

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09166

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析による精子成熟停止の新規機序解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文) comprehensively analyze the genomic abnormalities that exist in male infertility

研究代表者

福原 慎一郎 (fukuhara, shinichiro)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：20609870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析により男性不妊患者に存在するゲノム異常を網羅的に解析し、既知の原因遺伝子だけでなく新規の男性不妊原因遺伝子や点突然変異を見出すことを目的とした。現時点で、すでに男性不妊症、中でも最も重症な無精子症患者のうち、精巣内精子採取術を施行し、精巣組織病理検査にて成熟停止の診断であった50症例の血液からゲノムを抽出し、次世代シーケンサーにて全エクソンシーケンスを行った。成熟停止症例における遺伝子変異が見つかってきており、現在解析を進めているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠希望夫婦の1割が不妊に悩み、男性不妊症は原因の半分を占めるにもかかわらず大部分が未だ原因不明であり少子高齢化が進む本邦において原因の解明が強く望まれている。近年DNA解読技術の飛躍的な進歩に従い様々な疾患のゲノム変異を包括的に解析することが可能になり種々の分野で応用されているが男性不妊症の分野では遅れている。本研究ではさらに次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析により男性不妊患者に存在するゲノム異常を網羅的に解析し、既知の原因遺伝子だけでなく新規の男性不妊原因遺伝子や点突然変異を見出す。最終的には新たな男性不妊症診断および新たな治療法の開発に資する結果となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to comprehensively analyze the genomic abnormalities that exist in male infertility patients by analyzing all the exons using next-generation sequencers, and to find not only known causative genes but also new causative genes and point mutations for male infertility. We extracted genomes from the blood of 50 patients with azoospermia, the most severe form of male infertility, who had undergone intratesticular sperm extraction and were diagnosed as having maturation arrest by testicular histopathology, and sequenced all exons using a next-generation sequencer. Genetic mutations have been found in cases of maturation arrest, and we are currently analyzing them.

研究分野：男性不妊症

キーワード：男性不妊症

## 1. 研究開始当初の背景

わが国や欧米諸国では、全夫婦の割以上が不妊に悩まされており、その原因の半分は男性側にある。しかし、男性不妊については遺伝的素因や環境ホルモンなどの関与が示唆されているが、大部分が原因不明である。少子高齢化が進む我が国において不妊症は出生率低下の要因の一つとして少子化社会対策基本法〔2003年〕にもその治療支援が盛り込まれ、不妊症への社会的関心が一層高まっている。さらに男性因子へ社会的関心の高まりの結果、独自の男性不妊治療支援制度を取り入れる自治体が増加し、また2016年1月からは特定不妊治療助成の一環として男性不妊への助成金新設が開始された。最も重症な男性不妊症である非閉塞性無精子症はその精巣病理組織所見からセルトリセルオンリー症候群(SCOS: Sertoli cell only syndrome)(生殖細胞欠如)成熟停止(MA: Maturation arrest)(前期成熟停止および後期成熟停止)そして精子低形成(HS: Hypospermatogenesis)の大きく3病型に分類される。非閉塞性無精子症後期成熟停止や精子低形成は加齢や環境因子などによる二次的变化と推測され、多くは精巣内精子採取術で治療可能であるが、SCOSや前期成熟停止では、大部分が精子採取不可能である。また、僅かに精子が採取できたとしても、その精子の妊孕能は低く、大部分は挙児を得ることができず、多くの不妊カップルが身体的、経済的負担のみを負わされている。この非閉塞性無精子症の不十分な治療効果に加えて、さらにTESE-ICSIによって得られた出生児にも高頻度で男性不妊が認められるなどの後世への遺伝的問題もあり、非閉塞性無精子症の発症メカニズムの理解に立った診断・生殖補助医療の開発が強く望まれている。生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝承する役目を担っており、種の保存、繁栄に必須で、世代を越えて生存し、個体全体を作りうる全能性を保有しているなど、体細胞系列とは、大きく異なる特徴を有しているが、その詳細な分子機構は不明な点が多い。その全貌を解明することは非閉塞性無精子症の未だ不明な病因病態を解明する手がかりになり、真に不妊カップルに福音となる新しい診断法および治療法の開発につながると考えられる。

