

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390290
 研究課題名（和文）新規性分化遺伝子 CXorf6 変異の臨床スペクトラム決定とその発症機序の
 解明
 研究課題名（英文）Novel sex development gene CXorf6: determination of clinical spectrum
 in mutation positive patients and clarification of underlying factors
 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：本研究期間では、以下の進展が見られた。(1) 機能解析により、CXorf6 が非古典的 Notch 標的遺伝子である Hes3 の転写活性化因子として作用し、マスター遺伝子である SF1 により制御されていることを見いだした。(2) ノックダウン実験により、CXorf6 がテストステロン産生に関与するステロイド産生酵素活性に作用することを見いだした。(3) 尿道下裂患者においてさらなる遺伝子変異を同定した。(4) ノックアウトマウス作製とその解析から、CXorf6 が脂肪代謝に関連する可能性を見いだした。

研究成果の概要（英文）：We have obtained the following findings during the research period: (1) Functional studies revealed that CXorf6 has a transactivation function for the canonical Notch target HES3, and is regulated by SF-1 that functions as a master gene for sex development; (2) Knockdown experiments showed that CXorf6 has a regulatory function for the testicular steroidogenic enzymes; (3) Mutation analysis identified further CXorf6 mutations in patients with hypospadias; and (4) Knockout mouse experiments indicated that CXorf6 is involved in metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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、遺伝子変異、遺伝子機能、臨床像、ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

われわれは、X染色体長腕末端に存在する CXorf6 が新規尿道下裂発症責任遺伝子であることを世界で初めて報告した。この CXorf6

は、MTM1 (myotubular myopathy 遺伝子) を含む Xq28 の微小欠失を有する 3 家系 6 例の男児における遺伝子型-表現型解析から男児外陰部異常候補遺伝子とされていた遺伝

子である。これは、MTM1 の遺伝子内変異を持つ男児の外陰部が正常であることにたいし、MTM1 と CXorf6 を含む微小欠失を有する男児が例外なく尿道下裂などの外陰部異常を呈することに基づく。また、微小欠失保因者女性 3 例中 1 例が早発性卵巣機能不全を呈している。

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、CXorf6 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。そして、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。これは、胎児期の一過性男性ホルモン分泌不全が尿道下裂の原因であることを示唆すると共に、CXorf6 変異陽性男児の妊孕性が確保される可能性や CXorf6 変異陽性女性の卵巣機能が障害される可能性を示唆する。

これらの成果に基づき、本研究では、CXorf6 変異陽性患者の臨床スペクトラムを決定すること、および、CXorf6 変異による性分化異常症発症機序を *in vitro* および *in vivo* 機能解析により解明することである。これにより、“性”というヒトにおける根源的生命現象の分子基盤を明らかとすることに貢献することを提案した。

2. 研究の目的

以下の 4 点を主たる研究目的とする。

- (1) 外陰部異常症男児および卵巣機能障害女性における変異解析：これにより、CXorf6 変異の臨床スペクトラムを決定する。特に、小児期男児における尿道下裂以外の疾患における変異の有無、成人女性における卵巣機能不全および関連疾患における変異の有無に焦点を当てる。
- (2) CXorf6 の *in vitro* 機能解析：正常 CXorf6 蛋白の転写活性化能解析や DNA 結合能解析により、CXorf6 の標的遺伝子候補を Notch 標的遺伝子である Hes および Hey 遺伝子群から同定すると共に、標的遺伝子と類似する構造を有する遺伝子を *in silico* 解析で同定する。また、患者で同定された自然発症変異および人工的に導入した変異 CXorf6 蛋白の転写活性化能、DNA 結合能、細胞内局在を解析し、CXorf6 の機能ドメインを同定する。さら

