, T. Nagai, K. Hanaki, T. Ishii, M. Adachi, T. Tajima, Y. Hasegawa, T. Hasegawa, R. Horikawa, K. Fujieda and T. Ogata: 第32回日本分子生物学会年会（2009）
 “Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency: Identification and Characterization of Biallelic

- Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in 36 Japanese Patients.”
- 28) M. Miyado, M. Nakamura, M. Fukami, K. Miyado, T. Kikusui, Y. Ogawa and T. Ogata: 第32回日本分子生物学会年会 (2009)
 “Impaired expression of *Maml1* disturbs production of steroid hormones and feeding regulation.”
- 29) X. Qin, H. Zaha, R. Nagano, J. Yonemoto, H. Sone and J. Yoshinaga: 第12回日本内分泌攪乱化学物質学会 研究発表会 (2009)
 “Estrogenic activities of endocrine-disrupting chemicals and their effects on male genital disorders related genes expression.”
- 30) H. Sone, L. Yang, T. Fukuda, H. Akanuma, R. Nagano and H. Zaha: 21st Cent. Adv. Mol. Toxicol. Environ. Chem. Pathog. Dis., Tokyo, Japan, 2009.
 “The effect of low dose BPA on cell proliferation and senescence in human mammary epithelial cells.”
- 31) H. Sone, S. Imanishi, M. Okura, H. Zaha, H. Shiraishi and H. Fujimaki: PPTOX II : Role of environmental stressors in the developmental origins of disease, Miami, USA, 2009.
 “Prenatal exposure to permethrin inhibits brain development via disruption of vascular development in mice.”
- 32) X. Qin, H. Zaha, J. Yoshinaga, J. Yonemoto and H. Sone: 29th Int. Symp. Halogenat. Persistent Org. Pollut.-DIOXIN, Beijing, China, 2009.
 “Association of AHR and ESR1-responsive gene variations with susceptibility to endocrinedisrupting chemicals in risk of male genital disorders.”
- 33) A. Anami, S. Hayashi, Y. Sugo and H. Sone: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “The characterization of ultrasound examination to predict twin one fetal demise in monochorionic diamniotic twin pregnancies.”
- 34) S. Hayashi, K. Ishii, N. Kato, Y. Takahashi, M. Nakata, J. Murotuki, T. Murakoshi, Y. Nanba, Y. Ito and H. Sago: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “Perinatal outcome of monochorionic twin pregnancies complicated by amniotic fluid discordance without twin-twin transfusion syndrome.”
- 35) S. Hayashi, H. Sago, M. Hanaoka, M. Horiya, A. Anami, T. Nakamura, Y. Ito, T. Chiba, M. Kitagawa and M. Natori: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “Postnatal outcome in twin reversed arterial perfusion treated with radiofrequency ablation.”
- 36) H. Sago, S. Hayashi, N. Kato, Y. Nanba, Y. Ito, H. Hasegawa, H. Kawamoto, M. Saito, J. Murotsuki, Y. Takahashi, M. Nakata, K. Ishii and T. Murakoshi: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “Risks and the outcome of twin-to-twin transfusion syndrome after fetoscopic laser surgery.”
- 37) M. Hanaoka, S. Hayashi, M. Horiya, A. Anami, R. Oi and H. Sago: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.
 “The human chorionic gonadotropin and fetoscopic laser photocoagulation for twin-twin transfusion

syndrome.”

- 38) H. Sago: 11th Korea – Japan Joint Conference of Obstetrics and Gynecology, Soul, Korea, 2009.
“The Current State of Fetal Therapy in Japan.”
- 39) T. Ogata: The 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, 2010.
“Disorders of sex development: Shrinking black box. In: Disorders in gonadal differentiation and development.”
- 40) T. Ogata, R. Yoshida and F. Massart: The 49th Annual Meeting of European Society for Paediatric Endocrinology, Prague, Czech Republic, 2010.
“Haplotype analysis of the estrogen receptor alpha gene in precocious puberty.”
- 41) T. Ogata: The 6th Biennial Scientific Meeting of The Asia Pacific Paediatric Endocrinology, Xi’an, China, 2010.
“Endocrine Disruptors – the environment and its impact on paediatric endocrinology. In: Hot Topic Session.”
- 42) 緒方 勤: 松葉のダイオキシン調査2010実行委員会 (2010)
「子どもの健康と環境ホルモン」
- 43) 緒方 勤: 10th Asahikawa Winter Conference on Molecular Medicine (2010)
「性分化疾患における最近の臨床的・分子遺伝学的進歩」
- 44) 緒方 勤: 第13回胎児遺伝子診断研究会 (2010)
「胎児成長発達とゲノムインプリンティング」
- 45) 緒方 勤: 第249回日本小児科学会東海地方会特別講演 (2010)
「性分化疾患の発症機序：遺伝-環境相互作用の観点から」
- 46) 緒方 勤: 日本アンドロロジー学会第29回学術大会・第16回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会特別講演 (2010)
「性分化疾患研究の最前線」
- 47) 緒方 勤、中村美智子、宮戸真美、深見真紀: 第28回内分泌代謝サマーセミナー (2010)
「MAMLD1変異とテストステロン産生障害：変異陽性患者およびノックアウトマウスの表現型解析とin vitro機能解析」
- 48) M. Miyado, M. Nakamura, M. Fukami, K. Miyado and T. Ogata: 第33回日本分子生物学会年会 (2010)
“Impaired expression of *Mamld1* disturbs the gene expression of steroidogenic enzymes.”
- 49) 宮戸真美、中村美智子、深見真紀、宮戸健二、緒方 勤: 第44回日本小児内分泌学会 (2010)
「ステロイドホルモン産生におけるMamld1の機能解析」
- 50) 中村美智子、深見真紀、宮戸真美、須川史啓、緒方 勤、野々村克也: 第19回日本小児泌尿器科学会 (2010)
「Mamld1は、マウスライディッヒ腫瘍細胞において、ステロイド合成酵素遺伝子の発現調節を介し、テストステロン産生に関わっている」
- 51) 左 勝則、青木宏明、宮田あかね、三井真理、池谷美樹、渡辺典芳、小澤伸晃、塚原優己、久保隆彦、村島温子、左合治彦、北川道弘: 第62回日本産婦人科学会学術講演会 (2010)
「妊娠初期ならびに中期血圧値による妊娠高血圧症候群の発症予測」

- 52) 須郷慶信、林 聡、大石由利子、堀谷まどか、加藤有美、青木宏明、高橋宏典、三浦裕美子、三原慶子、佐々木愛子、左合治彦、名取道也：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2010）
「当センターにおける妊娠30週の胎児超音波スクリーニング検査の検討」
- 53) 佐々木愛子、小澤伸晃、林 聡、澤井英明、増崎英明、平原史樹、左合治彦：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2010）
「日本における出生前診断の動向（2003～2008年）」
- 54) T. Ogata: 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters (COW 2011), Copenhagen, Denmark, 2011.
“Genetic susceptibility to endocrine disrupters: Estrogen receptor polymorphisms.”
- 55) T. Ogata and M. Fukami: The 13th European Congress of Endocrinology (ECE 2011), Rotterdam, Netherlands, 2011.
“Disorders of Sex Development: Recent Progress.”
- 56) T. Ogata: Hamamatsu DOHaD Conference, Hamamatsu, Japan, 2011.
“Genetic susceptibility to endocrine disrupters: Estrogen receptor polymorphisms.”
- 57) 緒方 勤：国際医療福祉大学熱海病院学術講演会（2011）
「子どもの成長と成熟」
- 58) 緒方 勤：第1回乳幼児発達指導研究会（2011）
「乳幼児期および思春期の性について」
- 59) 緒方 勤：浜松小児科医会（2011）
「子どもを取り巻く環境と健康」
- 60) 緒方 勤：第81回京都内分泌同好会（2011）
「性分化疾患研究の進歩」
- 61) 緒方 勤：第3回岐阜小児内分泌学術講演会（2011）
「性分化疾患の分子基盤」
- 62) 緒方 勤：第12回山陰内分泌研究会（2011）
「性分化疾患の分子基盤: update」
- 63) 緒方 勤：第40回Medical Photonics Seminar（2011）
「子どもを取り巻く環境と小児の健康」
- 64) 緒方 勤：第2回生殖医療研究会（2011）
「先天奇形症候群とゲノムインプリンティング」
- 65) J. Yonemoto, J. Kawahara, H. Sone, T. Hattori, T. Matsumura, Y. Ohya and S. Sugama: 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Brussels, Belgium, 2011.
“Prenatal Exposure to OH-PCBs in Relation to Body Weight and Neurodevelopment.”
- 66) 宮戸真美：第3回領域会議 性差構築の分子基盤（2011）
「*Mamld1*遺伝子の胎仔精巣における機能解析」
- 67) 宮戸真美、中村美智子、宮戸健二、緒方 勤、深見真紀：第45回日本小児内分泌学会（2011）
「精巣における*Mamld1*の機能解析」
- 68) 鏡雅代、松岡健太郎、加藤英弥子、宮戸真美、松原圭子、深見真紀、山中美智子、鈴木伸宏、永井敏郎、緒方 勤：第45回日本小児内分泌学会（2011）

