



Title	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
Author(s)	今, 雅史
Description	配架番号 : 2207
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12103号
Issue Date	2016-03-24
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k12103">https://doi.org/10.14943/doctoral.k12103</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/61911">https://hdl.handle.net/2115/61911</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Masafumi_Kon.pdf



# 学 位 論 文

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)

2016年3月

北 海 道 大 学

今 雅 史



# 学 位 論 文

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)

2016年3月

北 海 道 大 学

今 雅 史

## 目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	3 頁
略語表	6 頁
対象と方法	7 頁
結果	14 頁
考察	23 頁
総括／結論	28 頁
謝辞	29 頁
引用文献	30 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は、以下の論文に投稿した。

1. Kon M., Suzuki E., Dung V. C., Hasegawa Y., Mitsui T., Muroya K., Ueoka K., Igarashi N., Nagasaki K., Oto Y., Hamajima T., Yoshino K., Igarashi M., Kato-Fukui Y., Nakabayashi K., Hayashi K., Hata K., Matsubara Y., Moriya K., Ogata T., Nonomura K., Fukami M.

Molecular basis of non-syndromic hypospadias: systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 62 patients.

Hum Reprod. 30:499–506 (2015).

本研究の一部は、以下の学会に発表した。

1. 今雅史 鈴木江莉奈 長谷川行洋、五十嵐麻希 福井由宇子 水野健太郎、小島祥敬、Dung Vu Chi、緒方勤、野々村克也、深見真紀

非症候性尿道下裂発症における単一遺伝子変異の寄与の解明

第 47 回 日本小児内分泌学会学術集会 2013/10/10-12 東京

2. 今雅史、鈴木江莉奈、長谷川行洋、五十嵐麻希、福井由宇子、水野健太郎、小島祥敬、林祐太郎、郡健二郎、Dung Vu Chi、緒方勤、野々村克也、深見真紀  
尿道下裂患者における既知発症責任遺伝子および感受性遺伝子変異解析

第 18 回日本生殖内分泌学会学術集会 2013/12/7 東京

3. 今雅史、室谷浩二、長谷川行洋、長崎啓祐、Dung Vu Chi、上岡克彦、大戸佑二、五十嵐登、三井貴彦、鈴木江莉奈、五十嵐麻希、福井由宇子、守屋仁彦、野々村克也、緒方勤、深見真紀

非症候性尿道下裂発症における単一遺伝子変異の寄与の解明

第 48 回日本小児内分泌学会学術集会 2014/9/25-27 浜松

4. 今雅史、橘田岳也、三井貴彦、吉野薫、上岡克彦、守屋仁彦、深見真紀、野々村克也、篠原信雄

非症候性尿道下裂の分子基盤：患者 62 名における全既知遺伝子変異解析および全ゲノムコピー数解析

第 24 回小児泌尿器科学会総会 2015/7/1-3 東京

5. Kon M, Kitta T, Mitsui T, Yoshino K, Ueoka K, Moriya K, Fukami M, Nonomura K and Shinohara N

Molecular basis of non-syndromic hypospadias: Systematic mutation screening and genome-wide copy-number analysis of 63 patients

26th ESPU Congress 2015/10/14-17 Prague

## 緒言

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 例とされているが<sup>1-3</sup>、人種毎に異なり、白人が最も罹患しやすく、次に黒人、さらにアジア人、ヒスパニックと続く<sup>2-5</sup>。本邦の既報では北海道における罹患割合が 10000 出生に対し 3.9 例と報告されている<sup>1</sup>。罹患率の経時的変化については見解が分かれ、近年増加しているという報告と<sup>2,5,6</sup>、増加は無いとする報告が存在する<sup>1,7,8</sup>。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<sup>1,9</sup>。

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<sup>1,10-12</sup>。

また、過去の報告では、家族内発症の尿道下裂例の解析も行われ<sup>13,14</sup>、ほとんどの報告で父性要素と母性要素は同率だった事、患者の兄弟と子供の発症リスクが同等だった事から、本症例の発症に単一遺伝子変異が関与している可能性が高い事が示唆される事となった<sup>13</sup>。

2012 年に Van der Zanden らは、162 の既報研究を review し、15 の疾患原因遺伝子と、3 の疾患原因候補遺伝子を発表した<sup>15</sup>。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した。また、*CYP11A1* 疾患感受性遺伝子として示したが、そのリスク変異はまだ明らかにされていない。当 review にて挙げられた疾患原因遺伝子や疾患原因候補遺伝子遺伝子には、*AR* や *SRD5A1* などの、発生初期に生殖結節の男性化に関与するとされる遺伝子や、*HSD3B2* や *HSD17B3* などの男性化に重要な役割を果たすホルモン合成に関与する遺伝子が含まれている。

これまでの遺伝子解析方法としては、症例群に対して、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サンガー法による遺伝子変異検索中心の研

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、さらに本疾患における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、コピー数解析についても同様で、解析点を極小範囲に限定した解析はなされているものの<sup>16,17</sup>、全コピー数解析については、特殊症例でのみ行われており、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<sup>18</sup>。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 (next-generation sequencing (NGS)) 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 (comparative genomic hybridization (CGH)) 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。

成育医療研究センター分子内分泌研究部では、国内はもとより、国外の様々な施設より性分化疾患をはじめ、成長障害や性成熟異常、先天性奇形、生殖機能障害などの内分泌異常が引き起こすと考えられる様々な先天疾患患児の DNA サンプルを引き受け、解析、研究している。本研究に関連する分野として、尿道下裂を含む性分化疾患における遺伝子の解析研究を行い、既知遺伝子変異の検索および機能解析や、新規原因遺伝子の発表をしてきた。尿道下裂に関しては、MAMLD1 が尿道下裂の原因遺伝子である事を発見し<sup>19</sup>、さらに MAMLD1 変異が胎生期のホルモン産生に影響を及ぼす事も見出している<sup>20,21</sup>。次世代解析法も積極的に導入しており、性分化疾患における既知遺伝子変異の解析に次世代シーケンサーのカスタムアンプリコンである SureSelect を用いた解析法を使用していた他、遺伝子コピー数異常の解析では、アレイ CGH を用い、尿道下裂を含む性分化異常症患児における微小構造異常の解析も施行され、発表している<sup>22</sup>。

