

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791496

研究課題名（和文） エピジェネティック変異による男性不妊症の戦略的研究

研究課題名（英文） Comprehensive research on epigenetics in male infertility

研究代表者

前田 雄司 (MAEDA YUJI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20377394

研究成果の概要（和文）：ゲノム上にコードされた各遺伝子は、個体を形成する種々の細胞毎に選択的に遺伝子発現制御が行われている。活性化もしくは不活性化される遺伝子の組み合わせにより、その細胞の個性が決定され、その細胞独自の細胞機能を発現し個体全体としての生理機能を営むように調整制御されている。この制御機構のひとつとしてエピジェネティクス機構が深く関与しており、発生や発癌といった一連の生命現象の中でエピジェネティクス機構がその原因として重要であることが、近年の分子生物学の発展により明らかとされてきた。哺乳類の精子形成機構において精子形成細胞はその成熟段階に応じて種々の重要な遺伝子の発現を細かく制御しながら、減数分裂を行い妊孕性ある配偶子として機能するようになっていく。本研究の結果から、精巣特異的に発現するある特定遺伝子がDNAメチル化による制御機構を受けており、精子形成過程に影響していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The gene expression is selectively controlled. The individuality of the cell is determined by combination of activated genes so that it makes the physiological functions as the entire individual. Epigenetics is taking part as one of the control mechanisms of gene expression. Recent reports showed that epigenetic control is important in embryology or oncology. In mammalian spermatogenesis, spermatogenic cells develop into functional gametes through meiosis with complex gene expression. Our study suggested that certain genes important in spermatogenesis are involved in epigenetic control of its expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

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，精子形成

1. 研究開始当初の背景

ゲノム上にコードされた各遺伝子は、個体を形成する種々の細胞毎に選択的に遺伝子発現制御が行われている。活性化もしくは不

活性化される遺伝子の組み合わせにより、その細胞の個性が決定され、その細胞独自の細胞機能を発現し個体全体としての生理機能を営むように調整制御されている。この制御

機構のひとつとしてエピジェネティックス機構が深く関与しており、発生や発癌といった一連の生命現象の中でエピジェネティックス機構がその原因として重要であることが、近年の分子生物学の発展により明らかとされてきた。一方、哺乳類の精子形成機構において、精子形成細胞はその成熟段階に応じて種々の重要な遺伝子の発現を細かく制御しながら、減数分裂を行い妊孕性ある配偶子として機能するようになっていく。これまでこの分野におけるエピジェネティックス研究、なかでもDNAメチル化に関する研究は基礎的なものがほとんどで、ヒト臨床に直結した研究はごく限られたものでしかなかった。しかし高精度な分析方法（マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法）が確立・応用されたため、男性不妊症患者から採取したヒト臨床検体を使用した高精度な研究が可能となった。

エピジェネティックスはゲノム自身の変異以外のメカニズムで遺伝子の発現に影響を与える現象であり、DNAメチル化、ヒストンのアセチル化・メチル化、およびクロマチンリモデリングなどが挙げられる。中でもDNAメチル化は種々の発癌機序の一部となっていることが多くの研究から報告されている。例えばRB, p16, E-cadherin, VHL, MLH1などの重要な癌抑制遺伝子はプロモーター領域のCpGアイランド（CpG配列が高頻度に存在する特定の領域）のメチル化により不活化されることが知られている。他に、精神神経疾患でもRett症候群、ICF症候群などがメチル化異常によって発症することが報告されている。一方、男性不妊症の領域では、Y染色体AZF（Azoospermia factor）領域微小欠失（いわゆるジェネティックな異常）の関与が明らかにされてきたが、DNAメチル化の関与については研究が進んでいない。しかし、精子形成に重要な役割を果たし、かつDNAメチル化によってその発現が制御されていることが、少数の遺伝子ではあるが、近年の基礎的研究で明らかにされてきた。その中の1つVASA（別名DDX4）は、DEAD（Asp-Glu-Ala-Asp）ボックス型ATP依存性RNA helicaseをコードする。RNA分子の構造変化を引き起こして翻訳調節を行っており、精子形成の過程で重要な役割を果たすことが知られている。VASA遺伝子のノックアウトマウスでは減数分裂が停止し、精子形成が消失する。この遺伝子のプロモーター領域にはCpGアイランドが存在し、組織特異的メチル化可変領域（Tissue-dependent and differentially methylated region; T-DMR）として遺伝子の発現制御にメチル化が深く関与していることが報告されている。ALF遺伝子は、TFIIA (transcription factor II A) large (α/β) subunit の germ-cell specific