- 「RTL1遺伝子の胎盤における機能の解明：胎盤発育不全、子宮内胎児発育遅延の原因解明をめざして」
- 69) 五十嵐麻希、加藤芙弥子、辻克和、緒方 勤、深見真紀：第56回日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会 共同大会（2011）
「アンドロゲン受容体遺伝子サイレント変異を有する不完全型アンドロゲン不応症の1例」
- 70) 秦咸陽、小島祥敬、水野健太郎、上岡克彦、吉永淳、米元純三、林祐太郎、群健二郎、緒方 勤、曽根秀子：第14回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会（2011）
「尿道下裂男児の皮膚細胞を用いた環境内分泌かく乱化学物質の目的遺伝子の解明」
- 71) 米元純三、河原純子、曽根秀子、服部達也、松村徹、大矢幸弘、洲鎌盛一：第14回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会（2011）
「保存臍帯中OH-PCB濃度と2歳児の体重、軽度発達障害との関係」
- 72) 宮戸真美、中村美智子、宮戸健二、緒方 勤、深見真紀：第34回日本分子生物学会（2011）
“Mamld1 regulates expression of steroidogenic enzyme genes in mouse fetal testes.”
- 73) 五十嵐麻希、加藤芙弥子、辻克和、緒方 勤、深見真紀：第34回日本分子生物学会（2011）
「アンドロゲン受容体遺伝子サイレント変異を有する不完全型アンドロゲン不応症の1例」
- 74) 須郷慶信、林聡、大石由利子、堀谷まどか、加藤有美、青木宏明、高橋宏典、三浦裕美子、三原慶子、佐々木愛子、左合治彦、名取道也：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2011）
「当センターにおける妊娠30週の胎児超音波スクリーニング検査の検討」
- 75) 佐々木愛子、小澤伸晃、林 聡、澤井英明、増崎英明、平原史樹、左合治彦：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2011）
「日本における出生前診断の動向（2003～2008年）」
- 76) 緒方 勤：第42回九州小児内分泌懇話会（2012）
「ゲノムインプリンティングと個体・胎盤成長発達」
- 77) 緒方 勤：JCR研修会（2012）
「小児内分泌関連疾患におけるインプリンティングにかかわる最近の話題」

(3) 出願特許

- 1) 緒方 勤：（独）国立成育医療研究センター研究所；「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。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

- 1) 緒方 勤：Certificate of Excellent Reviewer, Human Reproduction, Oxford University Journals. 2009年6月11日。

8. 引用文献

- 1) R. Yoshida, M. Fukami, I. Sasagawa, T. Hasegawa, N. Kamatani and T. Ogata: The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 90, 8, 4716–4721 (2005)
“Association of cryptorchidism with a specific haplotype of the estrogen receptor alpha gene: implication for the susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors.”
- 2) M. Watanabe, R. Yoshida, K. Ueoka, K. Aoki, I. Sasagawa, T. Hasegawa, K. Sueoka, N. Kamatani, Y. Yoshimura and T. Ogata: Human Reproduction, 22, 5, 1279–1284 (2007)
“Haplotype analysis of the estrogen receptor 1 gene in male genital and reproductive abnormalities.”
- 3) XY. Qin, H. Zaha, R. Nagano, J. Yoshinaga, J. Yonemoto and H. Sone: Toxicol Lett., 206, 2, 152–157 (2011)
“Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism.”
- 4) DW. Singleton, Y. Feng, J. Yang, A. Puga, AV. Lee and SA. Khan: Environ Res., 100, 1, 86–92 (2006)
“Gene expression profiling reveals novel regulation by bisphenol-A in estrogen receptor-alpha-positive human cells.”
- 5) Y. Gibert, S. Sassi-Messai, JB. Fini, L. Bernard, D. Zalko, JP. Cravedi, P. Balaguer, M. Andersson-Lendahl, B. Demeneix and V. Laudet: BMC Dev Biol., 11, 4 (2011)
“Bisphenol A induces otolith malformations during vertebrate embryogenesis.”
- 6) M. Fukami, Y. Wada, K. Miyabayashi, I. Nishino, T. Hasegawa, A. Nordenskjöld, G. Camerino, C. Kretz, A. Buj-Bello, J. Laporte, G. Yamada, K. Morohashi and T. Ogata: Nat Genet., 38, 12, 1369–1371 (2006)
“CXorf6 is a causative gene for hypospadias.”
- 7) M. Fukami, Y. Wada, M. Okada, F. Kato, N. Katsumata, T. Baba, K. Morohashi, J. Laporte, M. Kitagawa and T. Ogata: J Biol Chem., 283, 9, 5525–5532 (2008)
“Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1 or CXorf6) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence.”
- 8) MD. Ritchie, LW. Hahn, N. Roodi, LR. Bailey, WD. Dupont, FF. Parl and JH. Moore: Am J Hum Genet., 69, 1, 138–147 (2001)
“Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer.”

(2) 臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備に関する研究

浜松医科大学医学部小児科 / (独) 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部 緒方 勤

(独) 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部 深見真紀

(独) 国立環境研究所環境リスク研究センター健康リスク研究室 曾根秀子

<研究協力者>

(独) 国立成育医療研究センター研究所分子内分泌研究部 吉田理恵・宮戸真美

(独) 国立成育医療研究センター病院周産期センター 左合治彦・中村知夫

(独) 国立環境研究所環境リスク研究センター環境リスク研究推進室 青木康展

平成21～23年度累計予算額：3,322千円（うち、平成23年度予算額：1,204千円）

予算額には、間接経費を含む。

【要旨】 本研究は、尿道下裂などの小児先天奇形発症を対象とする環境リスク評価法の基盤整備を行うことを目的とする。近年、停留精巣や尿道下裂などの先天奇形が増加しているという疫学的データが日本や欧米諸国から報告され、大きな社会的問題となっている。そして、これらの現象に共通する原因として、内分泌攪乱物質の影響が推測されている。さらに、内分泌攪乱物質として作用しうる環境化学物質の生産量・排出量は、近年増加している。また、このような先天異常の発症が、内分泌攪乱物質の暴露量や暴露時期の他に、個体の遺伝的感受性にも支配されるという作業仮説のもとに、研究を行ってきた。上記のような遺伝因子と環境因子の相互作用で出現する表現型を適切に解析するためには、同一集団において両者を解析することが重要である。

しかし、現在までの研究（特に小児を対象とする研究）は、遺伝因子と環境因子を異なる集団で解析しているという弱点を有する。特に、暴露量の検討に際し、ゲノムDNA・RNAおよび不死化リンパ球を保存するという体制は見られない。また、小児検体（特に正常検体）の採取・保存は、倫理的に極めて困難であるため、臍帯血・胎盤などの胎児付属物が保存の対象となると考えられるが、本邦には環境リスク評価を目的とする臍帯血・胎盤バンキングシステムは存在しない。

そこで、本研究では、正常児における臍帯血・胎盤の使用およびバンキングを行った。これまでに、DNA・リンパ球セルライン検体として、臍帯血1,200、胎盤67、精子形成障害患者150、尿道下裂・停留精巣患者350、早発性卵巣機能不全患者120、口蓋裂患者60例分を集積した。また、組織検体として、胎盤67、尿道下裂・停留精巣患者の外陰部皮膚350、口蓋裂患者の口腔粘膜60例分を集積した。胎盤・臍帯血を用いた発現解析やメチル化解析を行い、新鮮な胎盤では様々な解析が可能であることが判明した。さらに、確実にSNP配列の解析が可能であるゲノムDNAを抽出するために、微量な血液の保存条件の詳細な検討を行った。

【キーワード】 小児先天奇形、環境リスク評価、バンキングシステム、臍帯血・胎盤、長期フォローアップ

1. はじめに

近年、停留精巣や尿道下裂などの先天奇形が増加しているという疫学的データが日本や欧米諸

国から報告されている。これらの現象に共通する原因が内分泌攪乱物質の影響であると推測されており、さらに内分泌攪乱物質として作用しうる環境化学物質の生産量・排出量は近年増加傾向にあると報告されている。われわれは、このような先天異常の発症が、内分泌攪乱物質の暴露量や暴露時期の他に、個体の遺伝的感受性にも支配されるという作業仮説のもとに、研究を行ってきた。その結果、遺伝因子（感受性）と環境因子（化学物質）の相互作用によって出現する先天異常の表現型を適切に解析するために、同一集団において両者を解析することが重要であることがわかった。

