

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

研究目的

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。

サブテーマ1: バイオマーカーの開発

緒方勤(浜松医科大学、国立成育医療研究センター研究所)

深見真紀、吉田理恵、宮戸真美(国立成育医療研究センター研究所)

曾根秀子、青木康展(環境研究所)

サブテーマ2: 臍帯血・胎盤バンキングシステムの整備

緒方勤(浜松医科大学)

吉田理恵(国立成育医療研究センター研究所)

左合治彦、中村知夫(国立成育医療研究センター病院)

曾根秀子、青木康展(環境研究所)

対象疾患: 尿道下裂、停留精巣などの男児外性器異常、口蓋裂

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

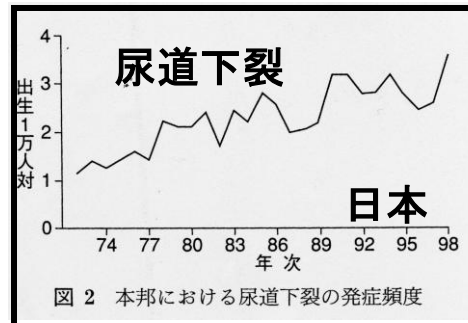
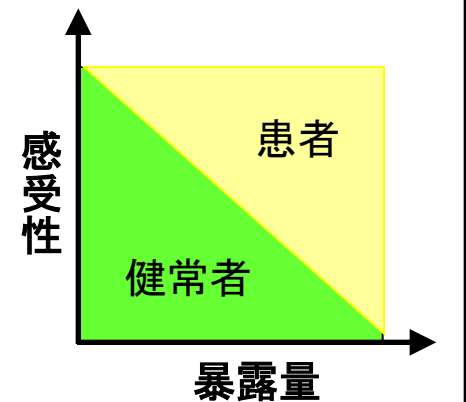


図2 本邦における尿道下裂の発症頻度



エストロゲン受容体: 多数の内分泌攪乱化学物質のkey molecule

ヒト胎児期における合成エストロゲン製剤暴露

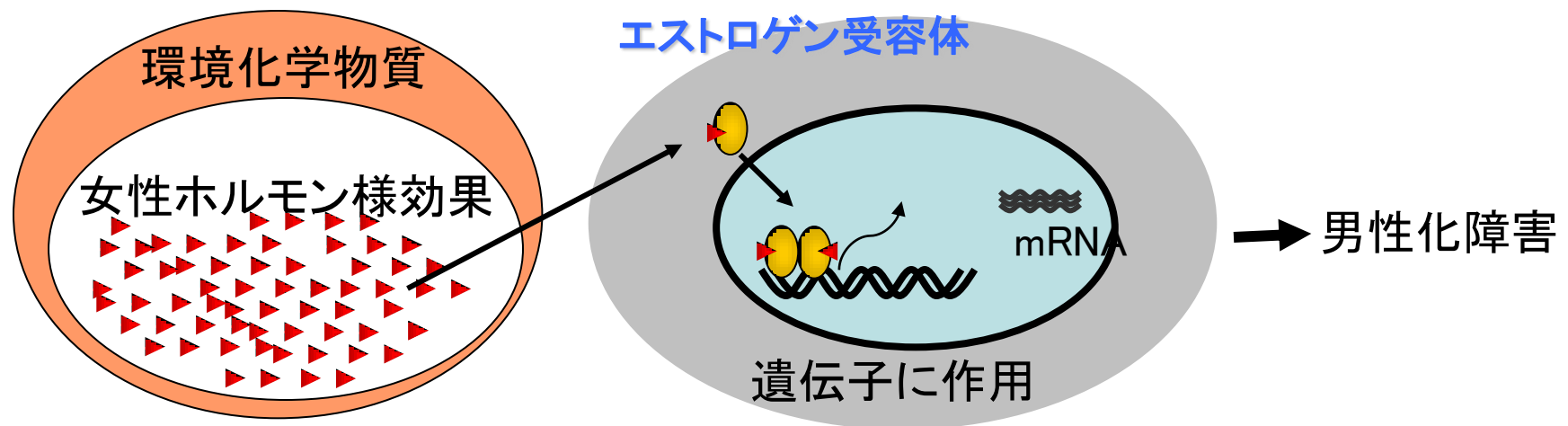
ジエチルスチルベステロール (DES): 1940年代から1971年までの間、米国で流産防止薬として妊婦に投与された

尿道下裂の増加 (DES暴露群で4.4%、コントロール群で0.0%、 $P=0.017$)

停留精巣の増加 (DES暴露群で30.4%、コントロール群で7.9%、 $P<0.005$)
(妊娠11週前の投与では、さらに2倍に増える)

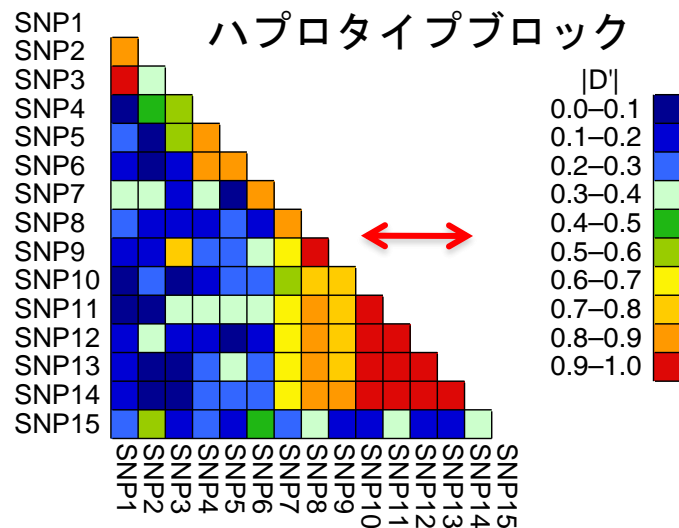
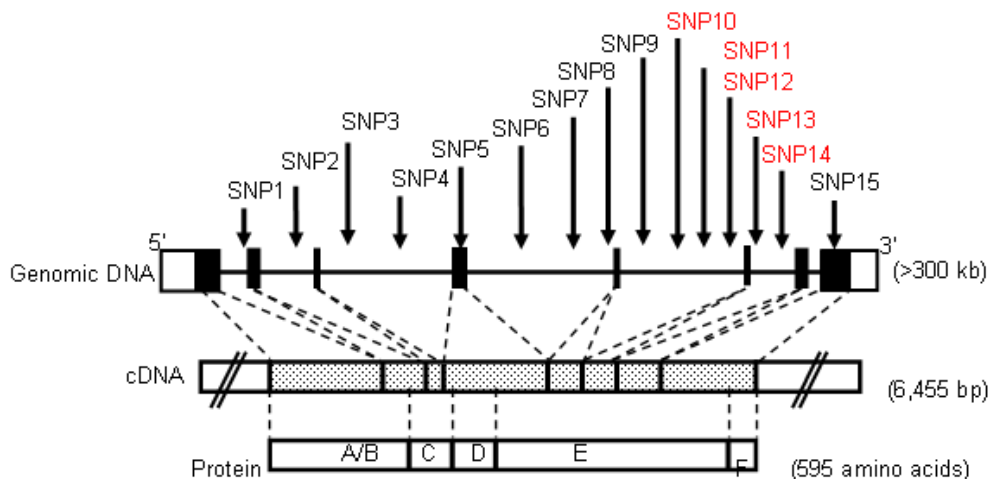
マウス暴露実験 (テストステロン産生低下による尿道下裂)

