

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670697

研究課題名(和文)造精機能障害とエピジェネティクス異常の解明

研究課題名(英文)Analysis of abnormalities of epigenome in testicular dysfunction

研究代表者

市岡 大士 (ICHIOKA, Daishi)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号：20712813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：不妊外来を受診した194人の血液よりDNAを抽出した。乏精子症かつ精子無力症、乏精子症、精子無力症のいずれか(OAT群)が81人、非閉塞性無精子症(azo群)が57人、精液所見正常、射精障害、閉塞性無精子症のいずれかの診断(対照群)が56人であった。

MTHFR遺伝子のrs1801133(C677T)、rs1801131(A1298C)について、TaqMan SNP genotyping assayを用いて、それぞれのアレルを同定した。OAT群、azo群ともに、対照群との間でSNPの頻度に有意な差は見られなかった。対照をHapMapの日本人を用いて比較したが、同じく有意差は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Men visiting with infertility clinic were enrolled in this study. DNA was extracted from blood samples in 194 patients. 194 patients consist of 81 OAT (oligoasthenoteratozoospermia), 57 non-obstructive azoospermia (azo group) and 56 controls (normal semen analysis, ejaculation disorder and obstructive azoospermia).

Of MTHFR gene Allele variations were identified for rs1801133 (C677T) and rs1801131 (A1298C), using a TaqMan SNP genotyping assay. There were no differences between OAT group plus azo group and control group. We also compared allele variations of our samples to Japanese HapMap data, but did not found the significant difference.

研究分野：男性不妊症

キーワード：男性不妊 メチル化

1. 研究開始当初の背景

男性不妊症における造精機能障害のメカニズムの大半は未解明であり根本的治療は精索静脈瘤症例以外では存在しない。しかし、精索静脈瘤でも造精機能障害は必発ではなく、また根治術による改善率は約 50%にとどまり基本的な病態は未解明である。近年のエピジェネティック研究の進展に伴い、精子形成過程においてのゲノムインプリンティングや減数分裂などの特異的なステップに DNA メチル化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。哺乳類の細胞でみられる DNA メチル化は 5'-CG-3' 配列 (以下 CpG) を有するシトシン残基のみに起こるが、この反応は DNA メチル基転移酵素(DNMT)で触媒される。また、メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)は生体内における DNA メチル化のメチル基として必須の S-アデニル-L-メチオニンの産生経路のキーとなる酵素である。この MTHFR の一塩基多型(SNP)による酵素活性の低下と男性不妊との関連が報告されている。現在までに日本人における精子 DNA メチル化異常や MTHFR 遺伝子多型と造精機能障害の関連についてはほとんど解明されていない。以上より、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

男性不妊症における造精機能障害とエピジェネティクス制御異常の意義が明らかになり、ヒトの男性不妊の原因解明につながる。さらに、本研究で得られる成果は将来的には精索静脈瘤根治術や葉酸投与などの薬物療法など、現状では経験に基づいて行われている男性不妊症治療の個別化医療への展開につながることを期待される。

3. 研究の方法

本研究は不妊外来通院カップル男性 (精液所見正常者を含む) を対象とした多施設共同研究として行った。不妊外来通院男性のうち同意を得られた男性の末梢血から DNA を抽出した。MTHFR 遺伝子の Rs1801133(C677T) Rs1801131(A1298C) の 2 つの SNP について、TaqMan® SNP Genotyping Assays を用いて遺伝子型のタイピングを行った。OAT 群: 乏精子症 (Oligozoospermia)、精子無力症 (Asthenozoospermia)、奇形精子症 (Teratozoospermia)、AZO 群: 非閉塞性無精子症、対照群: 精液所見正常、射精障害、閉塞性無精子症の 3 群に分けて遺伝子多型との関連を検討した。HapMap の日本人のデータとの比較解析も合わせて行った。

4. 研究成果

不妊外来受診された患者 194 人の血液より DNA を抽出した。194 人の内訳は、乏精子症かつ精子無力症、乏精子症、精子無力症のいずれかに診断された方 (OAT 群) が 81 人、非閉塞性無精子症 (azo 群) が 57 人、精液所見正常、射精障害、閉塞性無精子症のいずれかの診断 (対照群) が 56 人であった。精索静脈瘤を合併している頻度はそれぞれ 53, 11, 17 例であった。対象症例を表 1 に示す。

表 1. 対象症例

診断	症例数	Varix あり
OAT 群 (乏精子症精子無力症+乏精子症+精子無力症)	81	53
AZO 群 非閉塞性無精子症	57	11
対照群 (精液所見正常+射精障害+閉塞性無精子症)	56	17

全症例の各 SNP の頻度を表 2 に示す。HapMap のデータと比べて有意な差は見られなかった。

表 2 . Rs1801131 の頻度 (全体)

	自験例		HapMap Jpt
	N=194	%	N=172
allele			%
AA	127	65.5	65.1
AC	61	31.4	32.6
CC	6	3.1	2.3
Allele 頻度	N=388	%	%
A	315	81.2	81.4
C	73	18.8	18.6
	N=194	%	%
AA+AC	188	96.9	97.7
CC	6	3.1	2.3

Rs1801133 の頻度 (全体)

