

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 今 雅史

学位論文題名

非症候性尿道下裂の分子基盤の解明に関する研究：
次世代シーケンサーおよび、比較ゲノムハイブリダイゼーションを用いた、全既知遺伝子変異解析および、ゲノムコピー数解析

(Studies on molecular basis of non-syndromic hypospadias:
Systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis using
next-generation sequencing and comparative genomic hybridization)

【背景】尿道下裂は、陰茎腹側の発達に異常があり、外尿道口が陰茎先端まで延長せず、陰茎腹側や陰囊、もしくは会陰部に開口する先天疾患で、46,XY disorder of sex development (DSD)の比較的一般的な表現型として知られている。その罹患率は一般に10000出生に対し約4~40例とされている。また、尿道下裂は単独の奇形（非症候性尿道下裂）としても先天性奇形症候群の一表現型としても認められる疾患である。非症候性尿道下裂は、多因子疾患として知られ、これまでに多くの疾患原因とされる遺伝子変異、環境因子が報告されてきた。

2012年にVan der Zandenらにより15の疾患原因遺伝子と、3の疾患原因候補遺伝子が発表され、さらに、13遺伝子における49の遺伝子多型が本症例の発症に関与している可能性を示された。

これまでの遺伝子解析方法としては、症例群に対し、単一もしくは少数の遺伝子についてその変異を検索する研究が主であった。特に比較的症例数の多い本疾患においては、網羅的な遺伝子変異の検索は施行されてこなかったのが現状であり、さらに複数遺伝子の関与に関しては議論されてこなかった。また、全コピー数解析については、非症候性尿道下裂症例を多症例において解析した報告は無い。よって、非症候性尿道下裂症例における、単一遺伝子の変異や微小コピー数異常が本疾患発症に関わる役割は未だに不明である。

近年の遺伝子解析技術の進歩により、遺伝子変異検索に関しては、次世代シーケンサー一等の技術が発展し、多症例に対し多遺伝子における変異の検索が比較的容易に可能となった。さらにコピー数異常の検索に関してはCGHアレイ法により、全ゲノムを対象にコピー数解析を行う事も可能となった。そこで我々は、次世代シーケンサーや、CGHアレイ法等の解析法を用いて、比較的頻度が多い本疾患において、単一遺伝子変異がその発症に起因する頻度や、複数の疾患責任遺伝子が関与する症例の有無、および遺伝子変異のタイプ、更にコピー数異常の関与を明らかにする為に、本研究を行った。

【対象と方法】非症候性尿道下裂62症例（日本人57症例、ベトナム人5症例）。

尿道下裂の尿道開口部に関する臨床情報を得られた症例は49症例で、11症例は外尿道口が陰茎亀頭部に開口するmild type (anterior)の尿道下裂で、14症例は陰茎中部に開口するmoderate type (middle)、24症例は陰茎基部から陰囊会陰部に開口するsevere type (posterior)の尿道下裂であった。停留精巣と、矮小陰茎の合併はそれぞれ5症例と11症例であった。

既報データに基づき、下記の25遺伝子を解析対象とし次世代シーケンサーによる塩基置換スクリーニングを行った。解析対象遺伝子: *AR, ATF3, BMP4, BMP7, BNC2, CTGF, CYP11A1, CYR61, DGKK, EGF, ESR1, ESR2, FGF8, FGFR2, GSTM1, GSTT1, HOXA4, HOXB6, HSD3B2, HSD17B3,*

MAMLD1, MID1, NR5A1 (SF1), SRD5A2, WT1.

抽出された塩基置換はサンガー法で確認した。変異蛋白の機能を *in silico* 解析で評価した。さらに、アレイ CGH による全ゲノムコピー数解析を行った。コピー数異常を認めた症例については、FISH を用いて染色体構造解析を行った。

【結果】シーケンス解析では、62 例中 7 例に疾患に関連すると推測される既知責任遺伝子病的変異を同定した。この変異にはヘミ接合性 *AR* 変異 (3 例)、ヘテロ接合性 *BNC2* 変異 (1 例)、ホモ接合性 *SRD5A2* 変異 (1 例)、が含まれていた。1 例ではヘミ接合性 *AR* 変異とヘテロ接合性 *HOXB6* 変異、他の 1 例ではホモ接合性 *HSD3B2* 変異とヘテロ接合性 *SRD5A2* 変異の重複が同定された。ヘミ接合性 *AR* 変異を認めた患者の 1 例は、mild type (anterior) の尿道下裂であった。さらに、25 例で病的意義が不明である塩基置換が同定された。コピー数解析では、1 例に Y 染色体の部分欠失および重複を認めた。この染色体構造変化は、FISH 解析で mosaic dicentric Y と判明した。

【考察】網羅的変異スクリーニングにて、非症候性尿道下裂症例の約 11% に病的変異と予測される変異が認められた。この結果は重度尿道下裂症例において約 30% におよぶ例に *AR* や *SRD5A2* のような遺伝子に特異的な変異をもつ事を示した既報に合致する。同時に、非症候性尿道下裂症例において、原因遺伝子の変異が病因に重要な役割を示すことも示している。さらに、本研究の結果は、*AR* 遺伝子の異常が、46, XY DSD における様々な表現形の原因としてある一定の割合に存在する事を示した既報を支持する結果となった。*HSD3B2* の変異においては、これまでは副腎機能に重大な欠陥をおよぼすとされていた変異であるが、非症候性尿道下裂のみが表現形として現れる症例も存在する事を示した。*AR* p. R841S における変異は、これまで ambiguous genitalia の症例で報告されていた変異であり、本研究で尿道下裂症例から同変異が同定された事により、*AR* 遺伝子のミスセンス変異における表現形の多様性が示された。

特筆すべきは、本研究の中で 2 症例において、病因となりうる変異が重複して 2 遺伝子において同定された点である。これらの結果により初めて 2 遺伝子の変異 (biallelic 変異) により非症候性尿道下裂が発症した可能性を示す事が出来た。

一方で、日本人症例においては、既報の疾患感受性があるとされる一塩基多型は、非症候性尿道下裂の発症に関与しないか、わずかな役割しか持っていない可能性が示唆された。しかし本研究では少症例ながらも、これらの一塩基多型を 2 遺伝子で持つ症例が存在することから、これらの一塩基多型が oligogenicity として、疾患罹患リスクの上昇に寄与する可能性は否定できないと考える。

コピー数異常の解析では、1 症例にのみ dicentric Y を認めた。このコピー数異常は尿道下裂の複数の症例において既報のコピー数変化である。コピー数異常による尿道下裂の発症はまれである事を示唆していると考ええる。

病因変異として同定された変異を持つ症例のほとんどは severe type (posterior) の尿道下裂であったが、*AR* 遺伝子の変異が同定された 1 例については mild type (anterior) の尿道下裂症例であった。本研究結果により、単一遺伝子変異は様々なタイプの尿道下裂症例において病因となり得ることが示唆された。

【結論】非症候性尿道下裂の 10% 以上が単一遺伝子変異もしくは染色体微細構造異常に起因することがはじめて明らかとなった。比較的軽度の尿道下裂患者においても単一遺伝子変異が存在することが見出された。重要な点として、本症の発症に monoallelic 変異、biallelic 変異、oligogenic 変異のすべてが関与する可能性が見出された。尿道下裂患者における遺伝子変異や染色体微細構造異常の同定は、当該患者の治療方針決定や遺伝カウンセリングにきわめて有用である。