

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09668

研究課題名(和文) Y染色体微小重複が男性不妊症に与える影響 - Y染色体は微小欠失だけではない -

研究課題名(英文) The effect of Y chromosome microduplication on male infertility

研究代表者

飯島 将司 (Iijima, Masashi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70749168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Y染色体微小欠失が男性不妊症、とりわけ無精子症の原因の一つであることはよく知られている。Y染色体長腕の特定の領域はその構造的特徴から欠失や重複を来しやすく、また小さな領域であるため通常の染色体検査では診断が困難である。欠失は従来PCRと電気泳動法による古典的な検査法で診断をしていたが、MLPA法はコピー数の増加も調べることができる感度の良い方法として着目した。その結果、微小欠失はもちろんのこと、従来方法では検出が難しかったコピー数の増加も検出することができた。MLPA法は男性不妊症においてY染色体のコピー数を調べるのに有用な方法と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不妊症の診療は2022年4月より一部が保険適用化され、男性不妊症患者におけるY染色体微小欠失の検査についても従来自費で行われていたが、保険適用されることとなった。今回保険適用された検出方法はPCR-rSSO法でコピー数の増加については検出することができない。一方で、MLPA法はコピー数の増加も検出することができ、またその検出方法は解析が難しいY染色体を調べるのに適していると考えられる。検査コストも抑えられるため、今後のスタンダードな検査法として検討できるのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is well known that Y chromosome microdeletion is one of the causes of male infertility, especially azoospermia. Deletions and duplications are sometimes detected in the specific region of the long arm of the Y chromosome due to their structural characteristics. Because the regions including deletions and duplications are small, it is difficult to diagnose by conventional chromosomal karyotyping. Y chromosome microdeletions have been diagnosed by the classical test method of PCR and electrophoresis, but the MLPA method was focused on as a sensitive method that can also detect the increase in the number of gene copies. As a result, it was possible to detect not only deletions but also an increase in the number of copies, which was difficult to detect by conventional methods. The MLPA method was considered to be a useful method for examining the number of copies of the Y chromosome in male infertility.

研究分野：男性不妊症

キーワード：Y染色体 男性不妊症

1. 研究開始当初の背景

不妊症は現在少子化問題を抱える本邦において取り組むべき重大な問題であり、社会的な関心も年々高まってきている。不妊症は男女双方の問題としてとらえるべき必要があり、WHO のデータでは約半数に男性因子が関与していることが示されている。男性不妊症の原因は様々であるが、その 8 - 9 割は精巣における精子形成障害であるとされている。よって、男性不妊症について考えるうえで精子形成障害についての研究が非常に重要であるといえる。精子形成障害の原因は多彩であるが、半数近くが不明であるのも事実である。その中で比較的頻度が高く、疾患との関連性が確実であるのが遺伝学的な原因である。精子形成障害を引き起こす遺伝学的異常には染色体の数や構造として表現される染色体核型異常と、染色体核型検査では判断することができない Y 染色体の微小欠失とに大別される。染色体核型異常は男性不妊患者の約 5% に認め、Y 染色体微小欠失は無精子症や高度乏精子症を対象とした場合に 10% 前後に認めることが分かっている。そのような背景から欧米のガイドラインでは無精子症および高度乏精子症に対して染色体核型検査および Y 染色体微小欠失の検査を行うことを推奨している[1]。

精子形成障害が高度になると射出精液中の精子数が減少し、最終的には無精子症となってしまう。無精子症に対する根本的な治療法はほぼないのが現状であり、精巣内にわずかに残っている可能性のある精子を外科的に回収する精巣精子採取術に望みを託すのみである。しかしながら、精巣精子採取術によって精子が回収できる可能性は患者背景によって違いはあるが、一般的に 30 - 50% 程度とされている。精巣精子採取術を行う前には特に遺伝学的検査を行う必要性が高いが、これはある特定の異常を認めた場合に手術による精子回収率がほぼ 0% である症例があるためである。その特定の異常のほとんどが Y 染色体に関連する異常であり、そのため Y 染色体微小欠失の検査が臨床的に特に重要であるといえる。