(インスリン様3ホルモン産生低下による停留精巣)



内分泌攪乱物質感受性ハプロタイプの同定(尿道下裂、停留精巣)

ESR1:エストロゲン受容体 α 遺伝子 (ホルモン産生ライディッチ細胞で発現)



推定ハプロタイプ

GAGCC

AGATA

GGGTA

AGGTA

ハプロタイプ頻度(患者対対照)

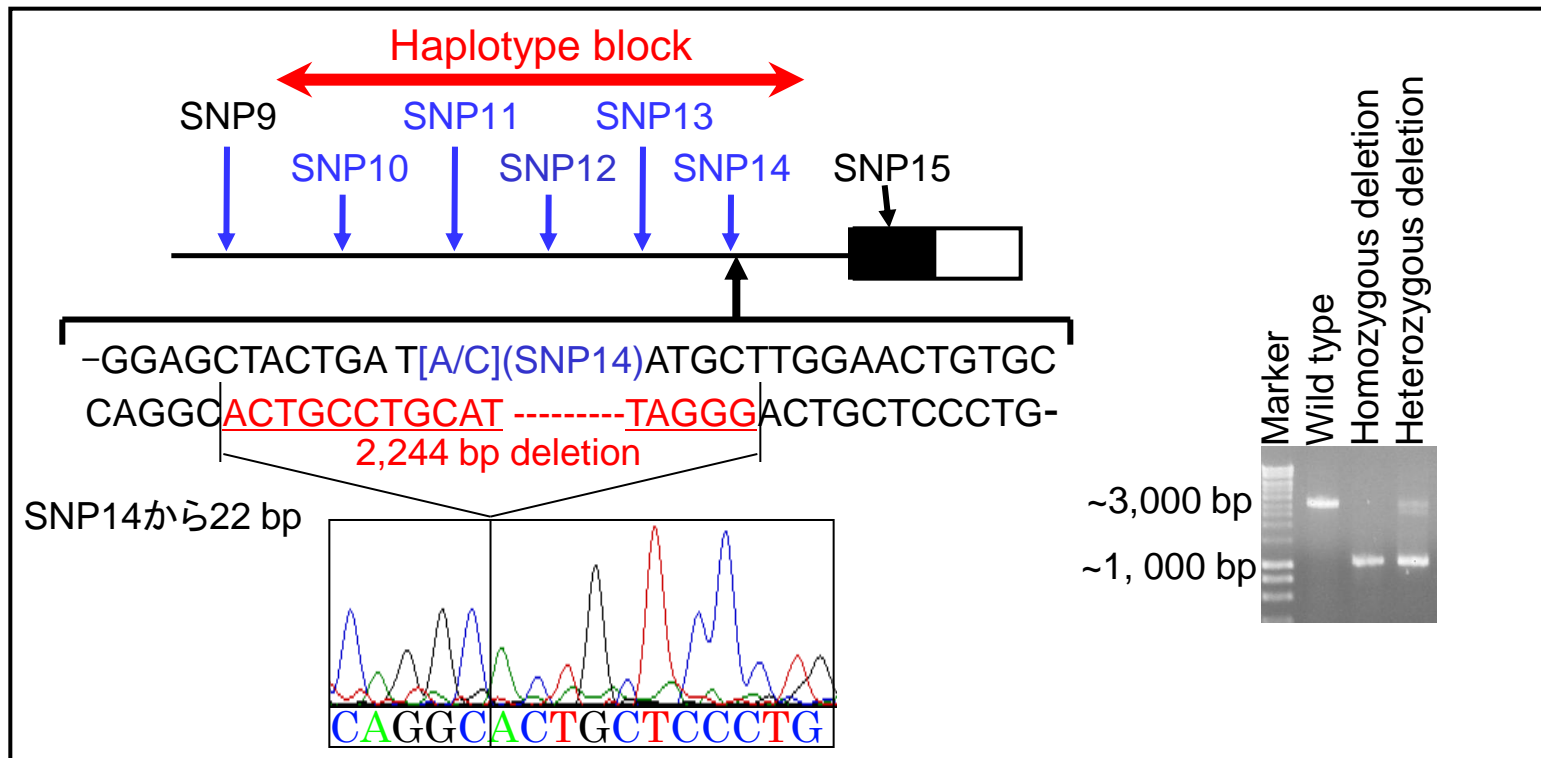
停留精巣	<i>P</i> -value	0.044	0.034	0.55	1.00
	OR (95% CI)	0.61	1.78 (1.02–3.09)	1.34	1.06
尿道下裂	<i>P</i> -value	0.23	0.0024	1.00	0.084
	OR (95% CI)	0.7	2.46 (1.35–4.51)	0.95	0.34

ホモ接合体頻度(患者対対照)

停留精巣	<i>P</i> -value	0.10	0.0040	0.10	0.25
	OR (95% CI)	0.51	7.55 (1.59–35.82)	N.D.	N.D.
尿道下裂	<i>P</i> -value	0.66	0.000057	N.D.	N.D.
	OR (95% CI)	0.83	13.75 (2.89–65.53)	N.D.	N.D.