上記の如く、次世代解析法を用いた遺伝子解析法の実績をもつ成育医療研究センター分子内分泌研究部にて研究をするにあたり、次世代解析法による遺伝子解析を本疾患に適用する事で得られる知見は多いと考えた。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。

本研究により、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。

略語表 (本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである)

CGH	comparative genomic hybridization
DSD	disorder of sex development
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
MAF	Minor allele frequency
NGS	next-generation sequencing

## 対象と方法

### 対象

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）に対し解析を施行した。全ての症例は協力施設に尿道下裂として受診した症例で、停留精巣と矮小陰茎を除く臨床的合併症を持った症例と、染色体異常が同定されている症例は本研究から除外した。46, XY DSD を家族歴にもつ症例は存在しなかった。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。

### 研究倫理

本研究は成育医療研究センターで施設内倫理委員会委員会の承認を得て、患者の両親へ説明を行い、書面での同意を得ている。

### DNA

各症例の DNA は、各協力施設より本研究施行施設である成育医療研究センターに送付された末梢血から同施設にて DNA 化し保存してあるサンプルを用いた。また、一部の症例においては DNA サンプルのみを当施設へ送付されたものも存在し、当該サンプルについては DNA 化された過程は不明である。

### 対象遺伝子

#### 変異スクリーニング

緒言にて言及した 2012 年に発表された van der Zanden らの review に基づき、下記の 25 遺伝子を解析対象とした<sup>15</sup>。

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.*

## 解析方法

### 次世代シーケンサーによる遺伝子変異スクリーニング

#### HaloPlex

網羅的遺伝子解析は本研究にて対象とした 25 遺伝子を含む領域を対象としたカスタムアンプリコンである HaloPlex (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) (Design ID 02185-1348467147) を使用した。

#### HaloPlex 実験方法

1. サンプル濃度調整：ゲノム DNA のサンプルを PicoGreen 染色キット (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) にて定量し、 $5\text{ng}/\mu\text{l}$  となるように濃度調整した。
2. 8 種類の制限酵素処理によるゲノム DNA の断片化：HaloPlex キットに含まれる酵素 A 群 (8 種), 酵素 B 群 (8 種) をそれぞれ Buffer, BSA と共に混合し、8 種の制限酵素 mix を作成 ( $5\mu\text{l}$ )。その 8 種それぞれに  $5\text{ng}/\mu\text{l}$  に濃度調整されたサンプルを  $5\mu\text{l}$  ずつ分注した。サーマルサイ클ラーを用い、制限酵素とゲノム DNA の混合されたサンプルを  $37^\circ\text{C}$  で 30 分インキュベートし制限酵素処理した。
3. 制限酵素処理の確認:2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用い、ゲノム DNA が制限酵素処理されている事を確認した。
4. 制限酵素処理したゲノム DNA と HaloPlex プローブのハイブリダイゼーション：ゲノムのターゲット領域に由来する DNA 断片に特異的にハイブリダイズするように設計された HaloPlex プローブをハイブリダイゼーションソリューションと混合し、制限酵素処理したゲノム DNA と混合した。さらに、サンプル毎に設定した特異な Index を混合、プ

ロトコールに従い、95°C10分、54°C3時間インキュベートし、ハイブリダイズさせた。

5. ターゲット DNA のキャプチャ: HaloPlex プローブとのハイブリダイゼーションにより選択領域のみビオチン化された DNA を、HaloPlex Magnetic Beads suspension と混合し、磁気スタンドを用いキャプチャした。磁気ビーズによりキャプチャされた DNA を Wash solution にて洗浄し、ビーズを除去した。さらに環状化されたターゲット DNA 断片を Ligation Solution, DNA Ligase と混合、55°Cで10分インキュベートし、ターゲット DNA と HaloPlex Index Primer との間のニックを閉じた。キャプチャした DNA ライブラリは 50mM NaOH 溶液を用いたアルカリ条件下で溶出した。
6. ターゲット DNA の PCR 増幅: 5×Herculase Reaction Buffer、dTTPs、Herculase II Fusion DNA Polymerase (Herculase II Fusion DNA Polymerase, Agilent Technologies, Palo Alto, CA)、Primer1、Primer2、2M Acetic Acid、H<sub>2</sub>O を混合した PCR 溶液を作成。手順 5. にて溶出されたターゲット DNA のライブラリと混合。HaloPlex キット付属のプロトコールに従い、①98°C2分、②98°C30秒、60°C30秒、72°C10分、③72°C10分(②を21回繰り返す) PCR した。対象領域のみがサンプル毎に Index を付加された状態で増幅した事となる。
7. 増幅したライブラリの精製: AMPure XP ビーズ (Beckman Coulter, Brea, CA) にて PCR 産物をキャプチャし、用時調整した 70%エタノールで2回洗浄し、DNA ライブラリを精製、10mM Tris-acetate にて精製された DNA ライブラリを溶出した。
8. ターゲットエンリッチメントの確認: 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用い、DNA ライブラリが 175bp~625bp の間で適切にアンプリコンされているかどうかを確認すると共に、175bp~625bp の間のサンプル濃度を測定した (MiSeq によるシーケンスの際に濃度調整が必要となるため)。

MiSeq

Haloplex にて対象領域がアンプリコンされたサンプルを MiSeq (Illumina, San

Diego, CA)にて 150bp paired-end reads でシーケンスした。

## MiSeq 実験方法

MiSeq によるシーケンスは illumina 社の MiSeq 試薬キット v2、300 サイクル (カタログ番号 MS-102-2002) を使用して行った。

1. DNA 濃度調整 : HaloPlex 最終工程にて測定した濃度を元に、2nM となるように調整した。
2. DNA の変性、希釈 : 調整されたサンプル DNA を 0.2 N NaOH と混合し、ヴォルテックス。室温で 5 分間インキュベートし、DNA を一本鎖に変性させた。ハイブリダイゼーションバッファーである HT1 溶液と混合し、終濃度が 5pM となるように調整した。
3. インターナルコントロールの作成 : 全てのライブラリに対し、インターナル今とロールとして使用出来る PhiX ライブラリを 12.5pM となるように 1. 2. の手順と同じように変性、希釈した。
4. 容量比 30%となるように、DNA ライブラリと、PhiX ライブラリを混合した。
5. 混合試薬をカートリッジにセットし、MiSeq に設置、シーケンスを施行した。