に、SF1/Ad4BP が CXorf6 の発現調節因子であるか否かを検討する。

- (3) CXorf6 標的遺伝子候補の *in vivo* 発現パターンの解析：選択された CXorf6 の標的遺伝子候補にたいするマウス相同遺伝子を同定し、その組織発現パターンを解析する。これにより、ライディッヒ細胞のような性分化関連標的細胞で発現する遺伝子を同定する。
- (4) ノックアウトマウスの作製と解析：特に、雄における新生時期の外陰部形成と成獣期の精子形成能、雌における成獣期の卵巣機能の評価する。さらに、ノックアウトマウスの性腺における既知および候補性分化関連遺伝子の発現パターンを解析し、CXorf6 と相互作用する遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) CXorf6 の患者における変異解析

- ①集積済検体の男児外陰部異常患者における変異解析：われわれは、男児外陰部異常症患者 166 例を解析し、その結果、3 家系 4 例の尿道下裂患者において、ナンセンス変異を同定した。その後、約 200 例の外陰部異常症患者（約 100 例の尿道下裂患者と約 60 例の停留精巣患者）の DNA を集積しており、これらの検体において全コード領域の直接シーケンスを行う。プライマーおよび PCR 条件は既報の通りである。
- ②集積済検体の卵巣機能不全成人女性における変異解析と X 染色体不活化解析：われわれは、早発性卵巣機能不全患者約 100 例を既に集積している。これらの検体において全コード領域の直接シーケンスを行う。また、X 染色体不活性化パターンを既報の方法で行う。

(2) Notch シグナル伝達経路の *in vitro* 機能解析

- ①CXorf6 と高い相同性を有する MAML2 蛋白は、Notch 標的遺伝子である Hes1, 5, 7 のプロモーターに対して、単独では転写活性化能を持たないが、Notch 細胞内ドメインおよび DNA 結合蛋白である RBP-J と 3 量体を形成することで、Notch の転写活性化作用を増強することが確認されている。そして、Notch1-4 のうち、Notch1, Notch2 は、CXorf6 陽性の精巣のセルトリ細胞やライディッヒ細胞で発現している。これに関して、われわれは、Notch1, Notch2, RBP-J, MAML2 発現ベクターを研究協力者から入手し、高頻度に使用される U2OS 細胞や HEK293 細胞のみならず、性分化に必須の男性ホルモン産生細胞であるラ

- イディッヒ腫瘍細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立している。
- ②正常および変異 CXorf6 発現ベクターの作製：われわれは、CXorf6 の細胞内局在を解析するために、full-length cDNA を pEF-BOS に組み込んだ発現ベクターを作製している。さらに、既に同定されたナンセンス変異やミスセンス多型、人工的に mastermind-domain を含む複数のドメインに生じさせたミスセンス変異を有する発現ベクターを mutagenesis の手法で作製する。
- ③正常 CXorf6 蛋白の Notch 標的遺伝子に対する転写活性化能解析：上記のライディッヒ腫瘍細胞系を用いて、CXorf6 蛋白が古典的 Notch 標的遺伝子である Hes1, 5, 3 のプロモーターを活性化するか否かを検討する。これに関して、preliminary なデータであるが、われわれは、既に CXorf6 が単独で古典的 RBP-J 結合配列と無関係に Hes1, 5, 7 のプロモーターを活性化する可能性を見いだしている。これを確定的なものとすると共に、転写活性化能が存在する場合、Hes1, 5, 3 以外の Notch 標的関連遺伝子である Hes3 や Hey 遺伝子などに対する CXorf6 の転写活性化作用も検討し、最も強く転写活性化を受けるプロモーターを同定する。さらに、転写活性化が認められる場合、古典的 RBP-J 結合配列の関与を介するか、あるいは、直接的に Notch 標的遺伝子を活性化させるか否かをルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、および、クロマチン沈降法で検討する。これについて、われわれは、研究協力者から、Hes3, Hey 遺伝子のプロモーターを含む発現解析ベクター、および、RBP-J 結合配列に変異を導入した Hes1, 5 のプロモーターを含む発現解析ベクターを入手済である。
- ④変異 CXorf6 蛋白の細胞内局在解析：われわれは、正常 CXorf6 蛋白が核小体で MAML2 と共存することを見いだしている。変異蛋白の細胞内局在を解析することで、変異体の機能ドメインを検討する。
- (3) SF1/Ad4BP による発現調節解析
- ①われわれは、ヒト CXorf6 およびマウス相同遺伝子 G630014P10Rik の上流に、性分化遺伝子群の発現を調節するマスター遺伝子として作用する SF1/Ad4BP 結合領域が存在することを見いだしている。したがって、SF1/Ad4BP は、CXorf6 の発現を調節している可能性がある。
- ②DNA 結合能および転写活性可能解析：SF1/Ad4BP 結合領域を含む塩基配列に SF1/Ad4BP 蛋白が結合するか否かをゲルシフトアッセイで解析する。また、ルシフ

