

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
和田友香	主査 教授 玉 井 浩 副査 教授 勝 岡 洋 治 副査 教授 大 道 正 英 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 上 田 晃 一
主論文題名 <i>CXorf6</i> is a causative gene for hypospadias (<i>CXorf6</i> は尿道下裂の責任遺伝子である)	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景》</p> <p>尿道下裂は、外尿道口が陰茎の先端ではなく、陰茎の腹側から会陰部に開口する状態と定義される。これは、軽症(亀頭型、陰茎型)と重症型(陰茎基部型、会陰型)に分類され、出生男児の約 0.5% に認められる比較的頻度の高い軽度男児性分化異常症(46,XY DSD: disorders of sex development)である。46,XY DSDは、性腺・性管・外性器が形成されてゆく過程のどこかにおいて、男性ホルモンの効果が不十分であるときに生じる。したがって、尿道下裂においても、男性ホルモン産生経路やその受容体の遺伝子解析がなされているが、遺伝子変異は極めて少数例において同定されているにすぎず、多数の未知遺伝子の関与が推測されている。</p> <p><i>CXorf6</i>は、ミオチューブラーミオパチー責任遺伝子(<i>MTM1</i>)を含む Xq28 の隣接遺伝子症候群の観点から、尿道下裂を含む 46,XY DSD の候補遺伝子とみなされていた open reading frame である。すなわち、<i>MTM1</i> の遺伝子内変異陽性患者が正常男性外性器を有することに対し、<i>MTM1</i> を含む微小欠失を有する 3 家系 6 例の男児は、全例尿道下裂を主とする 46,XY DSD を呈した。Laporteらは、これに基づき 1997 年に 46,XY DSD 患者における共通欠失領域約 208 kb から <i>Cxorf6</i> をクローニングした。<i>Cxorf6</i> は、7つのエクソンからなり、3-6 エクソンが 424 個のアミノ酸をコードしている。しかし、46,XY DSD における <i>Cxorf6</i> 変異は同定されておらず、そのため、<i>Cxorf6</i> が 46,XY DSD の責任遺伝子であるかどうかは不明であった。</p> <p>本研究では、この <i>CXorf6</i> が尿道下裂を含む 46,XY DSD の責任遺伝子であるかどうかを検討した。</p> <p>《方法》</p> <p>46,XY DSD 患者 166 例(尿道下裂患者 56 例、XY 性腺異形成患者 19 例、停留精巣患者 40 例、その他原因不明の 46,XY DSD 51 例)において全翻訳エクソン 3-6 を直接シーケンス法で解析した。各組織での発現を確かめるため、ヒト cDNA ライブラリー(胎児精巣、胎児卵巣、胎児腎臓、外陰部、皮膚、肝臓、子宮、胎児全脳、成人全脳、下垂体、視床、脊髄)にたいして PCR 解析を行った。また尿道下裂の発症機序を検討するために、マウス <i>in situ</i> hybridization を行った。ナンセンス変異については nonsense-mediated mRNA decay (NMD) によって mRNA が分解され <i>CXorf6</i> の機能</p>	

を喪失しているかを RT-PCR により評価した。

《結果》

[*CXorf6* 変異解析]

尿道下裂患者 3 家系 4 症例 (症例 1 と 2 は異父兄弟) において、ナンセンス変異 (症例 1 と 2、370G>T (E124X); 症例 3、589C>T (Q197X); 症例 4、1957C>T (R653X)) が同定された。症例 1、2、4 では母親が保因者であることが確認された。スウェーデン人尿道下裂患者 1 人より P286S が同定されたが、これは尿道下裂陽性の同胞と甥には認められず、また 110 人の正常スウェーデン人のうち 8 人においても認められたため、多型と判定された。同様に、イタリア人尿道下裂兄弟患者より Q507R が同定されたが、これは尿道下裂を有する甥には認められず、多型と判定された。また、既知の多型である N589S が日本人患者 2 人、ヨーロッパ人患者 1 人と正常日本人男性 4 人から同定された。

