学位論文題名

Maternal genetic polymorphisms in GYP1A1,
GSTM1 and GSTT1 and the risk of hypospadias.

(尿道下裂児の母における CYP1A1,
GSTM1及び GSTT1遺伝子多型と尿道下裂リスクの関係)

学位論文内容の要旨

背景・目的

尿道下裂は比較的頻度の高い先天異常の一つである。尿道の形成はアンドロゲン依存性であるので、内分泌攪乱物質曝露や喫煙などの環境要因や母親の内因性エストロゲンと尿道下裂との関連が疑われている。一方、尿道下裂は遺伝要因も関与することが示唆され、さらに喫煙や他の化学物質には遺伝要因との交互作用があることが報告されている。特に第1相酵素 Cytochrome P450 の一種の CYP1A1 は環境化学物質のみならず内因性エストロゲンも代謝し、第2相解毒酵素の Glutathione-S-transferases(GSTs)はグルタチオン抱合により活性化された不安定な化合物を親水性の安定な化合物に変え、細胞を保護する働きをする。そこで我々は、CYP1A1 (MspI),GSTM1, GSTT1 遺伝子多型と尿道下裂との関連を調べるために症例対照研究を行った。

方法

2000-2004年に札幌市と名古屋市の泌尿器科2施設(大学病院:1、一般病院:1)で尿道下裂の手術歴がある児の母31名を症例群とした。2001-2004年に札幌市の1大学病院で出産を終えた、停留精巣・尿道下裂を持たない男児の母64名を対照群とした。全ての対象は日本人であった。

自記式質問紙票を用いて、母親の出産時年齢、妊娠中の喫煙、教育歴、児の出生時体重、合併奇形について調べた。また、手術を行った泌尿器科医が、尿道下裂の重症度分類を行った。重症度の診断基準は、亀頭、冠状溝、陰茎部の開口を軽症(遠位)型とし、陰茎陰囊部、陰囊部の開口を重症(近位)型とした。本研究は、全ての対象にインフォームドコンセントを行い、本調査への協力を得た。

血液は、両群の母より末梢血を2ml採取しDNA抽出を行った。GSTM1,GSTT1遺伝子の欠損の有無はPCR法にて行った。プライマーは、GSTM1 forward; 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' reverse; 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG CTG G-3', GSTT1 forward; 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3' reverse; 5'-Gaa GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'で作成した。CYP1A1 MspI 多型はPCR-RLFP法にて解析を行った。プライマーは、CYP1A1 forward; 5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GC-3', reverse;5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CC-3'で作成した。

統計解析は、SPSS ver10.0を用い、ロジスティック回帰分析によりオッズ比(OR)と95%信頼区間(95%CI)を求めた。まず、遺伝子多型と尿道下裂リスクのオッズ

比を求めるために、全ての対象者（症例 31、対照 64）で解析し粗オッズ比を求めた。次に、母親の児出生時年齢、児の出生時体重、母親の妊娠中の喫煙を交絡要因として調整するために、調査票の記載があった症例 24 例と対照 64 例で多変量ロジスティック回帰分析を行い、調整オッズ比を求めた。

結果

対照に比較して尿道下裂児における低出生体重児の割合が高く、有意なオッズ比 (OR) の上昇が見られた (OR=7.22, 95%CI=2.56-20.39)。児出生時の母親の年齢が 35 才以上の割合が症例で多く見られたが、有意な関連ではなかった (OR=3.00, 95%CI=0.97-9.30)。妊娠中の母の喫煙に関しては、有意な関連は見られなかった。

遺伝子多型に関しては、GSTM1, GSTT1 遺伝子欠損型と疾病との間に有意な関連は見られなかったが、CYP1A1 野生型ホモ接合と比較して、ヘテロ接合、ヘテロ+変異型ホモ接合で有意なオッズ比の低下が見られた (各々 OR=0.31, 95%CI=0.1-0.8; OR=0.4 95%CI=0.2-1.0)。