エラーゼ法を用いた転写活性可能解析を行う。これについて、われわれは、SF1/Ad4BP 発現ベクターを研究協力者から入手済であり、既に同様の実験を報告していることを付記する。

(4) ノックアウトマウスの作製と解析

- ①ノックアウトマウスの作製：われわれは、マウス相同遺伝子 G630014P10Rik において、ヒト CXorf6 の重要な機能を担う領域と相同な配列が第3エクソンに存在することを見だし(図3)、既に第3エクソンを欠失した DNA コンストラクトの構築に着手している。このコンストラクト作製を終了させ、本年度中にノックアウトマウスの作製を完了させる。

4. 研究成果

(1) CXorf6 の患者における変異解析

われわれは、尿道下裂患者約 100 例を新たに解析し、1 例において IVS4-2A>G という splice acceptor site の AG が GG の変換される変異を同定した(図1, 2)。そして、mRNA の配列解析から、この変異の結果、正常のスプライスが傷害され、第5エクソンの10塩基はなれた部位の AG が alternative splice acceptor site として利用されていることが判明した。この変異は、明確な病的変異と考えられる。

スプライシング

・スプライス部位におけるスプライス ドナーサイト(初めのGT)とスプライス アクセプターサイト(AG)は必須のコンセンサス配列である。

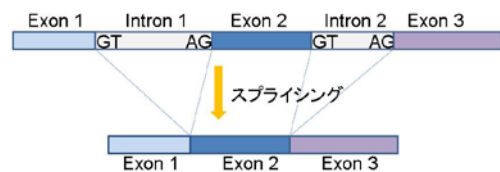


図1.正常の MAML1 遺伝子スプライシング。

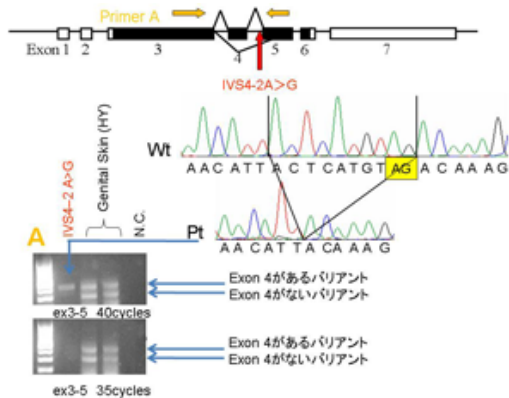


図2. IVS4-2A>G の MAML1 遺伝子スプライシング。

(2) CXorf6 の in vitro 機能解析
 われわれは、CXorf6 が、MAL2 と相同性を有し (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)。さらに、CXorf6 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)、CXorf6 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。この成果は、CXorf6 の機能を解明する上で重要なものであり、精巣において SF1-CXorf6-Hes3 という転写調節経路が作用していることを推測させるものである。

