

## *MAMLD1/Mamld1*が精巣機能に与える影響

### 学位論文内容の要旨

#### 【背景】

*MAMLD1* (Mastermind-like domain containing 1)は、ヒト染色体 Xq28 から単離された尿道下裂の責任遺伝子であり、現在までにナンセンス変異を含む複数の機能喪失変異が尿道下裂患者で同定されている。これまでの研究から、*MAMLD1* は胎児性分化臨界期の精巣におけるテストステロン産生に関与し、その変異はテストステロンの産生量低下を介して尿道下裂を引き起こすと考えられている。しかしながら、*MAMLD1* がどのような機序でテストステロン産生を制御しているかは未解明である。今回は、この機序を解明するため、マウスライディッヒ腫瘍細胞を用いて、*Mamld1* ノックダウン実験を行った。また、テストステロン産生低下は、尿道下裂発症に関わるだけでなく、出生後の性腺機能にも影響する可能性がある。しかし、*MAMLD1* の変異をもつ患児の出生後の性腺機能についての報告もない。今回、*MAMLD1* の変異が同定された尿道下裂患児の、経時的な内分泌学的検査所見を得たので同時に報告する。

#### 【対象と方法】

In vitro 実験では、マウスライディッヒ腫瘍細胞(MLTC-1)において、siRNA を用いて *Mamld1* の発現を一過性に抑制し、1) コレステロールからテストステロンへ至る 8 種類のステロイドホルモン代謝産物濃度、2) 内在性コントロール遺伝子  $\beta 2$ -microglobulin に対する相対的遺伝子発現量、3) MLTC-1 細胞数を測定した。

症例に関しては、*MAMLD1* 変異が認められ、その機能低下が証明されている尿道下裂患児 3 例の、陰茎長、精巣容積、血清 LH/FSH/Testosterone 値、超音波所見などを、変異発見時から数年単位で経時的に測定した。

#### 【結果】

In vitro 実験では、*Mamld1* の発現抑制により、17-ヒドロキシプレグネノロン、17-ヒドロキシprogesteron、DHEA、アンドロステンジオン、テストステロンが有意に減少し、*Cyp17a1* の mRNA 発現量が有意に低下した。*Mamld1* の発現抑制効果は 3 日目まで

続いたが、その間 MLTC-1 の細胞数はコントロールと比べて変わらなかった。

*MAMLD1* 変異をもつ尿道下裂児 3 例は、乳児期から学童期前の時期では、負荷試験を含め、血清のホルモン値は基準範囲内であった。しかし、7 才を過ぎたあたりから、LH/FSH の上昇や、hCG 負荷に対するテストステロンの反応性の低下が認められた。さらに、2 例では精巣の超音波検査において、微小石灰化が認められた。

#### 【結語】

*Mamld1* は、精巣のライディッヒ細胞において、ステロイド合成酵素遺伝子 *Cyp17a1* の発現調節を介し、テストステロン産生に関わっていると考えられる。また、*MAMLD1* は、胎生期の性分化に必要なテストステロンの産生を減少させるだけでなく、出生後の精巣機能にも影響を及ぼすことが示唆される。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	水上	尚典
副査	教授	野々村	克也
副査	教授	櫻木	範明
副査	教授	清野	研一郎

## 学位論文題名

### *MAMLD1/Mamld1*が精巣機能に与える影響

本研究は、尿道下裂の原因遺伝子の 1 つとして同定された *MAMLD1/Mamld1* (Mastermind-like domain containing 1) について、*in vitro* 実験と臨床データから、*Mamld1* が、精巣のライディッヒ細胞において、ステロイド合成酵素遺伝子 *Cyp17a1* (Cytochrome P450, family 17 subfamily A polypeptide 1) の発現調節を介し、テストステロン産生に関わっていること、*MAMLD1* は、胎生期の性分化に必要なテストステロンの産生減少から尿道下裂の発症に関わるだけでなく、出生後の精巣機能にも影響を及ぼすことを示唆したものである。

発表終了後、清野教授から、今回は、mRNA レベルでの実験だが、タンパクレベルでの証明はできたのか質問があった。*MAMLD1/Mamld1* に対するいい抗体が見つからず、ウェスタンブロット法などのタンパクレベルでの解明には至らなかったが、テストステロンなどの代謝産物を測定することで間接的な証明が出来たものと考えていると返答した。さらに、マイクロアレイで *Mamld1* の発現抑制により変動した遺伝子の中に、*Cyp17a1* と関連する遺伝子はあるのか質問があった。これに対し申請者は、*Cyp17a1* と関連する遺伝子は本研究では検出することができず、変動があった遺伝子も、もともと発現量が低いものが多く、偽陽性の遺伝子を拾っている可能性もあると返答した。

櫻木教授から、*MAMLD1* 変異陽性症例では、乳児期の内分泌学的検査では異常を認めなかったということだが、尿道下裂の発症と *MAMLD1* は、どのように関連しているのか質問があった。尿道下裂には胎児期のアンドロゲン効果が必須であるが、さらに性分化には臨界期があり、その時期でのアンドロゲン不足と関連しているかが問題となるが、*in vitro* 実験では、短期間では *Mamld1* はライディッヒ細胞の増殖に影響を与えなかったが、生体内では、精巣の発達にも影響を及ぼし、*MAMLD1* が正常に機能しないと、臨界期におけるテストステロン産生が不足する可能性があるかと返答した。また、以前イタリアでダイオキシンが問題となった際、尿道下裂の発症が増加したとの報告があるかとの質問があったが、そのような報告はないと返答した。

野々村教授から、MAMLD1 に近接する遺伝子である MTM1 の異常で発生する myotubular myopathy の遺伝形式と母親の表現型に関して質問があり、母親が保因者となる伴性遺伝と、突然変異などによる新規発生の場合があり、母親には外性器や生殖に異常を認めず、また男児はその筋症状が重く、男児から次世代へは引き継がれないと返答した。また、タンパクレベルでの解明は今後必要なこと、ステロイド代謝にはバックドアパスウェイなど様々な経路があり、今後、広い視点での検討が必要であるとの指摘があった。

水上教授から、MAMLD1 変異陽性症例には今後加療が必要かとの質問があった。現在のところ、まだ思春期前であるが、すでにヒト胎盤性ゴナドトロピンに対するテストステロンの反応性が悪くなっているため、第2次性徴が発現しない可能性もあり、テストステロン補充なども考慮する必要があると考えていると返答した。また、尿道下裂と原発性性腺機能不全を合併している症例の中には、MAMLD1 に異常がある症例がいる可能性を考えており、それら症例における遺伝子解析を試みたいと考えていると回答した。さらに、胎児期のテストステロン産生にはピークがあるとのことだが、それを証明した論文はあるのかとの質問があった。申請者はこれに対し即答できなかったが、野々村教授から 1970 年代に Simon らにより証明されているとの助言があった。胎児発育不全症例に、尿道下裂が多い印象を受けるが、この両者を一元的に説明するような研究報告はあるかとの質問があった。これに対し申請者は尿道下裂症例では低出生体重児の割合が多い報告は散見されるが、胎児発育不全と尿道下裂との直接の関連やその原因にまで言及した報告はないと返答した。

本研究の一部は、PLoS One, 2011, Apr 29; 6(4):e19123 に掲載されており、この知見は、Mamld1 が Cyp17a1 の発現に影響を与えることを初めて報告したものであり、今後のステロイド代謝やテストステロン産生の機序の解明に役立つものと期待される。また、尿道下裂症例の原因解明に資するものである。

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単位取得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。