しかし、これまでの研究（特に小児を対象とする研究）は、遺伝因子と環境因子を異なる集団で解析を行っていた。特に、小児検体（特に正常検体）の採取・保存は倫理的に極めて困難であり、現在まで本邦には環境リスク評価を目的とする臍帯血・胎盤バンキングシステムは存在していない。

このような遺伝因子と環境因子の相互作用で出現する表現型を適切に解析するためには、同一集団において両者を解析することが重要である。特に、臨床情報が整備され、かつ、バイオマーカーのプロファイリングが終了した試料のバンキングがなされれば、長期フォローアップや遺伝-環境相互作用および遺伝子間相互作用の解析を行う上で極めて有用と考えられる。

以上から、小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備には臍帯血・胎盤バンキングシステムの構築が重要であると考えられる（図(2)-1）。

サブテーマ2: 臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備

1. 試料およびデータの集積と保存

対象: 胎盤、臍帯、臍帯血由来の組織
DNA、cDNA (RNA)、セルライン樹立
感受性と暴露量を同一試料で解析

- ① 遺伝因子解析: 同定されたバイオマーカーの解析
- ② 暴露量測定: バイオマーカー関連環境化学物質の測定
- ③ 臨床情報: 長期コホートスタディの基盤

2. 保存試料のプロファイリングと品質管理

- ① プロファイリング: 同定されたバイオマーカー
- ② 品質管理: インプリンティング遺伝子のメチル化パターンと発現量、環境残留性化学物質の測定、毒性等量の測定など

3. 少量サンプル解析のパイロットスタディ

- ① 保存条件の異なる血液のゲノムDNA回収量
- ② 保存条件の異なる血液のゲノムDNAの品質確認

図(2)-1 サブテーマ2

2. 研究開発目的

本研究は、尿道下裂などの小児先天奇形発症を対象とする環境リスク評価法の基盤整備を行うことを目的とする。このために、環境リスク研究に広く貢献できる臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備を行う。臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備では、分子生物学的解析試料と暴露量測定試料の両者を対象とする。そして、連結可能匿名化の臨床情報を採取し、またバイオマ-

カーとして使用しうる多型・ハプロタイプの頻度や疾患責任遺伝子の発現量などのプロファイリングを行った後に試料をバンキングして、長期フォローアップを可能とすると共に、今後の遺伝-環境相互作用や遺伝子間相互作用の研究のために役立てることを目標とする。

また、小児先天奇形発症者からの血液の提供は、少量であることが予想されるため、遺伝子多型解析に必要なゲノムDNAサンプルを微量の血液から採取可能かどうか、保存プール血液を用いて調べる。

3. 研究開発方法

(1) 試料およびデータの集積と保存に関する研究

1) 試料およびデータの集積に関する研究

分子生物学的な解析試料として、臍帯血・胎盤からDNA採取、RNA採取、不死化リンパ球作製を行う。また、可能な限り、母親あるいは両親の末梢血からDNA採取、RNA採取、不死化リンパ球作製を行う。

2) 試料およびデータの保存に関する研究

暴露量測定試料を用いて、ビスフェノールやダイオキシンなど代表的化学物質を測定すると共に、残りを凍結保存する。臨床情報として、食事内容、生活環境など詳細な妊娠歴を成育コホート方式に従い記録し、ある程度の暴露量を把握する。また、出生後の新生児所見、臍帯・胎盤所見を連結可能匿名化で記録する。これにより、下記のプロファイリングデータおよび将来のデータとの対応、および、長期フォローアップを可能とする。

(2) 保存試料のプロファイリングと品質管理に関する研究

バイオマーカーとして使用しうる多型・ハプロタイプの頻度や疾患責任遺伝子の発現量などのプロファイリングを行い、データベースとして保存し、今後の遺伝-環境相互作用や遺伝子間相互作用の研究のために公開する。さらに、品質管理は、胎盤・臍帯血を含むこれまでに集積した検体を用いたインプリンティング遺伝子のメチル化パターンと発現量を解析することで実施する。詳細を次に示す。

インプリンティング遺伝子のメチル化は、親由来特異的なゲノムDNAのメチル化可変領域(メチル化を受ける、あるいは受けない領域)のメチル化状態を調べることで解析する。ゲノムDNAのメチル化状態は、親由来の特異的インプリンティング遺伝子の発現パターンと密接に連動する。このメチル化は、ゲノムDNAのCpG配列のシトシンに起こる。そのため、ゲノムDNAにbisulfite処理(非メチル化シトシンのみがチミンへと変換される)を行うと、ゲノムDNAのメチル化可変領域のメチル化と非メチル化状態を識別できるようになる。このようなbisulfite処理により生じたゲノムDNAのメチル化可変領域のメチル化と非メチル化状態は、特異的な制限酵素部位を生じさせる。これを利用して、メチル化されているクローンの比率(methylation index)を求め、定量的評価を行う。具体的に、ゲノムDNAのメチル化可変領域のメチル化と非メチル化状態を区別しないプライマーを設計し、bisulfite処理したDNAを増幅する。得られたPCR産物を制限酵素処理すると、非メチル化DNAとメチル化DNAを区別することができ、Bioanalyzer(Agilent)による定量が可能となる。正常範囲を逸脱するmethylation indexを示した検体につい

て、そのPCR産物をサブクローニングし、直接シーケンスで解析することで詳細なメチル化状態を調べる。

また、環境残留性化学物質の測定やエストロゲン活性およびアリール hidrocarbon活性などを指標にした毒性等量の測定を行う。

(3) 少量サンプル解析のパイロットスタディに関する研究

特殊血液保存用ろ紙（カード）であるFTA Elute（GE Healthcare）とFTA（GE Healthcare）を用いて血液を保存する。その後、FTA EluteカードからゲノムDNAを抽出してPCRを行い、ゲノムDNA回収量およびPCR産物の濃度より増幅効率を算出する。さらに、これらのサンプルが、SNP解析に利用できるかを検討する。詳細を次に示す。

1) 保存条件の異なる血液のゲノムDNA回収量に関する研究

a 特殊血液保存用ろ紙FTA EluteとFTAへの血液保存

保存プール血液は、すぐに特殊血液保存用ろ紙FTA Eluteに40 μ l、FTAに125 μ lをカードに滴下したのち、3時間（FTA Elute）、または1時間（FTA）風乾させる。カードはシリカゲルとともに保存する。

b FTA Elute保存血液のゲノムDNA抽出

FTA Eluteカードに保存した血液は、専用のマイクロパンチ（GE healthcare）を用いて、カードからディスクをくり抜く。そのディスクは、1.5 mlのマイクロチューブに入れ、500 μ lの滅菌水を加え、ただちにボルテックス（3回、計5秒間）する。ディスクを30 μ lの滅菌水が入った0.5 mlチューブに移し、完全に沈んだ状態で95 $^{\circ}$ C、25分間加熱する。その後、60回パルスボルテックスで攪拌し、30秒間遠心してディスクを取り除き、ゲノムDNA溶出液を得る。

c 凍結保存血液のゲノムDNA抽出

-80 $^{\circ}$ Cおよび-20 $^{\circ}$ Cにて凍結保存していた血液100 μ lより、DNeasy（QIAGEN）を用いてゲノムDNAを抽出する。

d FTA Elute保存血液のDNeasyを用いたゲノムDNA抽出

FTA Eluteカードに保存した血液は、専用のマイクロパンチ（GE healthcare）を用いて、カードからディスクをくり抜く。そのディスクは、滅菌水で洗い、1.5 mlチューブに移し、滅菌水中に完全に沈んだ状態で95 $^{\circ}$ C、5分間加熱し、ゲノムDNA溶出液を得る。得られた溶出液に、Proteinase K、RNase（QIAGEN）を加えて室温で2分反応後、DNeasyのAL bufferを加えて攪拌し、56 $^{\circ}$ C、15分反応させる。つぎに95 $^{\circ}$ C、20分溶出させたのち、ボルテックスとピペッティングによる攪拌を行い、100%エタノールを加えてカラムへ移す。その後、リンス、溶出を行う。

e FTAのディスクの洗浄

FTAカードに保存した血液は、専用のマイクロパンチ（GE healthcare）を用いて、カードからディスクをくり抜く。そのディスクは、200 μ lの精製試薬が入ったマイクロチューブに入れ、ピ