MiSeq によりシーケンスされ電子データ化された症例の遺伝子情報は SureCall (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 及び SAMtools 0.1.17 software (<http://samtools.sourceforge.net>)<sup>23</sup> の 2 通りのソフトウェアを用い正常遺伝子配列と比較し、遺伝子変異情報を Excel データ化した。

## 遺伝子変異情報の解析

SureCall および、SAMtools にてデータ化された変異情報は 1 サンプルにつき多い症例で 1000 コール以上にものぼる。その情報から病的意義のある変異および、尿道下裂の原因として過去に指摘されている変異を抽出した。その方法を以下に示す。

1. 多遺伝子の変異情報から、本研究で対象にしている 25 遺伝子以外の遺伝子変異を除く。
2. アミノ酸置換を来さない silent mutation や、intron、5' -UTR、3' -UTR 部位の変異を除外する。
3. オンライン上のデータベース（1000genome <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes/> , HGVB <http://www.genome.med.kyoto-u.ac.jp/SnpDB/>）を用い、明らかな正常多型を除外する。(Minor allele frequency (MAF) $>0.01$  を基準とした) 但し、MAF $>0.01$  であっても、既報のリスクアレルに関しては解析対象とした<sup>15</sup>。
4. サンガー法により各変異を確認。

#### 同定変異の評価

上記実験にて同定された各変異は *in silico* 解析によりその機能を予測した。エクソン内の蛋白変異をもたらすミスセンス変異はその蛋白機能変化を Polyphen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)<sup>24</sup> を用いて予測し、スプライスサイト変異によるスプライス異常は Genome Project Data ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html))<sup>25</sup> を用いて予測した。また、塩基挿入や欠失に関しては、“probably damaging” として評価した。

予測された機能変化により、塩基変異を以下の 3 群に分類した。

- [1] putative pathogenic mutations: 既報の 46, XY 原因遺伝子変異、もしくは未報告の変異で *in silico* 解析により “probably damaging” または “possibly damaging” と推定された変異。
- [2] putative risk variants: リスク多型として既報の一塩基多型、または原因遺伝子内の頻度の低い多型 (MAF $<0.01$ ) で<sup>28</sup>、*in silico* 解析により “probably damaging” または “possibly damaging” と推定された一塩基多型。
- [3] probable benign changes: 原因遺伝子、感受性遺伝子、もしくは候補遺伝子内の変異であるが、*in silico* 解析により変異蛋白機能変化が “benign” と推定された変異。

同定された一塩基多型と本疾患発症リスクの関連性を評価するために、日本人症例に限りその一塩基多型における本研究群での変異アレル割合と、データベース上(dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)での日本人一般集団での変異アレル割合を比較した。

## コピー数解析

### アレイ CGH

コピー数解析はアジレント社の catalog human array (8×60 k format, catalog number G4450A, Agilent Technologies) を使用した。

本研究では疾患表現形に影響を及ぼすとされる 1.5Mb 以上のコピー数変化をコピー数異常として同定した<sup>26</sup>。また、正常集団のデータベース(Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation/>)) と比較し正常多型を除外した。

### アレイ CGH 実験方法

DNA のラベル化にはアジレント社の SureTag DNA Labelling Kit(Agilent Technologies, Palo Alto, CA)に含まれる試薬を使用した。

1. ゲノム DNA の制限酵素反応：サンプル DNA 及び、リファレンス DNA、それぞれ 1  $\mu$ g に H<sub>2</sub>O を加え、20.2  $\mu$ l となるように調整。サンプル制限酵素反応の試薬、H<sub>2</sub>O、10×Reaction BufferC、Acetylated BSA、Alu I、Rsa I を加え、37°C2 時間、65°C20 分でインキュベートした。
2. DNA のラベル化：制限酵素反応を加えたゲノム DNA に Ransom Primer を加え、95°C3 分インキュベート、さらに 5×Buffer、10×dNTP、ラベル化色素(Cy3-dUTP または Cy5-dUTP)、Exo-klenow fragment を加え、37°C2 時間、65°C10 分で PCR した。
3. ラベル化 DNA の精製：ラベル化された DNA に TE buffer を加え、専用のカラムに滴下、14000g で 10 分遠心。カラムを通過した液は破棄し、再度カラムに TE buffer を加え 14000g で 30 分遠心。カラムを逆向きにセット、遠心(1000g 1 分)し、カラムに残ったサンプルを回収した。

精製された DNA は Nano Drop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) にて収量を測定し、確認した。精製後、サンプル DNA (Cy3 ラベリング) とリファレンス DNA (Cy5 ラベリング) を混合した。

4. ハイブリダイゼーション: ラベル化 DNA サンプルに Cot-1 DNA、10×aCGH Blocking Agent、2×Hi-RPM Hybridization Buffer を加え、95°C 3 分、37°C 30 分遮光下でインキュベートした。インキュベート後、直ちにガasket スライド上にハイブリダイゼーション溶液を滴下、アレイスライドをガasket スライドに載せ、二枚のスライドをハイブリダイゼーションチャンバーにセットした。チャンバーを 65°C にセットしたオープンローターに差し込み、65°C、20rpm の設定にて 24 時間ハイブリダイゼーションした。
5. マイクロアレイの洗浄: ハイブリダイゼーション後、アレイスライドをピックアップし、Wash Buffer 1 内のスライドラックに設置、遮光下で 5 分洗浄。スライドラック毎 Wash Buffer 2 に移し、1 分洗浄し、スキャナにセットしアレイを読み込んだ。
6. 読み込んだファイルを Agilent 社の Agilent Genomic Workbench Feature Extraction (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) にて解析した。

fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 解析

同定されたコピー数変化を FISH 法を用いて評価した。(外注)

統計学的解析

患者群と一般集団とのアレル頻度の差の統計学的解析は  $\chi^2$  乗解析と、Fisher の正確確率検定を用い評価した。

## 結果

次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異スクリーニング

HaloPlex にてアンプリコンされ、MiSeq によりシーケンスされた結果、各症例サンプルにおけるアンプリコンの平均 depth は 115.0 であった。

putative pathogenic mutations : 7 症例において、8 遺伝子変異が病因変異として同定された。(表 1、図 1)

