

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462547

研究課題名(和文) ヒト無精子症と早発閉経の病態解明および臨床医学への応用

研究課題名(英文) Analysis of human azoospermia and POF and its clinical advance

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：PLK4 遺伝子はserine-threonine kinase をコードしており、体細胞分裂後期の進展に必須である。私はヒトPLK4遺伝子がヒトSCOSの原因遺伝子かどうか解析した。mutation解析の結果、SCOS患者においてPLK4のドメイン内に13bp のヘテロの欠失を検出した。この変異によりframe shiftがおこり、コードされるアミノ酸は正常の970個からわずか85個のみとなり、functional domainは本来のわずか21%しか存在しなかった。また機能解析ではmutationを持つ配列では中心小体の数が変化せずPLK4遺伝子の機能が失われていることが判明した。

研究成果の概要(英文)：PLK-4 is a key regulator of centriole duplication and male mice with a point mutation in PLK4 are known to show azoospermia associated with germ cell loss. We found a heterozygous 13-bp deletion of PLK4 in an azoospermic patient with Sertoli cell-only syndrome (SCOS). In vitro centriole amplification was observed in wild-type PLK4-transfected cells, but not in mutant ones, indicating that the PLK4 mutation can cause azoospermia by SCOS.

研究分野：male infertility

キーワード：azoospermia SCOS meiosis mutation

1. 研究開始当初の背景

(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 MZTESE-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、今日まで乏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。

2. 研究の目的

(1) 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明らかにされてきた。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。

本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目的とする。

3. 研究の方法

(1) Plk4 (Polo-like Kinase 4) 遺伝子は serine-threonine kinase をコードしており、Plk family の一つであり、体細胞分裂後期の進展に必須である。Plk4 はマウスにおいて細胞分裂過程における中心小体の複製機能を有する。近年、Plk4 にヘテロに mutation をもつマウスがその精巣のサイズが減少し、また組織学的に germ cell の完全な消失を呈し SCOS による無精子症を示すことが明らかにされた。そこで、私はヒト PLK4 遺伝子がヒト SCOS の原因遺伝子かどうか解析した。対象は組織学的に SCOS と診断された日本人無精子症患者 80 名。旭川医科大学の倫理委員会の承認後また、全て文章によるインフォームドコンセントを得た後に血液を採取し、Genomic DNA を抽出し、PLK4 の coding region 及び隣接するイントロン部位に primer をそれぞれ設定し、PCR 法、PCR 産物のカラムによる精製、PCR 産物の濃度チェックを行い、ダイレクタシークエンスし mutation 解析を施行した。さらに、検出した mutation をもつ配列および正常配列を融合発現ベクターに挿入し細胞にトランスフェクションし、一過性の発現を行い中心小体の複製の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 上記の方法にて mutation 解析を行った結果、まず SCOS 患者群においてヒト PLK4 遺伝子の最も重要な部位である Serine/Threonine protein kinases ドメイン内に 13bp に及ぶヘテロの deletion を検出した。

この deletion により frame shift がおこり、極めて早期に stop codon が生じ、mutation によりコードされるアミノ酸は正常の 970 個からわずか 85 個のみとなる。

さらに、最も重要である functional domain (Serine/Threonine protein kinases ドメイン) は本来のわずか 21% しか存在しないこととなる。そこで機能解析を行ったところ、正常 PLK4 を導入された細胞は著明に中心小体の数が増加しているのに対し、mutation を持つ配列ではコントロールと同様に中心小体の数は変化せず、mutation により PLK4 遺伝子の機能が失われていることが判明した。さらに mutation を持つ配列を over expression させると、細胞内の核は明らかな形態異常を示すものが多数存在し、またその核の大きさもコントロールと比較して統計学的に有意差を持って大きかった。

以上より世界で初めて SCOS の原因遺伝子である PLK4 が証明された

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 23 件)

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*, 査読有、2016、(in press)
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*, 査読有、2016、(in press)
Ueda H, Miyamoto T, Tsurusaki Y, Minase G, Matsumoto N, Sengoku K, Rapid diagnostic testing of a newborn in a family with hypertrophic cardiomyopathy. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology*, 査読有、2016、(in press)
Nakanishi K, Yamashita A, Miyamoto T, Takeguchi R, Furuya A, Matsuo K,

Tanahashi Y, Kawamura M, Sengoku K, P450 oxidoreductase deficiency with maternal virilization during pregnancy. *Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology* 査読有 2016, (in press),

Miyamoto T, Bando Y, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Iijima M, Namiki M, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N, Sengoku K. A PLK4 mutation causing azoospermia in a man with Sertoli cell-only syndrome. *Andrology*, 2016, 査読有 4:75-81. doi: 10.1111/andr.12113

Miyamoto T, Minase G, Okabe K, Ueda H, Sengoku K. Male infertility and its genetic causes. *J Obstet Gynaecol Res*, 査読有 2015, 41: 1501-1505.