AGATAハプロタイプのホモ接合体は、顕著な尿道下裂と停留精巣発症感受性を有する性分化臨界期に大量に要求されるテストステロンとInsulin-3ホルモン産生を阻害する

ESR1感受性ハプロタイプに絶対連鎖する微小欠失の同定



- 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

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

論文投稿中

遺伝子型解析結果		欠失あり		
		ヘテロ	ホモ	欠失なし
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

統計解析結果		尿道下裂患者 vs. 対照男児	停留精巣患者 vs. 対照男児	
アリル頻度の比較		<i>P</i> -value	0.034	0.038
		Odds ratio	3.09	1.78
		95% C.I.	1.20-7.94	1.03-3.07

遺伝子型頻度の比較				
欠失なし	vs.	<i>P</i> -value	0.0066	0.075
ヘテロ 欠失 + ホモ 欠失		Odds ratio	4.48	1.75
		95% C.I.	1.40-14.3	0.94-3.23

欠失なし +ヘテロ 欠失		<i>P</i> -value	0.77	0.088
vs. ホモ 欠失		Odds ratio	0.28	2.20
		95% C.I.	0.011-6.98	1.22-3.99

ESR1感受性ハプロタイプの世代間頻度解析

論文投稿中

遺伝子型解析結果

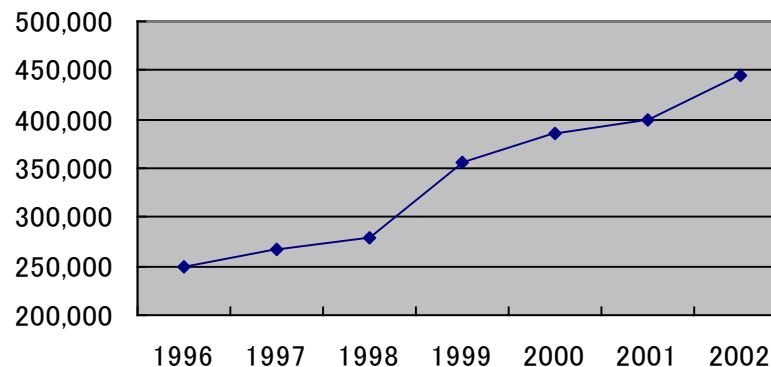
	非欠失ホモ	ヘテロ	欠失ホモ	計
成人男性	201	196	35	432
正常男児	47	33	2	82

欠失頻度の比較

成人男性	P値	OR	95%CI
vs 正常男児	0.034	1.527	1.03-2.26

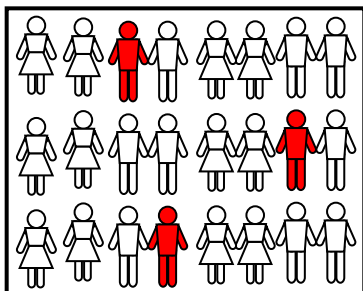
リスクハプロタイプは、現在の小児において疾患を発症しやすい
暴露増加の反映

ビスフェノール国内生産量 (t)

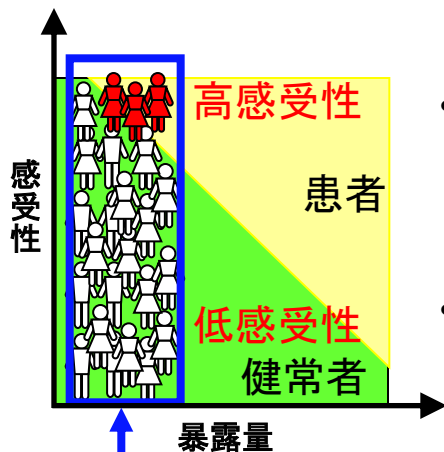


感受性と暴露量の相関

現在の集団を対象とする相関解析



一般集団
・大多数の健常者(白)
・少数の患者(赤)

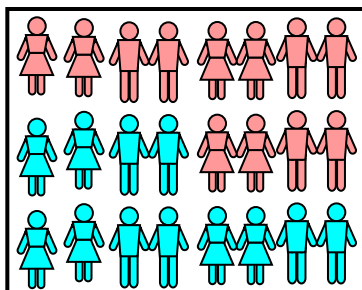


- ・多くの患者は、高感受性素因を有すると考えられる。
- ・暴露量の個体間は小さいと予測される。

感受性多型の同定

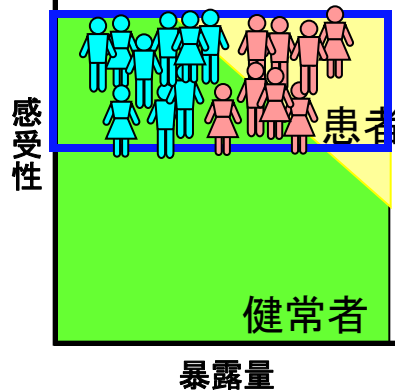
一般社会環境における暴露量?

異なる世代間における高感受性集団の比較



高感受性集団
・小児(ピンク)
・成人(青)

高感受性個体を保護しうる暴露量閾値



- ・感受性素因の個体間は小さいと予測される。
- ・暴露量の世代間には大きいと予測される。

環境リスク評価
脆弱な集団を保護
する暴露量閾値

世代間における暴露量の差異?

