

令和元年6月14日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11077

研究課題名(和文) 次世代シーケンサーによるヒト男性不妊症及び不育症の原因遺伝子同定

研究課題名(英文) identification of the genes causing male infertility and habitual abortion by next generation sequencing in human

研究代表者

宮本 敏伸 (MIYAMOTO, TOSHINOBU)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：70360998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、不妊症の約半数を占める重要な原因因子である男性不妊症及び不育症の原因遺伝子群の同定及びその病態機序を遺伝学的に解明することで、男性不妊症における、より低侵襲かつ確かな診断法を確立し、世界的な生殖医学分野のレベルアップに貢献することを目的とした。今日までヒト無精子症患者からのDNAを用いて次世代シーケンシング法によるエクソーム解析を行い、ヒトの全遺伝子群からすでにSCOS及びMAによる無精子症の原因候補遺伝子群を12個同定できた。それらすべてのノックアウトマウスを作製し、現在機能解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト男性不妊症の原因遺伝子は多岐にわたるとされているものの、今日まで世界的に原因遺伝子として同定されたのはわずかにおよそ10遺伝子である。今日までヒト無精子症患者からのDNAを用いて次世代シーケンシング法によるエクソーム解析を行い、ヒトの全遺伝子群からすでにSCOS及びMAによる無精子症の原因候補遺伝子群を12個同定できた。それらすべてのノックアウトマウスを作製し、現在機能解析中である。よって本研究は世界のトップレベルを走っていると自負する。

研究成果の概要(英文)：In this study, identification of the causative genes of male infertility and habitual abortion, which are important causative agents that account for about half of infertility, and genetic elucidation of the pathophysiology of their pathogenesis, in male infertility We aimed to establish a less invasive and accurate diagnostic method and contribute to the improvement of the world of reproductive medicine. To date, exome analysis by next-generation sequencing was performed using DNA from human azoospermia patients, and 12 candidate gene groups responsible for azoospermia due to SCOS and MA were already identified from all human gene groups. All those knockout mice were generated and are currently under functional analysis.

研究分野：生殖医学

キーワード：azoospermia male infertility habitual abortion gene

1. 研究開始当初の背景

現在日本の最も深刻な社会問題の一つとして間違いなく少子化問題が存在する。しかしながら、その背景として近年日本では、不妊症及び不育症患者が増加傾向にあることは一般的にはあまり認識されていない。本研究では、不妊症の約半数を占める重要な原因因子である男性不妊症の原因遺伝子群及び病態を解明し、また同時に現在原因不明とされている不育症の原因を遺伝学的に解明することにより、男性不妊症及び女性不育症における、より低侵襲かつ的確な診断法を確立することにより、臨床医学への応用をはかり、世界的な生殖医学分野のレベルアップに貢献することを本研究の目的とする。

2. 研究の目的

(1) 今日、日本の最も深刻な社会問題の一つとして間違いなく少子化問題が存在する。しかしながら、その背景として先進国において不妊症カップルが増加傾向にあることは一般的にはあまり認識されていない。現在日本では、約10から15%のカップルが挙児希望をもちながら不妊に悩まされている。今日までの体外受精、顕微授精さらにはMDTESE-ICSI法に代表される不妊治療のめざましい進歩により、不妊治療の成果は着実に進歩が認められるものの、男性不妊症特に精巣内にすら成熟精子を全く有していない、いわゆる非閉塞性無精子症は現在でも不妊治療の大きな壁となっており、有効な治療法が確立されていないのが現状である。多くの患者が遺伝学的な素因を示唆されているものの、その原因のほとんどは今なお明らかにされていない。

