

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10642

研究課題名(和文) 無精子症に対する新規薬物療法確立のためのヒト精巢の網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文) Genome-wide analysis for human spermatogenesis

研究代表者

白石 晃司 (SHIRAIISHI, Koji)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00535255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト精巢組織から次世代シーケンサー(NGS)によるトランスクリプトーム解析を行った。23,616の遺伝子のmRNAについて解析を行ったところ、cell cycle, nucleic acid bindingなどの遺伝子群が高発現の上位を占めた。非閉塞性無精子症症例との比較においてその発現は特にヒストンH3.5などのエピジェネティック関連遺伝子に認められた。また精索静脈瘤症例においてcell cycle関連遺伝子の発現が低下し、精索静脈結紮術の効果と関連することが判明した。NGSによるトランスクリプトーム解析は造精機能障害の病態解明において有用な方法であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis using next-generation sequencer (NGS) for human testicular samples has shown that data from 23,616 genes were available and gene ontology analysis has shown that the gene clusters for cell cycle, nucleic acid binding. Expression of human specific histone H3.5 was revealed to be decreased in men with non-obstructive azoospermia (NOA) compared with that from normal spermatogenesis. Immunohistochemistry using an antibody against histone H3.5 has shown that histone H3.5 plays roles on DNA synthesis in spermatogonia and spermatocyte. Transcriptome analysis has also shown that expressions of cell cycle-related molecules in NOA men with varicocele and low expressions of these cluster of molecules was shown to be varicolectomy-resistant cases. Transcriptome analysis could provide a novel informations for human spermatogenesis and open diagnostic and therapeutic windows for male infertility treatment.

研究分野：アンドロロジー

キーワード：男性不妊 網羅的遺伝子解析 精巢

1. 研究開始当初の背景

不妊治療において顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI)をはじめとする補助生殖技術の進歩は華々しいが、顕微鏡下精巣内精子採取術 (micro-TESE)にて精子が採取できなかった非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia; NOA) 症例については治療法はない。我々はそのような患者に対しサルベージ内分泌療法 (hCG/FSH 療法) を行い、約 20% の症例で 2 回目の micro-TESE にて精子採取が可能であった。また精索静脈瘤を有する NOA 症例における精索静脈瘤手術の有用性も報告している。しかしサルベージ内分泌療法の効果を予測する因子や精索静脈瘤手術により術後の射出精子出現を予測する臨床的因子は不明であり、何らかの分子マーカーの探索が必要とされていた。

精子形成には精巣内テストステロンや EGF-like growth factor 以外の多くの因子が関与し、内分泌療法や精索静脈瘤手術に伴う精祖細胞や精母細胞などの精細胞の細胞動態や分化過程も非常に複雑であるため、一定の分子に着目した研究には限界があり、関与が大きいと考えられる分子の解析から検討するほうが効率的である。本研究においては新世代の高速ゲノム解析技術が不可欠であると判断し、我々はヒト精巣組織にて次世代シーケンサー (NGS) を用いたトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行っているため、網羅的遺伝子解析をスタートとし解析を進めていくこととした。

2. 研究の目的

トランスクリプトーム解析にてまず精巣内の RNA 発現を網羅的に解析することで造精機能障害の病態の解明を行う。

特に我々が注目しているヒト精巣特異的ヒストン H3.5 の特性と造精機能における役割について検討する。H3.5 遺伝子上流近傍のメチル化やアセチル化といった修飾などを解析するため、クロマチン-DNA の結合部位を解析する目的でクロマチン免疫沈降法 (ChIP アッセイ) を行う。遺伝子プロモーター領域のヌクレオソームの配置を中心とした染色体構造変化などの関与を調べる目的で、NGS を用いた ChIP-sequence にてゲノムワイドに H3.5 の DNA 結合サイトを同定する。

次に特定の分子に着目し、さまざまな病態 (NOA や精索静脈瘤など) における治療効果予測のための分子マーカーの探索を行い、臨床パラメーターとの比較検討を行う。更に遺伝子発現プロファイルに基づき造精機能障害に対する新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

