

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592388

研究課題名(和文)精子形成遺伝子群の網羅的解析による精子形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of spermatogenesis using a comprehensive analysis of genes related to human azoospermia

研究代表者

千石 一雄 (Sengoku, Kazuo)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：30163124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：UBR2, SEPTIN12, HORMAD1遺伝子に着目し、減数分裂異常による無精子症患者と正常コントロール群との比較解析を行い、UBR2, SEPTIN12およびHORMAD1遺伝子多型はヒト減数分裂異常による無精子症に関連することを明らかにした。また、ダイレクトシーケンスを用いたmutation解析を行った結果sertoli cell only syndrome (SCOS) 発生にSEPTIN12およびLRWD1遺伝子多型が関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the human UBR2, SEPTIN12 and HORMAD1 genes are associated with azoospermia by meiotic arrest using mutational analysis in Japanese patients with azoospermia. We found the genotypic and allelic frequencies of c.1,066A>T variant in UBR2, and the c.204G>C (Gln38His) variant in SEPTIN12 were associated with azoospermia. We also detected three polymorphism sites, SNP1, SNP2 and SNP3 were found in exons 3, 8 and 10 in HORMAD1. Both SNP1 and SNP2 were associated with human azoospermia with meiotic arrest. In addition, mutational analysis of LRWD1 was conducted, and three SNPs were identified in the patients with SCOS. The frequency of the SNP1,2 alleles of LRWD1 were significantly elevated in the SCOS group. Moreover, the genotype and allele frequencies in SNP3, SNP4, and SNP6 of SEPTIN12 were notably higher in the SCOS group than in the control. These results suggest that UBR2, SEPTIN12, HORMAD1 and LRWD1 might play critical roles in human spermatogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：無精子症 遺伝子 減数分裂異常 セルトリ細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の出生数の減少は我が国にとって大きな社会問題となっていることは周知の事実である。その要因として生涯未婚率の増加、晩婚化による女性の高齢化に伴う不妊の増加が指摘されているが、不妊の原因の 50%は男性に原因が存在することはあまり知られていない。男性不妊の治療に関しては、顕微授精法 (ICSI) の臨床への急速な普及により、無精子症例に対しても精巣組織から精子が取得可能な場合は児を得ることが可能となっている (TESE-ICSI)。しかし、精巣から成熟精子を取得できる確率は 50%にもみたくなく、そのような例では現在有効な治療法は存在しない。

男性不妊の遺伝因子に関しては近年の分子生物学的手法を駆使した種々の報告が認められ、特に、Y 染色体長腕の微小欠失 Azospermia factor region (AZF a, b, c, gr/gr) が精子形成障害に関与することが明らかにされている。しかし、AZF 領域に異常を認める症例はわずか数%程度と推定されている。このように精子形成障害症例の多くに遺伝学的素因が示唆されているものの、いまだ多くの謎に包まれている現状にある。

以上の経過より、我々は、精子形成に関与する遺伝子は Y 染色体上以外にも存在すると考え、精子形成に関与する遺伝子群を網羅的に解析することにより、精子形成メカニズムを解明することが可能であると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト精子形成に関与する複数の遺伝子を同定し、さらにそれらの遺伝子のノックアウトマウスを作製し機能解析を行うという逆行性遺伝学という新しい手法を用い、いまだ明らかにされていない精子形成過程を解明することである。さらに、本研究の遂行により、侵襲の少ない無精子症原因診断法の確立、精原細胞から成熟精子への体

外培養系の確立、さらに体外培養下の遺伝子治療への道筋の構築など男性不妊の病態の解明、治療法の確立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

減数分裂停止によるヒト無精子症原因候補遺伝子の解析

1) UBR2 遺伝子の解析

近年、UBR2^{-/-}雄マウスは減数分裂異常に起因する無精子症を呈し不妊であることが報告された。そこで、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された日本人患者 30 人および正常コントロール 80 名を対象にして解析した。

血液から DNA を抽出し、すべての coding region において mutation 解析を施行した。

2) SEPTIN12 遺伝子の解析

SEPTIN12^{+/-}キメラ雄マウスは不妊であることが報告されている。そこで、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された日本人患者 30 名と正常コントロール 140 名を対象にして mutation 解析を施行した。

3) HORMAD1 遺伝子の解析

HORMAD1 は減数分裂に関与し、ノックアウトマウスはオス、メスともに不妊を呈する。HORMAD1^{-/-}雄マウスの精巣では減数分裂停止による精子形成障害を認める。そこで、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された日本人患者 30 名と正常コントロール 80 名を対象にして mutation 解析を施行した。

ヒト Sertoli cell only syndrome (SCOS) の原因候補遺伝子の解析

1) SEPTIN12 遺伝子と SCOS 症例の検討

減数分裂停止、SCOS 患者および正常コントロール精巣を用いたマイクロアレイ解析により 10 個の遺伝子がヒト精子形成に関与することが報告されている。我々は SEPTIN12

遺伝子が減数分裂停止による無精子症と関連することを示したが、SCOS との関連に関しても検討を加えた。組織学的に SCOS による無精子症と診断された日本人患者 100 名と正常コントロール 140 名を対象にして mutation 解析を施行した。