ペッピングをしながら、室温で5分間インキュベートする。その後、精製試薬を捨てる。この工程を3回行い、さらにTEバッファー（10mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0）200 µlで2回洗浄する。PCR直前にディスクを取り出して乾燥させた後、PCR反応液にディスクを入れて使用する。

f FTA保存血液のゲノムDNA抽出

上記5)で洗浄したディスクを取り出した後、PBS、Protenase K、RNaseを加え、2分間インキュベートする。AL buffer (QIAGEN, DNeasy)を加え、ボルテックスで攪拌後、56°Cで2時間、時々攪拌しながらインキュベートする。DNeasyのプロトコールに従い、ゲノムDNAの溶出を行う。

g 保存プール血液より抽出したゲノムDNA濃度測定

保存プール血液より抽出したゲノムDNA濃度を測定するため、Picogreen (Molecular Probes)を用いて2本鎖DNAの定量を行う。2本鎖DNAの濃度は、Molecular Imager FX (BIO RAD) およびABI 7700 (ABI)を用いて蛍光値を測定して算出する。

2) 保存条件の異なる血液のゲノムDNAの品質確認に関する研究

a 保存プール血液より抽出したゲノムDNA増幅

保存プール血液は、ごく微量 (FTA Elute保存血液40 µl、FTA保存血液125 µl、-80°Cおよび-20°Cにて凍結保存血液100 µl) であるため、ゲノムDNAの増幅が必要である。そのため、GenomiPhi (GE Healthcare) のプロトコールに従い、抽出したゲノムDNAの増幅を行う。GenomiPhiは、数ngのゲノムDNAから数µgの高分子量DNAが調製できるwhole genome amplification試薬であり、血液や口腔粘膜など、抽出したゲノムDNAが少量の場合でも検体の解析が十分に行える。

b ゲノムDNAの抽出確認

保存プール血液よりゲノムDNAが抽出されているか確認するため、ヒトCYP1A2の上流域のプライマー (5'-AACCGAGCCTAACCTCAAACCTT, 5'-GTAGAGAGGAGGTCTTGCCATG) を用いてPCRを行う。

4. 結果及び考察

(1) 試料およびデータの集積と保存に関する研究

1) 試料およびデータの集積に関する研究

本研究では、正常児における臍帯血・胎盤の使用およびバンキングを行った。

これまでに、DNA・リンパ球セルライン検体として、臍帯血1,200、胎盤67、精子形成障害患者150、尿道下裂・停留精巣患者350、早発性卵巣機能不全患者120、口蓋裂患者60例分を集積した。また、組織検体として、胎盤67、尿道下裂・停留精巣患者の外陰部皮膚350、口蓋裂患者の口腔粘膜60例分を集積した (図(2)-2)。

浜松医科大学病院 ・産科 ・小児科 ・こども発達センター など	これまでに蓄積された検体数 DNA・リンパ球セルライン 臍帯血 1,200 胎盤 67 精子形成障害患者 150 尿道下裂・停留精巣患者 350 早発性卵巢機能不全患者 120 口蓋裂患者 60 正常成人 >1,000
研究参加医療機関 ・産科 ・小児科 など	組織・線維芽細胞 胎盤 67 外陰部皮膚組織 (尿道下裂、停留精巣) 350 口腔粘膜 (口蓋裂) 60
成育医療研究センター病院 ・周産期診療科 ・新生児科 ・泌尿器科 ・形成外科	今後の見込み 臍帯血 >500/年 胎盤 >50/年 外陰部皮膚組織 >50/年 末梢血ゲノムDNA >500/年
研究参加医療機関 ・泌尿器科 ・小児科 など	

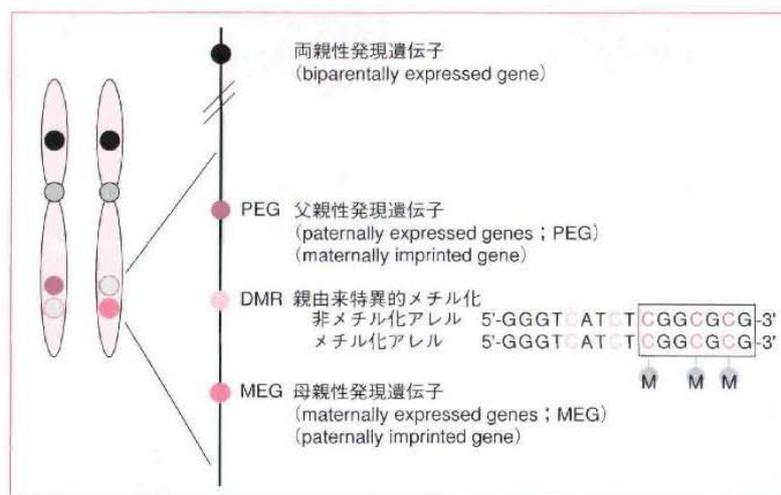
図(2)-2 検体集積システム

2) 試料およびデータの保存に関する研究

提供頂いた検体（臍帯血・胎盤、母親あるいは両親の末梢血）には、固有の研究番号（例：胎盤組織-001、検体の中身と三桁の数字）をつけ、研究者には検体と研究番号、診断名などの診療情報のみを渡している。対象者の氏名・住所などの個人識別情報と、検体に付けられた研究番号を結びつける対応表は、厳重に保管管理している。

(2) 保存試料のプロファイリングと品質管理に関する研究

胎盤・臍帯血を含むこれまでに集積した検体を用いて、発現解析やメチル化解析を種々の遺伝子やインプリンティング遺伝子を対象として行った。インプリンティング領域には、父親由来のときのみ働く遺伝子（父性発現遺伝子、paternanlly expressed gene: PEG）や母親由来のときのみ働く遺伝子（母性発現遺伝子、maternally expressed gene: MEG）とともに、メチル化可変領域（differentially methylated region: DMR）が存在する（図(2)-3）。



図(2)-3 インプリンティング遺伝子とメチル化可変領域 (DMR)

(Horm Front Gynecol、17, 12, 361-368 (2010)) より転載)

その結果、新鮮な胎盤では、種々の遺伝子やインプリンティング遺伝子を対象とする遺伝子発現解析やメチル化解析などの様々な解析が可能であることを見いだした。また、ホルマリン処理したパラフィンブロック中に保存された胎盤を用いた場合でも、200 bp以下のPCR産物は比較的容易に得られ、メチル化解析が可能であることを明らかにした。一方、1年以上経過したパラフィンブロック中に保存された胎盤を用いた場合、遺伝子発現解析は難しいことがわかった。長期間パラフィンブロック中に保存された組織から抽出されるRNAは、新鮮な組織から抽出したものと比較して、RNAの分解が進行していることが知られている。また、RNAの分解の程度は、パラフィンブロックの保存状態に大きく依存することも知られている。そのため、組織から抽出したRNAの18S rRNAがはっきりと確認できるか、あるいは18S rRNAも確認できないほどに分解が進んでいるかを確認することにより、RNA分解の程度の判断は可能である。これまでの経験より、RNAが分解されていても(18S rRNAを確認できない場合でも)、RT-PCRによる遺伝子の検出は可能な場合が多い。さらに、長期間パラフィンブロック中に保存された組織から抽出されるRNAを用いたRT-PCRは、新鮮な組織から抽出したものと比較して増幅効率が低い。そのため、増幅サイズを200 bp以下になるようにプライマーの設定を行うことで、遺伝子発現解析が可能となる。

現在、われわれは、胎盤を含む組織検体に関して、新鮮な組織検体と同等の遺伝子発現解析結果を得ることが可能な保存法を検討しており、これまでに胎盤を含む組織のRNAlater溶液(Life Technologies)を用いた保存を試みている。RNAlater溶液は、細胞中のRNAを安定化および保護するための試薬であり、組織中に迅速に浸透する水溶性の無毒性組織保存液である。遺伝子発現解析を行った結果、RNAlater溶液に保存した胎盤から抽出したRNAは、新鮮な胎盤から抽出したRNAと同等の品質を保持していることが明らかとなった。これらの結果は、胎盤・臍帯血を用いたバンキングシステムが、実際に有用であることを示唆する。

(3) 少量サンプル解析のパイロットスタディに関する研究

1) 保存条件の異なる血液のゲノムDNA回収量に関する研究

保存条件の異なる血液のゲノムDNAの回収量、抽出前処理の違い、およびFTAカードのサイズによるゲノムDNA回収量の検討を行った。

-20℃保存の血液と比較すると、-80℃保存の血液から抽出したゲノムDNA回収量は約2.5倍量多く、血液の保存は-80℃が適していることが明らかとなった。また、FTA Eluteカードを用いて保存した血液からゲノムDNA抽出方法を検討したところ、ボルテックスやピペッティングの作業を追加することにより、ゲノムDNAの回収量が増加した（表(2)-1）。

表(2)-1 保存条件の異なる血液のゲノムDNA回収量

	-80℃ 凍結保存 DNeasy	-20℃ 凍結保存 DNeasy	FTA Elute (ボルテッ クス) + DNeasy	FTA Elute (ピペッテ ィング) + DNeasy	FTA Elute	FTAカード →洗浄 →DNeasy
持ち込み血 液量 (μl)	100	100	24	24	2 (φ3mm, 1枚)	80
	-	-	(φ6mm, 2枚)	(同左)	-	(φ6mm, 6枚)
回収濃度 (ng/μl)	30	8.3	8	4.6	測定不能	3.3
回収量	2.3 μg	622 ng	約400 ng	250 ng	測定不能	314 ng
泳動量 (ng)	66	83	53	46	-	33