Illumina 社 GaIIx を用い NGS を行い、遺

伝子発現については FPKM (fragments per kilobase of exon million fragments mapped) で定量的に表記する。発現が亢進または低下する遺伝子群について遺伝子エンサイクロペディアの作成を行う。臨床データ (内分泌学的データ、染色体検査、精巣容積など) と対象とした遺伝子発現との関連を解析する。精巣組織はさまざまな細胞により構成されるため、ある遺伝子発現の変化が単に細胞種の相違によるものかどうかを常に組織学的検討を行い確認した。特にヒト精巣に特異的に発現する、ヒストン H3.5 については閉塞性無精子症患者の精巣から得られた造精機能正常サンプルと NOA 症例から得られた精巣サンプルにおいてその発現の比較検討を行った。H3.5 に対する特異的抗体の作成について大川研究室にて完了しており、その抗体を用いたタンパクレベルでの発現の検討を行った。さらに H3.5 の発現レベルについて精巣組織像や臨床データ (内分泌学的データ、染色体検査、精巣容積など) との比較を行った。申請者は精祖細胞や精母細胞での DNA 合成の評価法として proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫組織学による定量的評価法を確立しており、H3.5 の発現レベルや局在との比較を行う。TUNEL 染色によりアポトーシスとの関連について解析した。

同様なアプローチにてヒストン H3.5 に限らず、精子形成正常例と低下例における遺伝子発現の差について解析し、比較的症例数の多い精索静脈瘤症例についての解析を行った。

4. 研究成果

造精機能が正常なヒト精巣組織から次世代シーケンサー (NGS) によるトランスクリプトーム解析を行った。23,616 の遺伝子の mRNA について gene ontology 解析を行ったところ、cell cycle, nucleic acid binding および transcription factor 関連の遺伝子群が高発現の上位を占めた。

H3.5 結晶構造解析により 103 番目のフェニルアラニンからロイシンへの置換により疎水結合が弱くなり、H3.5 は他のヒストンに比較し、ヌクレオソームとの結合が不安定であることを報告した。また ChIP-sequence にてヒト精巣において、H3.3 は promoter および遺伝子座に集積する一方で H3.5 はプロモーターおよび transcription start sites 周辺に選択的な集積が認められた。H4 は精巣内の全ての細胞の核に認められたのに対し、H3.5 は主に精祖および精母細胞に認められた。また OA 症例と比較し NOA 症例において明らかに H3.5 陽性細胞数の低下を認めた。Micro-TESE にて精子採取可能症例また hypospermatogenesis/late maturation arrest 症例では、精子採取不可能症例および early maturation arrest に比較しそれぞれ H3.5 陽性細胞数が有意に多かつ

た。H3.5 の発現は PCNA の発現と強い正の相関を認めた。サルベージ内分療法により H3.5 陽性細胞が増加する傾向を認めた。H3.5 はヒト精巣において主に精祖および精母細胞特異的に発現し、全身の他のヒストンとは異なるヌクレオソームへの結合パターンにて、未分化な精細胞の分化増殖に関与していることが示唆された。またその発現はゴナドトロピンによる制御を受けており、内分療法による造精機能の獲得機序について重要な役割を担っている可能性が見い出された。

精索静脈瘤を伴う NOA において精索静脈結紮術 (Vx) により、10~20% の症例で射出精子の出現を認めうる。Vx を行った NOA-varico で maturation arrest であった症例に限って、精巣組織における NGS を用いたトランスクリプトーム解析を行った。Vx 後の造精機能改善の有無別に遺伝子発現のプロファイルを検討したところ、射出精子を認めた症例において cell cycle 関連の遺伝子群の発現が高い傾向を認めた。Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) による免疫染色を行ったところ、術後精子出現群においては有意に精祖細胞における PCNA の発現が明らかに高かった。Vx は精細胞の cell kinetics が盛んな精巣において精細胞の分化および増殖を改善させうると考えられた。