[変異陽性患者の臨床像]

全例、陰茎基部開口型の尿道下裂を呈していた。内分泌検査に明らかな異常は認められず、血清テストステロン値は、症例 1 では 2 歳 6 か月時に hCG 負荷後 2.9 ng/mL、症例 2 では 1 か月時に基礎値 2.6 ng/mL、症例 4 では 3 か月時に基礎値 2.7 ng/mL であった。

[発現パターン]

ヒト cDNA に対する PCR では、性腺、外陰部を含む全ての臓器で発現が確認され、エクソン 4 を含まないスプライシングバリエーションが示された。胎児マウス組織を用いた *in situ* hybridization では、性分化決定時期である胎児期 12.5 日から 14.5 日において、一過性に精巣において強い発現が観察された。この発現は、Ad4BP 抗体を用いた二重染色により、精巣形成に必須であるセルトリ細胞とテストステロン産生を行うライディッヒ細胞に特異的であることが確認された。また成獣マウス組織においては精巣ではごくわずかな発現を認めるのみであったが、卵巣顆粒膜細胞においては強い発現が観察された。外陰部および副腎では有意な発現は観察されなかった。

[NMD]

CXorf6 は末梢血で発現しているため、ナンセンス変異陽性患者と正常男児の末梢血からゲノム DNA と mRNA を抽出し、NMD の有無を検討した。その結果、今回同定された 3 つのナンセンス変異は全て NMD を受け、ほとんど転写されていないことが確認された。

《考察》

本研究により、X 染色体長腕に存在する *CXorf6* が新規尿道下裂 (46,XYDSD) 責任遺伝子であることを世界で初めて見出した。そして、マウス *CXorf6* が胎児期の性分化臨界期において一過性にセルトリ細胞およびライディッヒ細胞で発現していることから、この時期の男性ホルモン分泌不全が尿道下裂の原因であると推測される。また、この所見は、患者の生後の内分泌データが正常であったことを説明するものである。さらに、NMD を確認しえたことで、これらのナンセンス変異が病因であることが証明された。特に、エクソン 5 に存在する R653X において NMD が示されたことは、*CXorf6* のエクソン 1-4 と *MTMR1* のエクソン 3-16 の融合遺伝子症例 (*CXorf6* のエクソン 5 と *MTMR1* のエクソン 1,2 を欠失している症例) が 46,XY DSD を呈していないことから、エクソン 5 の機能が 46,XY DSD に寄与しないという過去の報告との矛盾を説明するものである。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	和田友香
論文審査担当者		主査 教授 玉 井 浩	
		副査 教授 勝 岡 洋 治	
		副査 教授 大 道 正 英	
		副査 教授 林 秀 行	
		副査 教授 上 田 晃 一	
主論文題名 <i>CXorf6</i> is a causative gene for hypospadias (<i>CXorf6</i> は尿道下裂の責任遺伝子である)			
論文審査結果の要旨			
《審査結果》 申請者は本研究により、X染色体長腕に存在する <i>CXorf6</i> が新規尿道下裂(46,XY DSD)責任遺伝子であることを世界で初めて見出した。 <i>CXorf6</i> は、ミオチューブラーミオパチー責任遺伝子 (<i>MTM1</i>) を含む Xq28 の隣接遺伝子症候群の観点から、尿道下裂を含む 46,XY DSD の候補遺伝子とみなされていた。しかし、過去に変異は同定されておらず、その関与は不明であった。 今回の研究では、種々の性分化異常症患者 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 3 種のナンセンス変異を同定した。これらの尿道下裂患者における内分泌学的データは正常であった。またマウス相同遺伝子が胎児期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ていることを確認している。これは患者の内分泌データが正常であったことを説明できるものである。さらに NMD (nonsense-mediated mRNA decay) を確認しえたことで、これらのナンセンス変異が病因であることも証明している。 以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。 (主論文公表誌) Nature Genetics 38(12): 1369-1371, 2006			