ヒト無精子症の原因として以前より、Y染色体上の部分的欠失 (Tiepolo & Zuffardi Hum Genet 1976) ことにAZF領域の欠失が報告されている。しかし、今日までこの領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として同定されたのは、DAZ, RBMY 及び USP9Y のわずか3つにすぎない (Rejio et al., Nat Genet 1995, Elliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, Sun et al., Nat Genet 1999)。世界的には今なお、多くの研究者がヒト無精子症原因遺伝子の検索をこのAZF領域において行っているものの、今日までのめざましい分子遺伝学の進歩にもかかわらず、最後に同定された原因遺伝子は実に16年前までさかのぼる。近年、私はその遺伝子変異により減数分裂停止に起因する無精子症を引き起こす新たな遺伝子、ヒトSYCP3を同定した (Miyamoto et al., Lancet 2003)。特筆すべき点はこのSYCP3はヒト12番染色体上に位置している点である。ヒトSYCP3はAZF領域以外で同定された世界で最初の無精子症原因遺伝子である。以上の研究成果により、私はヒト常染色体上にも多数のヒト無精子症原因遺伝子が存在すると確信し、今日まで研究を行ってきた。また世界的にも私が2003年ヒト12番染色体上に無精子症の原因遺伝子: SYCP3を同定して以来、常染色体上の遺伝子にもヒト男性不妊症の原因遺伝子検索が行われ、今日まで無精子症の原因としてヒトKLHL10 (17q21) (Yatsenko et al., Hum Mol Genet 2006); 巨大頭部精子症の原因としてヒトSPATA16 (3q26) (Dam et al., Am J Hum Genet 2007)さらには精子奇形の原因としてヒトAURKC (19q13) (Dieterich et al., Nat Genet 2007) 遺伝子の異常が報告されてきた。しかしながら、今日まで組織学的にヒト精巣内に胚細胞を全く有さない、ヒト無精子症のうち最も重度なSertoli cell only syndrome (SCOS)の原因遺伝子はこれまで同定されてこなかった。我々は、本年ノックアウトマウスの表現型をもとに、ヒトSCOS患者DNAを用いてヒトPLK4遺伝子のmutation解析を行い、ヘテロに13bpのdeletionをもつmutationを検出し、さらにこのmutationによりヒトPLK4遺伝子が本来持つ中心小体の増殖機能が完全に失われていることを同定し、ヒトSCOSの原因遺伝子としてヒトPLK4遺伝子の異常が存在することを世界で初めて証明した (Miyamoto et al., Andrology in press)。

ノックアウトマウスに代表されるマウスを用いた解析により、マウスにおける精子形成と幾つかの遺伝子の相関関係が明らかにされており、それらの知見をもとにこれまでヒト男性不妊症の原因遺伝子がいくつかに明らかになってきた。しかし、ノックアウトマウスの表現型が必ずしもヒトにおいて忠実に再現されている訳ではなく、この点がヒト男性不妊症の原因解明をより難しくさせている大きな要因である。そこで我々は、今まで世界的に行われてきたノックアウトマウスの作成、その後ヒトの相同遺伝子の解析を行うという方法ではなく、ヒト無精子症原因遺伝子をヒトからダイレクトに同定する方法で解析を進めている。具体的には、ヒト無精子症の中でも、組織学的に減数分裂停止 (MA) に起因するものおよびSCOSの患者DNAを用いて次世代シーケンサーによるエクソーム解析を行いヒトの全遺伝子から原因遺伝子の検索を行っている。

以上の研究を行うことにより、新たなヒト無精子症の原因遺伝子群を同定するとともに、さらにはいまだ明らかにされていない精子形成過程のメカニズムを明らかにする。現在、不妊症外来を訪れる挙児希望の夫婦のうち、精液検査から夫が無精子症と診断された場合、泌尿器科医とタイアップし、夫の内分泌学的検査 (血中LH, FSH, エストラジオール, テストステロン等)、染色体の核型分析、精巣の超音波検査及びY染色体AZF領域の微小欠失の有無の検索などが行われるが、これらの結果より精巣内に精子が存在するか否かある程度推測が可能なものの今日の医療では実際にMD-TESEを施行して初めて精子の存在の有無が判明するのが現状である。

本研究により、より低侵襲の無精子症原因の診断法の確立、精原細胞から成熟精子への体外培養への応用さらには体外培養下における遺伝子治療への道筋を構築し、ヒト男性不妊症治療の世界的なレベルアップに貢献することを本研究の第1の目的とする。

(2) 妊娠は成立するものの、流産を繰り返して出産まで至らないケースを一般に不育症と呼ぶ。このうち、3回以上流産を繰り返すものを習慣流産、2回繰り返すものを反復流産と呼び、両者は同様の検査及び治療を現在行っている。上述したように不妊症は体外受精などの治療によりその治療成績は着実に進歩しているものの、不育症に関してはその診断、治療ともにこれまで目覚ましい進展がなく現在でも治療困難な症例が極めて多く見受けられる。不育症の検査としては今日まで、女性の内分泌学的検査、画像診断法 (超音波検査、子宮鏡、子宮卵管造影、MRI