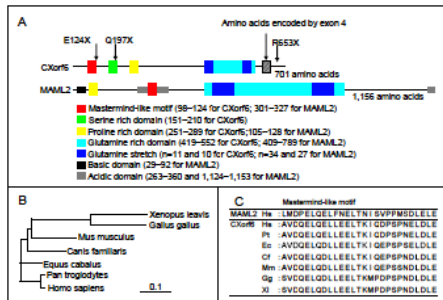


図 3. MAML2 と CXorf6 の相同性。

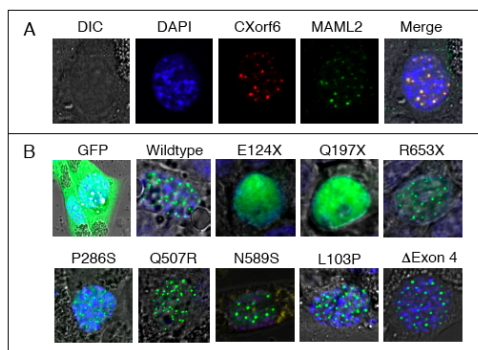


図 4. 正常および変異 CXorf6 の細胞内局在

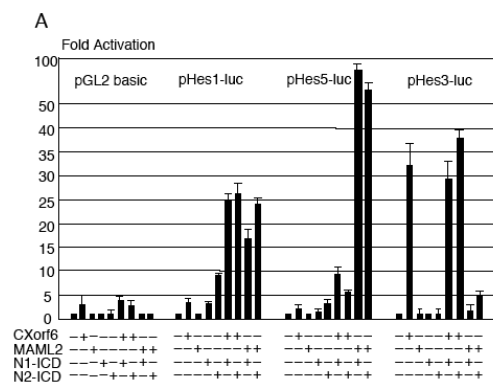


図 5. CXorf6 の Hes3 に対する転写活性化作用

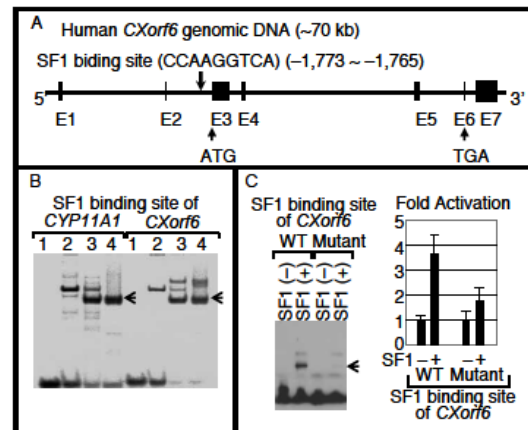


図 6. SF1 の CXorf6 に対する転写活性化作用。

(3) CXorf6 にたいするノックダウン実験
 われわれは、マウスライディッヒ細胞腫瘍細胞を用いて、siRNA を使ったノックダウン実験を行った。その結果、CXorf6 ノックダウンによりテストステロン産生量が有意に低下すること (図 7)、および、この低下がテストステロン産生に必要な CYP17A1 酵素活性の低下によることを見いだした (図 8、9)。これは、CXorf6 が、まさにテストステロン産生の関与することを示すデータである。

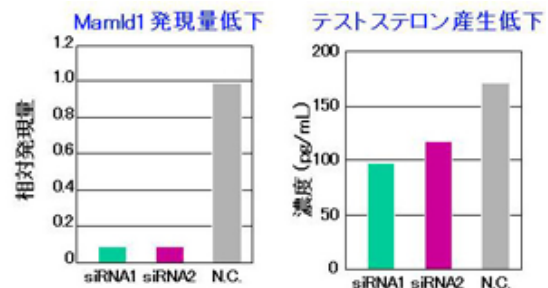
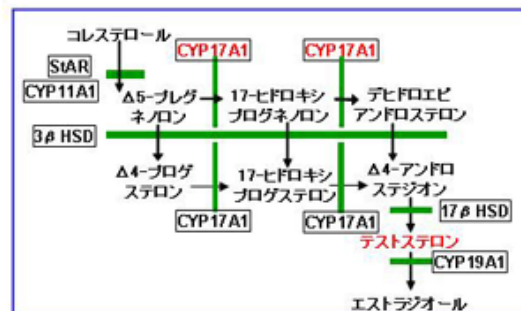