これらの研究成果より NGS を用いたトランスクリプトーム解析は造精機能障害の病態解明について有用な解析法であることが示され、それを主体とした解析にて多くの病態において診断や治療に結びつくヒントを与えてくれることが判明した。

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 4 件)

- 1) Shiraishi K, Shindo A, Harada A, Kurumizaka H, Kimura H, Ohkawa Y, Matsuyama H. Roles of histone H3.5 in human spermatogenesis and spermatogenic disorders. *Andrology* 6(1), 158-165, 2018. DOI: 10.1111/andr.12438 査読あり
- 2) Shiraishi K, Matsuyama H. Gonadotropin actions on spermatogenesis and hormonal therapies for spermatogenic disorders. *Endocrine Journal* 64(2), 123-131, 2017. DOI: 10.1507/endocrj.EJ17-0001 査読あり
- 3) Shiraishi K, Oka S, Matsuyama H. Predictive factors for sperm recovery after varicocelelectomy in men with non-obstructive azoospermia. *J Urol* 197(2), 485-490, 2017. DOI: 10.1016/j.juro.2016.08.085 査読あり

- 4) Urahama T, Harada A, Maehara K, Horikoshi N, Sato K, Sato Y, Shiraishi K, Sugino N, Osakabe A, Tachiwana H, Kagawa W, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenet Chromatin* 15; 9.2. 2016. DOI: 10.1186/s13072-016-0051-y 査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) 白石晃司、日高幸浩、岡 真太郎、松山豪泰. ヒト精巣組織を用いたトランスクリプトーム解析による造精機能障害の解析. 日本アンドロロジー学会第 36 回学術大会. 2017 年 6 月 30 日. 倉敷芸文会館 (倉敷市).
- 2) Shiraishi K, Oka S, Matsuyama H. Roles of histone H3.5 in human spermatogenesis and spermatogenic disorders. *American Urological Association* 2017. 2017 年 5 月 12 日. Boston (USA).
- 3) 白石晃司、松山豪泰. 非閉塞性無精子症診療の進歩と課題. 第 68 回西日本泌尿器科学会総会. 2016 年 11 月 22 日. 海峡メッセ下関 (下関市).
- 4) 白石晃司、日高幸浩、岡 真太郎、松山豪泰. 男性不妊症とヒト精巣組織を用いた網羅的遺伝子解析. 日本アンドロロジー学会第 35 回学術大会. 2016 年 6 月 24 日. 前橋テルサ (前橋市).
- 5) Shiraishi K, Oka S, Matsuyama H. Transcriptome analysis of testicular tissues in men with non-obstructive azoospermia with varicocele and predictive factors of sperm recovery after varicocelelectomy. *American Urological Association* 2016. 2016 年 5 月 10 日. San Diego (USA).
- 6) 白石晃司、岡 真太郎、松山豪泰. 精索静脈瘤を伴う非閉塞性無精子症のトランスクリプトーム解析と静脈瘤術後の精子回収予測. 第 104 回日本泌尿器科学会総会. 2016 年 4 月 24 日. 仙台国際センター (仙台市).
- 7) 白石晃司. 研究奨励賞受賞講演: ゴナドトロピンの精子形成における作用機序と無精子症治療への応用. 第 89 回日本内分泌学会学術総会. 2016 年 4 月 23 日. 京都国際会館 (京都市).
- 8) 白石晃司、岡 真太郎、松山豪泰. 非閉塞性無精子症に対するサルベージ内分療法による精細胞の DNA 合成能と精巣内アンドロゲンレセプター発現の変化. 第 20 回日本生殖内分泌学会学術集会. 2016 年 1 月 9 日. 神戸国際会議場 (神戸市).

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 晃司 (SHIRAISHI, Koji)
山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00535255

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大川 恭行 (OHKAWA, Yasuyuki)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：80448430

(4) 研究協力者

なし