

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791638

研究課題名(和文) DNAメチル化異常による精子形成障害と不妊治療に及ぼす影響

研究課題名(英文) Spermatogenesis disturbance due to aberrant DNA methylation and its impact on fertility treatment

研究代表者

杉本 和宏 (SUGIMOTO, KAZUHIRO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70621837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック制御と男性不妊症との関係に関するエビデンスは増えている。今回我々は、プロモーター領域にTDMR(組織特異的メチル化可変領域)をもつGTF2A1L遺伝子に注目して研究を行った。86症例の非閉塞性無精子症の中で17症例がhypospermatogenesisの組織型であった。この中で、5例がTDMRの高メチル化群、12例が低メチル化群であった。TDMRの高メチル化は、GTF2A1L遺伝子発現の低下と関連していた。しかし、両群とも精子回収率、受精率、妊娠率、出生率に関して比較的好成績であり、GTF2A1L遺伝子発現の異常は妊娠率へは影響を与えていなかった。

研究成果の概要(英文)：The GTF2A1L gene promoter contains the DNA methylation site of a tissue-specific differentially methylated region (TDMR). Eighty-six patients with non-obstructive azoospermia were assessed for the DNA methylation state of CpG islands in the GTF2A1L promoter using testicular genomic DNA. Based on histological criteria, 17 of the 86 patients had hypospermatogenesis. Patients with hypospermatogenesis were divided into two subgroups: high DNA methylation(HM, n=5) and low DNA methylation (LM, n=12). The GTF2A1L TDMR methylation rate differed significantly between the HM and LM groups ( $P=0.0019$ ), and GTF2A1L expression was significantly higher among the LM than in the HM patients ( $P=0.023$ ). High TDMR methylation was correlated with low GTF2A1L gene expression levels. Both groups demonstrated relatively good outcomes with respect to sperm retrieval, fertilisation, pregnancy and childbirth rates. We observed that aberrant GTF2A1L gene expression was not correlated with fertilisation rates.

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：エピジェネティクス メチル化 不妊症 精子

## 1. 研究開始当初の背景

少子化社会において不妊治療への期待は大きいが、生殖補助医療 (ART:assisted reproductive technology) を用いても、挙児を得ることができないカップルは非常に多く存在する。このため、男性不妊症の最多を占める精子形成障害の原因解明が期待されており、ジェネティックな原因である Y 染色体長腕 AZF(Azoospermia factor)領域の微小欠失に関する研究は進展した。無精子症や高度乏精子症の男性におけるその頻度は 5-10%であるとされている。しかし、エピジェネティックな観点から検討された報告はほとんど存在しない。

## 2. 研究の目的

エピジェネティクスは塩基配列によらない遺伝子の発現に影響を与える現象として、近年特に注目が高まってきた。臨床的には癌化との関わりだけでなく、生活習慣病など様々な疾患にも深く関与することが示唆されている。しかし、不妊症、精子形成障害との関連性について論じた報告は少ない。そこで、本研究では無精子症や高度乏精子症のような重症男性不妊症の原因として DNA メチル化異常が関与する可能性を明らかにし、さらに不妊治療の臨床成績へ与える影響についても検討することを立案した。

## 3. 研究の方法

86 症例の非閉塞性無精子症を対象とした。精巣組織の一部を採取し、組織学的に分類される精子形成障害の各々の形態: Normal spermatogenesis, Hypospermatogenesis, Maturation arrest, Sertoli cell only syndrome, Tubular sclerosis に分類した。

精巣組織の一部を採取して total RNA、genomic DNA を抽出した。

DNA 解析装置 MassARRAY を使用し、そのプロモーター領域に存在する TDMR のメチル化状態について、ハイスループットかつ定量的なメチル化解析を行った。

Hypospermatogenesis 症例に注目し、Real-time RT-PCR で GTF2A1L 遺伝子の発現解析を行った。その結果と定量化されたプロモーター領域のメチル化値との間の関係を比較検討し、メチル化状態が遺伝子の発現量に影響を与えているかどうかを検証した。

