

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04320

研究課題名(和文) ヒト造精機能障害に関わる分子基盤の全容解明を目指した統合的ゲノム・エピゲノム解析

研究課題名(英文) Integrated genomic and epigenomic analyses to understand the molecular bases for defects in spermatogenesis in humans

研究代表者

田嶋 敦 (Tajima, Atsushi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：10396864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：日本の特発性非閉塞性無精子症患者の全遺伝子エクソンの変異解析(エクソーム解析)や、精巣におけるエピジェネティック制御(DNAメチル化およびヒストン修飾)パターン分析などの多面的オミックス解析から、種々のタイプの変異(新生突然変異、エピゲノム変異、遺伝的リスクSNPなど)が蓄積する遺伝子が存在していることが明らかになり、「不妊症ホットスポット遺伝子」候補を見いだした。また、ゲノムワイド関連解析から、健常日本人男性の精子運動率の個人差に関わる遺伝要因としてERBB4 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 4)遺伝子SNP (rs3791686)を新たに同定した。

研究成果の概要(英文)：Integrated genomic and epigenomic analyses including whole-exome sequencing analysis in Japanese patients with idiopathic nonobstructive azoospermia and testicular epigenomic analysis helped us identify candidate “hot spot” genes that harbored various types of mutations (such as genetic and epigenetic mutations). In a two-staged genome-wide association study of sperm motility in Japanese males, furthermore, a single nucleotide polymorphism rs3791686 in ERBB4 on chromosome 2q34 was identified as a novel locus for sperm motility.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：男性不妊症 ゲノム エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

挙児を希望するカップルにおいて不妊症は10-15%の頻度で認められ、男性側および女性側の要因によるものが、それぞれ半数を占めるといわれている。男性不妊症患者の大多数では、精子形成不全などの造精機能障害を認める。これらの機能障害には遺伝、環境因子がともに関与することが示唆されているものの、ヒトY染色体長腕に位置する無精子症候補領域AZF (azoospermia factor)の欠失と高度に関連する場合(男性不妊症患者の1割程度)を除き、その病因の全容は明らかではない。

研究代表者らのグループを含め、造精機能障害を引き起こす要因を明らかにするための研究が世界中で実施され、男性不妊症の治療・診断につながる科学的根拠が少しずつ蓄積している現状にあった。その一方、男性不妊症は多因子疾患であることを鑑みると、病因の全容解明に向けては、従来の研究を進展させるのみならず、体系的な取り組みが十分なされていない視座からの研究を含めた多面的研究を実施することが肝要であると考えた。とりわけ、

(1) 特発性男性不妊症を「*de novo*疾患」とみなし、*de novo*責任変異が発症に関わる可能性

(2) 精子形成過程に関与する細胞に生じた後天的なエピジェネティック変異(エピ変異)が発症に関わる可能性

については、申請者の知る限りでは十分には探究されておらず、これらの検討を含めた統合的ゲノム・エピゲノム解析が必要であると考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多面的オミックスデータに基づき男性生殖機能に影響する遺伝要因の探査を行い、造精機能障害を伴う男性不妊症に関わる分子基盤の全容解明につながる知見を得ることである。具体的な主目的は以下のようにした。

(1) 原因不明の特発性無精子症患者由来のゲノムDNAを用いた全遺伝子エクソン領域のシーケンズ解析(エクソーム解析)から、新生突然(*de novo*)変異(片方の親の生殖細胞において新たに生じた突然変異)、特に、塩基置換型変異(SNV)や挿入欠失型変異(Indel)が疾患発症にどの程度寄与するかについて明らかにする。関与が認められた場合は、責任候補遺伝子の精巣におけるエピジェネティック制御(DNAメチル化およびヒストン修飾)パターンを分析し、後天的なエピジェネティック変異(エピ変異)による発現制御機構の乱れが精子形成不全の誘因となり得るかについて明らかにする。

(2) 上記(1)の知見や他の先行研究からの成果に基づき、多数の検体を用いた遺伝疫学的

手法(症例-対照関連解析、ゲノムワイド関連解析)から、各責任候補遺伝子内に疾患・形質に関わる高頻度SNP(single-nucleotide polymorphism)が存在するかについて明らかにする。この検討により、それぞれの遺伝子の疾患発症への寄与度を推定し、一つの遺伝子内に種々の変異(*de novo*変異、エピ変異、遺伝的リスクSNPなど)が蓄積する、いわゆる「ホットスポット遺伝子」が存在するかについて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 特発性無精子症患者のエクソーム解析