昨今、種々の分野でDNA解読技術の飛躍的な進歩に従い、次世代シーケンサーを用いて様々な疾患のゲノム変異を包括的に解析することが可能になってきている。その中でもがんはゲノム異常が蓄積することによって発症・進行するゲノムの病気であり、世界中で網羅的ゲノム解析や個別改良の開発が精力的に行われている。がんのゲノム変異の全容解明とカタログ化を目指し、「国際がんゲノムコンソーシアム(ICGC)」が発足し、全ゲノム解析が精力的に行われ、診断や個別改良の分野において重要な位置を占めつつある。これまで我々は独自に開発した精巣生殖細胞特異的発現をするcDNAを濃縮したマウス精巣ライブラリーなどから80クローン以上の遺伝子を単離し、これらの解析を進めるとともにヒト相同遺伝子(オルソログ)も逐次クローニングしてきた。さらに、これらのヒト遺伝子について日本人不妊男性、正常対照男性各300人についてそれぞれの全塩基配列を決め、その遺伝子多型Single Nucleotide Polymorphisms(SNPs)を比較検討し、不妊症例に特異的なSNPsを持つ不妊症関連遺伝子を同定してきた。その結果、単一の責任遺伝子の変異が不妊症の原因である頻度はわずか1%以下であることが明らかになった一方で、半数体生殖細胞特異的遺伝子の一つ(新規遺伝子X)において、不妊症群の5%近い症例で検出でき、妊孕群に比べ統計学的に有意に5倍高頻度に出現するSNPも同定した。しかしながらこれらの解析ではgenotype-phenotypeの関連性が不十分であった。phenotypeが成熟停止と判明している非閉塞性無精子症患者に限定したゲノムを用いてエクソンシーケンスを行い、妊孕性が確認できている正常コントロールと比較することによりgenotype-phenotypeの関連性を評価できる解析を行う。

男性不妊の原因は多岐にわたりGenotypeの探索を行うだけではgenotypeとphenotypeの関連が不明なままとなってしまうが、phenotypeのわかった男性不妊患者のゲノムを用いることにより、phenotype毎の現遺伝子の探索を行うことができる。ART治療効果を予測する精子機能検査は分子生物学的手法により推し進められてきた。我々も精子や精漿あるいは精巣生検組織のプロテオミクス解析から精巣内精子採取やARTの治療予想の検討を行ってきたが、網羅的にゲノム因子を解明することにより、精巣内精子の採取予測とつなげることが可能になると思われ、本研究は実用性と将来性を兼ね備えた医学的にも生殖生物学的にも重要なプロジェクトである。

## 2. 研究の目的

われわれはこれまで精子細胞に特異的に発現する多数の遺伝子をクローニングし、新たな男性不妊症診断法の開発を試みてきた。本研究ではさらに男性不妊の原因を網羅的に探究するため近年発展の著しいゲノム研究を男性不妊研究に発展させることを目的としている。少子化対策は特に本邦において喫緊の課題であるにもかかわらず、男性不妊を対象にした次世代シーケンサー等を用いたゲノム研究はがんの分野に比べて立ち遅れており、この分野でも研究の発展が非常に望まれるところである。本研究では、新たな男性不妊症の原因遺伝子を見出し、さらには身体的にも経済的にも負担の少ない男性不妊症の新規診断法を開発し、的確な不妊症治療法の

選択に資することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 成熟停止による非閉塞性無精子症患者のゲノム変異・SNP 解析

最も重症な男性不妊症患者の中でも成熟停止症例においているゲノム変異の同定を行う。平成30年度は既に提供を受けているサンプル100症例分の解析をすすめる。その後も引き続き無精子症患者からの血液検体収集を行う。医学的適応と患者同意があれば、精巣生検術や精巣内精子採取術を行い、その成績を明らかにするとともに精巣組織検体の収集を行う。

男性不妊症患者の精子および全血から抽出したゲノムを次世代シーケンサーを用いて、全エクソン解析を行う。男性不妊症発症に関連のある遺伝子を同定する。全エクソンシーケンス、および解析は東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻クリニカルシーケンス分野にて行う。本研究では、無精子症患者のゲノムとこれまで蓄積された数十万人のゲノムを用い、無精子症とくに成熟停止と連動するSNPを見出し感受性遺伝子を同定する。

