

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16784

研究課題名(和文) クラインフェルター症候群により解き明かされるX染色体の精子形成遺伝子群

研究課題名(英文) Spermatogenic genes of X chromosome elucidated by Klinefelter syndrome

研究代表者

飯島 将司 (Masashi, Iijima)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70749168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：クラインフェルター症候群の表現型異常には余剰X染色体上の遺伝子のうち、不活性化を回避している遺伝子群が原因であると考えられる。クラインフェルター症候群(KS)の患者8名および対象として正常核型の男性4名、女性4名の末梢血より得られたゲノムDNAを用いてマイクロアレイにて全ゲノムのメチル化状態を確認した。X染色体におけるメチル化の一致率はKS群と女性コントロール群との間で99.9%であった。X染色体不活性化を回避していると考えられるプローブは3315個あり、このうちプローブがCpGアイランドに存在し、KSの表現型異常に関与していると考えられる候補遺伝子は117個であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クラインフェルター症候群の症状に寄与している可能性がある遺伝子群として117個の遺伝子を候補として挙げる事ができた。これらのデータを基に、更に原因に寄与している遺伝子を絞り込むことによって、クラインフェルター症候群の症状の改善につながる治療法の開発などに寄与しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Phenotypic abnormality of Klinefelter's syndrome is considered to be caused by a group of genes on the extra X chromosome that avoid inactivation. The methylation status of the entire genome was analyzed by microarray using genomic DNA obtained from peripheral blood of 8 patients with Klinefelter syndrome (KS) and 4 males and 4 females with normal karyotype as controls. The concordance rate of methylation in X chromosome was 99.9% between KS group and female control group. There were 3315 probes considered to avoid X chromosome inactivation. Among these, there were 117 candidate genes considered to be involved in the phenotypic abnormality of KS because the probe is present in the CpG island.

研究分野：男性不妊症

キーワード：クラインフェルター症候群 メチル化 X染色体 精子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の原因として乏精子症、無精子症に代表される造精機能低下が最も多いが、生殖補助医療の発展に伴い精巣精子採取術によりごく少数でも精子を得ることができれば顕微授精により拳児を得ることができる時代となった。しかし、無精子症患者における精巣精子採取術での精子採取率は 30-40%程度にとどまっており、これは現時点でのこの治療法の限界ともいえる。造精機能障害の大半は原因不明であり、未だ解明されていない遺伝学的原因は数多く存在すると考えられる。

### 【X染色体の特徴】

#### X染色体不活性化

男性の核型は 46,XY であり女性の核型は 46,XX である。すなわち生存に必要な X 染色体は 1 本であり、女性においては X 染色体が 1 本余剰な状態といえる。X、Y の性染色体と 13、18、21 番染色体のみが余剰であっても生存可能であるが、Y 染色体、13、18、21 番染色体には遺伝子が少ないことから説明可能である。X 染色体には生存に不可欠な遺伝子が多く存在しており、余剰染色体が活性であった場合は通常生存不可能である。しかし、通常、余剰 X 染色体は不活化を受けており多くの余剰 X 染色体上の遺伝子は発現しないことで、遺伝子の発現量の均衡が取れている。

#### X染色体不活性化回避遺伝子

余剰な X 染色体が全て不活性であると、男性 (46,XY) との間に遺伝子数の不均衡が生じることとなる。しかし、実際には一部の遺伝子が不活化を免れているため、この不均衡は解消されている。これら、X 染色体不活性化回避遺伝子が不足しているのがターナー症候群 (45,X) であり、過剰に存在しているのがクラインフェルター症候群 (47,XXY) である。いずれの疾患も生殖機能障害を来し、これら遺伝子が生殖細胞にとって重要であることが示唆される。

### 【クラインフェルター症候群】

男性不妊症の遺伝学的原因として最多であり、大半が非閉塞性無精子症の表現型を呈する。前述のとおり X 染色体不活性化回避遺伝子が余剰に存在することで表現型異常を呈していると考えられる。造精機能障害は全症例に共通の表現型であるが、その他の教科書的に知られる高身長、女性化乳房、精神遅滞は表現型の頻度としては少ない。X 染色体不活性化遺伝子には常に不活化を回避する遺伝子とそうでない遺伝子が存在し、表現型の多様性は X 染色体不活性化を回避する遺伝子群のパターンにより規定されていると考えられる。

## 2. 研究の目的

クラインフェルター症候群 (KS) の染色体核型は 47,XXY で、1 つの余剰な X 染色体が高度精子形成障害を引き起こす。余剰 X 染色体は通常染色体レベルで不活性化を受けているが、一部の遺伝子が不活性化を免れることが知られている。この X 染色体不活性化回避遺伝子群が KS の表現型異常を引き起こしていると考えられているが、解析の報告は小規模なものがわずかにあるのみである。KS における X 染色体不活性化回避遺伝子群を多数の検体で網羅的に調べることで、KS の精子形成障害を来す候補遺伝子群を明らかにすることを目的とする。また、これら X 染色体遺伝子群を同定できれば、各遺伝子の変異を詳細に検討することで、今まで原因不明とされていた正常核型における精子形成能低下症例の原因解明にも繋がる可能性があり重要と考えられる。