Y染色体欠失などの染色体構造異常を認めない原因不明の非閉塞性無精子症患者(精子形成不全を伴う男性不妊症)57名につき、SeqCap EZ Human Exome Library v3.0を用いてエクソン領域DNAを濃縮抽出し、エクソーム解析用ライブラリーを作製した。イルミナ社HiSeq2000(学内既設)を用いて取得したエクソーム塩基配列データは、ヒト参照ゲノム配列(hg19)に整列マッピングした後、変異箇所抽出および同定変異の機能的注釈付けを行った。これらの解析には、BWA-MEM(<http://bio-bwa.sourceforge.net>), GATK(<https://www.broadinstitute.org/gatk/>)などを用いた。既知変異データベースに登録のない新規変異の中で、有害度が高いと考えられるもの(終止変異、フレームシフト変異など)を同定した。新規有害変異が認められた遺伝子については、主として、ENCODE(Encyclopedia of DNA Elements)プロジェクトからのエピゲノム情報などに基づく情報学的解析から、精巣におけるエピジェネティック制御(DNAメチル化およびヒストン修飾)パターンを分析した。また、追加の無精子症患者DNAを用いて、候補遺伝子の変異スクリーニング解析を行った。

(2) 疾患・形質との統計遺伝学的関連分析

エクソーム解析などにより見いだした責任候補遺伝子につき、不妊症患者(無精子症および乏精子症)、有妊対照男性由来DNAを用いた症例-対照関連解析から、各遺伝子内のSNPの疾患発症への寄与度を分析した。各SNPの遺伝子型は、TaqMan PCR法、あるいはPCR-RFLP法により決定した。

また、研究成果の一般性を評価する目的で、一般成人男性における生殖関連特性(精子濃度、血中ホルモン濃度など)との関わりについての遺伝疫学的分析を行った。具体的には、日本人健常成人男性約800名につき、Illumina社HumanCore BeadChipを用いてゲノム全域SNPタイピングを行い、約25万SNPsの遺伝子型を決定した。その後、Beagle(<https://faculty.washington.edu/brownin/g/beagle/beagle.html>)を用いて未分析SNPの遺伝子型補完(インビューテーション)を行った。SNP遺伝子型と生殖関連特性値との

関連については、PLINK

(<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>)、R統計 (<http://www.r-project.org/>)、を用いて分析した。年齢、BMI (Body Mass Index) で調整した検定 P 値に基づき、一定基準を満たす SNPs を関連候補遺伝子として統計学的に選別し、結果検証用のサンプル (日本人健常成人男性約 700 名) を用いた関連検証実験に供した。検証実験では、TaqMan PCR 法により候補 SNPs の遺伝子型を決定した。

4. 研究成果

(1) 日本の特発性無精子症患者のエクソーム解析から、遺伝子変異の推定有害度、日本人集団における変異頻度、遺伝子の発現組織などの情報も加味して、有害度の高い新規な突然変異をもつ責任候補遺伝子群を同定した (未発表)。一部の変異については、変異同定した家系内での変異解析 (両親、有妊兄弟など) を行い、*de novo* 変異であることを確認した。加えて、それら遺伝子の精巣におけるエピジェネティック制御 (DNA メチル化およびヒストン修飾) パターンの分析や、追加症例における候補遺伝子変異スクリーニング解析などの多面的オミックス解析を実施することにより、種々のタイプの変異が蓄積する遺伝子が存在しうることが明らかになり、「不妊症ホットスポット遺伝子」候補を見いだした (未発表)。

(2) 遺伝疫学的手法により、特発性男性不妊症 (無精子症および乏精子症) の発症に関わる遺伝的要因として、*TUSC1* (tumor suppressor candidate 1) 遺伝子 SNP (rs12376894、rs12348) ならびに *DPF3* (double PHD fingers) 3) 遺伝子 SNP (rs10129954) を見いだした (Sato et al., *J Assist Reprod Genet* 2018)。また、4 つの SNP 遺伝子座 (rs7867029、rs12870438、rs7174015、rs724078) が日本人男性の生殖機能 (精液検査値、有妊/不妊) に与える影響を精査し、新規知見を得た (Sato et al., *Hum Reprod* 2015)。

日本人男性の種々の生殖関連特性に対するゲノムワイド関連解析から、健常日本人男性の精子運動率の個人差に関わる遺伝的要因として *ERBB4* (erb-b2 receptor tyrosine kinase 4) 遺伝子 SNP (rs3791686) を新たに同定した (Sato et al., *J Med Genet* in press)。また、日本人の血中 FSH (Follicle stimulating hormone) や性ホルモン結合グロブリン (sex hormone-binding globulin, SHBG)、テストステロン濃度の個人差に関わる遺伝的要因も明らかにした (Sato et al., *J Hum Genet* 2016; *Hum Reprod Open* 2017)。