2) LRWD1 遺伝子の解析

ヒト精巢のマイクロアレイ解析およびマウスでの検討成績から LRWD1 遺伝子が精子形成に密接に関与することが報告されている。そこで、組織学的に SCOS による無精子症と診断された日本人患者 100 名と正常コントロール 100 名を対象にして mutation 解析を施行した。

4. 研究成果

減数分裂停止によるヒト無精子症原因候補遺伝子の解析

1) UBR2 遺伝子の解析

Mutation 解析の結果 UBR2 遺伝子に 4 か所の新規 single nucleotide polymorphism(SNP) を検出した。このうちの SNP4 は患者群と正常群でアレルおよびゲノタイプの出現頻度に有意な差を認めた。本成績から UBR2 遺伝子は減数分裂停止によるヒト無精子症に関与することが示唆された。

2) SEPTIN12 遺伝子の解析

Mutation 解析の結果 SEPTIN12 遺伝子に 3 か所の SNP を検出し、このうちの SNP 1 (204 G>A) は患者群と正常群でアレルおよびゲノタイプの出現頻度に有意な差を認め、ヒト減数分裂停止無精子症との関連が示唆された。

3) HORMAD1 遺伝子の解析

Mutation 解析の結果 HORMAD1 遺伝子に 3 か所の SNP を検出し、1 つは新規の SNP であった。エクソン 3, 8 に認められた SNP1,2 は患者群と正常群でアレルおよびゲノタイプの出現頻度に有意な差を認め、ヒト減数分裂停止無精子症との関連が示唆された。

ヒト Sertoli cell only syndrome(SCOS)の原因候補遺伝子の解析

1) SEPTIN12 遺伝子と SCOS 症例の検討
Mutation 解析の結果 8 か所の SNP を検出し、このうち 7 つは新規の SNP であった。ハプロタイプ解析では SCOS 患者と正常群に有意な差は認められなかったが、SNP3,4,6 は患者群と正常群でアレルおよびゲノタイプの出現頻度に有意な差を認め SCOS 発生に関与することが示唆された。

2) LRWD1 遺伝子の解析

エクソン 3 と 13 に 3 か所の SNP を検出し、ハプロタイプ解析では SCOS 患者と正常群に有意な差は認められなかったが、SNP 1 と SNP 2 は患者群と正常群でアレルおよびゲノタイプの出現頻度に有意な差を認め SCOS による無精子症に関与することが示唆された。

以上の研究成績よりノックアウトマウスで減数分裂停止による無精子症の表現形を示す UBR2, SEPTIN12, HORMAD1 遺伝子が減数分裂停止によるヒト無精子症患者と関連を有することが明らかとなった。また、SEPTIN12 および LRWD1 遺伝子は SCOS による無精子症発症に関与することを明らかにした。

今後はこれら遺伝子の機能解析を進め、精子形成メカニズムの詳細を解析することにより無精子症の診断及び新たな治療法の開発が期待される。

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 8 件)

Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Saijo Y, Namiki M, Sengoku K: Single-nucleotide polymorphisms in the LRWD1 gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with Sertoli cell-only

syndrome. *Andrologia* 48(3):273-276, 2014

Miyamoto T, Akiba S, Sato N, Fujimura T, Takagi Y, Kitahara T, Takema Y, Iizuka H, Sengoku K: Study of the vulvar skin in healthy Japanese women: components of the stratum corneum and microbes. *Int J Dermatol*: 53(12) 1500-1505, 2013

Sengoku K, Miyamoto T, Horikawa M, Katayama H, Nishiwaki K, Kato Y, Kawanishi Y, Saijo T. Clinicopathologic risk factors for recurrence of ovarian endometrioma following laparoscopic cystectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 92(3) 278-284, 2013

Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Horikawa M, Saijo Y, Sengoku K. Single-nucleotide polymorphisms in *HORMAD1* gene may be a risk factor for azoospermia caused by meiotic arrest in Japanese patients. *Asian J Androl*, 14(4): 580-583, 2012

Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Horikawa M, Saijo Y, Sengoku K. Single-nucleotide polymorphisms in the *SEPTIN12* gene may be associated with azoospermia by meiotic arrest in Japanese men. *J Assist Reprod Genet*, 29(1):47-51, 2012

Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Sengoku K. Male infertility and its causes in human. *Adv Urol* 2012

Miyakawa K, Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Saijo Y, Namiki

M, Sengoku K. Single-nucleotide polymorphisms in the *SEPTIN 12* gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with Sertoli cell-only syndrome. *J Androl* 33(3):483-487, 2012

Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Horikawa M, Saijo Y, Sengoku K. Single nucleotide polymorphisms in the *UBR2* gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. *J Assist Reprod Genet* 28(8): 743-746, 2011

〔学会発表〕(計 3 件)

宮本敏伸、宮川博栄、千石一雄: ヒト Sertoli cell-only syndrome (SCOS) におけるヒト *LRWD1* 遺伝子の解析
日本産科婦人科学会 2013

宮川博栄、宮本敏伸、千石一雄
Sertoli-cell-only syndrome による無精子症患者群とヒト *SEPTIN12* 遺伝子の多型解析
北日本産科婦人科学会 2013

千石一雄: 男性不妊とその要因
日本産科婦人科医学会学術講演会 教育講演
2013

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

千石一雄 (SENGOKU KAZUO)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 30163124

(2) 研究分担者

宮本敏伸 (MIYAMOTO TOSHINOBU)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号 : 70360998