

平成 23 年 3 月 22 日現在

機関番号： 10107

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20591902

研究課題名（和文） ヒト無精子症関連遺伝子の網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of genes related to human azoospermia

研究代表者

千石 一雄 (SENGOKU KAZUO)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号： 30163124

研究成果の概要（和文）： SPATA17 遺伝子および LMTK2, PARP-2 遺伝子に着目し、減数分裂異常による無精子症患者と正常コントロール群との比較解析を行い、LMTK2, PARP2 遺伝子はともにヒト減数分裂異常による無精子症に関連することを明らかにした。また、ヒト精巣を用いたマイクロアレイ解析により同定された遺伝子の一つである SPATA17 の解析では、3カ所の SNP を認め、SNP3 のアレル出現頻度は無精子症患者で有意に高率であり、ヒト精子形成に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： We investigated whether the human PRDM9, CDK2, PMC3IP, LMTK2 and PARP-2 defects are associated with azoospermia by meiotic arrest using mutational analysis in Japanese patients with azoospermia. We found three novel SNPs in the PRDM9, and that the genotype and allele frequencies of heterozygotes in SNP2 and SNP3 of PRDM9 were significantly higher in the patient groups. We also detected five SNPs in PARP2, and showed that the genotype frequency of heterozygote in SNP1 of PARP2 was higher in the patients group. In addition, mutational analysis of SPATA 17 which was one of 10 novel genes implicated as a cause of male infertility identified by microarray analysis of human testicular tissue was conducted. Three SNPs were identified in the patients with meiotic arrest. The frequency of the SNP3 allele of SPATA17 was significantly elevated in the meiotic arrest group. These results suggest that PRDM9, PARP2 and SPATA17 might play critical roles in human spermatogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：無精子症、遺伝子、精子形成、減数分裂異常

## 1. 研究開始当初の背景

体外受精、顕微授精さらには無精子症患者の精巣から外科的手術により精子を顕微鏡下に採取し顕微授精を行う、TESE-ICSI 法など、近年の男性不妊症に対する治療法の目覚ましい進歩により男性不妊に対する治療成果は着実に進歩している。

しかし、無精子症のなかでも精巣内に成熟精子を全く有していない患者は現在でも有効な治療法が存在せず、今日の不妊治療の大きな障害となっている。その中の多くの患者は遺伝学的な素因を示唆されているものの、その原因のほとんどは未だ不明のままである。

ヒト無精子症の遺伝学的要因として、ヒト Y 染色体上の微小欠失、AZF (Azoospermia factor) 領域の欠失が以前より報告され注目を集めている。しかしながら、今日までこの領域でヒト無精子症の原因遺伝子として同定されたのは、DAZ, RBMY および USP9Y のわずか3つにすぎない。今なお、多くの研究者が無精子症原因遺伝子の探索をこの AZF 領域において行っているが、最後に同定された原因遺伝子は実に 10 年前までさかのぼる。さらに最近ではヒト無精子症患者のうち、Y 染色体に微小欠失を伴うものは 10% 以下であろうと推定されている。

我々はこれまでに、減数分裂停止に起因するヒト無精子症を引き起こす新たな遺伝子ヒト SYCP3 を同定した。特筆すべき点は SYCP3 は Y 染色体上ではなく、ヒト 12 番染色体上に位置している点である。

以上の経過より、我々は世界的に注目されている AZF 領域以外にも多数のヒト無精子症原因遺伝子が存在すると考え、精子形成に関与する遺伝子群を網羅的に解析することにより、男性不妊の新たな診断、治療法の開発が可能になるものと考えている。

## 2. 研究の目的

(1) ノックアウトマウスに代表されるマウスを用いた解析により、マウスにおいては精子形成に関与する多数の遺伝子が明らかにされている。しかし、ノックアウトマウスの表現型は必ずしもヒトにおいて忠実に再現されることは多くはない。この点がヒト男性不妊症の原因解明をより難しくさせている大