Nakajima E, Ishigouoka T, Yoshida T, Sato T, Miyamoto T, Shirai M, Sengoku K, Prenatal diagnosis of congenital imperforate hymen with hydrocolpos, *J Obstet Gynecol*, 査読有 2015, 35: 311 – 313

Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Minase G, Ueda Y, Namiki M, Sengoku K. SIN3A mutations are rare in men with azoospermia. *Andrologia*, 査読有 2015, 47:1083-1085.

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*, 査読有、2014, 46: 273 – 276.

Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Sasaki S, Okada E, Kobayashi S, Kashino I, Itoh K, Nakajima S, Tajima S, Goudarzi H, Azumi K, Kanazawa A, Otake Y, Yila TA, Ait Bamai Y, Cong S, Baba T, Braimoh TS, Ban S, Washino N, Konishi K, Kato S, Uno A, Limpar M, Minakami H, Nonomura K, Mitsui T, Endo T, Baba T, Sengoku K, Saijo Y, Yoshioka E, Miyamoto T, Yuasa M, Sata F, Kurahashi N, Tamaki J, Kajiwara J, Todaka T, Murohashi H, Matsuura H, Matsumura T, Ishizuka M. Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile--updated 2013. *Environ Health Prev Med*. 査読有、2013, 18: 429-450.

Kondo Y, Saito H, Miyamoto T, Lee BJ, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kim JH, Yu YS, Matsumoto N. Pathogenic mutations in two families with congenital cataract identified with whole-exome sequencing. *Mol Vis*, 査読有、2013, 19: 384-389.

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, 査読有、2013, 52:1500-1505.

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

水無瀬学, 西野 共子, 上田 寛人, 大石 由利子, 宮川 博栄, 宮本 敏伸, 千石 一雄, 妊娠 20 週にびまん性大細胞性悪性リンパ腫と診断され、化学療法を行い、生児を得た 1 例, 北海道産科婦人科学会会誌, 査読有, 59: 27 - 32, 2015

宮本敏伸, ヒト男性不妊症の原因遺伝子解明および臨床医学への応用, 日本産科婦人科学会雑誌, 査読有, 66: 2552 - 2558, 2014

千石一雄、宮本敏伸、真井英臣、水無瀬学, 子宮内膜症に伴う不妊に対する治療方針, 金原出版株式会社, 産婦人科の実際, 64: 907 - 913, 2015

宮本敏伸、水無瀬学、千石一雄, 男性不妊, 医学書院, 臨床婦人科産科, 69: 448 - 453, 2015

千石 一雄, 宮本 敏伸, 水無瀬学, 生殖内分泌分野 男性不妊症(解説/特集), 泰山堂, 産科と婦人科, 82: 343 - 346, 2015

千石 一雄, 宮本 敏伸, 水無瀬学, 【現代生殖医療のメインストリーム ART マスターたちの治療戦略】不妊治療の実際 タイミング療法(解説/特集), 金原出版株式会社, 産婦人科の実際, 63: 652 - 1657, 2014

千石 一雄, 宮本 敏伸, 水無瀬学, いま注目されている 早発卵巣不全(POI) POI の病因と病態, 医学書院, 臨床婦人科産科, 68: 844 - 849, 2014

⑳ 宮本敏伸、水無瀬学、千石一雄, 増刊号 産婦人科処方ofのすべて すぐに使える実践ガイド 婦人科編 II 内分泌・不妊 卵巣過剰刺激症候群, 医学書院, 臨床婦人科産科, 68: 80 - 82, 2014

㉑ 宮本敏伸、水無瀬学、千石一雄, 増刊号 産婦人科処方ofのすべて すぐに使える実践ガイド 婦人科編 II 内分泌・不妊 多くの卵巣性卵巣症候群, 医学書院, 臨床婦人科産科, 68: 77 - 79, 2014

㉒ 千石 一雄, 宮本 敏伸, 大石 由利子, 【内分泌疾患に強くなる】専門医

に学ぶ内分泌疾患の診断・治療 性腺疾患 女性性腺機能低下症, 医学書院, Medicina, 50: 1832 - 1835, 2013

: corresponding author

〔学会発表〕(計 3 件)

宮本敏伸、特別講演；男性不妊の原因遺伝子解明及び臨床医学への応用、日本産婦人科学会学術集会総会 2014 年 04 月、日本産婦人科学会、東京
宮本敏伸、ヒト無精子症の原因遺伝子としてのヒト PLK4 遺伝子の同定、日本産婦人科学会学術集会総会, 2014 年 04 月、日本産婦人科学会、東京
宮本敏伸、教育講演：男性不妊とその要因、日本産婦人科学会総会, 2013 年 05 月、札幌市

〔図書〕(計 1 件)

宮本敏伸、VII 培養室業務の実際：液体調整法、生殖補助医療(ART)-胚培養の理論と実際、日本卵子学会、2016 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

学術関係受賞

宮本敏伸、日本医師会医学研究奨励賞、公益社団法人 日本医師会, 2014 年 11 月

宮本敏伸、日本産婦人科学会学術奨励賞、日本産婦人科学会, 2014 年 04 月

宮本敏伸、日本産婦人科学会総会優秀演題賞、日本産婦人科学会, 2014 年 04 月

宮本敏伸、北海道生殖医学会最優秀賞、北海道生殖医学会, 2014 年 02 月

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