さらに、2本鎖DNAを特異的に認識するピコグリーン吸光度法において、カードに保存した血液から抽出したゲノムDNA濃度測定を行った結果、FTA Elute（ピペッティング）+ DNeasy, Pro K→95℃において、高いゲノムDNA回収率が得られることを見いだした。また、FTAカードに保存した血液は、直径の小さなカードから抽出したゲノムDNAを使用した場合、高いPCR増幅効率が得られることを見いだした（表(2)-2）。

表(2)-2 抽出前処理の違い、およびFTAカードのサイズによるゲノムDNA回収量

	FTA φ1mm	FTA φ3mm	FTA Elute + DNeasy Pro Kなし	FTA Elute (ピペッテ イング) + DNeasy Pro K→95℃	FTAカード →洗浄 →DNeasy	-80℃ 凍結保存 DNeasy
持ち込み血 液量 (μl)	0.4	3.3	30 (φ3mm, 10枚)	40 (φ11mm, 1枚)	80 (φ6mm, 6枚)	100
回収濃度 吸光度測定 (ng/μl)	-	-	2	4	3.3	30
回収濃度 ピコグリーン 測定 (ng/μl)	-	-	0.056	0.175	0.33	33
回収量	-	-	約100 ng	340 ng	314 ng	2.3 μg
GenomiPhi による増幅 産物濃度 (ng/μl)	706	622	760	810	720	740

これらの結果は、少量の血液検体の保存には、血液からのゲノムDNAを多く回収するため、-80℃凍結保存が最も適した保存法であることを示唆する。しかし、今後も集積数が増えていく検体の全てを、-80℃凍結保存で管理することは、凍結保存場所および施設の観点から限界を迎えることは避けられない。そこで、今回使用した特殊血液保存用ろ紙（カード）による微量血液検体の保存は、今後の検体保存に大いに利用できると考える。カードに保存した血液は室温で保存が可能であり、特別な検体の保存場所を用意する必要がない。これは凍結保存場所の確保が困難になるという問題点を解決できる。さらに、研究協力機関において得られた血液検体を、バンキングするために検体の輸送は必須である。そのため、検体を室温で保存することが可能になれば、検体の輸送に関しても大きな利点が出てくる。

また、カードに保存した血液から抽出したゲノムDNA回収の効率は、直径が小さいものを使用した方が良いことを見いだした。しかし、抽出されるゲノムDNAの回収量が少ないという問題点が十分に解決されたとは言い難い。今後、ゲノムDNA抽出法の向上を目指して、さらなる条件検討が必要である。

2) 保存条件の異なる血液のゲノムDNAの品質確認に関する研究

さらに、保存条件の異なる血液から抽出したゲノムDNAの品質を確認するため、イルミナ社のビーズアレイによるSNP解析を行った（表(2)-3）。

表(2)-3 保存条件の異なる血液、外陰部皮膚線維芽細胞および外陰部皮膚組織から抽出したゲノムDNAの品質確認

サンプル名	否検出数 (#No_Calls)	SNP測定数 (#Calls)	解析成功率 (Call_Rate)	配列一致率	DNA使用量 ng
-20℃ 凍結保存	0	96	1.00	100	201.8
-80℃ 凍結保存	0	96	1.00	100	296.1
FTA Pro K	1	95	0.9896	97.92	1.6
FTA Elute Pro K	0	96	1.00	SNP	5.4
ヒト細胞株 A	0	96	1.00	SNP	547.3
ヒト細胞株 B	0	96	1.00	SNP	406.2
ヒト細胞株 C	0	96	1.00	SNP	275.7
ヒト細胞株 D1	0	96	1.00	100	533.3
ヒト細胞株 D2	0	96	1.00	100	276.7
ヒト組織 F	0	96	1.00	SNP	19.1
ヒト組織 M1	0	96	1.00	100	240.9
ヒト組織 M2	0	96	1.00	100	354.9

その結果、FTAカードで保存した血液から、Protenase K処理の工程を加えて抽出した1.6 ngのゲノムDNAを用いた場合、SNP解析成功率は98 %であった。また、FTA Eluteカードで保存した血液から、Protenase K処理の工程を加えて抽出した5.4 ngのゲノムDNAを用いた場合、SNP解析成功率は100 %であった。これらの結果から、カードで保存した微量な血液は、Protenase K処理の工程を加えてゲノムDNAを抽出する方法を用いた場合、SNP解析に使用できるゲノムDNAを得ることが可能な検体であることが明らかとなった。さらに、今回得られた高いSNP解析成功率は、カードに保存した血液から抽出したゲノムDNAが、多くの実験に使用できる高い品質を保持していることを示している。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

臨床情報が取得され、感受性多型や関連遺伝子のプロファイリングと品質管理がなされた試料をバンキングすることは、同一集団において暴露量評価と遺伝子解析を可能とし、遺伝-環境相互作用や遺伝子間相互作用を含め、今後の多くの研究に役立つ。また、連結可能匿名化で臨床情報を取得することで長期フォローアップが可能となり、バイオマーカーの妥当性の検証や新たなバイオマーカーの検出が可能となる。

試料の保存は、この点において極めて有用である。また少量サンプル解析の結果は、大規模小児疫学調査における貴重な血液を可能な限り少ない量でゲノム解析を可能にすることを示した基礎データである。

(2) 環境政策への貢献

これまで、ゲノムDNA・RNAおよび不死化リンパ球を保存するという体制は見られない。また、小児検体（特に正常検体）の採取・保存は、倫理的に極めて困難であるため、臍帯血・胎盤などの胎児付属物が保存の対象となると考えられるが、本邦には環境リスク評価を目的とする臍帯血・胎盤バンキングシステムは存在しない。本研究の環境リスク研究に広く貢献できる臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備は、先天奇形のなかでも尿道下裂など、生殖と密接に関連する領域の研究において、遺伝因子と環境因子の相互作用で出現する先天奇形の表現型の適切な解析を可能とする。尿道下裂など生殖と密接に関連する領域の研究は、少子化対策の観点から、強いインパクトを持つと考えられる。また、バンキングシステムの整備により、精神発達障害、発癌性、催奇形性など、環境化学物質との関連が危惧される疾患の発症機序解明にも貢献する。

6. 国際共同研究等の状況

国際共同研究計画名：

重金属及びダイオキシン類の曝露量と口蓋口唇裂の発生頻度との関連性に関する研究

カウンターパート氏名・所属・国名：

賈 光・北京大学医学部公衆衛生学研究室・中国

参加・連携状況：

張 濟主任医師（済南市疾病予防控制中心）や顧依群主任医師（北京市海淀区妇幼保健院）と連携して、検体を収集し、ヒト組織における重金属及びダイオキシン類の負荷量を調べる。また、重金属及びダイオキシン応答遺伝子に着目し、口蓋口唇裂の発生頻度と曝露量との関係を調べる。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) MS. Alam, S. Ohsako, T. Matsuwaki, XB. Zhu, N. Tsunekawa, Y. Kanai, H. Sone, C. Tohyama and M. Kurohmaru: *Reproduction*, 139, 2, 427-437 (2010)
“Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di (n-butyl) phthalate.”
- 2) X.Y. Qin, F. Wei, J. Yoshinaga, J. Yonemoto, M. Tanokura and H. Sone: *FEBS Lett.* 585, 20,

3310-3315 (2011)

“siRNA-mediated knockdown of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 affects hypoxia-inducible factor-1 regulatory signaling and metabolism in human breast cancer cells.”

3) T. Ogata* et al.: J. Hum. Genet.,

“Haplotype analysis of *ESR2* in Japanese patients with spermatogenic failure: Implications for genetic susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors.” (accepted)

<査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。)
特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

1) T. Ogata, J. Laporte and M. Fukami: Hormone Research, 71, 5, 245-252 (2009)

“*MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene involved in hypospadias.”

