

機関番号：82612  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008 ～ 2010  
 課題番号：20390265  
 研究課題名（和文）新規性分化・生殖機能異常責任遺伝子 MAMLD1 変異による疾患成立機序の解明  
 研究課題名（英文）Molecular mechanism leading to impaired sexual differentiation and reproductive failure in patients with MAMLD mutations  
 研究代表者  
 深見真紀（FUKAMI MAKI）  
 独立行政法人 国立成育医療研究センター・臨床内分泌研究室・室長  
 研究者番号：40265872

研究成果の概要（和文）：変異陽性患者の臨床解析を行い、MAMLD1 が胎児期の外性器形成のみならず、思春期の男性ホルモン産生と精子形成に関与する可能性を見出した。また、ホルモン産生細胞を用いた *in vitro* 実験から、Mamld1 が *Cyp17a1* の転写制御を介してテストステロン産生を修飾することを明らかとした。SF1-MAMLD1-CYP17A1 系は、精巣でのテストステロン産生調節に重要な機能を果たしていると推測される。

研究成果の概要（英文）：Clinical analysis of mutation-positive patients indicated that loss of function of MAMLD1 leads to various clinical features including abnormal genitalia, testosterone deficiency, impaired spermatogenesis and infertility. *In vitro* assays suggested that Mamld1 enhances *Cyp17a1* expression primarily in Leydig cells and permit to produce a sufficient amount of testosterone for male sex development. Collectively, it is likely that SF1-MAMLD1-CYP17A1 axis plays a critical role in regulation of testosterone production in the testis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学・生殖内分泌学

キーワード：生殖内分泌学、性分化、性ホルモン、ステロイド、MAMLD1

## 1. 研究開始当初の背景

*Mastermind like domain containing 1* (*MAMLD1*)は、Xq28 の微小欠失を有する外性器異常症男性患者の共通欠失領域から単離された遺伝子である。われわれは、166 例の外性器異常症患者における *MAMLD1* 変異解析を行い、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。さらに、変異陽性男性の出生後の内分泌学的検査所見が正

常であることを明らかとした。また、われわれは、*MAMLD1* マウス相同遺伝子 (*Mamld1*) が、胎児性決定臨界期の精巣ライディッヒ細胞とセルトリ細胞、および、成獣期卵巣顆粒膜細胞で強く発現していることを見出した。以上の成績は、胎児期特異的男性ホルモン分泌不全が *MAMLD1* 変異陽性患者における尿道下裂の原因であることを示すと共に、変異陽性女性で卵巣機能が障害される可能性を示唆

する。しかし、本研究前に同定された患者は少数であり、*MAMLD1* 異常症の臨床スペクトラムは不明であった。

また、われわれは、*MAMLD1* 蛋白が Notch シグナル経路共役因子、Mastermind like 2 (*MAML2*) と相同性を有し、核内 PML 小体において共存することを見出した。また、*in vitro* では、*MAMLD1* が非古典的 Notch 標的遺伝子 *Hes3* プロモーターを転写活性化することを明らかとした。以上の成績は、*MAMLD1* が、最近ヒトとマウスにおいて同定された非古典的 Notch シグナル経路の構成因子である可能性を示唆する。しかし、本研究開始前には、*MAMLD1* の生体内機能および標的遺伝子は不明であり、*MAMLD1* 変異が性腺機能障害を招く機序は解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*MAMLD1* 変異陽性患者の臨床像の解析と *MAMLD1* の細胞内機能の解明により、本遺伝子変異による性分化異常・生殖機能障害の疾患成立機序を明らかとすることである。

## 3. 研究の方法

(1) *MAMLD1* 変異陽性患者の臨床スペクトラムの決定：外性器異常、精子形成不全、卵巣機能不全、不妊症などの性腺機能障害を有する患者における *MAMLD1* 変異解析を行い、新規患者を同定した。本研究では、*MAMLD1* 全翻訳領域の直接塩基配列決定を行った。変異が同定された場合は、患者のリンパ芽球様細胞株から mRNA を抽出し、mRNA 量の測定および nonsense mediated mRNA decay とスプライスパターンの検討を行った。さらに、変異陽性患者の経時的臨床解析により、*MAMLD1* 変異の臨床像と予後を明らかとした。

(2) *MAMLD1* 細胞内機能の解明：RNA 干渉による一過性遺伝子発現抑制（ノックダウン）によって、内在性 *MAMLD1* の発現量を変化させた性ホルモン産生細胞株を作成した。本研究では、恒常的に *MAMLD1* を発現しているマウスライディッシュ腫瘍細胞（MLTC-1）（ATCC, CRL-2065™）に、リポフェクトアミン法で 2 種類の siRNA を導入した。導入 48 時間後の *MAMLD1* mRNA が 30% 以下に抑制されていることを確認した。これらのノックダウン細胞から抽出した mRNA を cDNA マイクロアレイ、リアルタイム PCR、ウェスタンブロット法などの方法で解析し、*MAMLD1* 標的遺伝子を同定した。また、これらの細胞における培養液中のステロイド濃度を解析した。ステロイド測定においては、siRNA 導入 48 時間後に 1 時間 hCG 刺激（最終濃度 50 IU/L）を行

