

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2008

課題番号：16086215

研究課題名：性分化異常症および生殖機能障害の包括的遺伝子変異および多型解析とその臨床応用

研究課題名：Comprehensive mutation and susceptibility analyses and its clinical application in disorders of sex development and reproductive dysfunction

研究代表者：緒方 勤 (OGATA TSUTOMU)

国立成育医療センター研究所・小児思春期発育研究部・部長

研究者番号：40169173

研究成果の概要：単一遺伝子疾患としての性分化異常症：新規尿道下裂責任遺伝子 MAMLD1 の同定と機能解析、胎児期・乳児期特異的男性ホルモン産生経路 backdoor pathway の同定、第 14 染色体父性ダイソミーと母性ダイソミー表現型を招く（エピ）遺伝的機序の解明、AD4BP/SF1 遺伝子上昇の同定と機能解析、ゴナドトロピン分泌不全症の遺伝的機序の解明を行った。多因子疾患としての性分化異常症：内分泌攪乱化学物質感受性ハプロタイプの同定、外陰部異常症発症感受性多型の同定を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004 年度	17,400,000	0	17,400,000
2005 年度	17,400,000	0	17,400,000
2006 年度	17,400,000	0	17,400,000
2007 年度	17,400,000	0	17,400,000
2008 年度	17,400,000	0	17,400,000
総計	87,000,000	0	87,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：性分化異常症、単一遺伝子疾患、多因子疾患、ヒト遺伝疾患、内分泌攪乱物質

1. 研究開始当初の背景

性分化異常症および生殖機能障害を有する患者を対象とする遺伝子解析は、ほぼ例外なくある特定の遺伝子を対象とする変異解析であり、本研究のように、遺伝子変異と遺伝子多型の両者を包括的に解析しようとする試みは見られない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、性分化異常症および生殖機能障害を単一遺伝子疾患と多因子疾患の両者の観点から解析し、その成果を医療のみならず社会に還元することである。特に、下記の項目

に主眼を置く。

(1) 単一遺伝子疾患としての性分化異常症および生殖機能障害

既知および候補遺伝子の変異解析と遺伝子型・表現型解析：遺伝子変異頻度と臨床スペクトラムを決定すると共に、新規単一遺伝子疾患の確立を目指す。

変異遺伝子の機能解析：疾患成立機序の解明と原因療法の開発に挑む。

(2) 多因子疾患としての性分化異常症および生殖機能障害

疾患感受性および薬剤応答性に関与する遺伝子多型およびハプロタイプの同定：疾患感

受性では内分泌攪乱物質の関与に、薬剤応答性では重篤な副作用発症(卵巣 過剰刺激症候群など)に重点を置く。

特定遺伝子多型およびハプロタイプの機能解析: 遺伝統計学的に選択された標的遺伝子多型やハプロタイプが真に機能変動を伴うか否かを検討する。

3. 研究の方法

(1) 単一遺伝子疾患としての性分化異常症および生殖機能障害

既知および候補遺伝子の変異解析と遺伝子型-表現型解析(担当: 緒方 勤, 勝又 規行, 佐藤 直子): 変異解析では, 原則として, 既知および候補遺伝子の全てのエクソンのシークエンスを決定する。患者数が膨大であるときには, heteroduplex 法(DHPLC)によるスクリーニングを行う。また, FISH 解析 により遺伝子欠失および重複の有無を検討する。遺伝子型-表現型解析では, 代表的症状と例外的症状の両者を詳細に検討する。変異遺伝子の機能解析(担当: 勝又 規行): 変異遺伝子機能を, 導入細胞における発現量, dominant negative 効果, gel-shift assay などで検討する。

(2) 多因子疾患としての性分化異常症および生殖機能障害

疾患感受性および薬剤応答性に関与する遺伝子多型およびハプロタイプの同定(担当: 緒方 勤, 深見 真紀): 機能的多型とハプロタイプの相関解析を, 疾患感受性では患者-対象群間で, 薬剤応答性では治療を受けた患者間で行う。ハプロタイプ解析に要する連鎖不平衡領域の決定では, ヘテロ接合性が高く(低頻度アリルが 15%以上), 約 10 kb の等間隔に分布する SNPs を用いる。遺伝子型タイピングは Taqman 法で行い, 遺伝統計学的解析は東京女子医大鎌谷教授が開発したソフトにより行う。特定遺伝子多型およびハプロタイプの機能解析(担当: 深見 真紀): 選択された特定遺伝子多型およびハプロタイプと対象遺伝子多型およびハプロタイプを有する細胞に内分泌攪乱物質や薬剤を添加し, 遺伝子発現量を比較する。

