

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2007～2009
課題番号：19591887
研究課題名 (和文) ヒト無精子症原因遺伝子の同定および精子形成過程におけるメカニズムの解析
研究課題名 (英文) Identification of the genes causing azoospermia in human and analysis of the mechanism in spermatogenesis
研究代表者
宮本 敏伸 (MIYAMOTO TOSHINOBU)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：70360998

研究成果の概要 (和文)：

今日の日本の最も深刻な社会問題の一つとして少子化問題が存在する。その背景として近年先進国では不妊症カップルが増加傾向にあることは一般にはあまり認識されていない。ヒト不妊症の最も重要な原因の一つが男性因子である。そこで、我々はヒト無精子症、特にヒト減数分裂過程に関与する遺伝子の解析を行った。解析の結果ヒト MEISETZ 遺伝子、PARP-2 遺伝子および SPATA17 遺伝子がヒト精子形成過程とくにその減数分裂において重要な役割を担うことが提言された。

研究成果の概要 (英文)：

One of the most serious social problems facing Japan today is the declining birth rate. However, it is generally not well recognized that the number of infertile couples is on the rise in advanced nations. One of the most serious causes for infertility is male factor. Therefore, we analyzed the genes causing human azoospermia, especially meiosis. It was suggested that the human *MEISETZ*, *PARP-2* and *SPATA17* play critical roles in spermatogenesis, especially meiosis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2009 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：産婦人科学

キーワード：azoospermia, mutation, SNP, spermatogenesis

1. 研究開始当初の背景

今日の日本の最も深刻な社会問題の一つとして少子化問題が存在することは誰もが認めるところであるが、その原因のひとつである不妊症に関してはあまり議論されることはなかった。近年不妊に悩む夫婦の割合が増加傾向にあり、現在約 10%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 TESE-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状況にある。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のが現状である。

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。しかしながら、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 7 年前までさかのぼる。近年、私はその遺伝子変異により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最初の無精子症原因遺伝子である。以上より、私はヒト常染色体上にも多数の無精子症原因遺伝子が存在すると確信している。

2. 研究の目的

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いるものの、それらの知見がヒトにおいて還元されているケースはあまりにも少ない。加えて、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い。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、本研究で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今日までの常識を覆した方法をとっているのが特徴的であり、また独創的な点である。減数分裂異常による無精子症と診断された患者は世界的にも極めて少なく、その精巣組織は極めて貴重なものである。私は米国、イスラエルおよび国内の多施設の協力を得て現在まで 70 例の精巣組織を保持している。これらの組織及び正常組織を用いて differential screening 法を行った解析は今だ世界で例をみない。

私はまず、ヒト無精子症原因遺伝子を複数同定し、さらにノックアウトマウスによる解析を行いそのメカニズムを明らかにするという全く新しい手法で本研究を施行する予定である。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、とくにその減数分裂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 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最大の目的とする。

3. 研究の方法

私は differential screening 法を用いてヒト精子形成の減数分裂段階において重要な役割を担う新たな遺伝子群の単離を行う。正常な成人男性及び早期の減数分裂停止に起因する無精子症患者の精巣組織から抽出された RNA を利用する。本研究で用いられる全ての患者及び正常コントロール群の組織は米国、イスラエル及び国内の多施設で採取されたもので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。ヒト減数分裂をコントロールする遺伝子群を同定するために、正常成人および患者精巣から抽出された total RNA を用いてライブラリーを作成する。その後、Clontech 社の PCR-Select cDNA Subtraction Kit 及び PCR-Select Differential Screening Kit を用いて differential screening を施行し、正常精巣のみで発現し減数分裂異常による無精子症患者の精巣では発現を認めない cDNA 群を単離する。方法は全て Clontech 社のプロトコールに準ずる。その後、以下の手順で実験を行う。