表 1 putative pathogenic mutations が同定された症例

症例	国籍	Putative pathogenic mutation	外尿道口開口部位	停留精巣	矮小陰茎
1	日本	<b>AR (p. S176R)</b>	anterior	無し	無し
2	日本	<b>AR (p. A403V)</b>	データ無し	データ無し	データ無し
3	日本	<b>AR (p. R841S)</b>	posterior	無し	あり
4	日本	<b>AR (delins*)</b> <i>HOXB6</i> (p. S2N)	データ無し	データ無し	データ無し
5	日本	<i>BNC2</i> (p. M801R)	posterior	無し	無し
6	ベトナム	<b>SRD5A2 (p. R227Q)</b>	posterior	無し	あり
7	ベトナム	<b>HSD3B2 (p. A10T)</b>	posterior	あり (右)	あり

ホモ接合性、ヘミ接合性の変異は太字、ヘテロ接合性の変異は細字で示した。

\* c.1995delTGAAGGCTATGAATGTCinsCAGAA; p.666delEGYECQinsRK

図 1

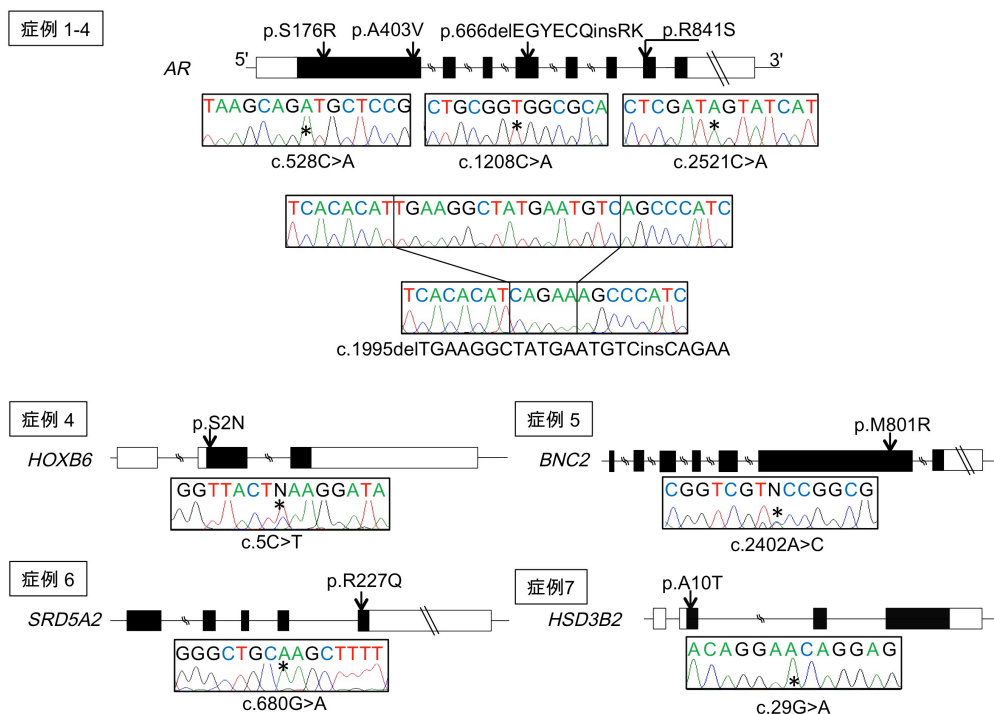


図 1 : putative pathogenic mutations が同定された症例の遺伝子内での部位および、シーケンスにおけるクロマトグラムを示す。\*のアレルが変異存在部位である。

同定された 8 変異は、ヘミ接合性のミスセンス変異が *AR* に 3 変異、ヘミ接合性の deletion/insertion が *AR* に 1 変異、ヘテロ接合性のミスセンス変異が *HOXB6*, *BNC2* に 1 変異ずつ、ホモ接合性のミスセンス変異が *SRD5A2* と *HSD3B2* に 1 変異ずつ認められた。そううち、症例 3 における *AR* (p. R841S) の変異、症例 6 における *SRD5A2* (p. R227Q) の変異はそれぞれ 46, XY DSD 症例において既報の変異であった<sup>15, 27, 29</sup>。

putative risk variants : 30 症例においてリスク多型と考えられる変異が同定された。(表 2)

表 2 putative risk variants が同定された症例

症例	国籍	Putative pathogenic mutation	Putative risk variant	外尿道口開口部位
3	日本	<i>AR</i> (p. R841S)	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	posterior
4	日本	<i>AR</i> (delins) <i>HOXB6</i> (p. S2N)	<i>MAMLD1</i> (p. N662S)	データ無し
6	ベトナム	<i>SRD5A2</i> (p. R227Q)	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	posterior
7	ベトナム	<i>HSD3B2</i> (p. A10T)	<i>SRD5A2</i> (p. R227Q)	posterior
8	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	posterior
9	日本		<i>MAMLD1</i> (p. N662S)	anterior
10	日本		<i>CYP11A1</i> (p. Q75P)	middle
11	日本		<i>CYP11A1</i> (p. A62P)	middle
12	日本		<i>BMP7</i> (p. T170M)	middle
13	ベトナム		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	データ無し
14	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	posterior
15	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	posterior
16	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	posterior
17	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	posterior
18	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	posterior
19	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	middle
20	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	middle
21	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	middle
22	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	anterior
23	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	データ無し
24	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	データ無し
25	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	データ無し
26	日本		<i>HSD17B3</i> (p. G289S) <i>MAMLD1</i> (p. N662S)	middle

27	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	データ無し
28	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	データ無し
29	日本	<b><i>MAMLD1</i> (p. N662S)</b>	posterior
30	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	anterior
31	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	middle
32	日本	<b><i>MAMLD1</i> (p. N662S)</b>	posterior
33	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	anterior

ホモ接合性、ヘミ接合性の変異は太字、ヘテロ接合性の変異は細字で示した。

これらの多型の中で、*HSD17B3*における p. G289S 変異 (rs2066476)、*MAMLD1*における p. N662S 変異 (rs2073043)、*SRD5A2*における p. R227Q 変異 (rs9332964) は尿道下裂もしくは矮小陰茎のリスク多型として既報の変異であった<sup>29-32</sup>。

表 3 に示すように、これらの多型は日本人における正常集団でのリスクアレル保有率と統計学的差は認められなかった。*BMP7* の多型においては、正常一般集団のアレル保有率がデータベースに示されておらず、統計学的差は検討出来なかった。