4. 研究成果

(1) 新規尿道下裂責任遺伝子 MAMLD1 の同定と機能解析

世界初の変異患者の同定

われわれは, 性腺異形成, 尿道下裂, 停留精巣などを有する患者 166 例を対象とする変異解析により, 3家系4例の尿道下裂患者にお

いて異なるナンセンス変異を同定し, MAMLD1 が尿道下裂発症責任遺伝子であることを世界で初めて明らかとした(図1)。

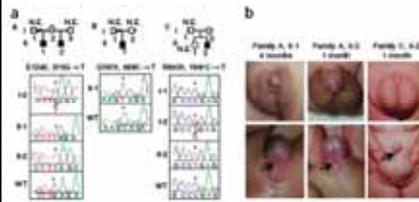


図1. a. 3家系におけるナンセンス変異

(家系 A, E124X; 家系 B, Q197; 家系 C, R653X)。b. 家系AとCの患者における尿道下裂。矢印()は外尿道口を示す。

マウスにおける発現パターン解析

マウス相同遺伝子が, 胎児期では性決定臨界期の精巣ライディッヒ細胞(男性ホルモン産生細胞)とセルトリ細胞で発現し, 卵巣および外陰部ではほとんど発現していないこと, 生後では精巣において発現せず, 卵巣顆粒膜細胞で強く発現していることを見いだした(図2)。

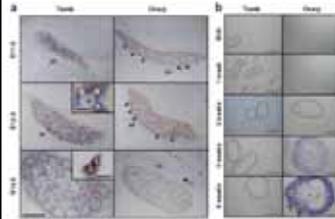


図2. a. マウス相同遺伝子の胎児期発現パターン。青いシグナルはMAMLD1のマウス相同遺伝

子に対する in situ hybridization に, 茶色のシグナルはセルトリ細胞とライディッヒ細胞のマーカーである SF1/Ad4BP にたいする蛍光抗体に由来する。b. マウス相同遺伝子の生後発現パターン。卵巣顆粒膜細胞で強く発現している。

MAMLD1 の in vitro 機能解析

われわれは, MAMLD1 が, MAL2 と同源性を有し(図3)、正常では核小体に存在するが, 変異蛋白が核小体に移行できないことを示した(図4)。

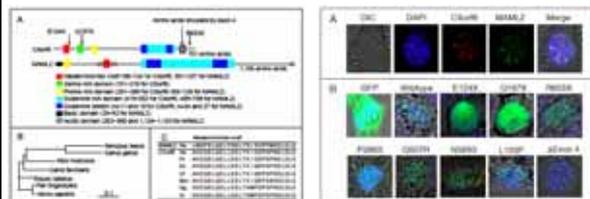


図3. MAMLD2 と MAMLD1 の同源性。図4. 正常および変異 MAMLD1 の細胞内局在

さらに、MAMLD1 が、非古典的 Notch 標的である Hes3 を転写活性化させること(図5)、MAMLD1 が SF1 により調節されていること(図6)を世界で初めて示した。

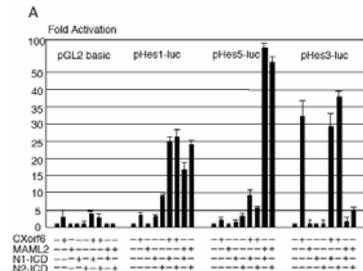


図5. CXorf6 の Hes3 に対する転写活性化作用



図6. SF1 の CXorf6 に対する転写活性化作用

(2) 胎児期・乳児期特異的男性ホルモン産生経路 backdoor pathway の同定
男女共通の外陰部異常症、副腎機能不全、骨系統疾患、妊娠中の母体男性化などを特徴とする POR 遺伝子異常症を有する計 35 例の患者を同定し、それらの患者において詳細な遺伝子型 表現型解析を行ない、残存活性は、骨系統疾患の重症度に密接に関与し、副腎機能と男性における性分化異常にある程度関与するが、必発である女性における性分化異常や妊娠中の母体男性化の重症度には影響しないことを見いだした。これは、各症状に関連する代謝経路が単純なものであるか複雑なものであるかによって説明され、女性における性分化異常には backdoor pathway が密接に関与し、したがって、ステロイドにより胎内治療が可能であることを見いだした(図7)。