2) 緒方 勤: 小児科診療、72, 1, 39-44 (2009)

「エピジェネティクスと遺伝疾患」

3) 緒方 勤: 臨床泌尿器科、63, 2, 109-116 (2009)

「男児外陰部異常症」

4) 緒方 勤、佐藤直子: ゲノム医学、9, 2, 67-70 (2009)

「中枢性性腺機能不全: Kallmann 症候群を主として」

5) 緒方 勤: 細胞工学、28, 6, 572-577 (2009)

「先天性疾患のエピジェネティクス: 第14染色体ダイソミー表現型発症機序をモデルとして」

6) 緒方 勤: 小児内科 増刊号 (小児疾患診療のための病態生理)、41, 319-321 (2009)

「性腺無形成と性腺異形成」

7) 緒方 勤: 科学、79, 9, 982-983 (2009)

「小児疾患と環境化学物質: 遺伝-環境相互作用の観点から」

8) 緒方 勤: 小児内科、41, 7, 1079-1084 (2009)

「SHOX遺伝子異常症: 臨床症状発症機序の解明」

9) 緒方 勤、伊達木澄人、山澤一樹: SGA性低身長症のマネジメント (藤枝憲二 監修)、メディカルレビュー社、41, 7, 57-68 (2009)

「胎内発育に影響する因子: IUGRの遺伝的要因」

10) 緒方 勤: 小児内分泌学 (日本小児内分泌学会 編集)、診断と治療社、305-309 (2009)

「性の分化機構」

11) 緒方 勤: 小児内分泌疾患鑑別診断チャート (藤枝憲二 編集)、診断と治療社、74-75 (2009)

「ミクロペニス」

12) 緒方 勤: 小児内分泌疾患鑑別診断チャート (藤枝憲二 編集)、診断と治療社、80-81 (2009)

「性分化異常」

13) 緒方 勤: 化学物質と環境、エコケミストリー研究会会報、96, 1-5 (2009)

- 「小児疾患と環境化学物質」
- 14) 深見真紀、和田友香、緒方 勤：小児科、50, 7, 939-945 (2009)
「小児疾患における臨床遺伝学の進歩(日本人が発見にかかわった遺伝子):尿道下裂 (CXorf6)」
- 15) 吉田理恵、緒方 勤：小児外科、41, 2, 95-97 (2009)
「泌尿器生殖洞の発生分化とその異常」
- 16) H. Sone, S. Imanishi, H. Akanuma, R. Nagano, T. Fukuda, S. Ohsako: The roles of free radicals in biology and medicine”, MEDIMOND SRL Publ., 45-52 (2009)
“Gene expression signatures of environmental chemicals in cancer and in developmental disorders.”
- 17) 左合治彦、林 聡、穴見 愛：産婦人科治療、98, 5, 846-853 (2009)
「胎児超音波スクリーニングの実際」
- 18) 左合治彦、林 聡、穴見 愛：小児外科(出生前診断の倫理と実際)、41, 5, 457-460 (2009)
「出生前診断と胎児治療—産科の立場から」
- 19) 左合治彦：日産婦東京地方部会誌、58, 3, 288-292 (2009)
「一絨毛膜双胎の異常に対する胎児手術」
- 20) 左合治彦、林 聡、青木宏明：周産期医学(アウトカムからみた周産期管理)、39, 10, 1381-1385 (2009)
「胎児治療」
- 21) 緒方 勤：Pediatric Endocrinology Reviews抄訳シリーズ. No. 3. ジャパンメディアートパブリッシング、2-3 (2010)
「内分泌攪乱物質：特に性分化・発達にたいする影響について」
- 22) 緒方 勤：Horm Front Gynecol (特集：エピジェネティクス・ゲノムインプリンティング)、17, 12, 361-368 (2010)
「生殖補助医療とインプリンティング異常」
- 23) 深見真紀、伊達木澄人、緒方 勤：Horm Front Gynecol (目で見る生殖内分泌疾患の診断と治療)、17, 2, 4-8 (2010)
「中枢性性腺機能低下症」
- 24) 左合治彦、林 聡、杉林里佳、江川真希子、佐々木愛子：産婦人科治療、101, 5, 538-543 (2010)
「胎児治療の適応と限界」
- 25) 緒方 勤、位田忍、堀川玲子：臨床泌尿器科、65, 12, 897-902 (2011)
「性分化疾患の分類と社会的性の決定について」
- 26) 緒方 勤：小児内科(ちょっと気になる症候のみかた考え方)、43, 10, 1795-1799 (2011)
「外性器の異常(性分化)」
- 27) 緒方 勤：Fetal & Neonatal Medicine、3, 3, 101-102 (2011)
「エピジェネティクス・インプリンティングと胎児・胎盤の成長・発達」
- 28) 緒方 勤：卵子学(森崇英 総編集)、京都大学学術出版会、88-100 (2011)
「性分化疾患」
- 29) 緒方 勤：遺伝カウンセリングハンドブック(福嶋義光 編集)、メディカルドゥ、130-131 (2011)
「性分化疾患における遺伝カウンセリング」

- 30) 緒方 勤:生殖卵総学:臨床への進展(石塚文平 編集)、医歯薬出版株式会社、17-25 (2011)
「減数分裂:基礎知識と臨床の進展」
- 31) 緒方 勤: Pediatric Endocrinology Reviews抄訳シリーズ. No. 26. ジャパンメディアアートパブリッシング、4-5 (2011)
「多様なヌクレオチド除去修復(NER)とその医学的意義」
- 32) 緒方 勤:内分泌・糖尿病内科学(森昌朋 編集)、シュプリンガー・ジャパン、168-170 (2011)
「性腺機能低下症」
- 33) 中村美智子、野々村克也、深見真紀、宮戸真美、須川史啓、緒方 勤:日本小児泌尿器科学会雑誌、20, 1, 33-37 (2011)
「*Maml1*は、マウスライディッヒ腫瘍細胞において、ステロイド合成酵素遺伝子*Cyp17a1*の発現調節を介し、テストステロン産生に関わっている」
- 34) 緒方 勤:今日の小児治療指針15版、医学書院、244-245 (2012)
「原発性性腺機能低下症」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) T. Ogata: The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.
“MAMALD1 for hypospadias and 46,XY disorders of sex development.”
- 2) T. Ogata: The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.
“Backdoor pathway to dihydrotestosterone identified in POR deficiency.”
- 3) T. Ogata: The Third Workshop Pediatric Andrology, Basel, Switzerland, 2009.
“ESR1 and cryptorchidism/hypospadias (the susceptibility to environmental disruptors).”
- 4) T. Ogata: The Seminar for Department of Physiology, Development & Neuroscience, Cambridge, England, 2009.
“(Epi)genetic mechanisms leading to the development of upd(14)pat/mat phenotypes.”
- 5) T. Ogata: The 9th International Congress of Andrology, Barcelona, Spain, 2009.
“Hypospadias.”
- 6) T. Ogata: The Seminar for Human Molecular Genetics, Prince Henry's Institute of Medical Research, Monash Medical Centre, Melbourne, Australia, 2009.
“Genetic mechanisms involved in hypospadias.”
- 7) T. Ogata: Disorders of sex development: underlying molecular causes, clinical management and future strategies, Melbourne, Australia, 2009.
“Clinical and molecular studies on Japanese patients with DSD.”
- 8) T. Ogata: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPE, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.
“Genetic causes of hypospadias. Symposium of syndromic DSD.”
- 9) T. Ogata: The 14th Annual Scientific Meeting of Korean Society for Pediatric Endocrinology, Seoul, Korea, 2009.
“Silver-Russell syndrome as a human imprinting disorder. Prenatal Lecutrin.”
- 10) T. Ogata: The 14th Annual Scientific Meeting of Korean Society for Pediatric Endocrinology,

Seoul, Korea, 2009.

“SHOX haploinsufficiency: lessons from clinical studies. Special Lecutre.”

11) T. Ogata: The International Ovarian Conference 2009, Tokyo, Japan, 2009.

“Pathogenesis of POF.”

12) 緒方 勤: 市民提案の循環型社会をめざす会 (2009)

「化学物質と子どもの体への影響」

13) 緒方 勤: 第2回博多シンポジウム (2009)

「性分化異常症 (尿道下裂) と内外因子」

14) 緒方 勤: 第18回東海新生児研究会 (2009)

「胎児成長発達とゲノムインプリンティング」

15) 緒方 勤: 第14回鹿児島小児内分泌研究会 (2009)

「性分化異常症: 分子基盤と臨床的知見」

16) M. Kagami, M. Fukami, M. O'Sullivan, A. Green, S. Takada, F. Kato, A. Ferguson-Smith and T. Ogata: The 24th Naito Conference, Sapporo, Japan, 2009.

“Essential role of the *MEG3*-DMR in the regulation of the maternally inherited human chromosome 14q32.2 imprinting region.”

17) MP. Brandão, M. Fukami, BB. Mendonca, M. Gerdulo, S. Domenice, IJP. Arnhold, T. Ogata and EMF. Costa: The Endocrine Society's 91st Annual Meeting, Washington, USA, 2009.

“A Novel Gain of function Mutation in the *MAMLD1* gene in patients with Undetermined 46,XY Disorders of Sex Development.”

18) MP. Brandão, EMF. Costa, M. Fukami, MG. Santos, NP. Pereira, S. Domenice, T. Ogata and BB. Mendonca: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.

“*MAMLD1* Homozygous gain-of-function missense mutation causing 46,XX disorder of sex development in a virilized female.”