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 17 件)

1. Sato Y, Tajima A, Sato T, Nozawa S, Yoshiike M, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. Genome-wide association study identifies *ERBB4* on 2q34 as a novel locus associated with sperm motility in Japanese men. *J Med Genet*, 2018 (in press). doi: 10.1136/jmedgenet-2017-104991 (査読有)。
2. Sato Y, Hasegawa C, Tajima A, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Yamauchi A, Iwamoto T. Association of *TUSC1* and *DPF3* gene polymorphisms with male infertility. *J Assist Reprod Genet*, 35:257-263, 2018. doi: 10.1007/s10815-017-1052-x (査読有)。
3. Shinmyo Y, Terashita Y, Dinh Duong TA, Horiike T, Kawasumi M, Hosomichi K, Tajima A, Kawasaki H. Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals. *Cell Rep*, 20:2131-2143, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.024 (査読有)。
4. Nishi A, Numata S, Tajima A, Zhu X, Ito K, Saito A, Kato Y, Kinoshita M, Shimodera S, Ono S, Ochi S, Imamura A, Kurotaki N, Ueno SI, Iwata N, Fukui K, Imoto I, Kamiya A, Ohmori T. *De novo* non-synonymous TBL1XR1 mutation alters Wnt signaling activity. *Sci Rep*, 7:2887, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-02792-z (査読有)。
5. Kasuga Y, Hata K, Tajima A, Ochiai D, Saisho Y, Matsumoto T, Arata N, Miyakoshi K, Tanaka M. Association of common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women: A case-control study. *Endocr J*, 64:463-475, 2017. doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0431 (査読有)。
6. Ueda H, Sasaki K, Halder SK, Deguchi Y, Takao K, Miyakawa T, Tajima A. Prothymosin alpha-deficiency enhances anxiety-like behaviors and impairs learning/memory functions and neurogenesis. *J Neurochem*, 141:124-136, 2017. doi: 10.1111/jnc.13963 (査読有)。
7. Sato Y, Tajima A, Katsurayama M, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, Namiki M, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. An independent validation study of three single