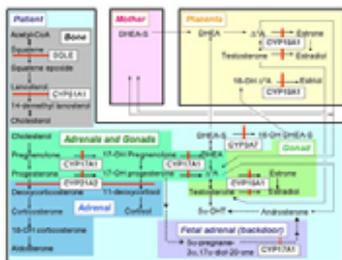


図7. Backdoor pathway

(3) 第 14 染色体父性ダイソミーと母性ダイソミ

ー表現型を招く(エピソード)遺伝的機序の解明
父性ダイソミー発症機序の解明
ダイソミーを有さないが、父親性ダイソミー14の表現型を有する患者 8 例と母親性ダイソミー14の表現型を有する患者 3 例において詳細な欠失解析、メチル化解析、発現解析を行い、家族性の 4 例において約 108 kb の微小欠失、別の

家族性症例において約 411 kb の微小欠失、孤発性の 1 例において約 475 kb の微小欠失、孤発性の 1 例において約 6.5 Mb の欠失、3 例においてエピソード変異を見いだした(図8、9、10)。そして、遺伝子型 表現型解析により、以下のことを世界で初めて報告した。(1) ヒト染色体 14q32.2 に存在するインプリンティング遺伝子群が intergenic differentially methylated region (IG-DMR) により調節されている(すなわち、母親由来の染色体に生じた IG-DMR を含む欠失あるいは IG-DMR の過剰メチル化はインプリンティング領域の発現パターンを全て父親由来のそれに変換し、父親由来の染色体に生じた IG-DMR を含む欠失は発現パターンを変化させず、父親由来の染色体に生じた IG-DMR に生じた低メチル化はインプリンティング領域の発現パターンを全て母親由来にそれに変換させる)。(2) 父親性ダイソミー (upd(14)pat) の表現型が主に父親性発現遺伝子 RTL1 の過剰発現に起因する。(3) 母親性発現遺伝子 RTL1 antisense が RTL1 の発現抑制因子として作用する。

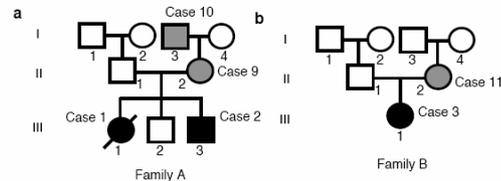


図8. IG-DMR を含む微小欠失を持つ 2 家系。母親由来アレルに欠失をもつ case 1-3(黒)は upd(14)pat 症状を、父親由来アレルに欠失をもつ case 9-11(灰色)は upd(14)mat 症状を呈する

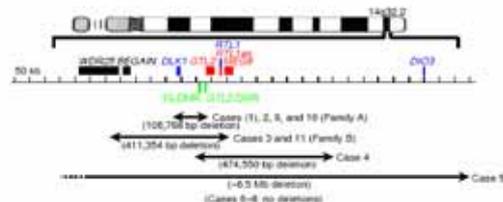
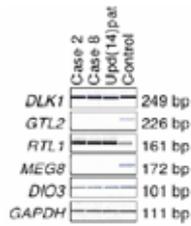


図9. 欠失例の欠失範囲。弧発欠失例の case 4,5、エピソード変異の case 6-8 は upd(14)pat 症状を示す

図10. 胎盤における発現実験。母親由来アレルのIG-DMRが欠失したcase 2、エビ変異を有するcase 9では父性発現遺伝子の発現が増加し、母性発現遺伝子の発現は消失している。特にRTL1の発現増加が著増している。これらの成績は、IG-DMRが母由来インプリンティング領域の調節因子であること、RTL1 antisenseがRTL1の発現抑制因子として作用することを示す。



母性ダイソミー表現型発症機序の解明
母性性ダイソミー (upd(14)mat) の表現型が主に父性発現遺伝子 RTL1 と DLK1 の発現消失により生じること、DMRのエビ変異が母性ダイソミー表現型を招くことを示した(図11)。

