

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22762

研究課題名（和文）次世代シーケンサーを使用した精巢内精子採取術による精子回収予測システムの構築

研究課題名（英文）Developments of sperm recovery prediction system by micro-TESE using next-generation sequencer

研究代表者

佐藤 陽一（SATO, Youichi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・教授

研究者番号：10363160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではmicro-TESEによる精子回収予測システムを構築することを目的とした。全エクソームシーケンス解析により得た変異のうち、健常者には無くタンパク質の機能に影響を与えるアレル頻度1%以下の変異を対象に検討を行ったが、応用が期待される精子回収予測モデルの構築には至らなかった。しかし、新規の精子回収予測因子を示唆する遺伝子変異を見出した。一方、ゲノムワイド関連解析から得た上位の変異について検討した結果、精巢特異的に発現している遺伝子上の3変異を用いた場合に正解率が最高値を示した。今後、例数を増やして検討することで、より信頼性の高い精子回収予測システムの構築が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム情報を用いた機械学習はmicro-TESEによる精子回収予測システムの開発に期待できることを示した。少子化対策が焦点の課題となる現代社会において、妊娠を望んでいる夫婦の6組に1組は不妊で悩んでいる。本研究により構築したmicro-TESEによる精子回収予測システムが応用されれば、精子回収の見込みの無いmicro-TESEの回避につながり、患者の精神的、身体的、経済的負担の軽減が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop the sperm recovery prediction system using micro-TESE. Among the variants obtained by whole exome sequence analysis, we investigated variants with an allele frequency of 1% or less that affect protein function, which are not found in healthy subjects. It did not reach the development of sperm recovery prediction system. However, we found a gene variant suggesting a novel sperm recovery predictor. On the other hand, as a result of examining the upper variants obtained from the genome-wide association study, the accuracy rate was the highest when 3 variants on the gene expressed specifically in the testis were used. In the future, it is expected that a more reliable sperm recovery prediction system will be developed by increasing the number of cases.

研究分野：遺伝医学

キーワード：男性不妊症 非閉塞性無精子症 次世代シーケンス micro-TESE 機械学習

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

妊娠を望んでいる夫婦の 6 組に 1 組が不妊で悩んでおり、その原因の半分は男性側にあると言われている。男性不妊症の原因は精子形成障害によるものが 8~9 割を占めており、精液中に精子がみられない無精子症、精子の数が少ない乏精子症、精子の運動率が悪い精子無力症として認知される。乏精子症や精子無力症の場合は精子数の増加・運動率の向上を期待して漢方薬やビタミン剤などが使用されている。しかし、無精子症の場合は有効な治療薬は無く、唯一行われているのが、顕微鏡下で精巣内の精子を採取する手術 micro-TESE である。この micro-TESE は 1 時間以上を要する手術で、術後の疼痛も続くこともあり、患者にとって身体的な負担は大きい。また、手術費用も保険が適用されないことから経済的な負担も大きく、さらに micro-TESE により、精子が回収できる可能性は 30~40%であることから、精子が回収できなかった場合の精神的な負担は大きい。

遺伝学的な知見から、無精子症患者の 1 割に Y 染色体の長腕に位置する無精子症候補領域 (AZF) の欠失がみられる。AZF は a, b, c の 3 領域からなり、このうち、a, b が欠失している場合は精子回収が不可能であることから、AZF 領域の欠失検査は、精子回収を予測する上でも有用である。しかし、残りの 9 割については、micro-TESE により精子が回収できるかどうかを予測するシステムが無い。従って、精子の回収が見込まれない micro-TESE の実施を回避するためにも精子回収を予測するシステムの開発が必要である。

### 2. 研究の目的

これまでに、micro-TESEによる精子回収の予測として、生殖ホルモン値などとの関係が検討されてきた。しかし、未だ精子回収を予測する因子はみつかっていない。昨今のゲノム解析技術の革新により、比較的安価で全ゲノム解析ができるようになり、疾患原因遺伝子の同定のみならず、がん領域を主とする疾患の診断にも使われ始めている。ゲノム解析は主に疾患の原因遺伝子を探索するために利用されてきたが、micro-TESEによる精子回収を予測に利用できないかと考えた。一方で、機械学習などを用いた人工知能(AI)は医用画像AI分析など、医療分野でもAI技術の実用化が進んでいる。そこで、本研究では次世代シーケンサーやマイクロアレイを使用した網羅的なゲノム情報から機械学習を用いて、micro-TESEによる精子回収予測システムを構築することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 全エクソームシーケンスによる変異遺伝子の抽出