#### 2) 精巣内精子の採取予測の非侵襲的な検査法・治療法の開発、論文作成

最近、精子の運動性や形態のみならず、精子代謝状態が妊孕性と関連する事実や精子あるいは精漿中タンパク組成と精子妊孕性が関連することが明らかにされてきている。しかしながら、これまでの単一の代謝系パラメータやタンパクマーカーは測定法が煩雑でコスト面や再現性、さらに感度・特異度ともに実用的とは言えない。上記の検討結果を解析した結果から得られる様々な異常と無精子症に対する精巣内精子採取術の採取成績とを解析検討し、精巣内精子採取の予測の非侵襲的な検査法の開発を試みる。本研究で得られた知見を国内外の学会で発表し、査読のある学術誌へ論文投稿を行う。

### 4. 研究成果

不妊を主訴に当院および協力施設を受診し、非閉塞性無精子症の診断で精巣内精子採取術を行った患者のうち成熟停止と診断された50例を対象とし、患者全血液より germline のゲノムDNAを採取した。SureSelect Clinical Research Exome V2を使用し Illumina 社性 HiSeq3000 にて全エクソンシーケンスを施行した。

シーケンスデータから下記条件で変異コールを行った。

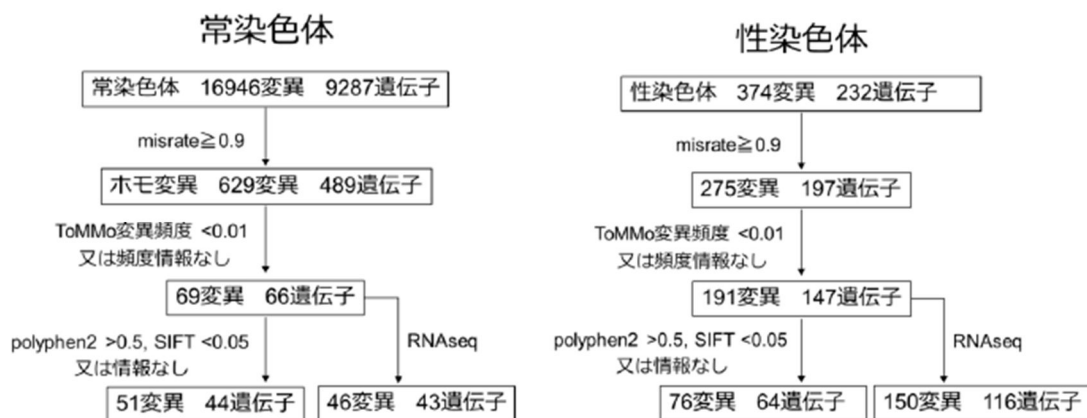
min\_depth>8, base\_quality>15, map\_quality>20, min\_variant\_read>4

min\_allele\_freq>0.02, post\_10\_q>0.02

50 検体中 44748 ケ所の変異 (9516 遺伝子、19197 ケ所) を見出した。

常染色体についてはホモ変異および性染色体で見つかった変異の中から公共データベース内の頻度に対し有意差を認めるものを抽出した。

公共データベースは ToMMo を使用した。



ホモ変異および公共データベースとの頻度情報に従って得られた絞り込み遺伝子数は上述のとおりである。

得られた遺伝子について検証作業および機能解析、別コホートでの検証を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Soda Tetsuji, Miyagawa Yasushi, Fukuhara Shinichiro, Tanaka Hiromitsu	4. 巻 19
2. 論文標題 Physiological role of actin regulation in male fertility: Insight into actin capping proteins in spermatogenic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reproductive Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 120 ~ 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/rmb2.12316	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki Yusuke, Fukuhara Shinichiro, Imamura Ryoichi, Kobayashi Yuki, Kuribayashi Sohei, Okada Koichi, Sekii Yosuke, Takezawa Kentaro, Kiuchi Hiroshi, Uemura Motohide, Kobayashi Hikaru, Nonomura Norio	4. 巻 9
2. 論文標題 Novel hydrogen producing Si based agent reduces oxidative stress, and improves sperm motility and in vitro fertilization rate in varicocoele	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 376 ~ 383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/andr.12890	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福原慎一郎
2. 発表標題 無精子症に対する取り組み
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮川 康  (miyagawa yasushi)  (70362704)	大阪大学・医学系研究科・招へい准教授    (14401)	
研究分担者	木内 寛  (kiuchi hiroschi)  (70403053)	大阪大学・医学系研究科・講師    (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関