い、培養液を採取した。

## 4. 研究成果

(1) *MAMLD1* 変異陽性患者の臨床像の解析：200 例以上の男児外性器異常症患者、性腺機能異常症患者を対象として、*MAMLD1* 変異スクリーニングを行なった。その結果、尿道下裂患者において、3 つのナンセンス変異 (E124X, Q197X, R653X)、1 つのスプライスアクセプター変異 (IVS4-2A>G)、1 つのミスセンス変異 (H279Q) が同定された。さらにこれらのナンセンス変異が nonsense mediated mRNA decay の機序により生体内において早期に分解される一方、スプライスアクセプター変異とミスセンス変異が安定型 mRNA を形成することが見出された。この知見に基づき、スプライスアクセプター変異とミスセンス変異の機能解析を開始した。さらに、患者の臨床像の解析から、*MAMLD1* 変異が、出生時の外性器異常のみならず、経時的精巣機能低下を招く可能性が見出された（図 1）。

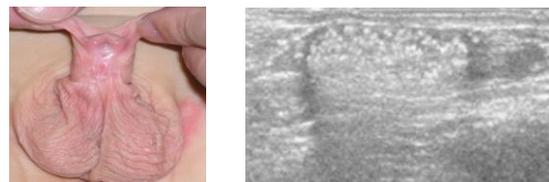


図 1. *MAMLD1* 変異陽性患者の臨床像 (左) 尿道下裂、(右) 精巣内微細石灰化

### Clinical findings

Age at exam. (yr)	0.01	2.0	7.0
Testicular volume (ml)	1-2		2
Penile length (cm)	2.5		3.5
LH (IU/L)	3.1	0.2	0.2 → 5.5
FSH (IU/L)	2.2	0.8	1.3 → 10.3
Testosterone (ng/mL)	2.6	0.2	0.1 → 0.7

表 1. ナンセンス変異陽性患者の経時的内分泌検査所見

2 歳時には明らかな異常を認めなかったが、7 歳時には、精巣機能不全を示唆するゴナドトロピン上昇と hCG に対するテストステロン低反応が確認された。

(2) *MAMLD1* 細胞内機能の解明：MLTC-1 を用いて、siRNA による *Maml1d1* 一過性発現抑制を行ない、*MAMLD1* の細胞内機能を検討した。ステロイド測定では、*Maml1d1* のノックダウンがアンドロステンジオンとテストステロンを含む複数のステロイド代謝産物の産生低下を招くことが見出された（図 2）。一方、プレグネノロン、プロゲステロンには差がな

く、 $17\alpha$ 水酸化酵素活性低下が示唆された。

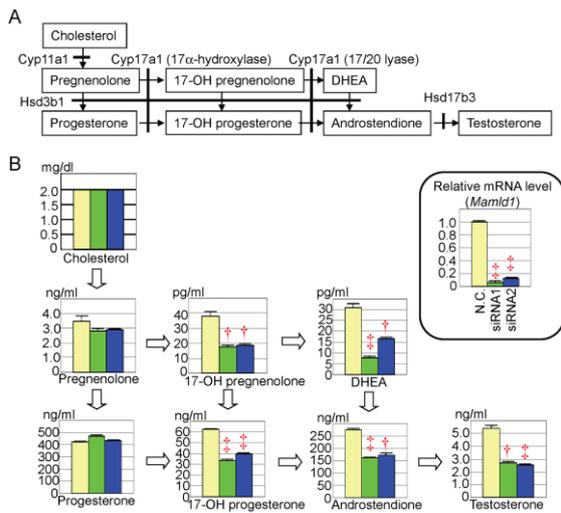


図 2. (A) テストステロン合成経路とそれに関与する酵素

(B) ノックダウン細胞培養液中ステロイド濃度。N.C.:ネガティブコントロール

さらに、ノックダウン細胞の mRNA 解析では、siRNA 導入 48 時間後の *CYP17A1* の発現量が、コントロールの約 60%程度に減少していることが確認された (図 3)。

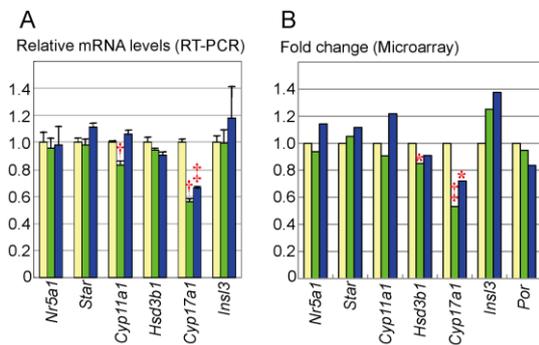


図 3. mRNA 相対定量

(A) Taqman 法によるリアルタイム PCR を用いた定量

(B) オリゴアレイによる定量

以上の成績は、*Mamld1*/*MAMLD1* が精巣におけるステロイド合成酵素 *CYP17A1* の転写活性化を介して、男性ホルモン産生に関与する可能性を示唆する。