counterpart をコードする。マウスにおける実験で、ALF 遺伝子は精子形成の中でも特に最終段階である spermiogenesis に重要であるとされる。この遺伝子の発現も、プロモーター領域のメチル化状態によって制御されることが分かっている。まずこれら代表的な遺伝子のメチル化異常が、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）とどのような関係にあるのかどうか解明する必要がある。またメチル化異常による精子形成障害が、これまで我々の研究グループで精力的に研究を行ってきたAZF（Azoospermia factor）領域微小欠失にみられる精子形成障害とどのような違いがあるのかを分析することにより、ジェネティックな原因（AZF）とエピジェネティックな原因（DNAメチル化）による精子形成障害の表現型の差異を検討することができる。さらに、男性不妊症患者から採取したヒト臨床検体と実際の不妊治療経過を組み合わせることにより、エピジェネティックな変化（DNAメチル化）が臨床的にTESE (testicular sperm extraction)・ICSI (intracytoplasmic sperm injection) の成績（精子回収率、受精・妊娠率）へ与える影響も検討する。

2. 研究の目的

本研究は、精子形成に関連する重要遺伝子のDNAメチル化による制御機構を解明すること、および得られた結果を利用し男性不妊症臨床への応用を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

不妊を主訴に来院し乏精子症、無精子症が認められた患者を対象とする。検査・治療のために精巣生検（ほとんどがTESE・精巣精子採取術のときに組織採取する）を行うが、その際に精巣組織の一部を研究目的のために使用する。当院における倫理委員会の承認のもと、患者のインフォームドコンセントを得て施行する。

患者の精巣組織および末梢血白血球よりtotal RNA, genomic DNAを採取する。目的遺伝子（前述のVASA, ALF）の発現解析（mRNA）には、Real-time RT-PCR (LightCycler system, TaqMan Probe, TaqMan Master, Universal ProbeLibrary; Roche Diagnostics) を GAPDH を内部標準として補正し、相対定量を行って各々のサンプル間のmRNA発現量を比較検討する。また基本的にAZF微小欠失がないことを確認するためのPCRを行い、ジェネティックな要素がないことを確認しておく。遺伝子特定領域のメチ

ル化の解析には、従来MS P (Methylation-specific PCR), COBRA (Combined bisulfite restriction analysis) などが行われてきた。しかし、PCRの温度設定が非常に煩雑である、データの再現性に乏しい、限られた領域のメチル化状態だけを検出しているなどの問題を指摘されていた。これに対し我々は、MassARRAY (Sequenom, SanDiego, CA) を使用し、ハイスループットかつ定量的なメチル化を行う。これは塩基特異的切断と MARDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法) を応用した解析方法で、従来法と比較して高精度・高信頼性が特徴とされている。具体的には、抽出された genomic DNA 1ug に EZ DNA methylation kit (Zymo Research) を用いて Bisulfite 処理を行う。CpG 領域を含む解析領域が増幅するようにプライマー設計を行い (reverse primer に T7 プロモーターをつけておく)、PCRにて増幅させる。in vitro transcription を行った後、制限酵素にて塩基特異的切断を行う。最後に MARDI-TOF MS にて質量分析を行ったデータを、専用解析ソフトで処理する。個々のサンプルの、個々の CpG サイトのメチル化状態がそれぞれ定量化され、0~100%で算出される。また Epigram 表示によって、赤 (メチル化 0%) ~ 橙~黄色 (メチル化 100%) で視覚的に把握することが可能である。マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法は外注・アウトソーシングにより経費効率を上げつつ、測定精度を維持する。