- 1) 単離された cDNA 群が本当に正常精巣に特異的に発現しているかどうか確認するため、正常及び無精子症患者の精巣からの RNA をそれぞれ用いて RT-PCR 法を行う。同時に、単離された cDNA がヒトにおいて精巣特異的な発現パターンを示すものかを確認するため Clontech 社のヒト cDNA パネルを用いて PCR 法を施行する。
- 2) 単離された cDNA 群の詳細な発現パターンを得るために、単離された cDNA をプローブとして正常ヒト精巣組織にて in situ hybridization 解析を行う。最も重要なクローンは胚細胞特異的な発現を示すものであり、特に減数分裂以後その発現が消失するもの (A) である。減数分裂以後に特異的に発現するもの (B) 及び精子形成過程の様々な段階で発現しているもの (C) に関しては今後の研究のためにストックしておく。(in situ hybridization の結果仮に A に属するクローンが単離できなかった場合あるいは極めて少数だった場合は B, C のクロ

ーンも含めて解析を継続する。)

- 3) 2 で重要と判断された cDNA が新規のものか確認するためにシーケンス解析を行う。
- 4) 3 で新規遺伝子と同定されたものに関しては、5'RACE 及び 3'RACE 法にて full-length cDNA を単離する。推定されるアミノ酸配列から後の実験のための抗体を作成する。ヒトゲノムシーケンスと単離された cDNA の配列を比較し、全てのエクソン-イントロンボーダーを同定する。さらに、ノックアウトマウス作成の準備のためマウスゲノムとのシーケンス配列の相同性を利用してマウス cDNA を単離しておく。
- 5) 減数分裂異常に起因する無精子症患者 200 例からの genomic DNA を用いて、単離された遺伝子の coding region 及び隣接するイントロン領域において mutation 解析を行う。
- 6) mutation が検出された後、多型を否定すべく正常コントロールでも同部位をシーケンス解析する。

上記より、その mutation により無精子症を引き起こすと思われるヒト無精子症原因候補遺伝子群が複数単離される。さらに、蛋白レベルで機能解析を行い単離した遺伝子群が原因遺伝子であることを確定するとともにそのメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

- 1) 近年、マウス Hop2, Cdk2 及び Meisez 遺伝子のノックアウトマウスが報告された。これらのマウスは全て生殖能力を全く有していなかった。詳細な解析の結果、これらのマウス全てが精子形成過程における減数分裂異常に起因する無精子症を呈することが判明した。そこで我々はこれら 3 つの遺伝子が

ヒトでもヒト無精子症の原因遺伝子となりうるのではないかとの仮説をもとに解析を行った。対象となる患者はアメリカ人、イスラエル人及び日本人の計 55 名である。すべての患者及び正常コントロール群は文章によるインフォームドコンセントを得た後に血液から DNA を抽出し、また大学の倫理委員会の承認を得た後に解析が開始された。3 つの遺伝子における全ての coding region において mutation 解析を施行した。解析の結果、coding region 内においてヒト HOP2 遺伝子で 1 箇所、CDK2 遺伝子で 1 箇所さらに、MEISEZ 遺伝子で計 3 箇所の single nucleotide polymorphism (SNP) を検出した。これらの SNP において正常コントロール群とそのアレル、ゲノタイプの出現頻度を比較検討したところ、HOP2 及び CDK2 遺伝子では患者群とコントロール群で有意な差を認めなかった。しかしながら、ヒト MEISEZ 遺伝子においては今回検出された 3 つの SNP のうちその 2 箇所において患者群とコントロール群でそのアレルおよびゲノタイプの出現頻度において統計学的な有意差を認めた ($p < 0.05$)。本研究により、ヒト MEISEZ 遺伝子がヒト無精子症特にその精子形成過程における減数分裂に関与していることが示唆された。