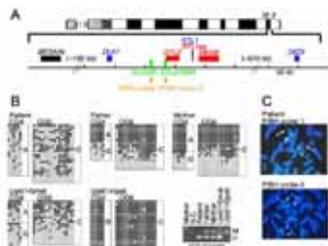


図11. 母性ダイソミー表現型患者におけるエビ変異。

(4) 内分泌攪乱化学物質感受性ハプロタイプの同定

内分泌攪乱物質のエストロゲン様作用を介在するとされているエストロゲン受容体遺伝子(ESR1)のハプロタイプ解析を15個のSNPsを対象として行い、リガンド依存性転写活性化ドメインに約50 kbの連鎖不平衡領域が存在し(図12)、ESR1のハプロタイプブロック内のAGATAハプロタイプのホモ接合体頻度が、停留精巣(P=0.0029, オッズ比7.6)のみならず、尿道下裂(P=0.000073, オッズ比13.75)と密接に相関することを見出した。これはエストロゲン様内分泌攪乱物質にたいする感受性の存在を確信させるデータである。

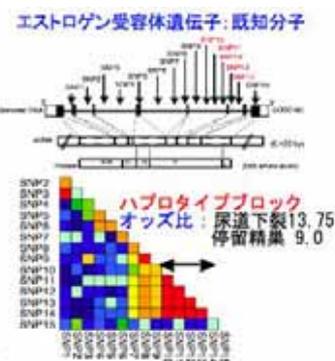


図12. エストロゲン受容体遺伝子の特定ハプロタイプのホモ接合体と尿道下裂・停留精巣の発症リスク

5. 主な発表論文等

- (雑誌論文) (計40件) 全て査読あり
- Ogata T, Laporte J, Fukami M. *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene involved in hypospadias. *Hormone Research* (in press).
 - Fukami M (筆頭), Ogata T (計21名中最終). Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (in press).
 - Ogata T (計10名中4番目), Sato N (計10名中5番目), Claahsen-van der Grinten HL, van der Donk K, Seminara S, Bergman JE, Brunner HG, Crowley WF Jr, Hoefsloot LH. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome - the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clinical Genetics* 75 (1): 65-71, 2009
 - Ogata T (計9名中最終). Premature ovarian failure and androgen receptor gene CAG repeat lengths weighted by X chromosome inactivation patterns. *Fertility and Sterility* 91 (2): 649-652, 2009
 - Ogata T, Fukami M, Wada Y. *MAMLD1 (CXorf6)* is a new gene for hypospadias. *Clinical Pediatric Endocrinology* 17 (4): 87-93, 2008.
 - Ogata T, Kagami M. Molecular mechanisms leading to the phenotypic development in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Clinical Pediatric Endocrinology* 17 (4): 103-111, 2008.
 - Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC. Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics* 3 (4): 181-187, 2008.
 - Ogata T, Wada Y, Fukami M. *MAMLD1 (CXorf6)*: a new gene for hypospadias. *Sexual Development* 2 (4-5): 244-250, 2008.
 - da Rocha ST, Edwards CA, Ito M, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting at the mammalian *Dlk1-Dio3* domain. *Trends in Genetics* 24 (6): 306-316, 2008.
 - Yamazawa K, Kagami M, Fukami M, Ogata T. Monozygotic female twins discordant for Silver-Russell syndrome and hypomethylation of the *H19*-DMR. *Journal of Human Genetics* 53 (10): 950-955, 2008.
 - Kagami M, Yamazawa K, Matsubara K, Matsuo N, Ogata T. Placentomegaly in paternal uniparental disomy for human chromosome 14. *Placenta* 29 (8): 760-761, 2008
 - Dateki S, Fukami M, Sato N, Muroya K, Adachi M, Ogata T. *OTX2* Mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial GH deficiency: functional studies using the *IRBP*, *HESX1*, and *POU1F1* promoters. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 93 (10): 3697-3702, 2008.
 - Ogata T (計15名中最終). Molecular and clinical findings and their correlations in Silver-Russell syndrome: implications for the critical role of *IGF2* as the growth determinant and the differential imprinting regulation of the *IGF2 H19* domain in bodies