表3 本研究で認められたまれな一塩基多型における、本研究と正常日本人でのリスクアレル保有率と統計学的差

遺伝子	多型	dbSNP	機能予測	アレル頻度		p 値
				本研究	正常日本人*	
<i>HSD17B3</i>	p. G289S	rs2066479	Putative risk variant	25/114	51/178	0.1267
<i>MAMLD1</i>	p. N662S	rs2073043	Putative risk variant	5/57	7/128	0.2933
<i>CYP1A1</i>	p. A62P	rs143070677	Putative risk variant	2/114	1/178	0.3377
<i>CYP1A1</i>	p. T173R	rs28399427	Putative risk variant	1/114	0/178	0.3904
<i>BMP7</i>	p. T170M	rs371762840	Putative risk variant	1/114	データ 無し	-
<i>EGF</i>	p. S16R	rs11568849	Probable benign change	4/114	7/178	0.5597
<i>ESR2</i>	p. G67S	rs376782264	Probable benign change	1/114	データ 無し	-
<i>BNC2</i>	p. I974V	rs3500589	Probable benign change	1/114	データ 無し	-

\* 1000genome を参照した。

probable benign changes : 13 症例において認めた。(表 4)

表 4 probable benign changes が認められた症例

症例	国籍	Putative risk variant	Probable benign change	外尿道口開口部位
27	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	<i>BNC2</i> (p. M539V)	データ無し
28	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	<i>BNC2</i> (p. P614S)	データ無し
29	日本	<b><i>MAMLD1</i> (p. N662S)</b>	<i>EGF</i> (p. S16R)	posterior
30	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	<i>FGFR2</i> (p. M97V)	anterior
31	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	<i>EGF</i> (p. S16R)	middle
32	日本	<b><i>MAMLD1</i> (p. N662S)</b>	<i>HSD3B2</i> (p. S284I) <i>EGF</i> (p. S16R)	posterior
33	日本	<i>HSD17B3</i> (p. G289S)	<i>HSD3B2</i> (p. R362W)	anterior
34	日本		<i>NR5A1</i> (g. IVS2-5G>A)	posterior
35	日本		<i>HOXB6</i> (p. P40S)	posterior
36	日本		<b><i>MAMLD1</i> (p. N675K)</b>	posterior
37	日本		<i>ESR2</i> (p. G67S)	posterior
38	日本		<i>EGF</i> (p. S16R) <i>BNC2</i> (p. I974V)	middle

表 2 に示すように、*EGF* における多型は日本人における正常集団でのリスクアレル保有率と統計学的差は認められなかった。*ESR2* と *BNC2* における多型は正常一般集団のアレル保有率がデータベースに示されておらず、統計学的差は検討出来なかった。

また、*NR5A1* におけるスプライシング部位の変異である (g. IVS2-5G>A) については *in silico* 解析においてスプライシングに影響しない事が予想された。

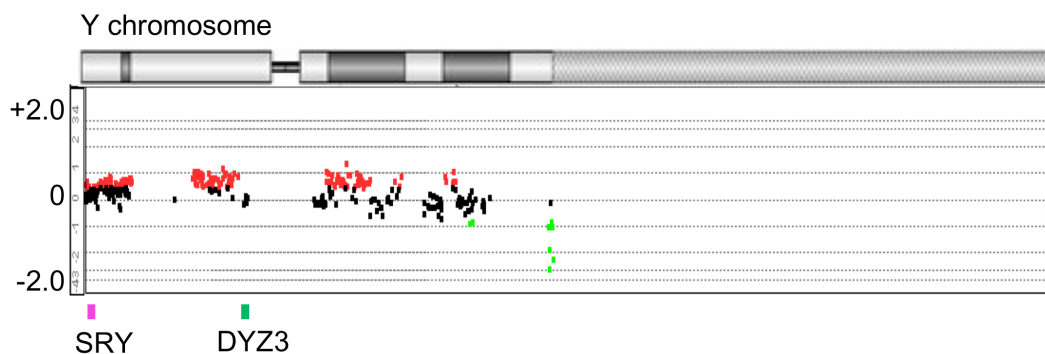
症例 39-62 の 24 症例については、目的遺伝子内に有意な変異を認めなかった。

## コピー数解析

1 症例（症例 8）において Y 染色体のコピー数異常が同定された。（図 2）

図 2 に示すように、Ypter から Yq11.223 にわたる約 23Mb のコピー数増加と、それ以外の領域のコピー数減少を認めた。log<sub>2</sub> signal ratios の詳細を確認すると、コピー数増加部では +1.0 より低く、コピー数減少部では -2.0 よりも高いプローブがほとんどである事から、モザイク型のコピー数異常が疑われた。

図 2. 症例 8 で認められたコピー数異常。



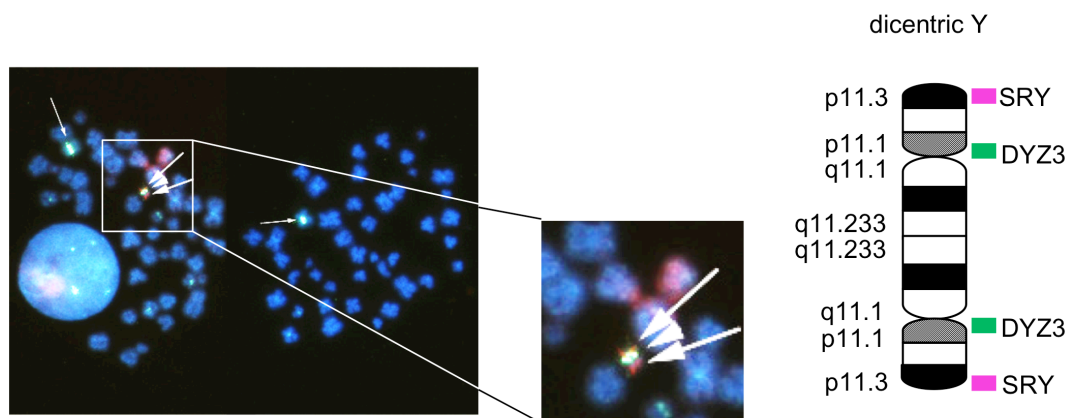
## アレイ CGH の結果

黒点は、正常範囲内、赤点はコピー数増加 (> +0.4)、緑点はコピー数減少 (< -0.8) したプローベを各々表している。

## fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 解析

Yp 領域 (Yp11.3) の SRY を含むプローブ (SRY) と、Y セントロメア領域のプローブ (DYZ3) を用いた FISH 解析では、SRY 領域であるピンクの発光が染色体上に二カ所存在し、モザイクの dicentric Y と判断した。（図 3）