きな要因である。

そこで、本研究では新たなヒト無精子症関連遺伝子の同定に関して、今まで行われてきた、ある遺伝子のノックアウトマウスからヒトの相同遺伝子の解析を行う方法をさらに発展させ、特に減数分裂異常による無精子症に関連するヒト遺伝子の異常を明らかにすることを第一の目的とする。

(2) これまでのノックアウトマウスの表現系からヒトの遺伝子異常を探求する研究スタイルとは逆に、ヒトにおいて組織学的に精巣内に胚細胞を有さずセルトリ細胞のみから構成される無精子症患者 (セルトリ細胞症候群: SCOS) の精巣組織及び正常コントロール組織を用いて cDNA マイクロアレイ解析を行うことにより、新たなヒト無精子症の原因遺伝子群を同定する。それにより、いまだ明らかにされていない精子形成過程、とくにその減数分裂過程のメカニズムを明らかにすることを第二の目的とする。

本研究の遂行により、より低侵襲の無精子症患者の原因診断法の確立、精原細胞から成熟精子への体外培養系の確立、さらには体外培養下における遺伝子治療への道筋を構築し、ヒト男性不妊症治療の世界的なレベルアップに貢献することが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 精子の減数分裂異常を示すノックアウトマウス遺伝子の解析

① 減数分裂停止によるヒト無精子症原因候補遺伝子である PRDM9 (MEISETZ) CDK2, HOP2 (PSMC3IP) 遺伝子に関する研究

近年、MEISETZ、CDK2、PSMC3IP 遺伝子のノックアウトマウスの雄は生殖能力を全く有していないことが報告された。詳細な解析の結果、これらのマウスは全てが精子形成過程における減数分裂異常に起因する無精子症を呈することが判明した。そこで我々はこの遺伝子がヒトでも無精子症の原因遺伝子となりうるのではないかとの仮説をもとに、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された日本人患者 18 名及び正常コントロール 350 名を対象として解析した。

血液から DNA を抽出し、3 つの遺伝子における全ての coding region において mutation 解

析を施行した。

#### ②ヒト無精子症原因候補遺伝子であるLMTK2, PARP-2 遺伝子に関する研究

LMTK2 ノックアウトマウスの雄精巣では円形精子細胞までの発育は認めるが、それ以降の精子発生は停止し不妊であることが報告された。また、PARP2 遺伝子は DNA damage 後の repair に関与する遺伝子で、雄のノックアウトマウスは減数分裂停止による無精子症を呈する。そこで、組織学的に減数分裂停止による無精子症と診断された日本人患者 18 名を対象とし、LMTK2 遺伝子に関しては 50 名の正常コントロール、PARP2 遺伝子に関しては 318 名の正常コントロール、および 86 名の sertoli cell only syndrome (SCOS)患者を対象とし、血液から DNA を抽出し、これらの遺伝子における全ての coding region において mutation 解析を施行した。

#### (2)cDNA マイクロアレイ解析により同定されたヒト無精子症の原因候補遺伝子 SPATA17 の研究

ヒト減数分裂停止、SCOS による無精子症患者および正常コントロールの精巣を用いたマイクロアレイ解析により、現在 10 個の遺伝子がヒト精子形成に密接に関与することが報告されている。その遺伝子の 1 つである spermatogenesis-associated 17 (SPATA17) はカルモデュリン結合蛋白 family のメンバーであり、精巣のアポトーシスに関与することが示唆されている。今回、日本人に限定し、18 例の減数分裂停止による無精子症患者、96 例の正常コントロールおよび 20 例の SCOS 患者を対象とし、血液から DNA を抽出し SPATA17 遺伝子の mutation 解析を行った。

すべての患者及び正常コントロール群は文章によるインフォームドコンセントを取得後、施設の倫理委員会の承認を得た後に解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1)精子の減数分裂異常を示すノックアウトマウス遺伝子の解析