19) S. Dateki, K. Kosaka, K. Hasegawa, M. Fukami, K. Muroya, M. Adachi, K. Motomura, N. Azuma, H. Tanaka, T. Tajima, H. Moriuchi and T. Ogata: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.

“Heterozygous *OTX2* mutations are associated with variable pituitary hormone deficiency.”

20) K. Matsuo, S. Suzuki, M. Maimaiti, T. Mulai, T. Hamajima, K. Motomura, Y. Naiki, T. Ogata, T. Tajima, T. Hasegawa and K. Fujieda: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.

“Evaluation of sensitive detection methods for somatic mosaicism of *GNAS1* mutation in patients with McCune-Albright syndrome.”

21) MP. Brandão, M. Fukami, BB. Mendonca, MG. Santos, S. Domenice, IJP. Arnhold, T. Ogata and EMF. Costa: The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPES, SLEP, JSPE, New York, USA, 2009.

“A gain of function mutation in the *MAMLD1* discloses a new pathway in the etiology of 46,XY disorders of sex development.”

- 22) K. Nakabayashi, W. Yoshida, K. Yamazawa, M. Kusumi, T. Ogata and K. Hata: The 47th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Baltimore, USA, 2009.
 “MeDIP-chip detection and quantitative DNA methylation analysis of differentially methylated regions in imprinted loci.”
- 23) 和田友香、深見真紀、須川史啓、宮戸真美、緒方 勤：第112回日本小児科学会学術集会（2009）
 「MAMLD1遺伝子におけるスプライス部位変異（IVS4-2A>G）の検討」
- 24) 和田友香、深見真紀、緒方 勤：第54回日本人類遺伝学会（2009）
 「MAMLD1遺伝子におけるスプライス部位変異（IVS4-2A>G）の検討」
- 25) 宮戸真美、中村美智子、須川史啓、深見真紀、宮戸健二、菊水健史、小川佳宏、緒方 勤：第43回日本小児内分泌学会（2009）
 「*Mamld1*発現異常が引き起こすホルモン産生と摂食調節の解析」
- 26) 加藤芙弥子、深見真紀、和田友香、マイラ ブランダオ、中村美智子、上松あゆみ、長谷川奉延、宮戸真美、緒方 勤：第43回日本小児内分泌学会（2009）
 「MAMLD1異常症：新規遺伝子変異の同定と変異陽性患者の表現型」
- 27) M. Fukami, G. Nishimura, K. Homma, T. Nagai, K. Hanaki, T. Ishii, M. Adachi, T. Tajima, Y. Hasegawa, T. Hasegawa, R. Horikawa, K. Fujieda and T. Ogata: 第32回日本分子生物学会年会（2009）
 “Cytochrome P450 Oxidoreductase Deficiency: Identification and Characterization of Biallelic Mutations and Genotype-Phenotype Correlations in 36 Japanese Patients.”
- 28) M. Miyado, M. Nakamura, M. Fukami, K. Miyado, T. Kikusui, Y. Ogawa and T. Ogata: 第32回日本分子生物学会年会（2009）
 “Impaired expression of *Mamld1* disturbs production of steroid hormones and feeding regulation.”
- 29) X. Qin, H. Zaha, R. Nagano, J. Yonemoto, H. Sone and J. Yoshinaga: 第12回日本内分泌攪乱化学物質学会 研究発表会（2009）
 “Estrogenic activities of endocrine-disrupting chemicals and their effects on male genital disorders related genes expression.”
- 30) H. Sone, L. Yang, T. Fukuda, H. Akanuma, R. Nagano and H. Zaha: 21st Cent. Adv. Mol. Toxicol. Environ. Chem. Pathog. Dis., Tokyo, Japan, 2009.
 “The effect of low dose BPA on cell proliferation and senescence in human mammary epithelial cells.”
- 31) H. Sone, S. Imanishi, M. Okura, H. Zaha, H. Shiraiishi and H. Fujimaki: PPTOX II : Role of environmental stressors in the developmental origins of disease, Miami, USA, 2009.
 “Prenatal exposure to permethrin inhibits brain development via disruption of vascular development in mice.”
- 32) X. Qin, H. Zaha, J. Yoshinaga, J. Yonemoto and H. Sone: 29th Int. Symp. Halogenat. Persistent Org. Pollut.-DIOXIN, Beijing, China, 2009.
 “Association of AHR and ESR1-responsive gene variations with susceptibility to endocrinedisrupting chemicals in risk of male genital disorders.”
- 33) A. Anami, S. Hayashi, Y. Sugo and H. Sone: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics

and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.

“The characterization of ultrasound examination to predict twin one fetal demise in monochorionic diamniotic twin pregnancies.”

- 34) S. Hayashi, K. Ishii, N. Kato, Y. Takahashi, M. Nakata, J. Murotuki, T. Murakoshi, Y. Nanba, Y. Ito and H. Sago: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.

“Perinatal outcome of monochorionic twin pregnancies complicated by amniotic fluid discordance without twin-twin transfusion syndrome.”

- 35) S. Hayashi, H. Sago, M. Hanaoka, M. Horiya, A. Anami, T. Nakamura, Y. Ito, T. Chiba, M. Kitagawa and M. Natori: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.

“Postnatal outcome in twin reversed arterial perfusion treated with radiofrequency ablation.”

- 36) H. Sago, S. Hayashi, N. Kato, Y. Nanba, Y. Ito, H. Hasegawa, H. Kawamoto, M. Saito, J. Murotsuki, Y. Takahashi, M. Nakata, K. Ishii and T. Murakoshi: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.

“Risks and the outcome of twin-to-twin transfusion syndrome after fetoscopic laser surgery.”

- 37) M. Hanaoka, S. Hayashi, M. Horiya, A. Anami, R. Oi and H. Sago: 19th World Congress on Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Hamburg, Germany, 2009.

“The human chorionic gonadotropin and fetoscopic laser photocoagulation for twin-twin transfusion syndrome.”

- 38) H. Sago: 11th Korea – Japan Joint Conference of Obstetrics and Gynecology, Seoul, Korea, 2009.
“The Current State of Fetal Therapy in Japan.”

- 39) T. Ogata: The 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, Japan, 2010.

“Disorders of sex development: Shrinking black box. In: Disorders in gonadal differentiation and development.”

- 40) T. Ogata, R. Yoshida and F. Massart: The 49th Annual Meeting of European Society for Paediatric Endocrinology, Prague, Czech Republic, 2010.

“Haplotype analysis of the estrogen receptor alpha gene in precocious puberty.”

- 41) T. Ogata: The 6th Biennial Scientific Meeting of The Asia Pacific Paediatric Endocrinology, Xi’an, China, 2010.

“Endocrine Disruptors – the environment and its impact on paediatric endocrinology. In: Hot Topic Session.”

- 42) 緒方 勤: 松葉のダイオキシン調査2010実行委員会 (2010)

「子どもの健康と環境ホルモン」

- 43) 緒方 勤: 10th Asahikawa Winter Conference on Molecular Medicine (2010)

「性分化疾患における最近の臨床的・分子遺伝学的進歩」

- 44) 緒方 勤: 第13回胎児遺伝子診断研究会 (2010)

「胎児成長発達とゲノムインプリンティング」

- 45) 緒方 勤: 第249回日本小児科学会東海地方会特別講演 (2010)