図 3: fluorescence *in situ* hybridization (FISH)解析と、dicentric Y の Y 染色体概略図。



矢頭は DAZ3 プローブのシグナル、太矢印は SRY-containing プローブのシグナルを示す。

左図にある細矢印は、X のセントロメア領域を示すプローブのシグナルである。

表 5 に putative pathogenic mutations が同定された症例における臨床情報を示す。putative pathogenic mutations が同定された症例の尿道下裂の外尿道口開口部は severe type (posterior) だけではなく、mild type (anterior) の症例も含まれていた。ホルモンデータに関しては症例 3 と 7 からのみ得られたが、正常範囲内であった。

表 5 putative pathogenic mutations が同定された症例における臨床情報

症例	1	2	3	4	5	6	7	8	
遺伝子、領域	<i>AR</i>	<i>AR</i>	<i>AR</i>	<i>AR</i> / <i>HOXB6</i>	<i>BNC2</i>	<i>SRD5A2</i>	<i>HSD3B2</i>	Y chromosome <sup>1</sup>	
国籍	日本	日本	日本	日本	日本	ベトナム	ベトナム	日本	
DSD 家族歴	無し	データ無し	無し	データ無し	無し	無し	無し	無し	
尿道下裂 <sup>2</sup>	anterior	データ無し	posterior	データ無し	posterior	posterior	posterior	posterior	
臨床所見 停留精巣	無し	データ無し	無し	データ無し	無し	無し	あり (右)	無し	
矮小陰茎	無し	データ無し	あり	データ無し	無し	あり	あり	無し	
その他	無し	データ無し	無し	データ無し	無し	無し	無し	borderline MR	
検査時年齢	データ 無し	データ 無し	15 ヶ月	データ無し	データ 無し	データ 無し	3.5 年	データ 無し	
内分泌 データ	LH (IU/l) <sup>3</sup>	データ 無し	データ 無し	< 0.2 (< 0.2-0.3)	データ無し	データ 無し	データ 無し	データ 無し	データ 無し
	FSH (IU/l) <sup>3</sup>	データ 無し	データ 無し	< 1.0 (< 1.0-1.5)	データ無し	データ 無し	データ 無し	データ 無し	データ 無し
Testosterone (nmol/l) <sup>3</sup>	データ 無し	データ 無し	0.17 (0.10-0.45)	データ無し	データ 無し	データ 無し	0.16 (0.10-0.45)	データ 無し	

DSD, disorders of sex development; MR, mental retardation; LH, luteinizing hormone; FSH, follicle stimulating hormone.

1. Y 染色体のコピー数異常 2. 外尿道口開口部 3. 検査時年齢での正常値を括弧内に示した。

## 考察

本研究を施行するに当たり、他疾患にて遺伝子解析を施行している研究メンバーの協力を得て、サンガー解析法や、DNA サンプルの精製・増幅、および、PicoGreen や NanoDrop を用いた DNA の定量方法を予め学んだ。次世代シーケンスである NaloPlex については、他分野での HaloPlex 施行経験がある研究メンバーにライブラリ作成の手順を学び、プロトコールに従って行い、MiSeq でのシーケンスに関しても、SureSelect により作成されたライブラリ解析の経験を持つ研究メンバーに手順を学んだ。

本研究では、MiSeq でのシーケンス後の変異抽出に、SureCall (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 及び SAMtools 0.1.17 software (<http://samtools.sourceforge.net>)<sup>23</sup> の 2 つの解析ツールを使用した。当初 SAMtools のみの結果を基に解析を行っていたが、その後にリリースされた SureCall にて再解析を行ったところ、SAMtools では抽出されなかった変異が存在した。更に、その変異を Sangar 法で確認し実変異が存在する事が判明した。またその逆に、SAMtools のみで抽出された変異が SureCall で抽出されない例もある事が判明した。両解析ツールの大きな違いは、SAMtools においては Mapping に際し、シーケンスされた遺伝子配列について、全ゲノム配列を対象にマッチングさせて変異を検索するが、SureCall においては、HaloPlex にて設定した対象遺伝子配列のみを対象にマッチングさせる点にある。マッチングに際して大きな弊害となるのはライブラリ作成時に付加されるアダプター領域で、SAMtools については、全ゲノムに対してシーケンス配列を当てはめる為にアダプター領域がマッチングされてしまう miss read が多く存在していた為、変異抽出の際のフィルターを厳格に設定していた。その後に施行した SAMtools の変異抽出アルゴリズムの改善 (アダプター領域を誤リードしてしまう事による Mapping ミスをプログラムの改編により減少させ、さらにリード数過小による変

異抽出のフィルターを減少させた事)により、変異抽出数は増大したが、その差異は減少した。本研究においては、より正確性を高める為に2つのツールを併用して解析を行う事として実験を進めた。

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62例中7例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<sup>33,34</sup>。と同時に、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り<sup>33-35</sup>、さらに *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、非症候性の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<sup>34-36</sup>。

症例3の *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<sup>27</sup>。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。症例4には *AR* 遺伝子のヘミ接合性 deletion/insertion と、*HOXB6* 遺伝子にヘテロ接合性のミスセンス変異を同定した。また、症例7には *HSD3B2* 遺伝子のホモ接合性ミスセンス変異と、既報で酵素活性を3%に減弱するとされる *SRD5A2* 遺伝子のヘテロ接合性ミスセンス変異を同定した<sup>29,37</sup>。これらの結果によりわれわれは、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、われわれはまれな一塩基多型においては尿道下裂発症と関与する有意なデータを示す事が出来なかった。われわれのデータからは、日本人症例に

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、もしくはわずかな役割しか持っていない可能性を示唆された。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 遺伝子で持つ症例または、対アレル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。これら、まれな一塩基多型と疾患表現形との関連を明らかにするには本研究の症例数では少なすぎると考えられ、更なる研究が求められる。