など)による子宮奇形、子宮筋腫、子宮腺筋症等の有無といった解剖学的因子、自己抗体の有無、血液凝固能検査さらには夫婦の染色体核型分析などが広く行われてきた。しかし、これらの精査を施行しても原因不明とされる症例が約 30-40%存在しその原因が明らかにされないケースが多く見受けられるのが現状である。

以前より何らかの遺伝子の異常によりヒトにおいても流産が引き起こされるのではないかと疑問が多く臨床医及び研究者のなかでは起こっていた。近年、私が 2003 年に単離し、その遺伝子変異によりヒト減数分裂停止に起因する無精子症を引き起こすと証明した (Miyamoto et al., Lancet 2003) SYCP3 遺伝子の異常が原因不明と診断された習慣流産患者の流産の原因の一つであることが、解析された 26 名中 2 名の患者において証明された (Bolor et al., Am J Hum Genet 2009)。SYCP3 遺伝子はその遺伝子異常により卵細胞の減数分裂異常を引き起こし、その結果習慣流産を引き起こすと明確に示された最初の遺伝子である。

減数分裂とは精子形成過程において不可欠な現象であるが、同時に当然卵細胞の分化にも必須の現象である。(1)で述べたように私は現在減数分裂異常に起因する無精子症の原因遺伝子検索をヒト全遺伝子において行っている。上記研究において同定された減数分裂異常を引き起こす遺伝子群は SYCP3 遺伝子同様、卵細胞形成過程における減数分裂過程にも重要な役割を有している可能性が強く疑われる。以上より、精子形成の減数分裂に重要とされた遺伝子のすべてにおいて原因不明の習慣流産患者において解析を行い、ヒトにおいて流産を引き起こす遺伝子群を新たに同定し、現在の医療レベルでは診断がつけられない患者への新たな検査法を構築する。以上を本研究の第 2 の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 私はこれまで、ヒト減数分裂停止 (MA) に起因すると診断された無精子症の原因遺伝子としてヒト SYCP3 遺伝子の同定 (Miyamoto et al., Lancet 2003)、さらに本年ヒト SCOS による無精子症の原因遺伝子としてヒト PLK4 遺伝子の同定に成功してきた (Miyamoto et al., Andrology in press)。世界的に男性不妊症の原因遺伝子の同定は主にノックアウトマウスで無精子症を呈した遺伝子をヒトにて検索するという流れで今日まで進められてきたが、ノックアウトマウスの表現型が必ずしもヒトにおいて忠実に再現されている訳ではなくこの点がこの領域の研究の進展をこれまで阻んできた。

今回我々はヒト無精子症のうちヒト減数分裂停止 (MA) 及び SCOS に起因する無精子症のヒト原因遺伝子群の同定を患者 DNA を用いてダイレクトに網羅的に解析を行う。本研究で用いられる全ての患者 (MA 及び SCOS) 及び正常コントロール群の Genomic DNA は全て文章による同意を得た後保管されている。加えて、全ての無精子症患者は染色体異常がないこと及びその Y 染色体上に微小欠失が存在しないこと、さらには精巣領域の感染症、外科的損傷及び下垂体機能不全などが無いことが確認されている。全てのサンプルは匿名性が保たれた状態で保管されている。具体的には以下の手順で実験を行う。

- 1) 現在までにヒト SCOS 患者の DNA 860 例を用いてすでに次世代シーケンスサーを用いたエクソーム解析が施行中であり、ヒト全遺伝子中からヒト SCOS 患者におけるその原因遺伝子の検索が進められている。
- 2) さらに、ヒト減数分裂停止 (MA) に起因する無精子症患者 DNA 620 例を用いて上記 1 と同様にエクソーム解析を行い、原因遺伝子の検索を行う。
- 3) 上記 1 及び 2 にて得られた原因遺伝子において、mutation を確認すべく従来のシーケンス法にて各々の遺伝子においてその mutation を再確認する。
- 4) 上記にて得られたヒト無精子症原因遺伝子に関して、その各々の遺伝子が持つ機能に準じて

Mutation 配列を有する配列を発現ベクターに導入して蛋白を抽出して、蛋白レベルの機能解析を行う。具体的な例をあげると、本来の機能が binding protein であれば蛋白結合能が失われてないか、転写因子であれば下流の遺伝子の発現量に変化がないかどうか、増殖因子であれば対象となる細胞の増殖能が低下していないかなどを正常コントロールの配列と mutation を有する配列をそれぞれ発現ベクターに導入して蛋白レベルで正常コントロールと比較してその機能低下が起こっていないかどうかを解析する。