微小欠失の機能解析

尿道下裂患者の手術時外陰部皮膚検体の解析

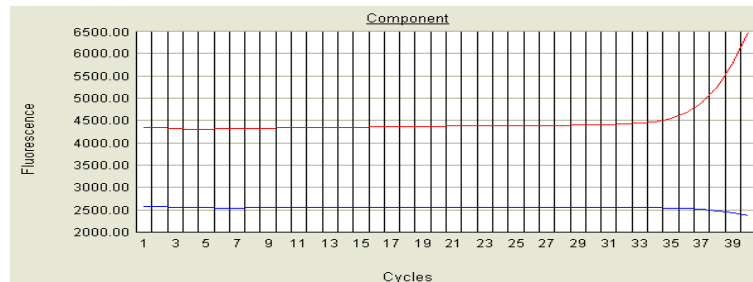
微小欠失(+)¹の尿道下裂患者と微小欠失(-)²の患者を同定しえた。

両者における*ESR1*発現比較

*ESR1*は外陰部皮膚組織でも末梢血でもほとんど発現していない

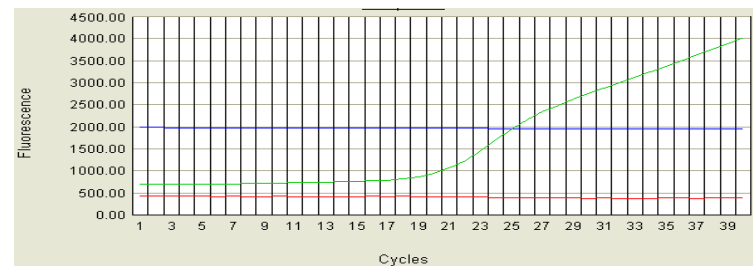
エストロゲン様物質暴露後の発現も極めて低い

ESR1



Ct値
35.5

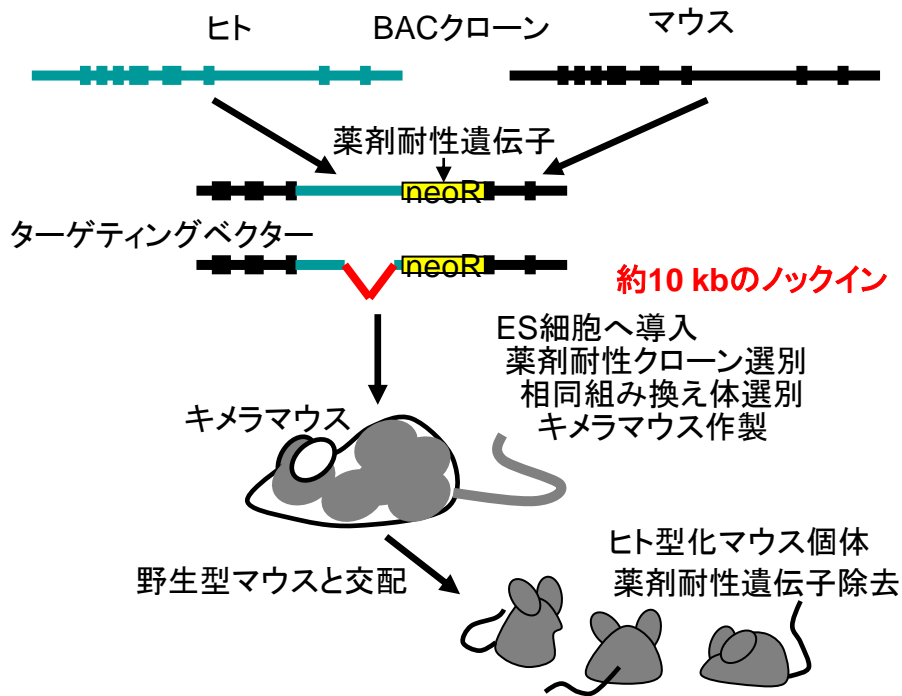
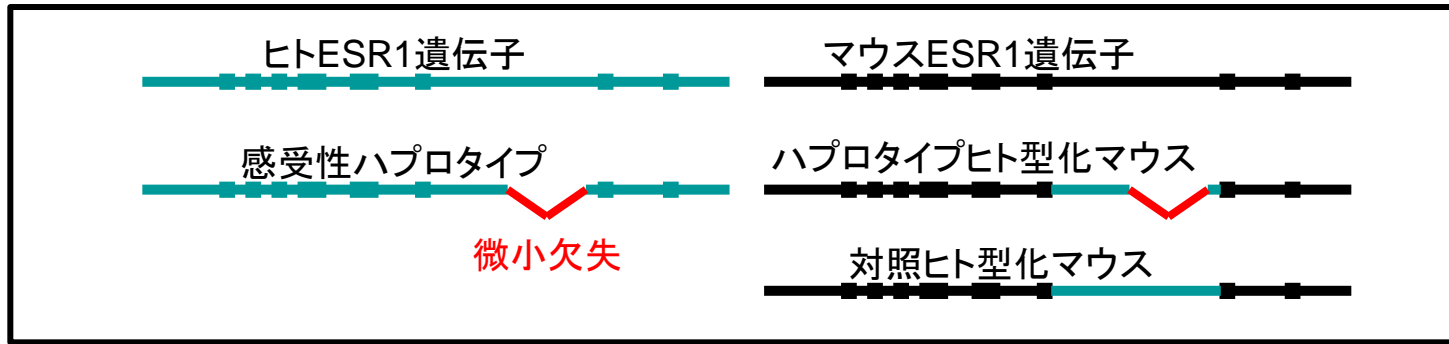
GAPDH



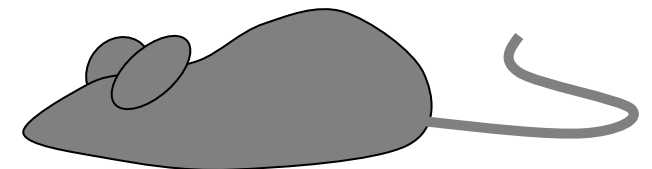
Ct値
21.7

微小欠失の機能解析

ノックインマウスの作製と暴露実験 (マウスでは相同領域が存在しない)