コピー数異常の解析では、1 症例にのみ、潜在するコピー数異常を認めた。症例 8 は、Ypter から Yq11.223 にわたる約 23Mb のコピー数増加と、それ以外の領域のコピー数減少を認め、FISH 解析によりモザイク dicentric Y と判定された。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<sup>17,38</sup>。既報では、dicentric Y 症例における尿道下裂発症の原因として、モザイクの Y 染色体発現欠損もしくは、Y 染色体の異常発現が起因すると考えられている<sup>17,38</sup>。残りの 61 症例において、有意なコピー数異常が同定されなかった事により、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。

本研究において、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症例 1 については mild type (anterior) の尿道下裂症例であり、矮小陰茎や停留精巣の合併も認めなかった。

これまで症候性の尿道下裂は、様々な遺伝子変異や染色体異常によりしばしば生じることは明らかにされてきたが<sup>15</sup>、本研究結果により、依然として、severe type (posterior) の尿道下裂の方が mild type (anterior) よりも強い関連は有るとは考えられるものの、単一遺伝子変異は mild type (anterior) の尿道下裂を含め、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。

病的変異の同定により、疾患による結果の予測が可能となり、遺伝子カウンセリングの正確さの向上にも寄与すると考える。本研究より、様々なタイプの尿道下裂において変異が同定され得る事を示した。よって多くのタイプの尿道下裂症例において遺伝子検査が施行されるべきであると考ええる。

本研究の限界を以下に示す。

## 1. 人種

本研究においては遺伝子検索を施行した人種は日本人とベトナム人のみである。緒言でも述べたように人種毎に尿道下裂の罹患率も異なる事から<sup>2-5,39</sup>、人種特異的な尿道下裂の原因も存在すると考える。例えば、アメリカ合衆国においては、尿道下裂の原因として *ATF3* の変異が 10%以上に存在すると報告されているが<sup>40</sup>、本研究では *ATF3* の変異が同定された症例は存在しなかった。また、本研究における *HSD3B2* の p. A10T 変異や、*SRD5A2* の p. R227Q 変異はベトナム人のみホモ接合性に認めており、日本人にはホモ接合性の変異は認めなかった。それゆえ、本研究の結果は単純に他人種に当てはめる事は出来ないと考える。

## 2. 検索遺伝子

本研究では、遺伝子変異スクリーニングを既報の 25 遺伝子に絞り、蛋白変異をもたらす変異や多型を解析した。遺伝子制御領域の変異や多型、本研究でスクリーニングしていない遺伝子における変異、また、エピジェネティック異常については、本研究における変異未同定の症例に存在する可能性は否定出来ない。よって、本研究での変異同定症例割合、すなわち、遺伝子要因による尿道下裂発症率は、実際よりも低く推定されている事が考えられる。

### 3. 臨床情報

本研究では、全ての症例から詳細な臨床情報を得る事は出来なかった。既報から遺伝子要因以外の様々な要因、例えば、低出生体重や胎盤機能不全、母体の高血圧等が尿道下裂の発症要因として明らかにされているが<sup>41-44</sup>、本研究での症例において、それらの環境要因が尿道下裂の表現形に及ぼす影響は検討出来なかった。さらに、病因変異を有する症例においても、内分泌データを得られなかった症例が多く、それらの変異によるホルモンデータへの影響を明らかにする事は、今後の研究課題と言える。

## 総括、結論

本研究により、明らかとなった新知見

1. 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事を示した。
2. 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事を示した。
3. 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を初めて明らかにした。

## 新知見の意義

これまでの知見では予測出来なかった多遺伝子の解析により、単一遺伝子変異および染色体微細構造異常が本症の発症に関与し得ることが分かった。さらに、様々なタイプの尿道下裂においても遺伝子異常の関与が示唆された事により、今後様々な尿道下裂症例において、遺伝子スクリーニングを行う価値があると考え、本症において遺伝子スクリーニングの重要性を示す事が出来たと考える。また、多遺伝子変異の関与が示唆されたため、遺伝子相互間の作用機序の解明等、今後の研究の土台となる可能性を持った知見と考える。

## 今後の研究、課題

本研究では、まれな一塩基多型に関して、本症発症との関連を示せず、その病因への役割は不明なままである。更に解析症例数を増やし、一塩基多型に関しても何らかの知見を得る事が必要である。

本研究は既報の 25 遺伝子のみを検索を行った。既報の原因遺伝子以外の遺伝子検索が必要と考える。例えば、家族発症例におけるエクソーム解析を行う事が有用と考える。

## 謝辞

本研究は、著者が北海道大学大学院医学研究科医学専攻博士課程在籍中の研究成果をまとめたものである。稿を終えるにあたり本研究の機会を賜りました同大学院医学研究科腎泌尿器外科学分野、野々村克也前教授（現名誉教授）、篠原信雄教授に深甚なる謝意を表します。さらに実際の研究の場となった国立成育医療研究センター分子内分泌研究部の深見真紀部長に研究デザインや手技、論文作成に至るまで、多大なるご協力を頂き、心より感謝申し上げます。また、研究技法をご指導いただきました同研究部のスタッフの皆様に心からお礼申し上げます。最後に、本研究において最も重要である尿道下裂患児およびそのご両親へ説明と同意をして頂き、成育医療研究センターに検体を送付して頂いた各協力施設の諸先生に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

1. Kurahashi, N. *et al.* The estimated prevalence of hypospadias in Hokkaido, Japan. *J. Epidemiol.* **14**, 73-77 (2004).
2. Nassar, N., Bower, C. & Barker, A. Increasing prevalence of hypospadias in Western Australia, 1980-2000. *Arch. Dis. Child* **92**, 580-584 (2007).
3. Blaschko, S.D., Cunha, G.R. & Baskin, L.S. Molecular mechanisms of external genitalia development. *Differentiation* **84**, 261-268 (2012).
4. Yang, J., Carmichael, S.L., Kaidarova, Z. & Shaw, G.M. Risks of selected congenital malformations among offspring of mixed race-ethnicity. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.* **70**, 820-824 (2004).
5. Nelson, C.P. *et al.* The increasing incidence of congenital penile anomalies in the United States. *J. Urol.* **174**, 1573-1576 (2005).
6. Sun, G., Tang, D., Liang, J. & Wu, M. Increasing prevalence of hypospadias associated with various perinatal risk factors in chinese newborns. *Urology* **73**, 1241-1245 (2009).
7. Porter, M.P., Faizan, M.K., Grady, R.W. & Mueller, B.A. Hypospadias in Washington State: maternal risk factors and prevalence trends. *Pediatrics* **115**, e495-e499 (2005).
8. Abdullah, N.A. *et al.* Birth prevalence of cryptorchidism and hypospadias in northern England, 1993-2000. *Arch. Dis. Child* **92**, 576-579 (2007).
9. Wu, W.H. *et al.* Developmental anomalies and disabilities associated with hypospadias. *J. Urol.* **168**, 229-232 (2002).
10. Wang, Y. *et al.* Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 706-712 (2004).
11. Chen, T. *et al.* Mutation screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 genes in Chinese patients with hypospadias. *Eur. J. Hum. Genet.*