図 7. ノックダウンによるテストステロン産生低下。

図 8. テストステロン産生経路。



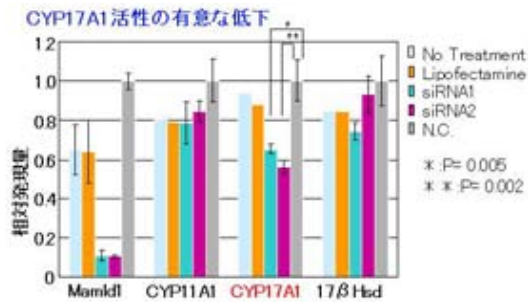


図9. CYP17A1 酵素活性の低下

(4) ノックアウトマウスの作出と機能解析
われわれは、ノックアウトマウスの作出に成功し、その解析を進めている。興味深いことに、ノックアウトマウスは、性的機能に異常はないが、高度の肥満を呈している(図10)。そして、現在、食欲亢進が判明し、種々の代謝マーカーの解析を行っている。

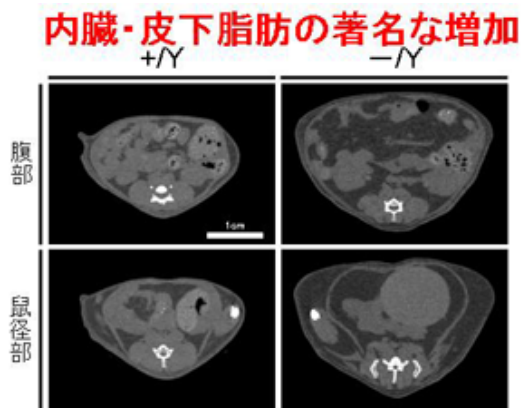


図10. ノックアウトマウスにおける高度の肥満。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Fukami M, Wada Y, Okada M, Kato F, Katsumata N, Baba T, Morohashi K, Laporte J, Kitagawa M, Ogata T. Mastermind-like domain-containing 1 (*MAMLD1* or *CXorf6*) transactivates the *Hes3* promoter, augments testosterone production, and contains the *SF1* target sequence. *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5525–5532, 2008.
2. Ogata T, Wada Y, Fukami M. *MAMLD1* (*CXorf6*): a new gene for hypospadias.

Sexual Development 2 (4-5): 244–250, 2008

3. Ogata T, Fukami M, Wada Y. *MAMLD1* (*CXorf6*) is a new gene for hypospadias. *Clinical Pediatric Endocrinology* 17 (4): 87–93, 2008.
4. Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T, Hanaki K, Uematsu A, Ishii T, Numakura C, Sawada H, Nakacho M, Kowase T, Motomura K, Haruna H, Nakamura M, Ohishi A, Adachi M, Tajima T, Hasegawa Y, Hasegawa T, Horikawa R, Fujieda K, Ogata T. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 94 (5): 1723–1731, 2009.
5. Wada Y, Nishimura G, Nagai T, Sawai H, Yoshikata M, Miyagawa S, Hanita T, Sato S, Hasegawa T, Ishikawa S, Ogata T. Mutation analysis of *SOX9* and single copy number variant analysis of the upstream region in eight patients with campomelic dysplasia or acampomelic campomelic dysplasia. *American Journal of Medical Genetics A* 149A (12): 2882–2885, 2009.
6. Fukami M, Maruyama T, Yoshimura Y, Ogata T. Isolated hypogonadotropic hypogonadism in a female with tachykinin receptor 3 gene mutations. *Hormone Research* (in press).
7. Fukami M, Nagai T, Mochizuki H, Muroya K, Yamada G, Taketani K, Ogata T. Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* (in press).
8. Ogata T, Laporte J, Fukami M. *MAMLD1* (*CXorf6*): a new gene involved in hypospadias. *Hormone Research* 71 (5): 245–252, 2009.