国際医療福祉大学病院リプロダクションセンターにおいて、micro-TESE が施行された非閉塞性無精子症患者 29 名を対象に、次世代シーケンサーを用いて、エクソン領域のシーケンス解析を行った。シーケンス解析で得られた塩基配列をヒト参照配列にマッピングし、single nucleotide variants (SNV), insertion/deletion (Indel) などの変異を抽出した。抽出した変異について、アノテーションツールを用いて、タンパク質の機能に影響を及ぼす変異を絞り込んだ。さらに、ゲノムデータベースを使用して、頻度が 1%以下の変異に絞り込んだ。

#### (2) ゲノムワイド関連解析

micro-TESE が施行された非閉塞性無精子症患者 28 名を対象に Illumina Asian Screening Array-24 Kit を用いて遺伝子型を判定し、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行った。GWAS により精子回収の有無と関連を示した SNVs について、別途収集した非閉塞性無精子症患者 5 名を validation 検体とし、サンガーシーケンスにより遺伝子型を決定した。

#### (3) 機械学習を用いた精子回収予測モデルの構築

機械学習のアルゴリズムとして Random Forest (RF)、Support Vector Machine (SVM)、Naïve Bayes (NB)、Neural Network (NN) を用いた。機械学習に用いる SNVs を増減させて正解率を比較し、最も正解率が高くなる SNVs 及びアルゴリズムを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 全エクソームシーケンスによる精子回収予測モデルの構築

非閉塞性無精子症と診断され、micro-TESE が施行された 29 名を対象にした。全エクソームシーケンス解析により、参照配列と異なる変異は一人あたり約 5 万塩基であった。このうち、タンパク質の機能に影響を与えるアレル頻度 1%以下の変異を絞り込み、さらに健常者 3 名にはない変異を抽出した結果、29 名で 1143 の変異が抽出された。抽出された 1143 変異について機械学習を行った。29 名のうち 28 名を学習群 1 名を試験群として、それぞれ交互に 29 回機械学習を行い正解率を算出した。しかし、いずれのアルゴリズムにおいても正解率が低かった。そこで、抽出した変異のうち 2 検体以上に共通していた 107 の SNVs と Indel に絞り込み、再度機械学習を行った。RF が最も高い正解率 65.5%を示したが、応用が期待される精子回収予測モデルの構築

には至らなかった。

一方、抽出した SNV の中に精子が回収されなかった 4 名にのみに共通していた SNV が 5 個あった。これらのうち 3 遺伝子は精子形成に関与していると報告されており、新規の精子回収予測因子である可能性が示唆された。

## (2) GWAS を用いた機械学習による精子回収予測モデルの構築

非閉塞性無精子症と診断され、micro-TESE が施行された 28 名を対象にした。アレイを用いたゲノム解析により、約 600,000 の SNV を得た。28 名のうち 27 名を学習群として約 600,000 の SNV について GWAS を行い、P 値 0.005、0.01、0.05 以下の SNV を抽出した。これらの解析を 28 名につき、交互に 28 回行った。モデルとし RF、SVM、NB、NN を用いて機械学習を行った。学習させていない残りの 1 名を試験群とし、28 名それぞれがテスト群となるように、合計 28 回シミュレーションした。また、正解率が高くなるような SNV の選択を検討した。関連解析の結果から、P 値 0.005、0.01、0.05 以下の SNV を抽出して機械学習を行った結果、P 値 0.01 以下の SNV が最も正解率が高かった。4 種のモデルで比較したところ、NB が最も高い正解率 78.5% を示した (表 1)。

表 1. 機械学習の結果

Random Forest				Naive Bayes			
	P<0.05	P<0.01	P<0.005		P<0.05	P<0.01	P<0.005
正解率	67.9%	67.9%	67.9%	正解率	64.2%	78.5%	64.3%
感度	67.9%	67.9%	67.9%	感度	66.7%	81.0%	73.7%
特異度	ND	ND	ND	特異度	0%	71.4%	44.4%
陽性的中度	100%	100%	100%	陽性的中度	94.7%	89.5%	73.7%
陰性的中度	0%	0%	0%	陰性的中度	0%	55.6%	44.4%

  

Support Vector Machine				Neural Network			
	P<0.05	P<0.01	P<0.005		P<0.05	P<0.01	P<0.005
正解率	67.9%	75.0%	67.9%	正解率	ND	75.0%	64.3%
感度	67.9%	73.1%	70.8%	感度	ND	77.3%	73.7%
特異度	ND	100%	50.0%	特異度	ND	66.7%	44.4%
陽性的中度	100%	100%	89.5%	陽性的中度	ND	89.5%	73.7%
陰性的中度	0%	22.2%	22.2%	陰性的中度	ND	44.4%	44.4%