Y 染色体微小欠失の検査についてはヨーロッパアンドロロジー学会のガイドラインで推奨されている方法があり[2]、我々の施設でもガイドラインに則り日本国内の検査の多くを引き受けていた経緯がある。検査を行ってきた中で、欧米のデータを基にした方法では検査の精度に疑問が感じられたため、日本人に適した検査方法があるのではないかと模索し、新たな検査法を開発した[3]。現在ではこの検査法を用いて日本国内で多くの施設が Y 染色体微小欠失の検査を行っている。

【参考文献】

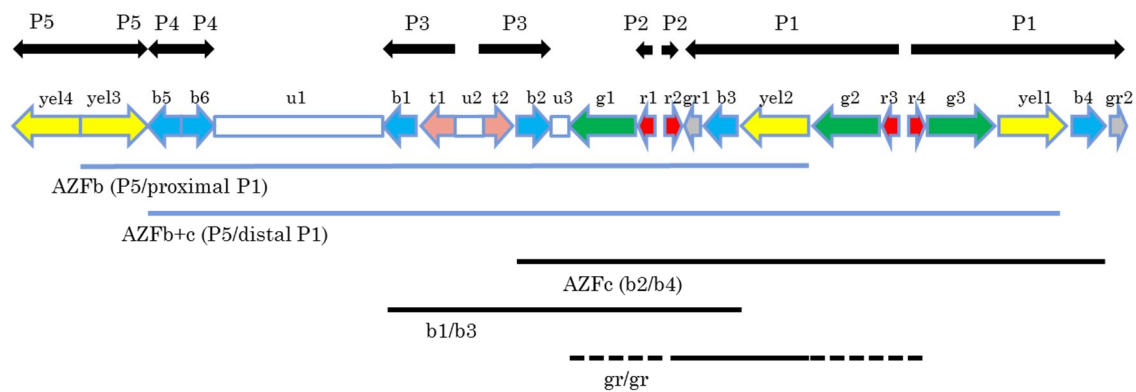
1. Guidelines on Male Infertility: European Association of Urology. 2013.
2. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*. 2014;2(1):5-19.
3. Iijima M, Koh E, Izumi K, Taya M, Maeda Y, Kyono K, et al. New molecular diagnostic kit to assess Y-chromosome deletions in the Japanese population. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*. 2014;21(9):910-6.

2. 研究の目的

Y染色体微小欠失のメカニズムに注目すると、Y染色体はパリンドローム(回文)構造(図1)と呼ばれる繰り返し配列を多く持つため、染色体内相同組み換えを起こしやすく、その結果欠失や重複を来しやすくとされている。その結果遺伝子のコピー数の変化を来し、精子形成障害を引き起こす。しかし、我々の開発した新検査法も従来の方法と同様ゲノムDNAのPCRによる増幅が基盤としてあるため、欠失の有無の評価は可能であるが、重複が起きた場合にその領域の遺伝子群のコピー数の変化をとらえることはできない。

本研究では欠失及び、重複によるY染色体上の遺伝子のコピー数の変化がどのように精子形成に影響を与えるのかという点に注目し、Y染色体微小重複について調べることを目的とした。

【図1. Y染色体長腕のパリンドローム構造および微小欠失のパターン】



3. 研究の方法

対象は過去に不妊を主訴に受診し、STS-PCR法でY染色体微小欠失の検査を受けた日本人男性のうちY染色体微小欠失の診断を受けた83名、コントロールとして欠失を認めなかった12名につき検討した。STS-PCR法でY染色体微小欠失と診断された83名の結果の内訳はAZFa欠失:4名、AZFb(P5/proximal P1)欠失:1名、AZFc(b2/b4)欠失:13名、AZFb+c(P5/distal P1)欠失:11名、b1/b3欠失:6名、b1/b4欠失:4名、b2/b3欠失:27名、gr/gr欠失:17名。