## 3. 研究の方法

当教室で過去に収集された不妊患者の血液 DNA サンプルの中からクラインフェルター症候群の診断がついている 8 例および、コントロールとして正常染色体核型をもつ男性 4 名、女性

4名のものを用いた。メチル化の解析として Illumina 社の MethylationEPIC BeadChip 450k をもちいて DNA マイクロアレイで解析を行った。メチル化の程度は各群の 値の平均値をとり、 値の差が 0.2 以上あるものを優位にメチル化が異なる状態とした。メチル化を回避しているプローブの絞り込みとして、男性コントロール群で 値が 0.1 未満、対象群でも 値が 0.1 未満のプローブおよび男性コントロール群で 値が 0.8 以上、対象群で 値が 0.8 未満をカットオフ値とした。

#### 4. 研究成果

X 染色体に限って検討すると、クラインフェルター症候群と女性コントロール群の間でメチル化状態の一致率は 99.9% とほぼ同様のメチル化の状態であった (図 1)。

X 染色体におけるメチル化の状態を図 2 に示す。男性コントロール群 (青) では

値 0.1 未満のメチル化を受けていないプローブ (活性化状態) と 0.8 以上のメチル化されているプローブ (不活性化状態) が大半を占めている。一方で KS 群 (赤) では 値 0.5 および 1.0 あたりに多く、2 本の X 染色体がともにメチル化を受けているプローブは 値 0.8-1.0 程度、1 本のみ X 染色体がメチル化を受けているプローブは 0.5 前後、2 本ともメチル化を受けていない場合 0-0.2 程度であることが分かる。KS において 2 本ある X 染色体のうち 1 本は通常不活性化をうけているが、一部の遺伝子はメチル化を回避している。不活性化を回避している遺伝子における 値をもう一本の X 染色体のメチル化の状態によって以下の 2 つのパターンに分類した。

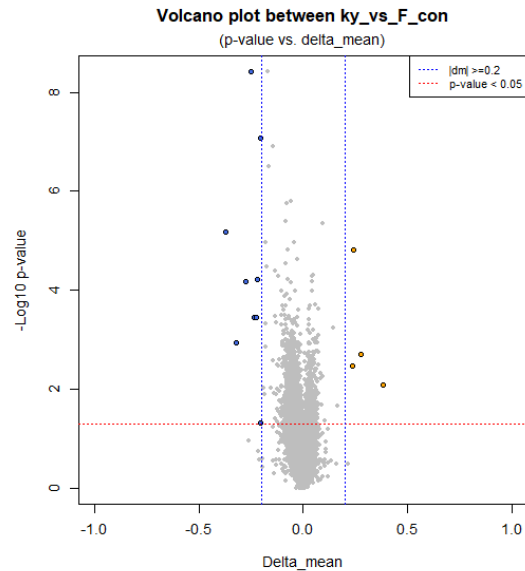


図 1 Volcano plot (女性コントロール群 vs KS 群)

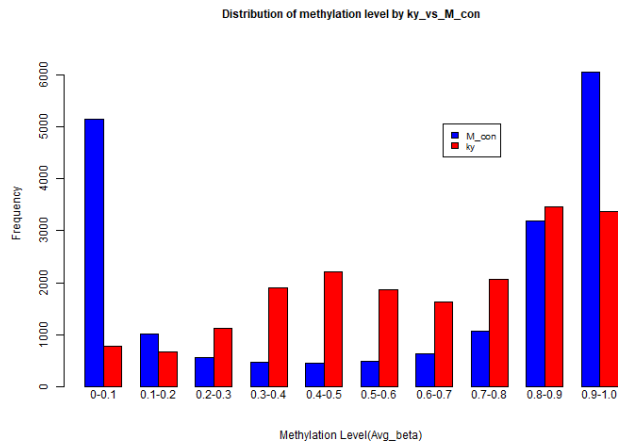


図 2 X 染色体におけるメチル化レベル別のプローブ数 (青: 男性コントロール群、赤: KS 群)

X 染色体において男性コントロール群で 値が 0.1 未満、対象群でも 値が 0.1 未満  
男性コントロール群で 値が 0.8 以上、対象群で 値が 0.8 未満

のグループには X 染色体上に設定されたプローブ 19087 個のうち 678 個あり、グループには 19087 個のプローブのうち 2647 個が認められた。これらのメチル化を回避しているプローブには 711 個の遺伝子が含まれていた。プローブの含まれる部位が CpG Island に限定すると 406 個のプローブ、117 個の遺伝子が抽出された。

本研究によりクラインフェルター症候群の表現型異常に関与する可能性がある遺伝子について

メチル化解析により X 染色体不活性化回避遺伝子を同定することで候補遺伝子を絞り込んだ。クラインフェルター症候群の表現型異常として精巣機能障害以外にも骨密度低下、代謝機能低下などを認めること、また、血液から得られたゲノム DNA によるメチル化解析による点から、精巣機能障害に関与する遺伝子に限定して絞り込むことは困難であるが、これら候補遺伝子群のなかから、更なる研究により表現型異常につながる遺伝子が発見されることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

##### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 田嶋 敦

ローマ字氏名:( Tajima Atsushi )

研究協力者氏名: 堀家 慎一

ローマ字氏名:( Horike Shinichi )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。