4. 研究成果

線虫から哺乳類まで進化の過程で保存され精子形成に不可欠な因子の1つとされている遺伝子 VASA (または DDX4 (DEAD box polypeptide 4)) に注目した。この遺伝子は ATP 依存性 DEAD box 型 RNA ヘリカーゼをコードし、RNA 分子の構造を変化させて翻訳調節を行うとされている。VASA 遺伝子の上流には promoter CpG islands が存在しているため、まず我々はこの領域のメチル化状態と遺伝子の発現を分析した。また、無・高度乏精子症と診断され、かつ染色体異常、AZF 領域微小欠失のないことが確認された症例を対象として、倫理委員会の承認のもと同意を得て TESE を前提として精巣組織の一部を採取し、病理組織学的評価、定量的メチル化分析、遺伝子の発現解析を行った。Normal spermatogenesis 症例ではいずれも低メチル化であった。しかし、Maturation arrest 症例の一部には CpG island の 70%以上がメチル化されている高メチル化群が存在し、高メ

チル化でない群に比して遺伝子の発現が有意に抑制されていた。臨床的に Maturation arrest である症例の中には高メチル化群が存在し、この群では VASA 遺伝子がメチル化による gene silencing を受けることで、ノックアウトマウスと同様に生殖細胞の分化が停止していることが示唆された。

次いで DNA メチル化によって遺伝子発現が制御され、TF2A の germ-cell specific counterpart をコードする遺伝子 ALF に注目し、同様の検討を行った。Normal (n=26) では全例でメチル化異常を認めなかったが、Hypospermatogenesis (n=17) の中でメチル化異常を認める 5 症例を同定し、遺伝子発現が有意に抑制されていた。(P=0.020, Promoter hypermethylation; PH 群) 臨床的には、TESE-ICSI による sperm retrieval rate (SRR) / pregnancy rate (PR) SRR (PH 群: non-PH 群) は 100%:100% で同等の成績だが、PR は 100%:63.6% であり PH 群で成績良好であった。

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 1 件)

- ① Sugimoto K, Koh E, Sin HS, Maeda Y, Narimoto K, Izumi K, Kobori Y, Kitamura E, Nagase H, Yoshida A, Namiki M. Tissue-specific differentially methylated regions of the human VASA gene are potentially associated with maturation arrest phenotype in the testis. J Hum Genet, 54, (2009), 450-456, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 杉本和宏, 中嶋一史, 中嶋孝夫, 島村正喜, 泉浩二, 成本一隆, 前田雄司, 溝上敦, 高栄哲, 並木幹夫, 吉田淳, 北村栄子, 永瀬浩喜, ALF gene promoter hypermethylation が TESE-ICSI 成績に与える影響, 第 46 回日本生殖医学会北陸支部学術総会, 2009 年 6 月 7 日, 金沢ニューグランドホテル (金沢市)
- ② Kazuhiro Sugimoto, Kouji Izumi, Kazutaka Narimoto, Sotaro Miwa, Yuji Maeda, Tohru Miyagi, Jiro Kanaya, Yasuhide Kitagawa, Yoshihumi Kadono, Hiroyuki Konaka, Atsushi Mizokami, Eitetsu Koh, Mikio Namiki, Impact of aberrant ALF gene methylation on outcome of testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection, AUA 2009 Annual Meeting, 2009 年 4 月 27 日, McCormick Place West Building (Chicago, IL, USA)

- ③ 杉本和宏, 申湖水, 前田雄司, 金谷二郎, 高栄哲, 並木幹夫, 吉田淳, 北村栄子, 永瀬浩喜, TESE-ICSI が DNA メチル化異常による精子形成障害を治療できる可能性, 第 97 回日本泌尿器科学会総会, 2009 年 4 月 19 日, 岡山コンベンションセンター (岡山市)
- ④ 杉本和宏, 下田ちはる, 申湖水, 前田雄司, 高栄哲, 並木幹夫, 吉田淳, 北村栄子, 永瀬浩喜, ALF 遺伝子にみられる promoter hypermethylation - エピジェネティック疾患としての精子形成障害の可能性 -, 第 13 回北陸泌尿器科 Basic Research Meeting, 2009 年 2 月 21 日, ホテル金沢 (金沢市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 雄司 (MAEDA, YUJI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号 : 20377394