上記研究にて MA 及び SCOS による無精子症の原因遺伝子が多数同定されることが期待される。

(2) 上記にて同定されたヒト無精子症を引き起こす新規遺伝子群に関して、それらの遺伝子が精子形成にどのように携わっているのかそのメカニズムを解析する。機能解析は時として膨大な時間と労力を要するため、重要なことは mutation を有する遺伝子のうちどの遺伝子を機能解析を進めるかを選択することである。まず最低 2 例以上に mutation を認めた遺伝子であることが最低条件であり、binding protein, growth factor などは上位の候補となる。各々の遺伝子が本来有する機能が mutation を持つことで消失もしくは低下していないかを検証する。1 例のみで mutation が認められた遺伝子は機能解析に進まずそのまま英文論文作成に進む。また本研究において一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) 部位が膨大な数の遺伝子において同定されることになる。SNP もヒト無精子症の原因として重要とされているため今後の研究のために全てのデータは厳重に保管する。

(2) 上記にて同定された無精子症原因遺伝子のうち、ヒト減数分裂に起因するものは次に、原因不明の習慣流産患者 92 名においてダイレクトシーケンス法にて mutation 解析を行う。

mutationがこれまでと別な部位に検出されたものに関してはそれぞれの遺伝子の蛋白レベルでの機能解析を行う。

4. 研究成果

本研究により、今日まで実にヒト無精子症原因遺伝子群を12個同定できた。それらすべてのノックアウトマウスを作製し、現在機能解析中である。また減数分裂異常に起因する無精子症に関する遺伝子にかんしては現在不育症患者250名において解析中である。なお同定された12個の遺伝子名については特許の関係上今回は記載しない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計18件)

1. Miyamoto T, Editorial comment to Autosomal gene defects investigation on male infertility in sertoli cell-only syndrome cases, International Journal of Urology, 2018, (IF:1.941)
2. Moe Minase, Toshinobu Miyamoto, Natsuki Hayashi, Gaku Minase, Kunihiro Nishiwaki, Kazuo Sengoku, A patient with a duplicate uterus, vaginal septum, and infertility diagnosed by laparoscopy and magnetic resonance imaging, Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology, 2018, (IF:0.404)
3. T. Miyamoto, T. Shin, M. Iijima, G. Minase, H. Okada, Y. Saijo, K. Sengoku, The poly(A) polymerase beta gene may not be associated with azoospermia caused by Sertoli-cell-only syndrome in Japanese patients by comparing patients and normal controls, Journal of Obstetrics and Gynecology, 2018, (IF:0.545)
4. Kumiko Ito, Tomoyuki Hanaoka, Naomi Tamura, Seiko Sasaki, Chihiro Miyashita, Atsuko Araki, Association between maternal serum folate concentrations in the first trimester and Children's Health, J Epidemiol, 2018, (IF:4.322)
5. Miyamoto T, Iijima M, Shin T, Minase G, Ueda H, Saijo Y, Okada H, Sengoku K, An association study of the single nucleotide polymorphism c190C>T (Arg64Cys) in the human testis-specific histone variant, H3t, of Japanese patients with Sertoli cell-only syndrome, Asian Journal of Andrology, 2017, (IF:3.259)
6. Hanaoka T, Tamura N, Ito K, Sasaki S, Araki A, Ikeno T, Miyashita C, Ito S, Minakami H, Cho K, Endo T, Baba T, Miyamoto T, Sengoku K, Kishi R; , Prevalence and Risk of Birth Defects Observed in a Prospective Cohort Study: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. , J Epidemiol. , 2017, (IF:4.322)
7. Minase G, Miyatake S, Nabatame S, Arai H, Koshimizu E, Mizuguchi T, Nakashima M, Miyake N, Saitsu H, Miyamoto T, Sengoku K, Matsumoto N, An atypical case of SPG56/CYP2U1-related spastic paraplegia presenting with delayed myelination, Journal of Human Genetics, 2017, (IF:2.942)
8. Nakanishi K, Oishi Y, Miyamoto T, Nakamura E, Nozawa A, Kitamura S, Sengoku K, Anti-E Alloimmunization in a Pregnancy with a Low Antibody Titer, Clinical and experimental Obstetrics and Gynecology, 2017, (IF:0.404)
9. T. Miyamoto, M. Iijima, T. Shin, G. Minase, H. Ueda, H. Okada & K. Sengoku, CUL4B mutations are uncommon in Japanese patients with Sertoli-cell-only syndrome and azoospermia, Journal of Obstetrics and Gynecology, 2017, (IF:0.545)
10. Nakanishi K, Miyamoto T, Murakami K, Ono M, Nozawa A, Sengoku K, Kitamura S, Naturally Conceived Heterotopic Pregnancy Treated with Abdominal Wall-lifting Laparoscopic Salpingectomy Using Spinal Anaesthesia, Journal Of Obstetrics and gynecology, 2017, (IF:0.545)
11. Ueda H, Miyamoto T, Minase G, Sengoku K, Prenatal diagnosis of a body stalk anomaly by a combination of ultrasonography and foetal magnetic resonance imaging, Journal of Obstetrics and Gynecology, 2017, (IF:0.545)
12. Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H, Sengoku K, Human Male Infertility and its Genetic Causes, Reprod Med Biol, 2016, (IF:0)
13. Minase G, Miyamoto T, Miyagawa Y, Iijima M, Ueda H, Saijo Y, Namiki M, Kazuo Sengoku K, Single-nucleotide polymorphisms in the human RAD21L gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia caused by meiotic arrest and Sertoli cell-only syndrome, Human Fertility, 2016, (IF:1.438)
14. Okamoto, Nakanishi K, Ono M, Nozawa A, Kitarura S, Miyamoto T, Sengoku K, Rectal perforation after incision of the vaginal canal following incorrect insertion of a Vagi-Pipe into the rectum during total laparoscopic hysterectomy, Journal of Obstetrics and Gynaecology, 2016, (IF:0.545)
15. Kawanishi Y, Saijo Y, Yoshioka E, Nakagi Y, Yoshida T, Miyamoto T, Sengoku K, Ito Y, Miyashita C, Araki A, Kishi R. , The Association between Prenatal Yoga and the Administration of Ritodrine Hydrochloride during Pregnancy: An Adjunct Study of the Japan Environment and Children's Study. , PLoS One. , 2016, (IF:2.766)
16. Ueda H, Minase G, Miyamoto T, Iijima M, Saijo Y, Nakashima M, Matsumoto N, Namiki M, Sengoku K, Single-nucleotide polymorphisms in ETV5: A risk factor for Sertoli cell-only

