

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860905

研究課題名(和文) 男児外生殖器異常発症に關与する環境因子と遺伝因子の複合的作用についての研究

研究課題名(英文) Combined action of environmental and genetical factors on male genital abnormalities

研究代表者

大石 彰 (Ohishi, Akira)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：80402337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれが得た成果は以下の項目である。

今回はLC/MSMS法を用いて、正常新生児の臍帯血におけるfrontdoor pathway・backdoor pathway両方の一斉分析を行った。胎児期から新生児期にかけての男性ホルモン産生経路を中心としたステロイドプロファイルを明らかにした。胎児期から新生児期における男性ホルモン産生機序はまだまだ不明な点が多く、性分化研究における重要な結果である。これまでに集積した日本人男児・成人男性、性分化異常症症例の末梢血DNAを使用し、ESR1遺伝子のイントロン内微小欠失頻度を解析し、この欠失がエストロゲン効果の感受性亢進を招くことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We gained the two new insights by this grant. First, we performed steroid profiling of umbilical cord blood from normal newborns by LC-MS/MS-based method. Given that there are still some unclear points of androgen generation during fetal period, those results are quite important for research on gonadal sex differentiation. Second, we analyzed the frequency of a 2244 base pair deletion within intron 6 of the ESR1 gene that is the significant gene modification involving increased sensitivity to estrogenic endocrine disruptors. We identified that this deletion has recessive effect on male genital abnormalities. Furthermore, the number of subjects involving with this deletion was higher in normal adult male group than in normal boy group, indicating that the sensitive subjects to estrogenic endocrine disruptors tended to be born with normal genitals during past decades when the level of endocrine disruptors was low.

研究分野：新生児学 先天奇形症候群

キーワード：性分化 環境ホルモン ステロイド エストロゲン 感受性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

近年、種々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。特に、男児尿道下裂の増加に関しては、本邦および欧米において明瞭なデータが報告されている。

これらの現象に共通する原因として、環境化学物質なかでも内分泌攪乱物質の影響が強く推測されている。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、抗男性ホルモンとして働き、男性化を障害する重要な原因の1つであると推測されている。このことは、内分泌攪乱物質として作用しうる環境化学物質の、国内および欧米諸国での生産量・排出量が近年急激に増加している事実とも整合する。

胎児の環境化学物質曝露において、懸念すべき事は、曝露量の増加に伴い遺伝的に脆弱な個体において様々な先天奇形の発症頻度が増加することである。これに関して、エストロゲン受容体遺伝子における特定のハプロタイプ(遺伝的に連鎖している多型の組み合わせ)のホモ接合体を有する個体が、停留精巣及び尿道下裂の発症の危険群であるという結果が報告されている(Yoshida, Ogata, (連携研究者) *et.al.* J Clin Endocrinol Metab 2005)。これは、内分泌攪乱物質に対する感受性が高い個体、言い換えれば遺伝的に脆弱な個体群が存在する事をしめす重要な結果である。

以上より、性分化異常症とくに外性器の男性化障害との関連を、個々の遺伝的な背景と化学物質曝露量の両方から複合的に検証することが重要となってくる。

2. 研究の目的

本研究の具体的な目的は以下の4点である。研究の進行にともない、研究当初の目的に追加項目が加わった。

- 正常新生児における肛門性器間距離(anogenital distance)の測定を行う。諸外国からのデータの報告はあるが、日本における報告は極めて少ない。
- 母体尿、臍帯血の環境化学物質の一

斉分析を行い、曝露量を決定する。

- 環境化学物質に対する感受性に関与する遺伝子多型を調べる。
- 性分化において、胎児期のステロイド代謝は重要である。胎児期を反映する、臍帯血における性ステロイドプロファイリングを行う。
- 環境ホルモンの感受性に強く関与するエストロゲン受容体遺伝子 *ESR1* の第7イントロンから同定された微小欠失について、尿道下裂の発症に関与することを明らかとする。