- and placentas. *Journal of Molecular Medicine* 86 (10): 1171 1181, 2008.
14. Ogata T (計 5 名中 2 番目). Epimutation (hypomethylation) affecting the chromosome 14q32.2 imprinted region in a girl with upd(14)mat-like phenotype. *European Journal of Human Genetics* 16 (8): 1019 1023, 2008.
 15. Fukami M (筆頭), Ogata T (計 10 名中最終). CXorf6 (MAMR1: mastermind-related 1) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the target sequence for SF-1. *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5525 5532, 2008.
 16. Ogata T (計 14 名中 11 番目). Essential role of Rtl1 in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nature Genetics* 40 (2): 243 248, 2008.
 17. Ogata T (計 24 名中最終). Deletions and epimutations affecting the human chromosome 14q32.2 imprinted region: implications for the phenotypic development in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Nature Genetics* 40 (2): 237 242, 2008.
 18. Ogata T (計 5 名中最終). Placental hypoplasia in maternal uniparental disomy for chromosome 7. *American Journal of Medical Genetics A* 146 (4): 514 516, 2008.
 19. Ogata T (計 12 名中 3 番目). Abnormal urethra formation as a model for hypospadias of the split-hand-foot malformation (SHFM). *European Journal of Human Genetics* 16 (1): 36 44, 2008.
 20. Ogata T (計 11 名中最終). Haplotype analysis of the estrogen receptor α gene in male genital and reproductive abnormalities. *Human Reproduction* 22(5):1279 1284, 2007.
 21. Sato N (筆頭), Ogata T (計 7 名中最終). Hypogonadotropic hypogonadism in an adult female with heterozygous hypomorphic mutation of SOX2. *European Journal of Endocrinology* 156 (2):167 171, 2007
 22. Fukami M (筆頭), Ogata T (計 12 名中最終). CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nature Genetics* 38 (12): 1369 1371, 2006.
 23. Ogata T (計 7 名中最終). Mutation and polymorphism analyses of INSL3 and LGR8/GREAT in 62 Japanese patients with cryptorchidism. *Hormone Research* 67 (2): 73 76, 2006.
 24. Ogata T (計 6 名中筆頭). Kallmann syndrome phenotype in a female patient with CHARGE syndrome and CHD7 mutation. *Endocrine Journal* 53 (6): 741 743, 2006.
 25. Fukami M (計 10 名中 9 番目), Ogata T (計 10 名中最終). Urine steroid hormone profile analysis in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: implication for the backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (7): 2643 2649, 2006.
 26. Sato N, Ohyama K, Fukami M, Okada M, Ogata T. Somatic and germline mutations of the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a mother and the son: implication for apparently mutation negative Kallmann syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91 (4): 1415 1418, 2006.
 27. Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R, Ohashi T, Nishimura G, Homma K, Ogata T. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and/or aromatase deficiency. *Pediatric Research* 59 (2): 276 280, 2006.
 28. Wada Y, Okada M, Fukami M, Sasagawa I, Ogata T. Association of cryptorchidism with Gly146Ala polymorphism in the gene for steroidogenic factor-1. *Fertility and Sterility* 85 (3): 787 790, 2006.
 29. Ogata T (計 5 名中 2 番目). Association of common LH variant with hyperfunctional promoter in a Japanese infertile woman. *Endocrine Journal* 52 (6): 781 784, 2005.
 30. Wada Y, Okada M, Hasegawa T, Ogata T. Association of severe micropenis with Gly146Ala polymorphism in the gene for steroidogenic factor-1. *Endocrine Journal* 52 (4) :445 448, 2005.
 31. Ogata T (計 9 名中最終). Segmental and full paternal isodisomy for chromosome 14 in three patients: localization of the critical region and implication for the clinical features. *American Journal of Medical Genetics A* 138 (2):127 132, 2005.
 32. Sato N, Hasegawa T, Hori N, Fukami M, Yoshimura Y, Ogata T. Gonadotropin therapy in Kallmann syndrome caused by heterozygous mutations of the gene for fibroblast growth factor receptor 1: report of three families. *Human Reproduction* 20 (8): 2173 2178, 2005.
 33. Yoshida R, Fukami M, Sasagawa I, Hasegawa T, Kamatani N, Ogata T. Association of cryptorchidism with a specific haplotype of the estrogen receptor α gene: implication for the susceptibility to estrogenic environmental endocrine disruptors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90 (8): 4716 4721, 2005.
 34. Ogata T (計 7 名中最終). Association of micropenis with Pro185Ala polymorphism of the gene for aryl hydrocarbon receptor repressor involved in dioxin signaling. *Endocrine Journal* 52 (1): 83 88, 2005.
 35. Fukami M (筆頭), Ogata T (計 16 名中最終). Cytochrome P450 oxidoreductase gene mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 90: 414 426, 2005.
 36. Hasegawa T, Fukami M, Sato N, Sasaki G, Fukutani K, Morohashi K, Ogata T. Testicular dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46,XY patient with a heterozygous inactive mutation of steroidogenic factor-1. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (12): 5930 5935, 2004.
 37. Ogata T (67 名中最終). Association of male infertility with Pro185Ala polymorphism in the aryl hydrocarbon receptor repressor