[学会発表] (計26件)

1. Fukami M, Morohashi K, Wada Y, Okada M, Laporte J, Kitagawa M, Ogata T. The novel hypospadias gene *CXorf6* transactivates the promoter of a non-canonical Notch target gene *Hes3* and contains the target sequence for SF-1. The Endocrine Society's 89th Annual Meeting. 2007.

2. Fukami M, Homma K, Ogata T. Urine steroid hormone profile analysis in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: implication for the backdoor pathway to dihydrotestosterone. International Symposium for Gonad and Brain Sex Differentiation. 2008.
3. Brandão MP, Fukami M, Mendonca BB, Gerdulo M, Domenice S, Arnhold IJP, Ogata T, Costa EMF. A Novel Gain of function Mutation in the MAMLD1 gene in patients with Undetermined 46,XY Disorders of Sex Development. The Endocrine Society's 91st Annual Meeting. 2009.
4. Brandão MP, Costa EMF, Fukami M, Santos MG, Pereira NP, Domenice S, Ogata T, Mendonca BB. MAMLD1 Homozygous gain-of-function missense mutation causing 46,XX disorder of sex development in a virilized female. The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE. New York, 2009.
5. Brandão MP, Fukami M, Mendonca BB, Santos MG, Domenice S, Arnhold IJP, Ogata T, Costa EMF. A gain of function mutation in the MAMLD1 discloses a new pathway in the etiology of 46,XY disorders of sex development. The 8th Joint meeting, ESPE-LWPES in association with APEG, APPEP, SLEP, JSPE. New York, 2009.
6. Fukami M, Maruyama T, Dateki S, Sato N, Yoshimura Y, Ogata T. Hypothalamic Dysfunction in a Female with Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism and Compound Heterozygous *TACR3* Mutations and Clinical Manifestation in Her Heterozygous Mother. The 14th International Congress of Endocrinology. March 25-28, Kyoto, 2010.
7. Miyado M, Nakamura M, Fukami M, Miyado K, Ogata T. Impaired expression of *Mamld1* disturbs the gene expression of steroidogenic enzyme and feeding regulation. The 14th International Congress of Endocrinology. March 25-28, Kyoto, 2010.
8. Nakamura M, Miyado M, Sugawa F, Kato F, Fukami M, Ogata T. Association between MAMLD1 and Steroid Hormone Production. The 14th International Congress of Endocrinology. March 25-28, Kyoto, 2010.
9. 緒方勤. POR: まとめと今後の展望. 第17回臨床内分泌代謝 update シンポジウム: POR 異常症をめぐって. 2007.
10. 緒方勤. 性分化異常症の遺伝的機序: 新しい展開. 第16回日本小児泌尿器科学会総会特別講演. 2007年(平成19年)7月13-15日, 神戸.
11. 緒方勤. 性分化異常症の遺伝的機序. 第111回日本小児泌尿科学会学術集会イブニングシンポジウム: 性分化異常症診療への新展開. 2008年(平成20年)4月25-27日, 東京.
12. 緒方勤. ゴナドトロピン分泌不全症における分子遺伝学および臨床的解析. 第81回内分泌学会学術総会シンポジウム. ゴナドトロピン分泌制御の新知見. 2008年(平成20年)5月16-8日, 青森.
13. 緒方勤. 中枢性性腺機能異常症の鑑別診断. 第82回日本内分泌学会教育講演. 2009年(平成21年)4月23-25日, 前橋.
14. 深見真紀, 緒方勤. 新規性分化異常症責任遺伝子の同定. 第17回臨床内分泌代謝 update. 2007.
15. 深見真紀, 和田友香, 長谷川奉延, 山田源, 諸橋憲一郎, 緒方勤. 新規性分化異常症責任遺伝子の同定と機能解析. 第80回内分泌学会学術総会: 高得点演題. 2007.
16. 深見真紀, 和田友香, 岡田美智代, 加藤芙美子, 勝又則行, 馬場崇, 諸橋憲一郎, Jocelyn Laporte, 北川元生, 緒方勤. *CXorf6 (MAMLD1: mastermind-like domain containing 1)* transactivates the promoter of *Hes3* and contains the target sequence for SF-1. 第11回小児分子内分泌研究会. 2007.
17. 深見真紀, 和田友香, 岡田美智代, 宮林香奈子, 長谷川奉延, 山田源, 諸橋憲一郎, Jocelyn Laporte, 北川元生, 緒方勤. 新規性分化異常症責任遺伝子の同定と機能解析. 第52回日本人類遺伝学会, 2007.
18. 深見真紀, 和田友香, 岡田美智代, 長谷川奉延, 山田源, 諸橋憲一郎, 北川元生, 緒方勤. 新規性分化異常症責任遺伝子による Notch 標的遺伝子の活性化. 第30回日本分子生物学会年会, 2007.
19. 深見真紀, 和田友香, 須川史啓, 宮戸真美, 上松あゆ美, 長谷川奉延, 緒方勤. 性分化異常症責任遺伝子 MAMLD1 の臨