①減数分裂停止によるヒト無精子症原因候補遺伝子である PRDM9 (MEISETZ)、CDK2, HOP2 (PSMC3IP) 遺伝子に関する研究

mutation 解析の結果、coding region 内においてヒト PSMC3I (HOP2) 遺伝子で 1 カ所、CDK2 遺伝子で 2 カ所、さらに、MEISETZ 遺伝子で 3 カ所の single nucleotide polymorphism (SNP) を検出した。これらの SNP において正常コントロール群と、そのアレル、ゲノタイプの出現頻度を比較検討したところ、HOP2 及び CDK2 遺伝子では患者群とコントロール群で有意な差を認めなかった。しかしながら、ヒト MEISETZ 遺伝子においては今回検出された 3 つの SNP のうちその 2 箇所において患者群とコントロール群でアレルおよびゲノタイプの出現頻度において統計学的な有意差を認めた。本成績から、ヒト MEISETZ 遺伝子がヒト無精子症、特に精子形成過程における減数分裂に関与していることが示唆された。

#### ②ヒト無精子症原因候補遺伝子であるLMTK2, PARP-2 遺伝子に関する研究

減数分裂停止による無精子症患者において 9 カ所の LMTK2 遺伝子の SNP を検出した。しかし、正常コントロールとそのアレル、ゲノタイプの出現頻度に有意な差は認められず、ハプロタイプ解析においても有意な関連は認められなかった。PARP2 遺伝子の解析では 5 カ所 SNP を検出し、ゲノタイプの頻度では SNP 1 と SNP2 において患者群と正常群で有意差を認めたが、アレル頻度に関しては SNP2 のみで差が認められた。ハプロタイプ解析では SNP1-SNP4 で有意な関連を認めた。SCOS と患者群との比較では、すべての SNP において有意な相関は観察されなかった。以上の成績より DNA damage の repair や減数分裂に関与する遺伝子である PARP2 はヒト減数分裂停止による無精子症に関連を有することが明らかとなった。

#### (2) cDNA マイクロアレイ解析により同定されたヒト無精子症の原因候補遺伝子 SPATA17 の研究

18 症例の日本人減数分裂異常による無精子症患者において 3 個のヌクレオチドの変化を認めた (SNP1:c.340A/G in exon5, SNP2:c.429C/T in exon 6, SNP3:c.608A/G exon 7)。しかし、この 3 個の変異はすべて正常コントロール群でも認められ mutation ではなく SNP であることが示された。また、SNP3 (c.608G/A) は患者群とコントロール群でそのアレルおよびゲノタイプの出現頻度において統計学的な有意差を認めた。また、SCOS 患者と減数分裂異常患者の比較においても SNP3 のアレル出現頻度に有意な差が認められた。しかし、SNP1 および SNP2 のアレル、ゲノタイプ出現頻度は各群で差は認められなかった。

以上の研究成績より SPATA17 遺伝子はヒト減数分裂異常による無精子症の発症に関与している可能性をこれまでとは異なった逆行性遺伝学的手法により明らかとした。

SPATA 17 のゲノタイプ、アレル出現頻度

SNPs	Genotype frequency		Allele frequency	
	Meiotic Arrest	Controls	Meiotic Arrest	Controls
SNP1	GA 4/18(22.222)	7/96(7.29)	G 4/36(11.1)	7/192(3.65)
SNP2	TC 2/18(11.1)2	4/96(25.0)		
	TT 0/18(0.00)	2/96(2.08)	T 2/36(5.56)	28/192(14.6)
SNP3	GA 6/18(33.3)	31/96(32.3)		
	GG 6/18(33.3)	3/96(3.13)	G 18/36(50.0)	37/192(19.3)

以上の研究成績よりノックアウトマウスでは減数分裂停止による無精子症の表現系を示す MEISETZ、PARP-2 遺伝子がヒト無精子症患者と関連を有することが明らかとなった。また、ヒト精巣組織のマイクロアレイ解析から明らかにされた遺伝子の一つである SPATA17 遺伝子も減数分裂異常による無精子症発症に関与することが明らかとなった。今後はこれら遺伝子の相互関係および精子形成に関与するメカニズムを詳細に解析することにより、無精子症の診断および新たな治療法の開発が期待される。