次に、GWASにより精子回収の有無と関連を示した上位10 SNVについて、別途収集した非閉塞性無精子症患者5名をvalidation検体とし、サンガーシーケンスにより遺伝子型を決定した。GWASを行った28検体を学習群として機械学習を行い、validation検体を試験群として正解率を算出した。機械学習に用いるSNVを上位10 SNV間で増減させて正解率を比較し、最も正解率が高くなるSNV及びアルゴリズムを検討した。その結果、関連が強い上位6 SNVsを用いた時、高い正解率を示した。また、10遺伝子の中で精巣特異的に発現している3遺伝子について、その組み合わせで検討した結果、3 SNV全てを用いた場合にNB及びNNアルゴリズムの正解率が最高値を示した(表 2)。

表 2. 精巣特異的発現遺伝子上のSNVを用いた機械学習の正解率

	アルゴリズム			
	Random Forest	Support Vector Machine	Naïve Bayes	Neural Network
1 SNV①	3/5(60%)	3/5(60%)	3/5(60%)	3/5(60%)
1 SNV②	4/5(80%)	4/5(80%)	4/5(80%)	4/5(80%)
1 SNV③	2/5(40%)	2/5(40%)	2/5(40%)	2/5(40%)
2 SNV①	3/5(60%)	4/5(80%)	5/5(100%)	4/5(80%)
2 SNV②	3/5(60%)	4/5(80%)	2/5(40%)	4/5(80%)
2 SNV③	4/5(80%)	4/5(80%)	2/5(40%)	4/5(80%)
3 SNV	4/5(80%)	4/5(80%)	5/5(100%)	5/5(100%)

今回、患者 28 例を対象とした検討であるが高い正解率を示したことから、今後、例数を増やして検討することで、より信頼性の高い精子回収予測システムの構築が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 Youichi Sato, Atsushi Tajima, Misaki Kiguchi, Suzu Kogusuri, Aki Fujii, Takehiro Sato, Shiari Nozawa, Miki Yoshiik, Makiko Naka-Mieno, Kosuke Kojo, Masahiro Uchida, Haruki Tsuchiya, Kazumitsu Yamasaki, Issei Imoto, Teruaki Iwamoto	4. 巻 65
2. 論文標題 Genome-wide association study of semen volume, sperm concentration, testis size, and plasma inhibin B levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 683-691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-020-0757-3	査読の有無 有
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 佐藤 陽一	4. 巻 51
2. 論文標題 男性不妊症関連遺伝子の精子形成メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 38-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 佐藤 陽一	4. 巻 3
2. 論文標題 男性不妊症関連遺伝子の精子形成メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 81-84
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福永 千香, 古城 公佑, 内田 将央, 土屋 春樹, 山崎 一恭, 岩本 晃明, 佐藤 陽一
2. 発表標題 次世代シーケンス解析は非閉塞性無精子症の原因解明に有効か?
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎 瑞貴, 上殿 千晴, 古城 公佑, 内田 将央, 土屋 春樹, 山崎 一恭, 岩本 晃明, 佐藤 陽一
2. 発表標題 家系を対象とした次世代シーケンス解析による新規男性不妊症原因遺伝子の同定と遺伝子改変マウス作製による精子形成に関する検討
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 濱口 恵寛, 山崎 一恭, 岩本 晃明, 佐藤 陽一
2. 発表標題 GWASによる精索静脈瘤関連遺伝子座の探索
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 亜紀, 山崎 一恭, 岩本 晃明, 佐藤 陽一
2. 発表標題 ゲノムワイド関連解析によるInhibin B値関連遺伝子座の同定と遺伝子改変マウス作製によるInhibin B産生に関する検討
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 陽一, 古城 公佑, 内田 将央, 土屋 春樹, 山崎 一恭, 岩本 晃明
2. 発表標題 個別化医療に向けた非閉塞性無精子症患者の次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第64回日本生殖医学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Youichi Sato, Fukunaga Chika, Kojo Kosuke, Uchida Masahiro, Tsuchiya Haruki, Yamasaki Kazumitsu, Iwamoto Teruaki
2. 発表標題 Elucidation of the causative gene of non-obstructive azoospermia by whole-exome sequencing.
3. 学会等名 American Society of Human Genetics, Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 陽一
2. 発表標題 ゲノムワイド関連解析によるヒト精子形成機構に関わる遺伝子の探索と機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎 瑞貴, 上殿 千晴, 古城 公佑, 内田 将央, 土屋 春樹, 岩本 晃明, 佐藤 陽一
2. 発表標題 男性不妊症新規原因遺伝子の同定と遺伝子改変マウス作製による精子形成機能に関する検討
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2018年度成果発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井 亜紀, 小栗 鈴, 中川 雄介, 田嶋 敦, 井本 逸勢, 山崎 一恭, 岩本 晃明, 佐藤 陽一
2. 発表標題 ゲノムワイド関連解析によるInhibin B値関連遺伝子の同定と遺伝子改変マウスを用いたInhibin B発現に関する検討
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 2019年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学大学院医歯薬学研究部医薬品情報学分野ホームページ  
<https://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/inf/>

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

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