gene: implication for the susceptibility to dioxins. *Fertility and Sterility* 82 (suppl 3): 1067-1071, 2004.

38. Ogata T(計7名中最終).. Testosterone enanthate therapy is effective and independent of SRD5A2 and AR gene polymorphisms in 53 Japanese boys with micropenis. *Journal of Urology* 172 (1): 319-324, 2004.
39. Ogata T(計7名中最終).. Genitourinary phenotype in XX patients with distal 9p monosomy. *Molecular Genetics and Metabolism* 82 (2): 173-179, 2004.
40. Sato N(筆頭), Ogata T(計19名中最終). Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (3): 1079-1088, 2004.

[学会発表](計 件)省略

[図書](計 件)省略

[産業財産権]

出願状況(計3件)

名称: エストロゲン受容体 α 遺伝子におけるハプロタイプブロックの同定および特定ハプロタイプによる男児外陰部異常症発症感受性亢進

発明者: 緒方勤

権利者: 国立成育医療センター

種類:

番号: 2004-250832

出願年月日: 2004年8月30日

国内外の別: 国内

名称: 尿道下裂および他のストロゲン依存性疾患発症のリスクとエストロゲン製剤効果の評価法としてのエストロゲン受容体 遺伝子のSNP解析法の開発発明者: 緒方勤

権利者: 国立成育医療センター

種類:

番号: 2006-116082

出願年月日: 2006年4月19日

国内外の別: 国外

名称: 新規性分化異常症責任遺伝子 MHX (Cxor6)による Notch リポーター遺伝子転写活性化の同定

発明者: 緒方勤

権利者: 国立成育医療センター

種類:

番号: 2006年4月7日

国内外の別: 国内

メディア発信

- (1) 日経新聞朝刊、日経産業新聞朝刊掲載(新規性分化異常症責任遺伝子 Cxor6 の同定について)2006年11月6日、緒方勤
- (2) 日経新聞朝刊掲載(尿道下裂の治療について)2006年11月6日、緒方勤
- (3) 読売新聞朝刊特集記事 2007年2月18日、日経新聞朝刊掲載 2007年1月29日(内分泌攪乱物質感受性ハプロタイプの同定について)緒方勤
- (4) 科学雑誌 Newton(X, Y 染色体)2006年2月、および、別冊号(性を決めるXとY)2006年11月、緒方勤
- (5) 共同通信 Medical News(ターナー症候群)、緒方勤
- (6) 朝日新聞朝刊掲載、読売新聞朝刊掲載、毎日新聞朝刊掲載(第14染色体インプリンティング領域の異常による疾患)2008年1月7日、1月13日緒方勤

6. 研究組織

(1)研究代表者

緒方 勤 (OGATA TSUTOMU)

国立成育医療センター研究所・小児思春期
発育研究部・部長

研究者番号: 40169173

(2)研究分担者

勝又 規行 (KATSUMATA NORIYUKI)

国立成育医療センター研究所・小児思春期
発育研究部・室長

研究者番号: 10260340

深見 真紀 (FUKAMI MAKI)

国立成育医療センター研究所・小児思春期
発育研究部・室長

研究者番号: 40265872

佐藤 直子 (SATO NAOKO)

国立成育医療センター研究所・小児思春期
発育研究部・研究員

研究者番号: 10383069