母親の出産時年齢、児の出生時体重、妊娠中の喫煙で調整すると、GSTM1, GSTT1 遺伝子欠損型とは有意な関連は見られなかったが、CYP1A1 野生型ホモ接合と比較して、ヘテロ接合、ヘテロ+変異型ホモ接合で有意なオッズ比の上昇がみられ (各々 OR=0.2, 95%CI=0.04-0.7; OR=0.3 95%CI=0.1-0.97)、CYP1A1 のヘテロ接合、ヘテロ+変異型ホモ接合遺伝子型は、独立した有意の関連要因であった。

また、母親の妊娠中の喫煙と尿道下裂との関連を調べるために、喫煙群と非喫煙群に分けて GSTM1, GSTT1, CYP1A1 の遺伝子多型の頻度を調べたが、有意な関連は見られなかった。

さらに、尿道下裂の重症度別に解析したが、有意な関連は見られなかった。

考察

本研究では、低出生体重児で尿道下裂のリスクが上昇し、CYP1A1 のヘテロ接合、ヘテロ+変異型ホモ接合で有意なリスク減少が認められた。

近年、尿道下裂の疫学研究において、一般人口と比べて、尿道下裂児の平均出生体重は低いこと、SGA 児や子宮内発育遅延との有意な関連のあることも指摘されている。本研究は、これらの先行研究の結果を支持するものであった。

一方、CYP1A1 は aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) 活性に関与するのみならず、エストロゲン不活性の 2-OH エストロゲンを産生することでエストロゲン代謝に関わっていることが知られている。例えばホルモン依存性腫瘍である乳がんでは、CYP1A1 変異型において、がんのリスクを低下させる報告もあるが、逆に、リスクが上昇するという報告もある。また、CYP1A1 はプロゲステロン・デヒドロエピアンドロステロンの水酸化に関わっていることも指摘されている。正常な尿道の形成は性ホルモンのバランスに依存することから、CYP1A1 によるエストロゲン代謝作用が尿道下裂の発生に関与している可能性が示唆された。

従来から、喫煙と代謝に関連する遺伝子多型の研究では母の遺伝的素因と環境要因との交互作用による児の先天異常との関連が指摘されている。本研究では、尿道下裂児の母において、喫煙と代謝関連遺伝子多型との交互作用は見られなかった。本研究では、サンプルサイズが少ないために喫煙との関連が見られなかった可能性もあるが、尿道下裂の発生においては、CYP1A1 は、外因性化学物質代謝としての働きよりもむしろエストロゲン代謝の働きの方が相対的に大きいことが示唆された。

本研究によって、母の CYP1A1 遺伝子型とその児の尿道下裂リスクとの有意な関連が示された。母親の生体内異物代謝やエストロゲン代謝が尿道下裂発生のリスクに影響を与える可能性があり、中でも CYP1A1 遺伝子型が尿道下裂の疾患感受性遺伝子の一つであることが疫学的に示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 野々村 克 也
副 査 教 授 水 上 尚 典
副 査 教 授 岸 玲 子

学 位 論 文 題 名

Maternal genetic polymorphisms in GYP1A1, GSTM1 and GSTT1 and the risk of hypospadias.

(尿道下裂児の母における CYP1A1,
GSTM1及び GSTT1遺伝子多型と尿道下裂リスクの関係)