- 2) 近年、マウス Parp-2 遺伝子が精子形成過程に関与していることが判明した。我々はヒト PARP-2 遺伝子と無精子症との関係を解析した。対象は減数分裂停止に起因する無精子症患者で、遺伝子の coding region で、ダイレクトシーケンス解析法により、mutation 解析を施行し、得られた多型部位において患者群とコントロール群において統計学的な解析を行った。その結果、ヒト PARP-2 において 5 つの SNP を検出し、患者群では正常コントロール群に比べ統計学的に有意な差を

認めた。結果、ヒト PARP-2 遺伝子が減数分裂停止に起因するヒト無精子症に関与していることが示唆された。

3) 2006 年マイクロアレイ法により減数分裂異常による無精子症患者の精巣においてその発現が低下している遺伝子がいくつか同定された。そこで我々はそのうちの一つである SPATA17 遺伝子に着眼し解析を行った。まず組織学的に減数分裂停止に起因する無精子症と診断された日本人患者 19 名及び妊孕性が確認されている正常コントロール 96 名から血液を採取し、DNA を抽出した。ヒト SPATA17 遺伝子の全ての coding region に隣接するイントロン部位にプライマーを設定し、nested PCR を行いダイレクトシーケンスにより mutation 解析を行った。得られた結果を統計学的に解析し、その有意差を検討した。解析の結果、エクソン 5, 6, 7 においてそれぞれ SNP1, SNP2, SNP3 を検出した。患者群と正常コントロール群でゲノタイプ及びアレルの出現頻度を検討したところ、SNP3 において患者群とコントロール群ではゲノタイプ ($p=0.00054$) アレル ($p=0.00075$) の出現頻度ともに統計学的に有意な差を検出した。本研究によりヒト SPATA17 遺伝子がヒト精子形成過程、特にその減数分裂に重要な役割を担うことが強く示唆された。

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 6 件)

1. Sakugawa N, Miyamoto T, Tsujimura A, Koh E, Miyagawa Y, Sato H, Namiki M, Okuyama A, Sengoku K. LMTK2 and PARP-2 gene polymorphism and azoospermia

secondary to meiotic arrest. J Assist Reprod Genet 26:545-552. 2009

2. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Sakugawa N, Miyakawa H, Sato H, Namiki M, Okuyama A, Sengoku K. A single nucleotide polymorphism in SPATA17 may be a genetic risk factor for Japanese patients with meiotic arrest. Asian J Androl. 11:623-628. 2009
3. 宮本敏伸、佐藤恒、佐久川直子、宮川博栄、千石一雄 ヒト無精子症とその要因 (総説) 北海道産科婦人科学会誌 53: 21-26, 2009
4. Miyamoto T, Koh E, Sakugawa N, Sato H, Hayashi H, Namiki M, Sengoku K. Two single nucleotide polymorphisms in PRDM9 (MEISETZ) gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. J Assist Reprod Genet. 25: 553-7. 2008
5. Sakugawa N, Miyamoto T, Sato H, Ishikawa M, Horikawa M, Hayashi H, Ishikawa M, Sengoku K. Isolation of the human ePAB and ePABP2 cDNAs and analysis of the expression patterns. J Assist Reprod Genet. 25:215-21. 2008
6. Miyamoto T, Yu YS, Sato H, Hayashi H, Sakugawa N, Ishikawa M, Sengoku K. Mutational analysis of the human MBX gene in four Korean families demonstrating microphthalmia with congenital cataract. Turk J Pediatr 49:334-6. 2007

[学会発表] (計 4 件)

2009年

宮本敏伸、教育講演： 男性不妊とその

要因 日本生殖医学会（金沢）

宮本敏伸、教育講演： ヒト無精子症に関わる遺伝子の解析、日本産婦人科学会北日本連合地方部会（札幌）

宮本敏伸、シンポジウム： ヒト無精子症に関わる遺伝子の解析、日本アンドロロジー学会（富山）

2007年

宮本敏伸、シンポジウム： ヒト無精子症原因遺伝子群、日本内分泌学会（東京）

〔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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

千石 一雄 (SENGOKU KAZUO)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30163124

(3) 連携研究者

()

研究者番号：