相同組み換えESクローンから
キメラマウスの作製に成功

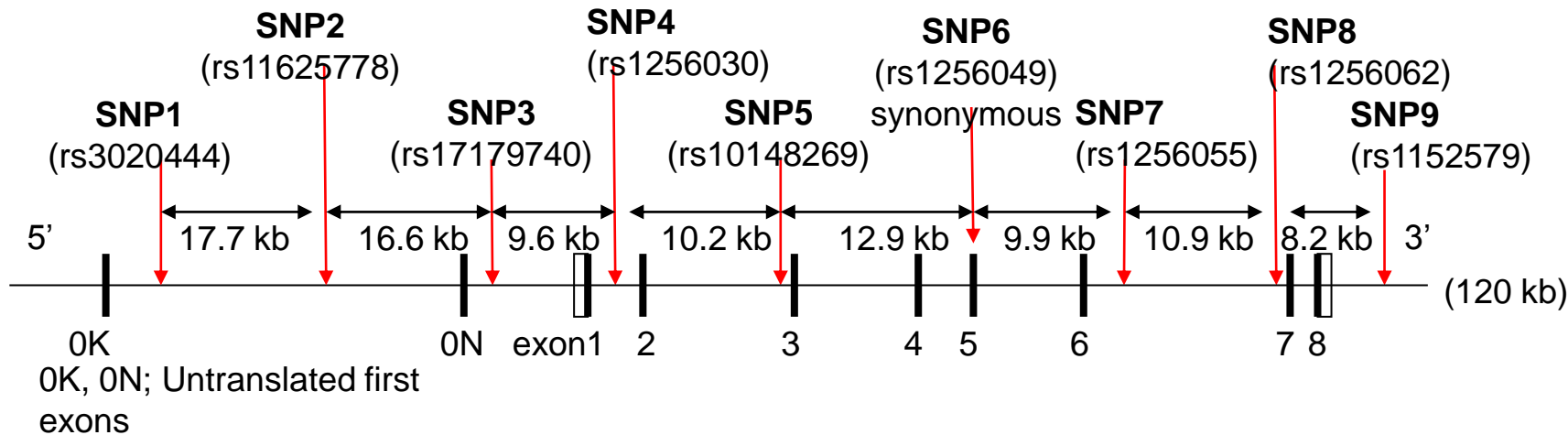


エストロゲン暴露実験

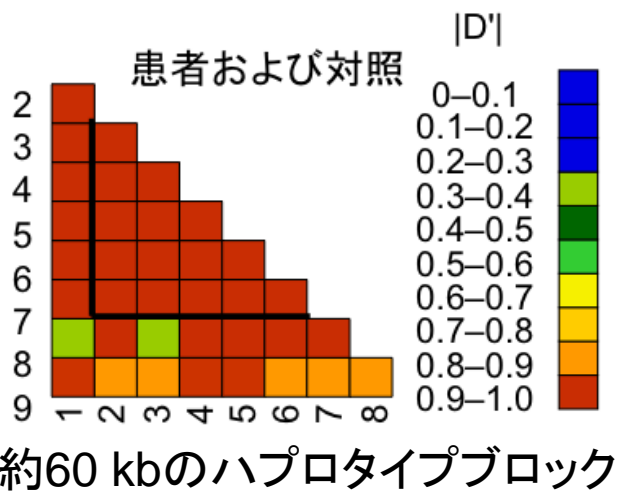
精子形成障害患者におけるエストロゲン受容体β型(ESR2)ハプロタイプ解析

J Hum Genet, in press

ESR2遺伝子は生殖細胞で発現



ESR2特定ハプロタイプと精子形成障害発症の関連



		TGTAGA	TACGGA	CGCGAG	TGCGGA
<優性様式>	<i>P</i> 値	0.0063	0.078	0.92	0.031
	オッズ比	2.08	0.63	0.98	0.46
	95%信頼区間	1.23-3.54	0.38-1.05	0.59-1.62	0.22-0.93
<劣性様式>	<i>P</i> 値	0.026	0.34	0.55	0.97
	オッズ比	2.16	0.58	0.75	0.95
	95%信頼区間	1.09-4.46	0.17-1.79	0.28-1.96	0.037-24.2
<遺伝子型様式>	<i>P</i> 値	0.0098	0.19	0.83	0.089
<Trend test>	<i>P</i> 値	0.0029	0.071	0.75	0.056

現在、特定ハプロタイプに特有の配列変化を解析中

性ホルモン効果関連遺伝子群、ダイオキシン関連遺伝子群

J Hum Genet, in press

- 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

内分泌攪乱化学物質とエピジェネティック変化

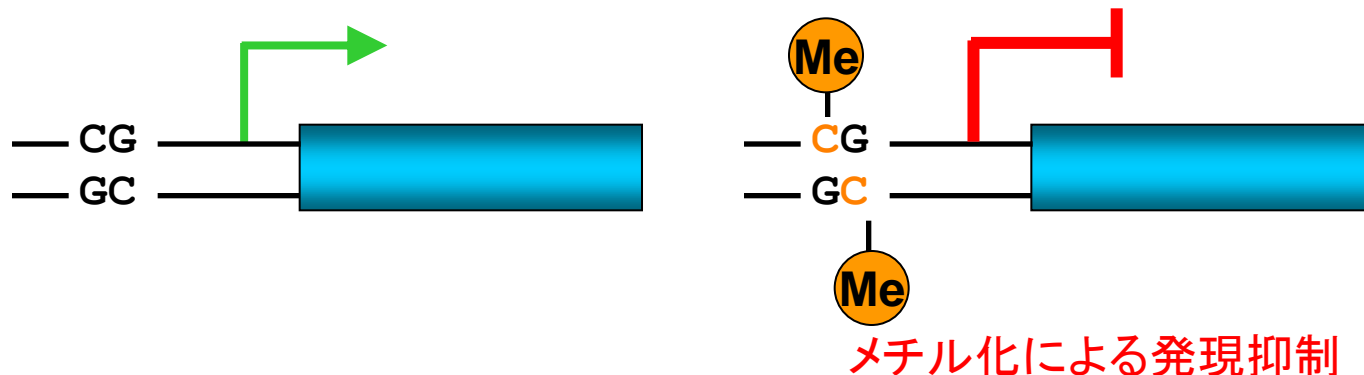
遺伝子の構造は正常であるが、プロモーターのメチル化などのために働きが悪くなる状態: 環境化学物質暴露は重要な原因

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 (5 α -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。



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

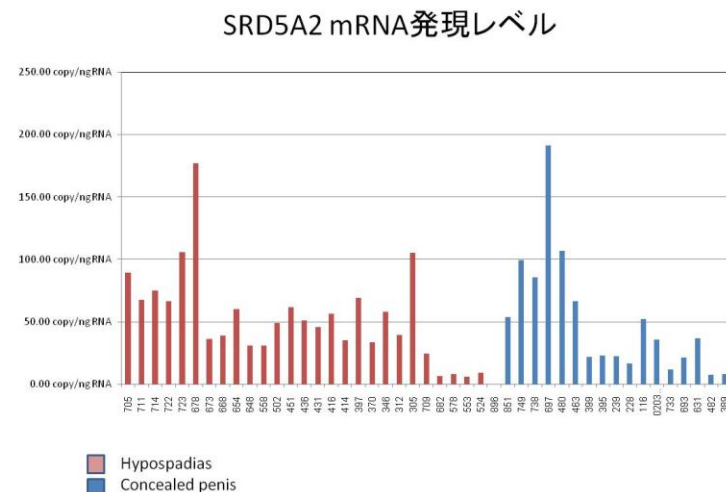
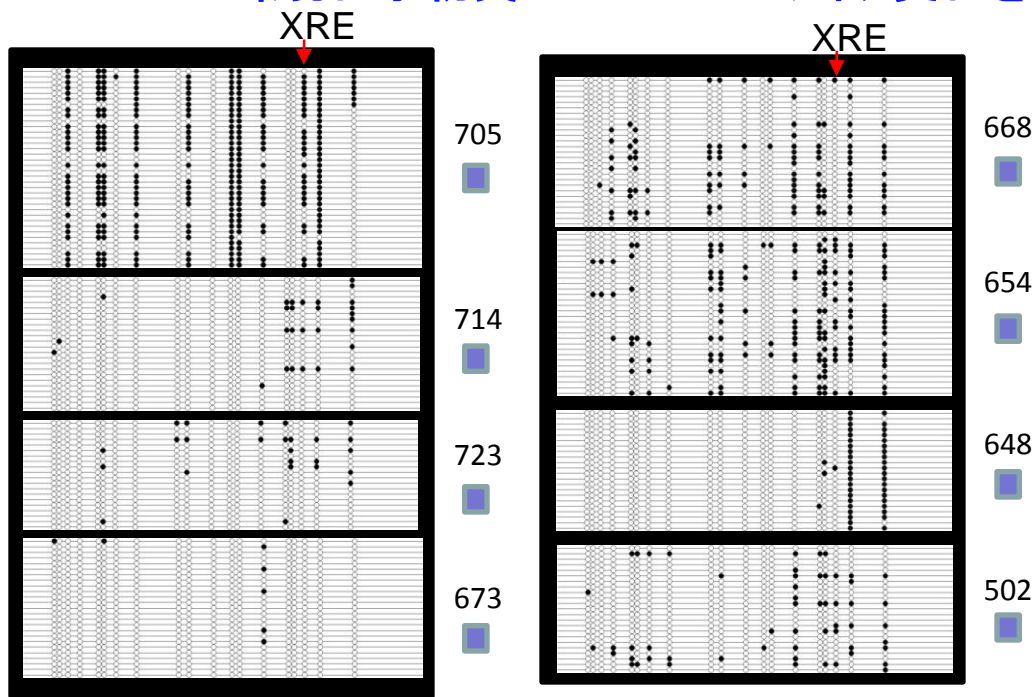
尿道下裂男児および非尿道下裂男児(埋没陰茎)の外陰部皮膚検体で3種の遺伝子のCpG領域メチル化頻度解析した。