## 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 23 件)

① T Miyamoto, A Tsujimura, Y Miyagawa, E Koh, H Sato, M Namiki, K Sengoku: Current concepts of human azoospermia and its causes. *Reprod Med Biol* 19: 121-127, 2010

② N Sakugawa, T Myamoto, A Tsujimura, E Koh, Y Miyagawa, H Sato, M Namiki, A Okuyama, K Sengoku: LMTK2 and PARP-2 gene polymorphism and azoospermia secondary to

meiotic arrest: *J Assist Reprod Genet* 26:545-552, 2009

③ Osumi D, Takahashi M, Miyosi E, Yokoe S, Lee SH, Noda K, Nakamori S, Gu J, Ikeda Y, Kuroki Y, Sengoku K, Ishikawa M, Taniguchi N; Core fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells. *Cancer Sci* 100(5): 888-95, 2009

④ Miyamoto T, Tsujimura T, Miyagawa Y, Koh E, Sakugawa N, Miyakawa H, Sato H, Namiki M, Okuyama A, Sengoku K: A single nucleotide polymorphism in SPATA17 may be a genetic risk factor for Japanese patients with meiotic arrest. *Asian J Androl* 11(5): 623-28, 2009

⑤ T Yamashita, H Katayama, Y kato, K Nishiwaki, H Hayashi, N Miyokawa, K Sengoku: Management of pelvic lymph nodes by sentinel node navigation surgery in the treatment of invasive cervical cancer *Int J Gynecol Cancer* 19:1113-1118, 2009

⑥ N. Sakugawa, T.Miyamoto, H.Sato, M. Ishikawa, M.Horikawa, H. Hayashi, M. Ishikawa, K. Sengoku: Isolation of the human ePAB and ePABP2 cDNAs and analysis of the expression patterns. *J Assist Reprod Genet* 25(may)215-221, 2008

⑦ Ryoko Kikuchi<sup>1</sup>, Hitoshi Tsuda, Ken-ichi Kozaki<sup>1</sup>, Yae Kanai, Takahiro Kasamatsu, Kazuo Sengoku, Setsuo, Hirohashi, Johji Inazawa and Issei Imoto :Frequent inactivation of a putative tumor

suppressor, angiopoietin-like protein2, in ovarian cancer. Cancer Res. Jul 1;68(13):5067-75. 2008

⑧ T. Miyamoto, E. Koh, N. Sakugawa, H. Sato, H. Hayashi, M. Namiki and K. Sengoku: Two single nucleotide polymorphisms in *PRDM9 (MEISET2)* gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia by meiotic arrest. J Assist Reprod Gene 25:553-557, 2008

[学会発表] (計 15 件)

① 宮本敏伸 佐藤恒, 千石一雄  
新たなヒト無精子症原因候補遺伝子である *SPATA17* 遺伝子の解析: 日本生殖医学会北海道地方会 2010

② 宮本敏伸, 佐藤恒, 佐久川直子, 千石一雄  
当教室において同定されたヒト無精子症に関わる遺伝子群  
日本産科婦人科学会、2010

③ 宮本敏伸  
男性不妊とその要因  
日本生殖医学会、2010

④ 宮本敏伸, 佐久川直子, 佐藤恒, 千石一雄  
ヒト無精子症におけるヒト *BREK2* 遺伝子及び *PARP-2* 遺伝子の解析  
日本生殖医学会 2009

⑤ 宮本敏伸, 佐久川直子, 千石一雄  
ヒト無精子症におけるヒト *LMTK2* 遺伝子及び *PARP-2* 遺伝子の解析  
日本生殖医学会、2008

[図書] (計 4 件)

① 千石一雄、石川睦男  
子宮内膜症取り扱い規約 第2部治療編・診療編  
不妊症に対するガイドライン 金原出版  
53-64、2010

② 千石一雄  
OGS now No 4. メディカルビュー 114-121  
櫻木範明 編集 2010

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

千石一雄 (SENGOKU KAZUO)  
旭川医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30163124

### (2) 研究分担者

宮本敏伸 (MIYAMOYO TOSHINOBU)  
旭川医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 70360998