	自験例		HapMap Jpt
	N=194	%	N=172
allele		%	%
CC	70	36.1	39.53
CT	91	46.9	48.83
TT	33	17.0	11.63
Allele 頻度	N=388	%	%
C	231	59.5	64.0
T	157	40.5	36.0
	N=194	%	%
CC+CT	161	83.0	88.4
TT	33	17.0	11.6

次に OAT 群と AZO 群を合わせて、対照群と比較を行った(表3)。Rs1801133 において、CT+TT は CC と比べて頻度が多い傾向があったが有意な差は認められなかった(P=0.36)。

表3 . Rs1801131 の頻度

	対照		OAT+AZO		HapMap Jpt
	N=56	%	N=138	%	N=172
allele					%
AA	39	69.6	88	63.8	65.1
AC	15	26.8	46	33.3	32.6
CC	2	3.6	4	2.9	2.3
Allele頻度	N=112	%	N=276	%	%
A	93	83	222	80.4	81.4
C	19	17	54	19.6	18.6
	N=56	%	N=138	%	%
AA+AC	54	96.4	134	97.10	97.7
CC	2	3.6	4	2.90	2.3
	N=56	%	N=138	%	%
AA	39	69.6	88	63.8	65.1
AC+CC	17	30.4	50	36.2	32.6

Rs1801133 の頻度

	対照		OAT+AZO		HapMap Jpt
	N=56	%	N=138	%	N=172
allele					%
CC	23	41.07	47	34.1	39.53
CT	22	39.29	69	50.0	48.83
TT	11	19.64	22	15.9	11.63
Allele頻度		%	N=276	%	%
C	68	60.7	163	59.1	64.0
T	44	39.3	113	40.9	36.0
	N=56	%	N=138	%	%
CC+CT	45	80.36	116	84.06	88.4
TT	11	19.64	22	15.94	11.6
	N=56	%	N=138	%	%
CC	23	41.07	47	35.80	39.53
CT+TT	33	58.93	91	64.20	48.83

最後に、OAT群、AZO群、対照群との比較を行った(表4)。2つのSNPともに、対照群との比較で有意な差はみとめられなかった。

表4 . Rs1801131 の頻度 (診断別)

	対照		OAT		AZO	
	N=56	%	N=81	%	N=57	%
allele						
AA	39	69.64	50	61.73	38	66.67
AC	15	26.79	28	34.57	18	31.58
CC	2	3.57	3	3.70	1	1.75
Allele頻度	N=112	%	N=162	%	N=114	%
A	93	83	128	79	94	82.5
C	19	17	34	21	20	17.5
	N=56	%	N=81	%	N=57	%
AA+AC	54	96.43	78	96.3	56	98.25
CC	2	3.57	3	3.70	1	1.75
	N=56	%	N=81	%	N=57	%
AA	39	69.64	50	61.73	38	66.67
AC+CC	17	30.36	31	38.27	19	33.33

Rs1801133 の頻度 (診断別)

	対照		OAT		AZO	
	N=56	%	N=81	%	N=57	%
allele						
CC	23	41.07	29	35.80	18	31.58
CT	22	39.29	40	49.38	29	50.88
TT	11	19.64	12	14.81	10	17.54
Allele頻度	N=112	%	N=162	%	N=114	%
C	68	60.7	98	60.5	65	57.0
T	44	39.3	64	39.5	49	43.0
	N=56	%	N=81	%	N=57	%
CC+CT	45	80.36	69	85.19	47	82.46
TT	11	19.64	12	14.81	10	17.54
	N=56	%	N=81	%	N=57	%
CC	23	41.07	29	35.80	18	31.58
CT+TT	33	58.93	52	64.20	39	64.20

本研究では、MTHFR 遺伝子の SNP と精液所見との明らかな関連を見出すことはできなかった。症例数が少ないことが一因の可能性があるので、引き続き症例の集積を行い、日本人における新たなエビデンスを明らかにする。

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 4 件)

Uchida M, Ichioka D (他 6 人, 4 番目)
Salvage chemotherapy with gemcitabine plus oxaliplatin for patients with testicular germ cell cancer Int J Clin Oncol. 2014 Dec;19(6):1112-1117.
doi: 10.1007/s10147-014-0667-5. 査読有

Kurobe M, Ichioka D, Joraku A (他 8 人, 4, 5 番目)
Paclitaxel, ifosfamide, and cisplatin (TIP) as salvage and consolidation chemotherapy for advanced germ cell tumor. J Cancer Res Clin Oncol. 2015 Jan;141(1):127-133.
doi: 10.1007/s00432-014-1760-x. 査読有

Ichioka D, Nishiyama H (他 11 人, 1 番目)
Impact of renal function of patients with advanced urothelial cancer on eligibility for first-line chemotherapy and treatment outcomes. Jpn J Clin Oncol. 2015 Sep;45(9):867-873. doi: 10.1093/jjco/hyv082. 査読有

Kikuchi E, Ichioka D (他 13 人, 5 番目)
Do metastatic upper tract urothelial carcinoma and bladder carcinoma have similar clinical responses to systemic chemotherapy? A Japanese multi-institutional experience. Jpn J Clin Oncol. 2016 Feb;46(2):163-169. doi: 10.1093/jjco/hyv180. 査読有

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

研究代表者

市岡大士 (ICHIOKA, Daishi)

筑波大学・附属病院・病院講師

研究者番号: 20712813

研究分担者

常樂 晃 (JORAKU, Akira)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 60436277