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



発現レベル基礎値はバラつく
(発現誘導で再解析中)

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茎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、埋没陰茎群に比べて、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	

尿道下裂患者の外陰部皮膚線維芽細胞を用いた暴露実験

E2

UP-REGULATION		DOWN-REGULATION	
Gene	Fold change	Gene	Fold change
SLC38A11	7.104141	CSF3	-9.93197
MAP3K8	6.803548	CXCL3	-7.31956
OLR1	6.629856	MTSS1	-6.17392
LOC100132319	6.268278	PTPN22	-6.16211
LMOD1	5.190962	NKX6-2	-5.76049
TAGAP	5.011251	MICAL3	-5.37948
MRVI1	4.753503	IL8	-4.3701
SPRY1	4.213157	ESYT3	-3.95613
ASB2	3.857113	TFPI2	-3.72549
FRY	3.795805	COL17A1	-3.51532

BPA

UP-REGULATION		DOWN-REGULATION	
Gene	Fold change	Gene	Fold change
SPIN4	1.65931	MMP11	-2.43083
POMZP3	1.455982	NEK10	-2.26265
WDR3	1.453648	TNFRSF10C	-1.92235
NHLRC2	1.411471	EPB41L4A	-1.91928
CCDC41	1.364746	LDLRAD3	-1.91265
MPP1	1.356291	FBXW12	-1.79411
FKBP4	1.340357	FSIP1	-1.78795
LRCH1	1.332147	TMEM190	-1.66348
ZNF850P	1.307375	ZNF546	-1.58212
ZBTB25	1.291857	LOC645967	-1.47452

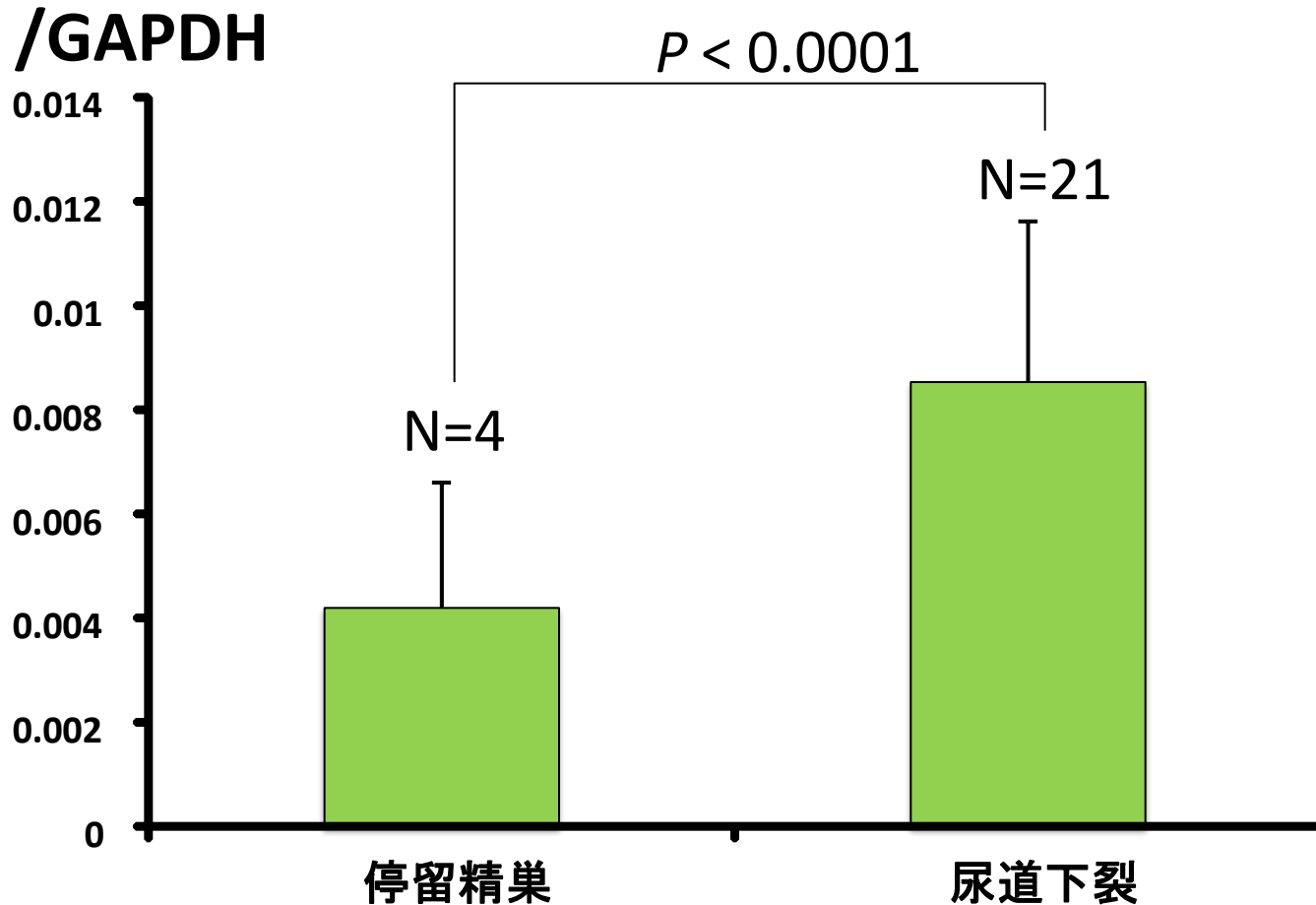
TCDD

UP-REGULATION		DOWN-REGULATION	
Gene	Fold change	Gene	Fold change
TAGAP	6.186387	FTCD	-3.24874
LOC100132319	5.957921	MICAL3	-2.58961
C6orf103	5.948178	INMT	-2.4473
FABP4	3.643628	SCAND3	-2.31426
LDLRAD3	3.117963	SLC40A1	-2.26487
LOC100133554	2.733596	FER1L4	-2.24806
FAM160A1	2.679635	MBL1P	-2.23678
C17orf76	2.66936	CPAMD8	-2.18167
LOC440900	2.624016	ZNF846	-2.17684
LAMC2	2.56916	CES8	-2.13456