3. 研究の方法

浜松医科大学医学部附属病院において、妊娠が判明した妊婦ならびに出生した児を対象とする。サンプル収集を計画立てて実施できる予定帝王切開となるケースを主たる対象とする。研究開始当初は、妊娠判明時にリクルートすることを計画していたが、診療のながれなどから困難であり、途中で、リクルートのタイミングを、予定帝王切開のために入院した時に変更した。母体の尿、臍帯血、胎盤を対象のサンプルとした。

解析表現系としては、外性器の状態、男女の肛門性器間距離の計測を評価する。臍帯血における、性分化関連ホルモン(IGF1、IGF2、LH、FSH)の測定および、ステロイドプロファイリングを行う。ステロイドプロファイリングはLC/MSMSにて行う。

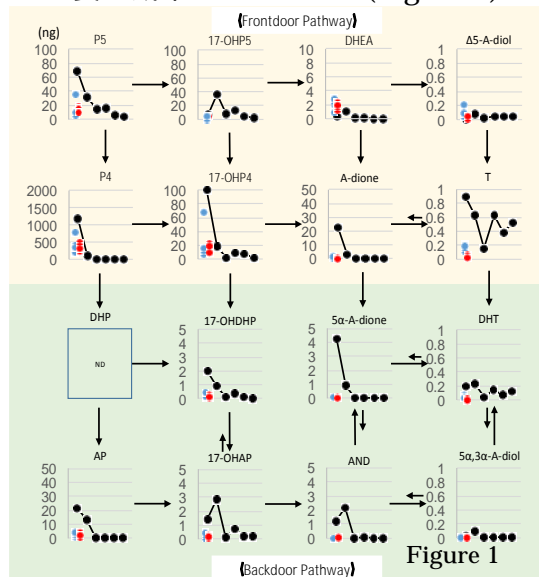
これまでに集積した日本人男児・成人男性、性分化異常症症例の末梢血DNAを使用し、エストロゲン効果の感受性亢進を招く *ESR1* 遺伝子の構造的変化である。 *ESR1* 遺伝子イントロン内の微小欠失を解析した。この微小欠失を特異的に同定するプライマーを設計し、PCR産物のサイズをキャピラリーシーケンサーにて解析した。

4. 研究成果

現在もリクルートを継続しており、肛門性器間距離、環境化学物質解析、臍帯血中の性ホルモン解析は、データ集積および解析中である。外陰部の測定データは約250人分、母体尿・血液、臍帯血、臍帯、児の尿のサンプルは、約50人分である。

本研究における研究終了時の成果は以下の2点である。

1. 臍帯血におけるステロイドの一斉分析を行った。通常のアンドロゲン産生経路を frontdoor pathway(テストステロンから強力な男性ホルモンであるジヒドロテストステロンを産生する)と呼ぶが、胎児期やある一定の病的な状態ではテストステロン産生を介さず、ジヒドロテストステロンを産生する経路である backdoor pathway が作動することが知られている。今回は、もっとも精度のよい LC/MSMS 法を測定法として採用した。これまでヒトにおける臍帯血のステロイドプロファイリングは行われておらず、性分化研究において極めて重要な成果である (Figure 1)



2. 日本人正常対照を用いた世代間の頻度解析において、微小欠失を有するも、正常にとどまる個体数は、正常男児群において、正常成人男性と比べて有意に少なかった。このことは環境化学物質に感受性を有する個体において、そ

Table 1 Genotype frequency of ESR1 microdeletion in Japanese boys and adult men

Genotyping [n,(homo	hetero	wild
Boys (n=98)	3 (0)	36 (53.84)	59 (46.15)
Adult men (n=	26 (3.75)	141 (27.50)	144 (68.75)

<Asspocation of ESR1 microdeletion genotype with phenotype>

	Dominant mode	
	P-value	P-value
Boys vs. Adult	0.016	0.074

Table 2 ESR1 microdeletion analyses in boys with hypospadias in a Japanese population