syndrome in Japanese men? , Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology , 2016 , (IF:0.404)

- 17. Miyamoto T, Abiko K, Itabashi A, Minase G, Ueda H, Sengoku K , MD-TESE-ICSI using fresh sperm resulted in a lower rate of miscarriage compared with frozen-thawed sperm , Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology , 2016 , (IF:0.404)
- 18. Sanai H, Miyamoto T, Minase G, Sanai Y, Ueda H, Sengoku K , A case of a pregnant patient with antiphospholipid antibody syndrome, deep vein thrombosis and heparin-induced thrombocytopenia who suffered an intrauterine fetal death , Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology , 2016 , (IF:0.404)

〔学会発表〕（計4件）

1. 水無瀬 萌, 宮本 敏伸, 水崎 恵, 寶田 健平, 北 香, 市川 英俊, 高橋 知昭, 加藤 育民, 片山 英人, 西脇 邦彦, 千石 一雄、当院における過去10年間の腹腔鏡下子宮筋腫核出術の検討、2018年
- 2. 川西 康之, 岸 玲子, 吉岡 英治, 西條 泰明, 吉田 貴彦, 宮本 敏伸, 千石 一雄, 伊藤 善也, 伊藤 佐智子, 宮下 ちひろ, 荒木 敦子 マタニティヨガ実践と切迫早産、早産との関連に関する検討日本産科婦人科学会 2018年
3. 水無瀬 学, 上田 寛人, 宮本 敏伸, 千石 一雄、減数分裂停止及びSertoli cell-only syndromeに起因する日本人無精子症患者におけるヒトRAD21L1遺伝子の解析に関する検討、日本産科婦人科学会、2018年
4. 水無瀬 学, 加藤 育民, 水無瀬 萌, 宮本 敏伸, 水崎 恵, 高橋 知昭, 千石 一雄、気胸の管理が必要となった希少部位子宮内膜症の2症例、日本女性医学学会雑誌 2018年

〔図書〕（計1件）

宮本敏伸 他、生殖補助医療(ART)、胚培養の理論と実際 （日本卵子学会）
2017年

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：千石 一雄

ローマ字氏名：(Sengoku Kazuo)

所属研究機関名：旭川医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：30163124