3種類の細胞に共通してup-/down-regulationを示した遺伝子数

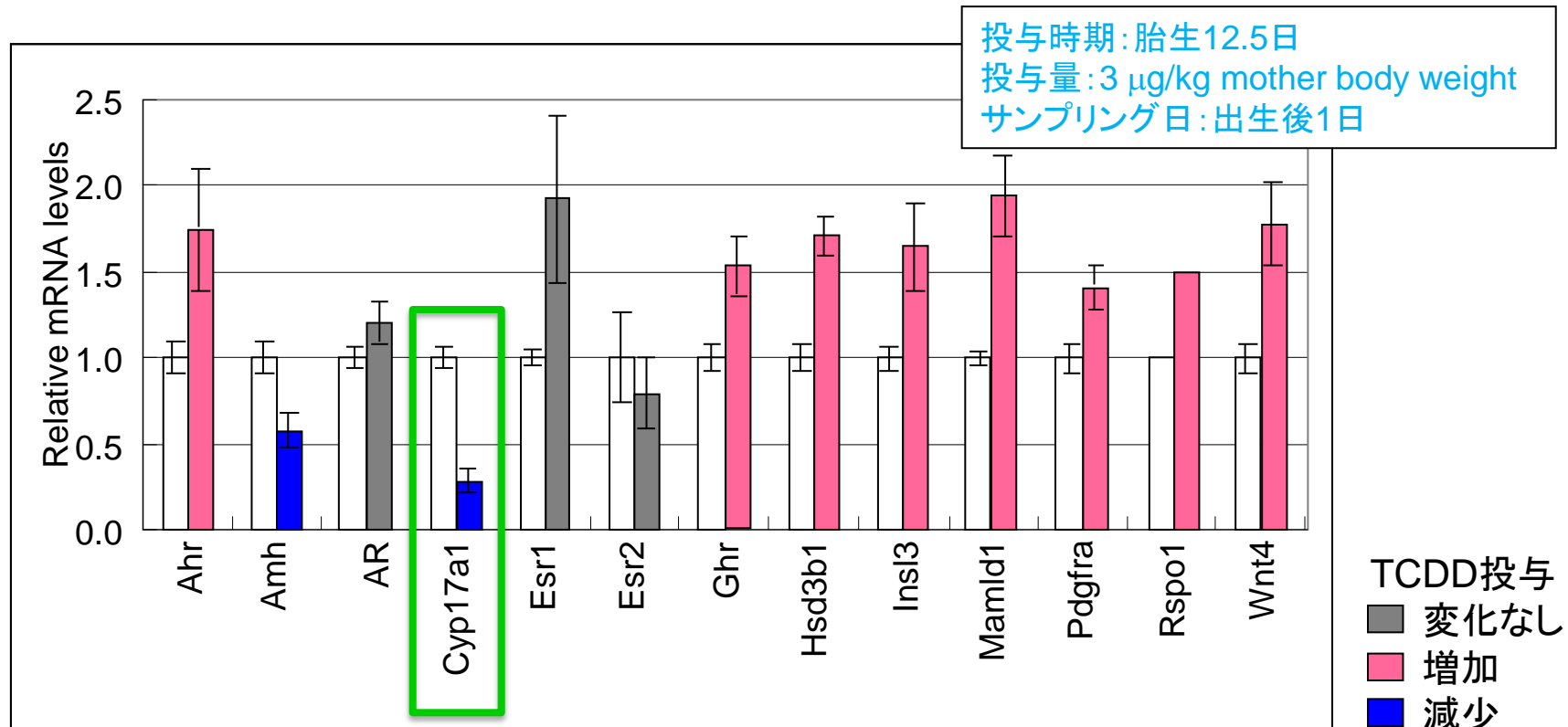
Chemicals	Up-regulated	Down-regulated
E2	432	528
BPA	34	75
TCDD	417	308

外陰部皮膚線維芽細胞36検体におけるARNT2発現量

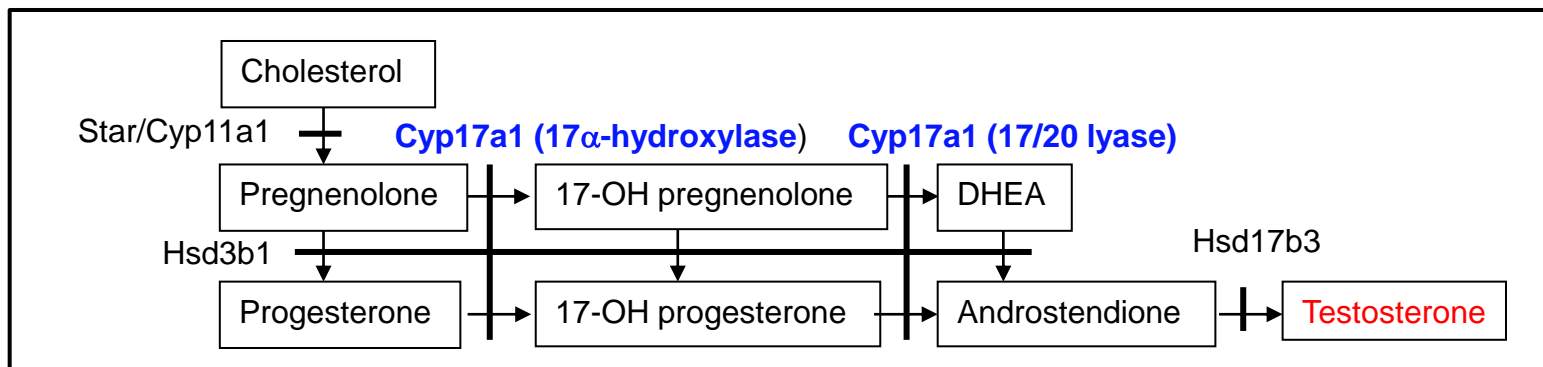


尿道下裂患者において停留精巢患者より有意に高発現

胎仔期TCDD暴露マウスの精巣における遺伝子発現変化



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)



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

検体集積システム

浜松医医科大学病院

- 産科
- 小児科
- こども発達センター など

研究参加医療機関

- 産科
- 小児科 など

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

研究参加医療機関

- 泌尿器科
- 小児科 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
早発性卵巣機能不全患者	120
口蓋裂患者	60
正常成人	>1,000