- nucleotide polymorphisms at the sex hormone-binding globulin locus for testosterone levels identified by genome-wide association studies. **Hum Reprod Open**, 2017:hox002, 2017. doi: 10.1093/hropen/hox002 (査読有).
8. Kanzawa-Kiriyama H, Kryukov K, Jinam TA, Hosomichi K, Saso A, Suwa G, Ueda S, Yoneda M, **Tajima A**, Shinoda KI, Inoue I, Saitou N. A partial nuclear genome of the Jomons who lived 3000 years ago in Fukushima, Japan. **J Hum Genet**, 62:213-221, 2017. doi: 10.1038/jhg.2016.110 (査読有).
 9. Takahashi M, Hosomichi K, Yamaguchi T, Yano K, Funatsu T, Adel M, Haga S, Maki K, **Tajima A**. Whole-exome sequencing analysis of supernumerary teeth occurrence in Japanese individuals. **Hum Genome Var**, 4:16046, 2017. doi: 10.1038/hgv.2016.46 (査読有).
 10. Sato Y, **Tajima A**, Katsurayama M, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, **Namiki M**, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. A replication study of a candidate locus for follicle-stimulating hormone levels and association analysis for semen quality traits in Japanese men. **J Hum Genet**, 61:911-915, 2016. doi: 10.1038/jhg.2016.82 (査読有).
 11. Kawarai T, **Tajima A**, Kuroda Y, Saji N, Orlacchio A, Terasawa H, Shimizu H, Kita Y, Izumi Y, Mitsui T, Imoto I, Kaji R. A homozygous mutation of *VWAZB* causes cerebellar ataxia with intellectual disability. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 87:656-662, 2016. doi: 10.1136/jnnp-2014-309828 (査読有).
 12. Shinmyo Y, Tanaka S, Tsunoda S, Hosomichi K, **Tajima A**, Kawasaki H. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. **Sci Rep**, 6:20611, 2016. doi: 10.1038/srep20611 (査読有).
 13. Tada H, Hosomichi K, Okada H, Kawashiri MA, Nohara A, Inazu A, Tomizawa S, **Tajima A**, Mabuchi H, Hayashi K. A *de novo* mutation of the LDL receptor gene as the cause of familial hypercholesterolemia identified using whole exome sequencing. **Clin Chim Acta**, 453:194-196, 2016. doi: 10.1016/j.cca.2015.12.028 (査読有).
 14. Hosomichi K, Shiina T, **Tajima A**, Inoue I. The impact of next-generation sequencing technologies on HLA research. **J Hum Genet**, 60:665-673, 2015. doi: 10.1038/jhg.2015.102 (査読有).
 15. Inoshita M, Numata S, **Tajima A**, Kinoshita M, Umehara H, Yamamori H, Hashimoto R, Imoto I, Ohmori T. Sex differences of leukocytes DNA methylation adjusted for estimated cellular proportions. **Biol Sex Differ**, 6:11, 2015. doi: 10.1186/s13293-015-0029-7 (査読有).
 16. Sato Y, **Tajima A**, Tsunematsu K, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, **Namiki M**, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. An association study of four candidate loci for human male fertility traits with male infertility. **Hum Reprod**, 30:1510-1514, 2015. doi: 10.1093/humrep/dev088 (査読有).
 17. Sato Y, **Tajima A**, Tsunematsu K, Nozawa S, Yoshiike M, Koh E, Kanaya J, **Namiki M**, Matsumiya K, Tsujimura A, Komatsu K, Itoh N, Eguchi J, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T. Lack of replication of four candidate SNPs implicated in human male fertility traits: a large-scale population-based study. **Hum Reprod**, 30:1505-1509, 2015. doi: 10.1093/humrep/dev081 (査読有).
- [学会発表] (計10件)
1. 小栗鈴、佐藤陽一、**田嶋敦**、佐藤丈寛、井本逸勢、岩本晃明、山内あい子：GWASによる血中 inhibin B レベル関連遺伝子座の探索。2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)。2017年。
 2. 木口美沙妃、佐藤陽一、**田嶋敦**、佐藤丈寛、井本逸勢、岩本晃明、山内あい子。GWASによる精子濃度の関連遺伝子座の探索。2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)。2017年。
 3. 佐藤丈寛、安達登、木村亮介、米田穰、太田博樹、**田嶋敦**、豊田敦、松前ひろみ、小金淵佳江、清水健太郎、埴原恒彦、Andrzej Weber、加藤博文、石田肇：古代ゲノム解析から推定される北アジアの人類集団史。日本人類遺伝学会第62回大会。2017年。
 4. 細道一善、井ノ上逸朗、**田嶋敦**、中岡博史、椎名隆、東史啓、猪子英俊、屋部登志雄、森島泰雄：Sequence Capture法によるKIRハプロタイプ構造決定と日本人

におけるその多様性. 第 26 回日本組織適合性学会大会. 2017 年.

5. 佐藤丈寛、安達登、木村亮介、米田穰、太田博樹、**田嶋敦**、松前ひろみ、清水健太郎、Andrzej Weber、加藤博文、石田肇：北海道礼文島浜中 2 遺跡出土オホーツク文化期人骨のゲノム解析. 第 70 回日本人類学会大会. 2016 年.
6. **田嶋敦**：次世代シーケンサーを用いた未診断疾患への取り組み. 第 70 回日本小児神経学会北陸地方会 公開シンポジウム. 2016 年.
7. Hosomichi K, Yabe T, Shiina T, **Tajima A**, Inoue I.: High-throughput sequencing method of the KIR haplotype for integrated MHC-KIR genotyping approach for clinical applications. ICHG2016 (第 13 回国際人類遺伝学会). 2016 年.
8. Sato Y, **Tajima A**, Katsurayama M, Imoto I, Yamauchi A, Iwamoto T.: A replication study of four candidate loci for sex hormone levels, identified by genome-wide association studies. ICHG2016 (第 13 回国際人類遺伝学会). 2016 年.
9. 葛山元貴、佐藤陽一、**田嶋敦**、井本逸勢、岩本晃明、山内あい子：性ホルモン関連遺伝子座 3 SNPs の日本人男性を対象とした replication 解析. 第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会. 2015 年.
10. 井下真利、沼田周助、**田嶋敦**、木下誠、梅原英裕、山森英長、橋本亮太、井本逸勢、大森哲郎：細胞異種性を考慮した末梢血白血球の DNA メチル化の性差の検討. 第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会 合同年会. 2015 年.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://big.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田嶋 敦 (TAJIMA, Atsushi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：1 0 3 9 6 8 6 4

(2) 研究分担者

並木 幹夫 (NAMIKI, Mikio)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：7 0 1 5 5 9 8 5

(平成 27、28 年度)

飯島 将司 (Iijima, Masashi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：7 0 7 4 9 1 6 8

(平成 29 年度)

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし