

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10652

研究課題名(和文) 造精機能障害診断ツールとしての精漿中microRNA発現プロファイルの解析

研究課題名(英文) Expression profiling of microRNAs in seminal plasma as a new tool for diagnosis of spermatogenic disorder

研究代表者

吉池 美紀 (Yoshiike, Miki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：60398964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：精漿中のマイクロRNAの発現プロファイルから、造精機能障害で特異的に発現が変化するmiRNAを見出し、診断や研究に役立つバイオマーカーとしての可能性を検討した。精漿のmiRNAマイクロアレイによる網羅的解析から候補を絞り込み、造精機能障害で変動している8個のマイクロRNAからなる評価パネルを作成した。精漿におけるこれらマイクロRNAの発現量をリアルタイムPCRにて定量した結果、miR891a-5pは閉塞性無精子症において有意に減少し、miR-1229-3pはmaturation arrest群において有意に増加することを見出した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to assess the utility of microRNAs (miRNAs) as new biomarkers for diagnosis of spermatogenic disorder and clinical or basic research of andrology. We found the miRNAs showing altered expression specifically in patients with impaired spermatogenesis based on expression profiles of in seminal plasma. Finally, we generated an expression panel with 8 miRNAs related to impaired spermatogenesis through comprehensive microarray analysis of candidate miRNAs. Determination of miRNA expression levels in seminal plasma with real-time PCR revealed that miR-891a-5p was significantly decreased in the patients with obstructive azoospermia, and miR-1229-3p was significantly increased in the patients with germ cell maturation arrest.

研究分野：生殖医学

キーワード：造精機能障害 マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

現在、無精子症をはじめとする精子形成不全の多くは原因不明の特異性造精機能障害と診断されている。これは、精子形成不全が種々の原因で起こり得ることと、その発症メカニズムがまだよく解明されていないことに起因する。近年の生殖補助医療技術の進歩により、障害のある精巣から精子や精細胞を回収できれば、顕微授精によって拳児を得ることが可能になった。しかし、自然妊娠につながる根本的な治療には、精子形成障害の原因に対応したバイオマーカーの開発と、原因究明に役立つ新たな研究ツールが必要である。

miRNA は 20 数塩基からなる non-coding RNA で、転写後調整による遺伝子の発現抑制効果により遺伝子発現調節を行っている。現在 2000 以上の miRNA が同定され、それらが、発生・分化・形態形成、細胞増殖や発癌など多くの生命現象に深く関わっていることが明らかになっている。特に癌の発生や進展に関連づけられる多数の miRNA が同定されており、日本では 2014 年、国立がんセンターを中心とした産学官連携プロジェクトが立ち上がり「1 回の採血で 13 種類のがんを発見する診断システム」の開発に着手した (2014.6.13 NEDO ニュースリリース)。

一方、男性不妊と miRNA の関連を検討した報告も 2010 年以降徐々に増加し、2013-14 には 20 件ほど検索される。しかし、材料として精巣組織や精子などの細胞を用いた検討がほとんどで、体液を用いた検討は少ない。精漿について網羅的検討が行われているのは 2 件で、非閉塞性無精子症において発現が亢進している 3 つの miRNA (Wang et al, Clin Chem 57:1722-, 2011) および無精子症で発現が低下し、かつ精子無力症で亢進している 7 つの miRNA (Wu et al, Hum Reprod 28:1827-, 2013) が報告されている。しかしどちらも検討症例数が少なく、その後の報告もないため、診断法への応用はまだまだ研究途上にあると言ってよい。

研究代表者らは国立がん研究センター落谷研究室との共同研究で既に膀胱腫瘍、前立腺癌に関連する血中、尿中 miRNA の研究を行っており、今回この技術を精漿に応用する。また、当研究室では正常男性(約 1000 例)および男性不妊症患者(500 名以上)の検体ライブラリを有しており、近年これを用いた後方視的な検討から多数の成果を上げている。これらの試料は精液検査、遺伝子異常、内分泌検査などの臨床データがそろっており、厳選して明確な定義の検体を用いて研究を進めていくことが可能である。そこで本研究では、精液中の miRNA が精子形成不全の種々の原因ごとに特徴的な発現プロファイルを示すことが予測されることから、非侵襲的に採取できる精液中の miRNA を、造精機能障害と関連付けて分析することを計画した。

2. 研究の目的

臨床データに基づいて可能な限り明確に定義された造精機能障害の患者群と正常群の間で、精漿中の miRNA の発現プロファイルを比較し、造精機能障害で特異的に発現が変化する miRNA を検出する。検出された miRNA 発現プロファイルを患者の臨床データと対比させて、指標となる miRNA の候補を決定する。次にそれらの miRNA を用いて多数例の患者群と正常群をスクリーニングし、造精機能障害の病因予測や病態把握あるいは精子形成の研究に役立つバイオマーカーとしての可能性を検討する。さらに、造精機能を反映する miRNA パネルをもとに造精機能障害診断システムの構築を目指す。

3. 研究の方法

1) 対象と試料の選択

精子形成障害で特異的に発現が変化する miRNA を見出すためには、試料を得る対象の定義を可能な限り明確にする必要がある。そこで精漿を保存してある不妊患者約 500 例と正常男性約 1000 例の中から、臨床データならびに精巣生検の組織像に基づいて miRNA の網羅的発現解析に用いる検体を選定した。

2) 精漿からの total RNA 抽出法の検討

精漿は蛋白濃度や粘性が高く、通常の方法だけでは純度が非常に低い total RNA しか抽出できないため、精漿からの最適な抽出法を検討した。

3) miRNA マイクロアレイ解析

選定された造精機能障害の症例 6 例 (2 例×3 群) と正常男性 2 例の精漿から RNA を抽出し、quality を検討した後、Agilent Sure Print G3 Human miRNA microarray (miRBase21)にて網羅的発現解析を行った。つぎに GeneSpring GX を用いて解析し、検体ごとの miRNA の発現プロファイルを作成した。

4) miRNA 評価パネルの作製

作成したプロファイルを解析し、症例 3 群の miRNA 発現をそれぞれ正常対照群のプロファイルと比較し、各症例群で発現が有意に変動している miRNA を抽出する。各群を分類するために必要な miRNA だけを複数個を抽出し、マーカー候補 miRNA による評価パネルを作製する。

5) 精漿中の miRNA を指標とした造精機能評価スクリーニングのための検討

様々なタイプの症例を含む不妊症患者について、精漿中のマーカー候補 miRNA をリアルタイム PCR を用いて定量した。miRNA の発現量と臨床データとの比較から、造精機能障害の程度や精巣組織・細胞の成熟度、Y 染色体の微小欠失の有無などを miRNA のプロファイルから予測することの可能性を検

討した。

4. 研究成果

1) miRNA 網羅的解析用検体の選定

まずは精巢生検組織を病理学的に見直し、主に Johnsen score (JS)を指標として厳密に定義できる sertoli cell only (SCO, JS: 2.0), maturation arrest (MA, J: 4-6), obstructive azoospermia (OA, JS: 8 以上)、ならびに正常検体として妊孕能を有する男性 (Fertile men, FE) のうち特に造精機能のパラメーターが高い個体を選択し、それらの精漿をライブラリから選出した。

2) 精漿からの total RNA 抽出法の検討

初めにグアニジンチオシアネート溶液 (Trizol)を用いて抽出、イソプロパノール沈殿の後、さらにスピнкаラム (miRNeasy Plasma kit, Qiagen) にて精製する方法が最も純度の高い RNA を抽出することができた。200uL の精漿から抽出した total RNA の収量は 407ng ~ 1306ng で 260/280 比は 1.37-1.55 であった。

3) miRNA マイクロアレイ解析

RNA の純度が高かった検体から FE 3 例、SCO 2 例、MA 2 例、OA 1 例を解析用検体として DNA チップ研究所に委託して miRNA マイクロアレイ (Agilent) を用いてアレイ解析を行った。精漿から抽出した RNA の RNA integrity number は 1.7-2.8 と非常に低かったが miRNA の解析には問題がないと考え、各検体スタート量 small RNA 10ng にて解析した。クラスタリング解析では各群の階層が明確に分かれる傾向は見られなかったが、主成分分析より第三主成分まで含めると累積寄与率が 70%を超えることから、これらの主成分によりデータの発現傾向が説明出来た (Fig.1)。

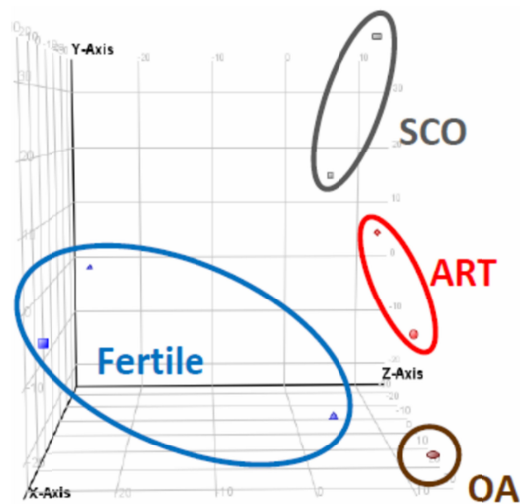


Fig.1 miRNAマイクロアレイ解析結果の主成分分析

FE と比較して発現上昇していた miRNA の数は SCO : 178, MA:94, OA:238、発現が低下

していた miRNA は SCO : 27, MA:170, OA:12 であった。

4) 造精機能評価パネルの作製と精漿中マイクロ RNA の定量解析

8 種類のマイクロ RNA (miR-200a-5p, 370-3p, 605-5p, 1307-5p, 3170, 3934-5p, 891a-5p, 1229-3p) からなる造精機能障害の評価パネルを作成し、精漿におけるこれらマイクロ RNA の発現量をリアルタイム PCR にて定量した。マイクロ RNA 発現量は RNU6B を内部標準とした Ct 値として表した。8 種類の miRNA のうち、精漿において恒常的に発現が認められたのは 6 種類であった。各群における発現量を Table 1 に示す。

Table. 1 各群における精漿中miRNA発現量

miRNA	FE n=15	MA n=6	AZF n=4	SCO n=15	OA n=6	p
370-3p	6.29 ± 0.78	6.91 ± 0.69	6.38 ± 0.14	6.26 ± 0.90	6.09 ± 0.62	0.3925
605-5p	-3.85 ± 1.57	-5.30 ± 1.39	-5.79 ± 1.78	-6.01 ± 2.79	-5.93 ± 2.23	0.0771
891a-5p	3.78 ± 1.06	2.15 ± 1.16	1.84 ± 0.50	2.40 ± 1.17	-1.65 ± 2.87	<0.0001
1229-3p	3.82 ± 0.89	5.52 ± 0.49	4.45 ± 0.27	4.26 ± 0.89	4.47 ± 0.89	0.0035
1307-5p	-0.89 ± 0.78	-0.41 ± 0.92	-0.41 ± 0.61	-0.39 ± 0.98	-0.65 ± 0.84	0.5748
3934-5p	4.61 ± 0.82	5.30 ± 0.14	5.01 ± 0.14	4.87 ± 1.10	5.17 ± 0.98	0.5289

FE: fertile men
MA: maturation arrest
AZF: AZF microdeletions of Y chromosome

SCO: Sertoli cell only syndrome
OA: obstructive azoospermia

このうち miR-891a-5p は各群間における発現量に有意差があり、FE 群にて高く、OA 群にて特に低下していた (Fig.2)。また、miR-1229-3p は MA 群において有意に高値であった (Fig.3)。

Fig.2 各群における精漿中miR-891a-5p 発現量

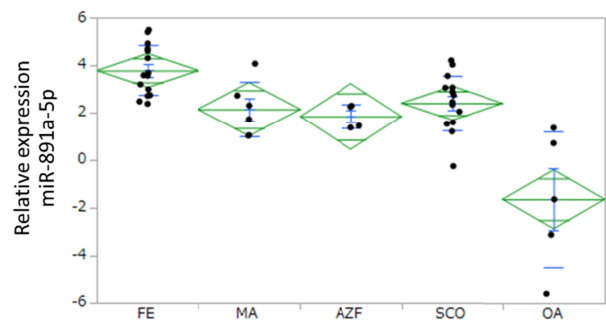
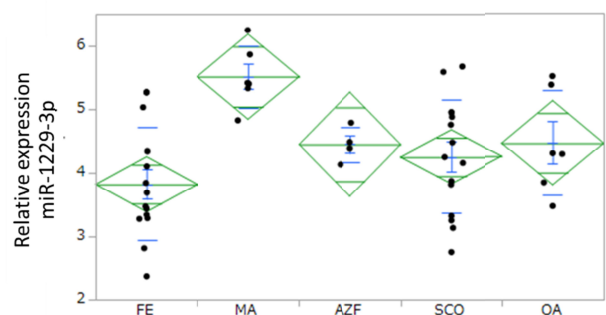


Fig.3 各群における精漿中miR-1229-3p 発現量



miR-891a-5p は OA 群においてのみ有意に低下していることから、精路閉塞を予測できる因子である可能性が高い。また miR-1229-3p は MA 群で発現が高いことから、精細胞の成熟停止に伴い分泌が増えることが示唆された。

以上より、精漿中マイクロ RNA は精子形成に関連して変動する因子であり、精漿における造精機能診断マーカーとなり得るツールであることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7件)

1. Sato Y, Tajima A, Sato T, Nozawa S, Yoshiike M, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T: Genome-wide association study identifies ERBB4 on 2q34 as a novel locus associated with sperm motility in Japanese men. J Med Genet. (査読有) in press, 2018.
2. Sato Y, Hasegawa C, Tajima A, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Yamauchi A, Iwamoto T. Association of TUSC1 and DPF3 gene polymorphisms with male infertility. J Assist Reprod Genet. (査読有) 35(2):257-263, 2018.
3. Yamasaki K, Yoshida K, Yoshiike M, Shimada K, Nishiyama H, Takamizawa S, Yanagida K, Iwamoto T: Relationship between Semenogelins bound to human sperm and other semen parameters and pregnancy outcomes. Basic Clin Androl. (査読有) 8;27:15, 2017.
4. Sato Y, Tajima A, Katsurayama M, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. A replication study of a candidate locus for follicle-stimulating hormone levels and association analysis for semen quality traits in Japanese men. J Hum Genet. (査読有) 61(11): 911-915, 2016.
5. Sato Y, Tajima A, Tsunematsu K, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. An association study of four candidate loci for human male fertility traits with male infertility. Hum Reprod. (査読有) 30(6):1510-1514, 2015.
6. Sato Y, Shinka T, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Yamauchi A, Iwamoto T, Nakahori Y: Y

chromosome haplogroup D2a1 is significantly associated with high levels of luteinizing hormone in Japanese men. Andrology. (査読有) 3(3):520-5, 2015.

7. Sato Y, Tajima A, Tsunematsu K, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T: Lack of replication of four candidate SNPs implicated in human male fertility traits: a large-scale population-based study. Hum Reprod. (査読有) 30(6):1505-1509, 2015.

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉池 美紀 (Yoshiike, Miki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号: 60398964

(2)研究分担者

岩本 晃明 (Iwamoto, Teruaki)

国際医療福祉大学病院・教授

研究者番号: 60046117

(4)研究協力者

小坂 展慶 (Kosaka, Nobuyoshi)

野澤 資亜利 (Nozawa, Shiari)