Genotyping [n,(homo	hetero	wild
HS (n=78)	14 (17.94)	32 (41.03)	32 (41.03)
NC (n=92)	3 (3.26)	36 (39.14)	53 (57.60)

<Asspocation of ESR1 microdeletion genotype with phenotype>

	Dominant mode		Recessive mode	
	P-value	OR (95% CI)	P-value	OR (95% CI)
HS vs. NC	0.031	1.92 (1.06-3.60)	0.00147	1.49 (1.79-23.52)

HS: hypospadiac boys; NC: normal control boys; OR: odds ratio; CI: confidential interval

の暴露量が増加した現代のほうが、かつての低い暴露量であったときよりも、性分化異常を発症しやすくなっていることを示している (Table1)。

また、ESR1 における微小欠失は、日本人の日本人男児において、劣性の効果 (ホモのときのみ効果を発揮する) を仮定したときに、尿道下裂の発症と有意な相関を示すことを見出した (Table2)。

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 92 件)

1. Fujisawa Y, Sakaguchi K, Ono H, Yamaguchi R, Kato F, Kagami M, Fukami M, Ogata T. Combined steroidogenic characters of fetal adrenal and Leydig cells in childhood adrenocortical carcinoma. J Steroid Biochem Mol Biol. 2016 May;159:86-93.
2. Saito K, Matsuzaki T, Iwasa T, Miyado M, Saito H, Hasegawa T, Homma K, Inoue E, Miyashiro Y, Kubota T, Irahara M, Ogata T, Fukami M. Steroidogenic pathways involved in androgen biosynthesis in eumenorrhagic women and patients with polycystic ovary syndrome. J Steroid Biochem Mol Biol. 2016 Apr;158:31-7.
3. Miyado M, Miyado K, Katsumi M, Saito K, Nakamura A, Shihara D, Ogata T, Fukami M. Parturition failure in mice lacking Mamld1. Sci Rep. 2015 Oct 5;5:14705.
4. Igarashi M, Wada Y, Kojima Y, Miyado M, Nakamura M, Muroya K, Mizuno K, Hayashi Y, Nonomura K, Kohri K, Ogata T, Fukami M. Novel Splice Site Mutation in MAMLD1 in a Patient with Hypospadias. Sex Dev. 2015;9(3):130-5.
5. Fukami M, Ogata T. Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: rare congenital disorder leading to skeletal malformations and steroidogenic defects. Pediatr Int. 2014 Dec;56(6):805-8.
6. Nakashima S, Ohishi A, Takada F, Kawamura H, Igarashi M, Fukami M,

Ogata T. Clinical and molecular studies in four patients with SRY-positive 46,XX testicular disorders of sex development: implications for variable sex development and genomic rearrangements. J Hum Genet. 2014 Oct;59(10):549-53.

7. Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kishi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, Ogata T., Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Satoh H; Working Group of the Epidemiological Research for Children's Environmental Health. Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). BMC Public Health. 2014 Jan 10;14:25.
8. Ohishi A., Ueno D, Ogata T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and adrenal hemorrhage in a filipino neonate with hyperbilirubinemia. AJP Rep. 2013 May;3(1):5-8.

〔学会発表〕(計30件)

発表者:小野 裕之、沼倉 周彦、堤 誠司、本間 桂子、長谷川 奉延、加藤 芙弥子、藤澤 泰子、緒方 勤「出生前診断された POR 異常症男児における Backdoor Pathway の検討」2016.1.15 岡山

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大石 彰(OHISHI Akira)

浜松医科大学 医学部附属病院 特任助教

研究者番号: 80402337

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

藤澤 泰子(FUJISAWA Yasuko)

浜松医科大学 医学部 講師

研究者番号: 40402284

緒方 勤(OGATA Tsutomu)

浜松医科大学 医学部 教授

研究者番号: 40169173

(4)研究協力者

深見真紀(FUKAMI Maki)

国立成育医療研究センター

曾根秀子(SONE Hideko)

独立行政法人国立環境研究所

吉永淳(YOSHINAGA Jun)

東京大学新領域創成科学研究科