- 15, 23–28 (2007).
- 1 2. Köhler, B. *et al.* The spectrum of phenotypes associated with mutations in steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) includes severe penoscrotal hypospadias in 46,XY males without adrenal insufficiency. *Eur. J. Endocrinol.* **161**, 237–242 (2009).
  - 1 3. Schnack, T.H. *et al.* Familial aggregation of hypospadias: a cohort study. *Am. J. Epidemiol.* **167**, 251–256 (2008).
  - 1 4. van Rooij, I.A. *et al.* Risk factors for different phenotypes of hypospadias: results from a Dutch case-control study. *BJU Int.* **112**, 121–128 (2013).
  - 1 5. van der Zanden, L.F. *et al.* Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment. *Hum. Reprod. Update* **18**, 260–283 (2012).
  - 1 6. Kojima, Y. *et al.* Molecular analysis of hypospadias in a boy with dicentric Y chromosome. *J. Urol.* **165**, 1244–1245 (2001).
  - 1 7. Tannour-Louet, M. *et al.* Identification of de novo copy number variants associated with human disorders of sexual development. *PLoS One* **5**, e15392 (2010).
  - 1 8. Kon, M. & Fukami, M. Submicroscopic copy-number variations associated with 46,XY disorders of sex development. *Mol. Cell. Pediatr.* **2**:7–14 (2015).
  - 1 9. Fukami, M. *et al.* CXorf6 is a causative gene for hypospadias. *Nat. Genet.* **38**, 1369–1371 (2006).
  - 2 0. Miyado, M. *et al.* Maml1 Deficiency Significantly Reduces mRNA Expression Levels of Multiple Genes Expressed in Mouse Fetal Leydig Cells but Permits Normal Genital and Reproductive Development. *Endocrinology* **153**, 6033–6040 (2012).
  - 2 1. Nakamura, M. *et al.* Maml1 knockdown reduces testosterone production and Cyp17a1 expression in mouse Leydig tumor cells. *PLoS One* **6**, e19123 (2011).
  - 2 2. Igarashi, M. *et al.* Cryptic Genomic Rearrangements in Three Patients with 46,XY Disorders of Sex Development. *PLoS One*

- 8, e68194 (2013).
- 2 3. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
  - 2 4. Adzhubei, I.A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–249 (2010).
  - 2 5. Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D. & Haussler, D. Improved splice site detection in Genie. *J. Comput. Biol.* **4**, 311–323 (1997).
  - 2 6. Cooper, G.M. *et al.* A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat. Genet.* **43**, 838–846 (2011).
  - 2 7. Melo, K.F. *et al.* Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 3241–3250 (2003).
  - 2 8. Cargill, M. *et al.* Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet.* **22**, 231–238 (1999).
  - 2 9. Sasaki, G. *et al.* Micropenis and the 5alpha-reductase-2 (SRD5A2) gene: mutation and V89L polymorphism analysis in 81 Japanese patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 3431–3436 (2003).
  - 3 0. Fukami, M. *et al.* Mastermind-like domain-containing 1 (MAMLD1 or CXorf6) transactivates the Hes3 promoter, augments testosterone production, and contains the SF1 target sequence. *J. Biol. Chem.* **283**, 5525–5532 (2008).
  - 3 1. Sata, F. *et al.* Genetic polymorphisms of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 and the risk of hypospadias. *J. Sex. Med.* **7**, 2729–2738 (2010).
  - 3 2. Kalfa, N. *et al.* Polymorphisms of MAMLD1 gene in hypospadias. *J. Pediatr. Urol.* **7**, 585–591 (2011).
  - 3 3. Albers, N. *et al.* Etiologic classification of severe hypospadias: implications for prognosis and management. *J. Pediatr.* **131**, 386–392 (1997).
  - 3 4. Boehmer, A.L. *et al.* Etiological studies of severe or familial

- hypospadias. *J. Urol.* **165**,1246-1254 (2001).
- 3 5. Audi, L. *et al.* Novel (60%) and recurrent (40%) androgen receptor gene mutations in a series of 59 patients with a 46,XY disorder of sex development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**,1876-1888 (2010).
- 3 6. Codner, E. *et al.* Cassorla FG. Molecular study of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene type II in patients with hypospadias. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**,957-964 (2004).
- 3 7. Makridakis, N.M., di Salle, E. & Reichardt, J.K. Biochemical and pharmacogenetic dissection of human steroid 5 alpha-reductase type II. *Pharmacogenetics* **10**,407-413 (2000).
- 3 8. Drummond-Borg, M. *et al.* Nonfluorescent dicentric Y in males with hypospadias. *J. Pediatr.* **113**,469-473 (1988).
- 3 9. Serrano, T. *et al.* International geographic correlation study of the prevalence of disorders of male reproductive health. *Hum. Reprod.* **28**,1974-1986 (2013).
- 4 0. Kalfa, N. *et al.* Genomic variants of ATF3 in patients with hypospadias. *J. Urol.* **180**,2183-2188 (2008).
- 4 1. Stoll, C., Alembik, Y., Roth, MP. & Dott, B. Genetic and environmental factors in hypospadias. *J. Med. Genet.* **27**,559-563 (1990).
- 4 2. Weidner, I.S., Møller, H., Jensen, T.K. & Skakkebaek, N.E. Risk factors for cryptorchidism and hypospadias. *J. Urol.* **161**,1606-1609 (1999).
- 4 3. Fredell, L. *et al.* Heredity of hypospadias and the significance of low birth weight. *J. Urol.* **167**,1423-1427 (2002).
- 4 4. Brouwers, M.M. *et al.* Hypospadias: risk factor patterns and different phenotypes. *BJU Int.* **105**,254-262 (2010).