- 「性分化疾患の発症機序：遺伝-環境相互作用の観点から」
- 46) 緒方 勤：日本アンドロロジー学会第29回学術大会・第16回精子形成・精巣毒性研究会共同開催学会特別講演（2010）
「性分化疾患研究の最前線」
- 47) 緒方 勤、中村美智子、宮戸真美、深見真紀：第28回内分泌代謝サマーセミナー（2010）
「MAMLD1変異とテストステロン産生障害：変異陽性患者およびノックアウトマウスの表現型解析とin vitro機能解析」
- 48) M. Miyado, M. Nakamura, M. Fukami, K. Miyado and T. Ogata: 第33回日本分子生物学会年会（2010）
“Impaired expression of *Mamld1* disturbs the gene expression of steroidogenic enzymes.”
- 49) 宮戸真美、中村美智子、深見真紀、宮戸健二、緒方 勤：第44回日本小児内分泌学会（2010）
「ステロイドホルモン産生におけるMamld1の機能解析」
- 50) 中村美智子、深見真紀、宮戸真美、須川史啓、緒方 勤、野々村克也：第19回日本小児泌尿器科学会（2010）
「Mamld1は、マウスライディッヒ腫瘍細胞において、ステロイド合成酵素遺伝子の発現調節を介し、テストステロン産生に関わっている」
- 51) 左 勝則、青木宏明、宮田あかね、三井真理、池谷美樹、渡辺典芳、小澤伸晃、塚原優己、久保隆彦、村島温子、左合治彦、北川道弘：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2010）
「妊娠初期ならびに中期血圧値による妊娠高血圧症候群の発症予測」
- 52) 須郷慶信、林 聡、大石由利子、堀谷まどか、加藤有美、青木宏明、高橋宏典、三浦裕美子、三原慶子、佐々木愛子、左合治彦、名取道也：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2010）
「当センターにおける妊娠30週の胎児超音波スクリーニング検査の検討」
- 53) 佐々木愛子、小澤伸晃、林 聡、澤井英明、増崎英明、平原史樹、左合治彦：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2010）
「日本における出生前診断の動向（2003～2008年）」
- 54) T. Ogata: 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disrupters (COW 2011), Copenhagen, Denmark, 2011.
“Genetic susceptibility to endocrine disrupters: Estrogen receptor polymorphisms.”
- 55) T. Ogata and M. Fukami: The 13th European Congress of Endocrinology (ECE 2011), Rotterdam, Netherlands, 2011.
“Disorders of Sex Development: Recent Progress.”
- 56) T. Ogata: Hamamatsu DOHaD Conference, Hamamatsu, Japan, 2011.
“Genetic susceptibility to endocrine disrupters: Estrogen receptor polymorphisms.”
- 57) 緒方 勤：国際医療福祉大学熱海病院学術講演会（2011）
「子どもの成長と成熟」
- 58) 緒方 勤：第1回乳幼児発達指導研究会（2011）
「乳幼児期および思春期の性について」
- 59) 緒方 勤：浜松小児科医会（2011）
「子どもを取り巻く環境と健康」

- 60) 緒方 勤：第81回京都内分泌同好会（2011）
「性分化疾患研究の進歩」
- 61) 緒方 勤：第3回岐阜小児内分泌学術講演会（2011）
「性分化疾患の分子基盤」
- 62) 緒方 勤：第12回山陰内分泌研究会（2011）
「性分化疾患の分子基盤: update」
- 63) 緒方 勤：第40回Medical Photonics Seminar（2011）
「子どもを取り巻く環境と小児の健康」
- 64) 緒方 勤：第2回生殖医療研究会（2011）
「先天奇形症候群とゲノムインプリンティング」
- 65) J. Yonemoto, J. Kawahara, H. Sone, T. Hattori, T. Matsumura, Y. Ohya and S. Sugama: 31th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Brussels, Belgium, 2011. “Prenatal Exposure to OH-PCBs in Relation to Body Weight and Neurodevelopment.”
- 66) 宮戸真美：第3回領域会議 性差構築の分子基盤（2011）
「*Mamld1*遺伝子の胎仔精巣における機能解析」
- 67) 宮戸真美、中村美智子、宮戸健二、緒方 勤、深見真紀：第45回日本小児内分泌学会（2011）
「精巣における*Mamld1*の機能解析」
- 68) 鏡雅代、松岡健太郎、加藤芙弥子、宮戸真美、松原圭子、深見真紀、山中美智子、鈴木伸宏、永井敏郎、緒方 勤：第45回日本小児内分泌学会（2011）
「*RTL1*遺伝子の胎盤における機能の解明：胎盤発育不全、子宮内胎児発育遅延の原因解明をめざして」
- 69) 五十嵐麻希、加藤芙弥子、辻克和、緒方 勤、深見真紀：第56回日本人類遺伝学会・第11回東アジア人類遺伝学会 共同大会（2011）
「アンドロゲン受容体遺伝子サイレント変異を有する不完全型アンドロゲン不応症の1例」
- 70) 秦咸陽、小島祥敬、水野健太郎、上岡克彦、吉永淳、米元純三、林祐太郎、群健二郎、緒方 勤、曾根秀子：第14回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会（2011）
「尿道下裂男児の皮膚細胞を用いた環境内分泌かく乱化学物質の目的遺伝子の解明」
- 71) 米元純三、河原純子、曾根秀子、服部達也、松村徹、大矢幸弘、洲鎌盛一：第14回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会（2011）
「保存臍帯中OH-PCB濃度と2歳児の体重、軽度発達障害との関係」
- 72) 宮戸真美、中村美智子、宮戸健二、緒方 勤、深見真紀：第34回日本分子生物学会（2011）
“*Mamld1* regulates expression of steroidogenic enzyme genes in mouse fetal testes.”
- 73) 五十嵐麻希、加藤芙弥子、辻克和、緒方 勤、深見真紀：第34回日本分子生物学会（2011）
「アンドロゲン受容体遺伝子サイレント変異を有する不完全型アンドロゲン不応症の1例」
- 74) 須郷慶信、林聡、大石由利子、堀谷まどか、加藤有美、青木宏明、高橋宏典、三浦裕美子、三原慶子、佐々木愛子、左合治彦、名取道也：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2011）
「当センターにおける妊娠30週の胎児超音波スクリーニング検査の検討」
- 75) 佐々木愛子、小澤伸晃、林 聡、澤井英明、増崎英明、平原史樹、左合治彦：第62回日本産婦人科学会学術講演会（2011）

「日本における出生前診断の動向（2003～2008年）」

76) 緒方 勤：第42回九州小児内分泌懇話会（2012）

「ゲノムインプリンティングと個体・胎盤成長発達」

77) 緒方 勤：JCR研修会（2012）

「小児内分泌関連疾患におけるインプリンティングにかかわる最近の話題」

（3）出願特許

1) 緒方 勤：（独）国立成育医療研究センター研究所；「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。

（4）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（6）その他

1) 緒方 勤：Certificate of Excellent Reviewer, Human Reproduction, Oxford University Journals.
2009年6月11日。

8. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

Assessment of the Environmental Risk for the Development of Congenital Anomalies

Principal Investigator: Tsutomu OGATA

Institution: National Research Institute for Child Health and Development

2-10-1 Ohkura, Setagaya, Tokyo 157-8535, JAPAN

Tel: +81-3-5494-7025 / Fax: +81-3-5494-7026

(Until 15 May 2012)

Hamamatsu University School of Medicine

1-20-1 Handayama, Higashi-ku, Hamamatsu 431-3192, JAPAN

Tel: +81-53-435-2312 / Fax: +81-53-435-2312

(Since 16 May 2012)

E-mail: tomogata@hama-med.ac.jp / tomogata@nch.go.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies, Hamamatsu University

[Abstract]

Key Words: Environmental endocrine disruptors, Genetic susceptibility, Estrogen receptor, Hypospadias, Cryptorchidism, Spermatogenic dysfunction

The objectives of this research are the establishment of assessment methods for environmental risks involved in congenital anomalies such as hypospadias (HS) and cryptorchidism (CO). For this purpose, we attempted to identify the biomarkers and to establish the banking system of placentas and cord blood. Consequently, we obtained several important data. For estrogen receptor alpha gene (ESR1), we found that a 2,244 bp microdeletion within the intron sequence is regarded as a marked susceptibility factor for the development of HS and CO in the Japanese population. Thus, we attempted to examine the ESR1 expression using genital skin fibroblasts and lymphoblastoid cell lines; however, the ESR1 expression was very faint, and we could not obtain supportive data. Thus, we attempted to construct model mice in which the microdeletion had been introduced (knock-in mice), and we were able to obtain chimeric mice and, since then, we have been working to obtain mice with germline-derived knock-in ESR1. We also performed association studies of male genital abnormalities with 96 SNPs in genes involved in testosterone production pathway and dioxin signaling. Consequently, significant associations were identified between cryptorchidism and CYP17A1 rs4919686 ($P=0.011$) and ARNT2 rs5000770 ($P=0.00073$), and between hypospadias and CYP1A2 rs2069521 ($P=2.29E-6$) and ARNT2 rs2278705 ($P=0.00039$) by the trend test. Similarly, significant associations were identified between cryptorchidism and NR1I2 rs1403526, rs2472680, CYP17A1 rs4919686, rs6163, rs2278705, ARNT2 rs2278705, rs5000770, rs7183507, rs7178949, and rs11072922, and between hypospadias and NR1I2 rs2461823, CYP17A1 rs17115149, CYP1A2 rs2069521, rs2069522, ARNT2 rs2278705, rs5000770, and rs1107922. We also examined

epigenetic modifications (methylation patterns) of AR (androgen receptor) and SRD5A2 (5alpha-reductase) using genital skins that express AR and SRD5A2, and identified a few of patients with hypermethylated promoter region of SRD5A2. Furthermore, we have started SNP- and haplotype-based association studies in patients with cleft palates/lips. For banking system, we have collected DNA, cell lines, and/or tissue samples from several sources [cord blood cells (n=1200), normal placentas (n=67), and patients with spermatogenic failure (n=150), HS/CO (n=350), premature ovarian insufficiency (n=120), and cleft palates/lips (n=60)]. These attempts will serve to achieve the purposes of this research.

小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備