尿道の形成はアンドロゲン依存性であるので、内分泌攪乱物質曝露や喫煙などの環境要因や母親の内因性エストロゲンと尿道下裂との関連が疑われている。一方、尿道下裂は遺伝要因も関与することが示唆され、さらに喫煙や他の化学物質には遺伝要因との交互作用が報告されている。特に第1相酵素 Cytochrome P450 の一種の CYP1A1 は環境化学物質や内因性エストロゲンを代謝し、第2相解毒酵素の Glutathione-S-transferases(GSTs)のグルタチオン抱合により代謝する。そこで我々は、CYP1A1(MspI), GSTM1, GSTT1 遺伝子多型と尿道下裂との関連を調べるために症例対照研究を行った。2000-2004年に札幌市と名古屋市の泌尿器科で尿道下裂の手術歴がある児の母31名を症例群とし、2001-2004年に札幌市の1病院で出産を終えた、停留精巣・尿道下裂を持たない男児の母64名を対照群とした。自記式質問紙票で、母親の出産時年齢、妊娠中の喫煙、教育歴、児の出生時体重、合併奇形について調べた。また、手術を行った泌尿器科医が尿道下裂の重症度分類を行った。GSTM1,GSTT1 遺伝子の欠損の有無は PCR 法にて行い、CYP1A1 MspI 多型は PCR-RLFP 法にて解析を行った。その結果、尿道下裂児における低出生体重児の割合が高く、有意なオッズ比の上昇が見られた。母親の出産時年齢、妊娠中の母の喫煙に関しては有意な関連は見られなかった。遺伝子多型については、GSTM1,GSTT1 遺伝子欠損型と疾病との間に有意な関連は見られなかったが、CYP1A1 野生型ホモ接合と比較して、ヘテロ接合、ヘテロ+変異型ホモ接合で有意なオッズ比の低下が見られた。母親の出産時年齢、児の出生時体重、妊娠中の喫煙で調整しても、ヘテロ接合、ヘテロ+変異型ホモ接合で有意なオッズ比の低下がみられ、独立した有意の関連要因であった。また、喫煙の有無で分けた GSTM1,GSTT1,CYP1A1 の遺伝子多型の頻度と疾病との関連や、重症度別に分けた結果も有意な関連は見られなかった。本研究では、尿道下裂と胎児発育との関連、CYP1A1 によるエストロゲン代謝作用が尿道下裂の発生に関与している可能性が示され、尿道下裂

の疾患感受性遺伝子の一つであることが示唆された。

学位論文公开发表は平成17年1月17日午前9時より、医学部臨床第3講堂において行われた。主査から紹介があった後、申請者はスライドを用いながら約20分間に渡って学位論文内容の発表を行った。その後、各審査員と約15分にお互って質疑応答を行った。出席者は12名であった。

副査の水上教授から、尿道下裂と双胎・体外受精の関連や、米国で尿道下裂有病率が多い理由、増加の理由について質問があった。これらの質問に対して、申請者は、先行研究を用いて、尿道下裂の発生には胎児発育やエストロゲン曝露との関連があること、尿道下裂の有病率には国による診断基準の違い、人種差、エストロゲン代謝遺伝子多型の頻度も関連している可能性について回答した。また、副査の岸教授から尿道下裂有病率の増加と医療技術の進歩による低出生体重児の生存率の増加の関連について質問があった。この質問に対して、申請者は、先行研究において、尿道下裂有病率が増加していない国でも低出生体重児の割合が増加している国があることを例に挙げ、増加の一要因ではあるとは考えられるが結論には至っていない、との回答をした。主査の野々村教授からは、本研究での喫煙と低出生体重との関連、母親の疾病との関連、エストロゲン曝露による尿道下裂発生のメカニズムについての質問があった。これらの質問に対して、申請者は、本研究では喫煙と低出生体重との関連を解析していないこと、先行研究を引用し、尿道下裂と母親の妊娠性糖尿病との関連やホルモン不均衡との関連について回答した。

いずれの質問に対しても、申請者は自らの調査研究に基づくデータや文献を引用し概ね妥当な回答を行った。

この論文は、生体内異物代謝やエストロゲン代謝の遺伝子多型が尿道下裂発生に関与することを示したはじめての研究であり、中でも CYP1A1 が尿道下裂の疾患感受性遺伝子の一つであることが示唆された点で高く評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。