- 床のおよび分子遺伝学的解析. 第 53 回日本人類遺伝学会, 2008.
20. 深見真紀, 和田友香, 須川史啓, 宮戸真美, 上松あゆ美, 長谷川奉延, 緒方勤. 性分化異常症責任遺伝子 MAMLD1 の臨床的および分子遺伝学的解析. 第 42 回日本小児内分泌学会学術集会, 2008.
21. 深見真紀. 日本人類遺伝学会奨励賞受賞講演: 新規尿道下裂発症責任遺伝子 MAMLD1 (CXorf6) の同定と機能解析. 第 53 回日本人類遺伝学会, 2008.
22. 深見真紀, 和田友香, 須川史啓, 宮戸真美, 上松あゆ美, 長谷川奉延, 諸橋憲一郎, 緒方勤. 性分化異常症責任遺伝子 MAMLD1 の臨床的および分子遺伝学的解析. 第 31 回日分子生物学会総会, 2008
23. 和田友香, 深見真紀, 須川史啓, 宮戸真美, 緒方勤. MAMLD1 遺伝子におけるスプライス部位変異 (IVS4-2A>G) の検討. 第 112 回日本小児科学会学術集会, 2009.
24. 和田友香, 深見真紀, 緒方勤. MAMLD1 遺伝子におけるスプライス部位変異 (IVS4-2A>G) の検討. 第 54 回日本人類遺伝学会, 2009.
25. 深見真紀, 丸山哲夫, 伊達木澄人, 佐藤直子, 堀川玲子, 緒方勤. 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症女性における Tachykinin 受容体 3 変異の同定と臨床像の解析. 第 43 回日本小児内分泌学会, 2009.
26. 深見真紀, 丸山哲夫, 伊達木澄人, 堀川玲子, 吉村泰典, 緒方勤. 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症女性における Tachykinin 受容体 3 変異の同定と臨床像の解析. 第 43 回日本生殖内分泌学会, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: Estrogen receptor alpha gene, genomic DNA, and diagnosis marker

発明者: 緒方勤、長谷川奉延、鎌谷直之

権利者:

種類:

番号: Patent No: US 7,601,828 B2

出願年月日: 2009 年 10 月 13 日

国内外の別: 米国

[その他]

ホームページ等

<http://www.nch.go.jp/endocrinology/index.htm>

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

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

和田 友香 (WADA YUKA)

国立成育医療センター(研究所)・小児思春期発育研究部・共同研究員
研究者番号: 80399485