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

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

暴露量推定

妊娠中の曝露評価対象物質と分析法

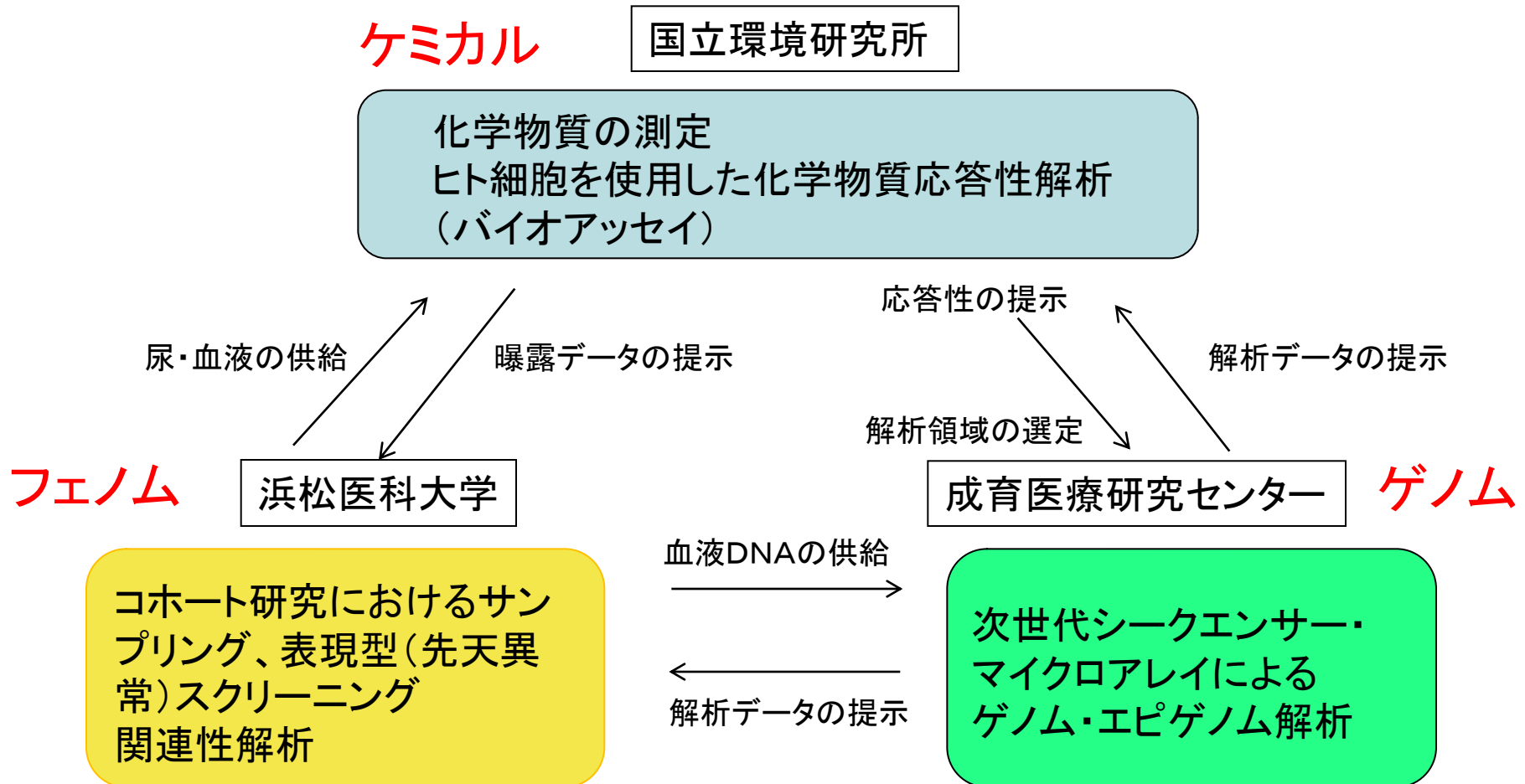
対象物質	測定対象	主な作用	測定方法	必要尿量 (mL)	進行状況
フタル酸エステル類	代謝産物9種類	抗アンドロジェン	LC/MS/MS	1	◎
ピレスロイド系殺虫剤	代謝産物3種類	抗アンドロジェン	LC/MS/MS	5	△
芳香族炭化水素化合物	代謝産物(1-ヒドロキシピレン)	エストロジェン様?	LC/FL	2	◎
パラベン	パラベン3種類、代謝産物3種類	エストロジェン様	LC/MS/MS	5	△
イソフラボン	ダイゼイン、イクオール	エストロジェン様	GC/MS	0.2	◎
クレアチニン	クレアチニン	尿量補正	吸光光度法	0.25	◎
喫煙(能動受動)	コチニン	交絡因子	GC/MS	2	◎

ヒトAGD測定位置(男性化の指標)



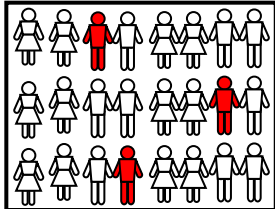
今後の研究方向

ケミカル-フェノム-ゲノム、3指標を計測するための効率良い体制の構築

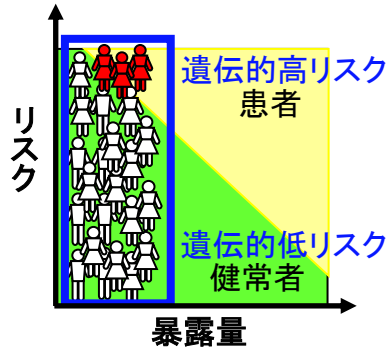


小児先天奇形発症における環境リスク評価法の基盤整備

バイオマーカーの開発



一般集団
・大多数の健常者(白)
・少数の患者(赤)



(曝露量の個体間には小さいと予測)

感受性多型関与の可能性

相関解析

機能解析

バイオマーカーとしての
多型・ハプロタイプ

単一遺伝子関与の可能性

メチル化解析

発現量解析

バイオマーカーとしての
単一遺伝子発現変化

臍帯血・胎盤バンクシステムの整備

試料およびデータの集積と保存

プロファイリングと品質管理



妊娠歴、胎盤、新生児所見

DNA、RNA、
リンパ球セルライン、
血清、血漿、
組織、線維芽細胞

バイオマーカー解析

インプリンティング
遺伝子解析

環境残留性化学物質
や毒性等量測定

検体・データ管理

バンキングとして公表
長期フォローアップ

同定したバイオマーカーの使用

新たなバイオマーカーの検出

- ・ バイオマーカーの開発とその解析による高リスク小児の同定
- ・ バンキングシステム構築による長期フォローアップと今後の研究の基盤整備
- ・ 環境改善への啓蒙と動機づけ