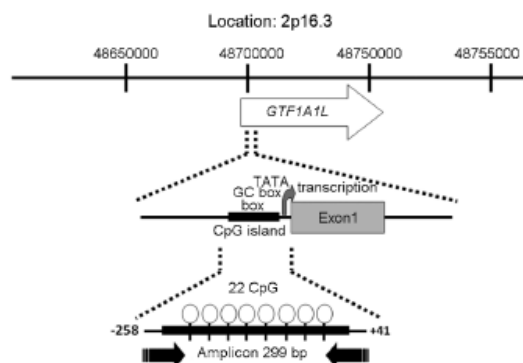
以上の実験データと、Hypospermatogenesis 症例の臨床成績 (TESE による精子回収率、TESE-ICSI による受精、妊娠、出産率) との間に関連がみられるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

86 症例の非閉塞性無精子症の組織学的分類の結果: Normal spermatogenesis は 26 例 (control 症例), Hypospermatogenesis: HS は 17 例, Maturation arrest: MA は 17 例, Sertoli cell only syndrome: SCO は 21 例, Tubular sclerosis: TS は 5 例であった。

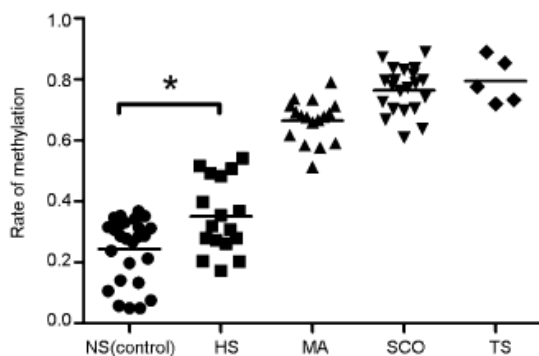
GTF2A1L 遺伝子のプロモーター領域には 22 個の CpG を含む CpG island が存在し、TDMR 領域として遺伝子発現の制御に關与している。図 1 のとおり -258bp ~ +41bp の領域を amplicon として MassARRAY によるハイスループットかつ定量的なメチル化解析を行った。

図 1



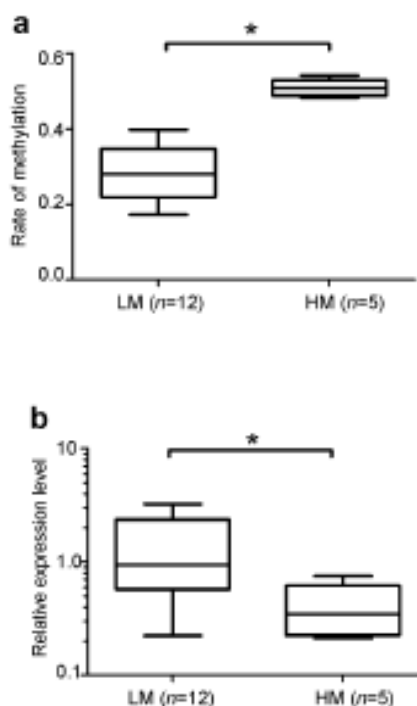
各組織学的分類ごとのメチル化状態は、図 2 のとおりであった。Hypospermatogenesis 症例は control 症例に比べて、有意に低いメチル化状態であった ( $P=0.029$ )。

図 2



Hypospermatogenesis 症例のメチル化状態を HM 群 (high DNA methylation,  $n=5$ ) と LM 群 (low DNA methylation,  $n=12$ ) の 2 群に分類した。その結果、図 3 のとおり、HM 群では、GTF2A1L 遺伝子発現が有意に低下していた。

図 3



しかし、両群とも精子回収率、受精率、妊娠率、出産率に関して比較的好成績であった。GTF2A1L 遺伝子発現の異常は妊娠率へは影響を与えていないと考えられる。これは、TESE-ICSI による生殖補助医療技術によって、TDMR メチル化異常による男性不妊症が克服されている可能性があると言える。

## 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 1 件)

1. Kazuhiro Sugimoto, Eitetsu Koh, Masashi Iijima, Masaki Taya, Yuji Maeda and Mikio Namiki. Aberrant methylation of the TDMR of the GTF2A1L promoter does not affect fertilisation rates via TESE in patients with hypospermatogenesis. Asian Journal of Andrology (2013) 15, 634–639. (査読有)

(DOI: 10.1038/aja.2013.56)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉本 和宏 (SUGIMOTO KAZUHIRO)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号 : 70621837