末梢血リンパ球より得られたゲノムDNAを用いてMLPA(Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)法にてY染色体遺伝子のコピー数変化を調べた。SALSA®MLPA® Probemix P360-B2 Y-Chromosome Microdeletionsを用いてプロトコールに従いゲノムDNAを増幅、Applied Biosystems 3730xl DNAアナライザでフラグメント解析を行った。データの解析はCoffalyser.NET(MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands)で行い、欠失のパターン分類は検査キットの説明書に従った。

4. 研究成果

STS-PCR法とMLPA法の結果は概ね同様の結果であった。それぞれの欠失パターン別にみると、欠失なし(STS-PCR法)の12名中1名でHSFY1の2コピーから3コピーの重複を認めた。AZFc欠失(STS-PCR法)の13名は全て典型的なコピー数のパターンで結果は一致していた。gr/gr欠失(STS-PCR法)の17名の内、14名で典型的なパターンであった。3名でb2/b4重複+gr/gr欠失のパターンであった。AZFa欠失4名は全て典型的なパターンであった。AZFb欠失1名も典型的なパターンであった。AZFb+c欠失(STS-PCR法)の11例は11例全例典型的なパターンで結果は一致していた。b1/b4欠失(STS-PCR法)の4例も4例全例で結果は一致していた。b1/b3欠失(STS-PCR法)の6名の内4名は典型的なパターンであった。しかし、

b2/b3 欠失 (STS-PCR 法) の 26 例では結果が一致していたのは 12 例だけであり、9 例は欠失なしと診断された。また、染色体異常のうちモザイクを認めているものに関してはモザイク頻度によってコピー数の変動は影響を受けており、モザイク頻度の推測も可能であった。

MLPA 法の結果は概ね STS-PCR 法の結果と一致しており、Y 染色体微小欠失の検出方法として十分臨床使用が可能と考えられた。b2/b3 欠失で結果が異なっていたのは、STS-PCR 法では sy1191 の欠失のみで判断せざるを得ないところを、MLPA 法ではその他複数のマーカーのコピー数の変化で判断ができるため、STS-PCR 法の結果が誤っていたと考えられる。

また、gr/gr 欠失は世界的には比較的稀な欠失パターンであり造精機能障害のリスクが軽度上昇すると報告されているが、日本人男性においては Y 染色体ハプログループ D に非常に多く認められるため、33%程度の出現率であり男性不妊症のリスクになるとは考え難いと考えられている。しかし、これらのデータは STS-PCR 法による検査結果に基づいており、コピー数の増加については検討されていないものがほとんどである。今回の研究においても STS-PCR 法で gr/gr 欠失と診断された 17 名のうち 3 名で重複を合併しており、これらが造精機能への程度影響しているかは今後の検討の余地があると考えられる。

MLPA 法は配列特異的なプローブにユニバーサルプライマーを結合させたものをハイブリダイゼーションさせた後に PCR で増幅し、キャピラリー電気泳動機でコピー数を測定するという原理のため、繰り返し配列が多く、またその繰り返し配列の部位でコピー数の増減が生じる Y 染色体の解析には非常に適した検査法であると考えられる。リアルタイム PCR 法などでコピー数を見る報告も散見されているが、マルチプレックス PCR で同時測定できるプローブ数には限りがあり効率面で劣ると考えられる。その点で MLPA 法はユニバーサルプライマーによる増幅を行うため条件は一定であり、また、プローブを結合させる配列の自由度も高く、スループット性にも優れている。プローブ設計の見直しの余地はあり、現在利用できる製品が限定されているという難点はあるが今後に期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯島将司
2. 発表標題 Y染色体微小欠失を伴う男性不妊症患者におけるY染色体遺伝子のCNVの評価
3. 学会等名 第56回北陸生殖医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯島将司
2. 発表標題 Y染色体微小欠失を伴う男性不妊症患者におけるY染色体遺伝子のCNVの評価
3. 学会等名 第71回日本泌尿器科学会中部総会
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	田嶋 敦 (Tajima Atsushi) (10396864)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究分担者	堀家 慎一 (Horike Shinichi) (40448311)	金沢大学・学際科学実験センター・准教授 (13301)	

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
---------	---------