## 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 12 件)

1. Nakamura M, Fukami M, Sugawa F, Miyado

M, Nonomura K, Ogata T: *Mamld1* knockdown reduces testosterone production and *Cyp17a1* expression in mouse Leydig tumor cells. PLoS ONE (in press)

2. Fukami M, Shozu M, Soneda S, Kato F, Inagaki A, Takagi H, Hanaki K, Kanzaki S, Ohyama K, Sano T, Nishigaki T, Yokoya S, Binder G, Horikawa R, Ogata T. Aromatase Excess Syndrome: Identification of Cryptic Duplications and Deletions Leading to Gain-of-Function of CYP19A1 and Assessment of Phenotypic Determinants. J Clin Endocrinol Metab. (in press)
3. Fukami M, Maruyama T, Yoshimura Y, Ogata T. Hypothalamic dysfunction in a female with isolated hypogonadotropic hypogonadism and compound heterozygous TACR3 mutations and clinical manifestation in her heterozygous mother. Horm Res Paediatr. 73(6): 477-481, 2010.
4. Fukami M, Nagai T, Mochizuki H, Muroya K, Yamada G, Takitani K, Ogata T. Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. Mol Genet Metab. 100(3): 269-273, 2010.
5. 深見真紀、和田友香、上松あゆ美、長谷川奉延、緒方勤. 小児内分泌学の進歩 2009. 性分化異常症発症責任遺伝子 *MAMLD1* の臨床的および分子遺伝学的解析. ホルモンと臨床. 57(12): 1025-1029, 2010.
6. 深見真紀. 最近話題の遺伝子異常による内分泌および類縁疾患. 性分化疾患. ホルモンと臨床. 58: 7 (印刷中) 2011.
7. 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. J Clin Endocrinol Metab. 94(5): 1723-1731, 2009.
8. Ogata T, Laporte J, Fukami M. *MAMLD1* (*CXorf6*): a new gene involved in hypospadias. Horm Res. (current name: Horm Res Paediatr) 71(5):245-252, 2009.

9. 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. *J Biol Chem*. 283(9): 5525-5532, 2008.
10. Ogata T, Fukami M, Wada Y. MAMLD1 (CXorf6) is a new gene for hypospadias. *Clin Pediatr Endocrinol*. 17 (4): 87-93, 2008.
11. Ogata T, Wada Y, Fukami M. MAMLD1 (CXorf6): a new gene for hypospadias. *Sex Dev*. 2(4-5):244-250, 2008.
12. Wada Y, Fukami M, Ogata T. MAMLD1: a new gene for hypospadias. *J Japan Soc Reproduct Endocrinol* 13: 37-42, 2008.

[学会発表] (計 8 件)

1. Fukami M, Nishimura G, Homma K, Hasegawa T, Fujieda K, Ogata T: Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients. The 2nd World Conference: Hormonal and Genetic Basis for DSD and Hot Topics in Endocrinology. Jan. 15-17, 2010, Miami, USA
2. Fukami M: MAMLD1 mutations: how do they lead to hypospadias? International Symposium on Pediatric Endocrinology. March 30-April 1, 2010, Tokyo, Japan
3. 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. Maml1 は, マウスライディッシュ腫瘍細胞において, 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. 第 19 回日本小児泌尿器科学会. 2010 年 6 月 30-7 月 2 日, 札幌.
4. Brandão MP, Fukami M, Mendonca BB, Santos MG, Domenice S, Arnold 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. Sep. 9-12 2009. New York,
5. 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 年 4 月 17 日-19 日. 奈良
6. 加藤英弥子, 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. 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. 第 43 回日本小児内分泌学会, 2009 年 10 月 1 日-3 日. 宇都宮
7. 宮戸真美, 中村美智子, 深見真紀, 宮戸健二, 菊水健史, 小川佳宏, 緒方勤. Maml1 発現異常が引き起こすホルモン産生と摂食調節の解析. 第 32 回日本分子生物学会, 2009 年 12 月 9 日-12 日, 横浜
8. 深見真紀, 和田友香, 須川史啓, 宮戸真美, 上松あゆみ, 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 53 回日本人類遺伝学会, 2008 年 9 月 27 日-30 日, 横浜

[その他]

ホームページ等

<http://111.89.135.117/endocrinology/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

深見 真紀 (FUKAMI MAKI)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・室長  
研究者番号: 40265872

### (2) 研究分担者

和田 友香 (WADA YUKA)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・研究員  
研究者番号: 80399485

### (3) 研究分担者 (2008 年度)

緒方 勤 (OGATA TSUTOMU)

独立行政法人 国立成育医療研究センター・分子内分泌研究部・部長  
研究者番号: 40169173  
(2009 年から連携研究者)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: