

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 14 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591811

研究課題名（和文） ヒト男性不妊症と習慣流産の病態解明およびその臨床医学への応用

研究課題名（英文） Analysis of the factors on male infertility and habitual abortion &amp; their Applications to clinical medicine

研究代表者

宮本 敏伸（MIYAMOTO TOSHINOBU）

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：70360998

研究成果の概要（和文）：本研究において我々はヒト精子形成とくに減数分裂停止（MA）に起因する無精子症原因遺伝子としてヒト *HORMAD1* 遺伝子を同定することができた。またヒト無精子症のうち組織学的に germ cell をまったく有さないいわゆる Sertoli cell-only syndrome (SCOS) の原因遺伝子としてヒト *LRWD1* 遺伝子の同定に成功した。さらに、MA および SCOS の両方に深く関与している遺伝子としてヒト *SEPTIN12* 遺伝子を証明した。

研究成果の概要（英文）：We identified the human *HORMAD1* gene causing azoospermia by meiotic arrest. In Addition, We also identified the human *LRWD1* gene causing azoospermia by SCOS and we demonstrated that the human *SEPTIN12* is critical in azoospermia by MA and SCOS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学

## 1. 研究開始当初の背景

今日、日本の最も深刻な社会問題の一つとして間違いなく少子化問題が存在する。しかしながら、その背景として先進国では不妊症カップルが増加傾向にあることは一般にあまり認識されていない。現在日本では、約 10 から 15% のカップルが挙児希望をもちながら不妊に悩まされている。今日までの体外受精、顕微授精さらには TESE-ICSI 法に代表される不妊治療のめざましい進歩により、不妊治療の成果は着実に進歩が認められるものの、男性不妊症特に精巣内にすら成熟精子を

全く有してない、いわゆる非閉塞性無精子症は現在でも不妊治療の大きな壁となっており、有効な治療法が確立されていないのが現状である。多くの患者が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今なお明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

ヒト無精子症の原因として以前より、Y 染色体上の部分的欠失 (Tiepolo & Zuffardi Hum Genet 1976) ことに AZF 領域の欠失が報

告されている。しかし、今日までこの領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として同定されたのは、DAZ, RBMY 及び USP9Y のわずか 3 つにすぎない (Rejio et al., Nat Genet 1995, Elliot et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, Sun et al., Nat Genet 1999)。世界的には今なお、多くの研究者がヒト無精子症原因遺伝子の検索をこの AZF 領域において行っているものの、今日までのめざましい分子遺伝学の進歩にもかかわらず、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。近年、私はその遺伝子変異により減数分裂停止に起因する無精子症を引き起こす新たな遺伝子、ヒト SYCP3 を同定した (Miyamoto et al., Lancet 2003)。特筆すべき点はこの SYCP3 はヒト 12 番染色体上に位置している点である。ヒト SYCP3 は AZF 領域以外で同定された世界で最初の無精子症原因遺伝子である。以上の研究成果により、私はヒト常染色体上にも多数のヒト無精子症原因遺伝子が存在すると確信し、今日まで研究を行ってきた。

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、マウスにおける精子形成と幾つかの遺伝子の相関関係が明らかにされており、それらの知見をもとに我々はこれまで新たなヒト無精子症原因遺伝子としてヒト MEI1 遺伝子 (Sato, Miyamoto, et al. J Hum Genet 2006)、MEISETZ 遺伝子 (Miyamoto et al. J Assist Reprod Genet 2008) 及びヒト PARP-2 遺伝子 (Sakugawa, Miyamoto et al. J Assist Reprod Genet 2009) などの同定に成功してきた。これらは全て減数分裂異常に起因する無精子症である。しかし、ノックアウトマウスの表現型が必ずしもヒトにおいて忠実に再現されている訳ではなく、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。

そこで近年我々は、今まで世界的に行われてきたノックアウトマウスの作成、その後ヒトの相同遺伝子の解析を行うという方法ではなく、ヒト無精子症原因遺伝子をヒトからダイレクトに同定する方法で解析を進めている。具体的には、ヒト無精子症の中でも、組織学的に減数分裂停止 (MA) に起因するも

のおよび germ cell を精巣内にすら認めない SCOS 症例群の精巣組織と正常精巣組織を用いてマイクロアレイ法を行い、MA 及び SCOS 組織においてその発現が正常組織と比較して著明に減少している遺伝子群をそれぞれ 5 個づつ同定することに成功した。さらに、そのうちの一つである SPATA17 遺伝子がヒト無精子症原因遺伝子であることを証明した (Miyamoto et al. Asian J Androl 2009)。上記に示したように、私はまず、ヒト無精子症原因遺伝子を複数同定し、さらにノックアウトマウスによる解析を行いそのメカニズムを明らかにするという全く新しい手法で本研究を施行する予定である。以上の研究を行うことにより、新たなヒト無精子症の原因遺伝子群を同定するとともに、さらには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。現在、不妊症外来を訪れる挙児希望の夫婦のうち、精液検査から夫が無精子症と診断された場合、泌尿器科医とタイアップし、夫の内分泌学的検査 (血中 LH, FSH, エストラジオール、テストステロン等)、染色体の核型分析、精巣の超音波検査及び Y 染色体 AZF 領域の微小欠失の有無の検索などが行われるが、これらの結果より精巣内に精子が存在するか否かある程度推測が可能なものの今日の医療では実際に TESE を施行して初めて精子の存在の有無が判明するのが現状である。

本研究により、より低侵襲の無精子症原因の診断法の確立、精原細胞から成熟精子への体外培養への応用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を本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

私は今日までに、組織学的に減数分裂停止に起因すると診断された無精子症患者の精巣 RNA と正常精巣 RNA を用いてマイクロアレイ法を施行し、減数分裂停止による無精子症患者でその発現が明らかに低下もしくは消失している 5 つの新規遺伝子の同定に成功している (このうちその 1 つである SPATA17 遺伝子に関してはすでにヒト精子形成に重要な役割を担うことを報告している (Miyamoto et al. Asian J Androl 2009))。また、同様に無精子症患者のうち SCOS 症例の精巣 RNA と正常精巣 RNA を用いてマイク

ロアレイ法を施行し、SCOS による無精子症患者においてその発現が低下もしくは消失している 5 つの新規遺伝子の同定にも成功している。単離された合計 10 個の cDNA は全て RACE 法にて full-length cDNA がすでに同定されている。

よって、上記の減数分裂異常に関与しているであろう遺伝子群残り 4 つ (SPATA17 遺伝子はすでに解析済みのため) と SCOS を引き起こしていると思われる 5 つの遺伝子に関して解析を行う。本研究で用いられる全ての患者 (MA 及び SCOS) 及び正常コントロール群の Genomic DNA は全て文章による同意を得た後保管されている。加えて、全ての無精子症患者は染色体異常がないこと及びその Y 染色体上に微小欠失が存在しないことが確認されている。全てのサンプルは匿名性が保たれた状態で保管されている。

具体的には、以下の手順で実験を行う。

- 1) 単離された cDNA がヒトにおいて精巣特異的な発現パターンを示すものかを確認するため Clontech 社のヒト cDNA パネルを用いて様々な組織において PCR 法を施行する。
- 2) 単離された cDNA 群の詳細な発現パターンを得るために、単離された cDNA をプローブとして正常ヒト精巣組織にて in situ hybridization 解析を行う。最も重要なクローンは胚細胞特異的な発現を示すものであり、特に減数分裂以後その発現が消失するもの (A) である。減数分裂以後に特異的に発現するもの (B) 及び精子形成過程の様々な段階で発現しているもの (C) に関しても重要と思われるため今後の解析のためストックしておく。
- 3) すでに単離されている full-length cDNA から推定されるアミノ酸配列より、後の実験のための抗体を作成する。ヒトゲノムシーケンスと単離された cDNA の配列を比較し、全てのエクソン-イントロンボーダーを同定する。さらに、ノックアウトマウス作成の準備のためマウスゲノムとのシーケンス配列の相同性を利用してマウス cDNA を単離しておく。
- 4) 減数分裂異常に起因する無精子症患者 200 例、及び SCOS 患者 400 例から抽出された genomic DNA を用いて、単離された遺伝子の coding region 及び隣接するイントロン領域において mutation 解析を行う。
- 5) mutation が検出された後、多型を否定すべく正常コントロールでも同部位をシーケンス解析する。

上記より、その mutation により無精子症を引き起こすと思われるヒト無精子症原

因候補遺伝子群が複数単離される。さらに、蛋白レベルで機能解析を行い単離した遺伝子群が原因遺伝子であることを確定するとともにそのメカニズムを明らかにする。

(\*)

- 1) 単離された遺伝子群の正常な full-length 及び mutation を含む open reading frame のシーケンス配列をヒト精巣 cDNA を鋳型として PCR 法にて増幅する。各々の PCR 産物を Flag 及び HA タグ付きのバクテリア expression vector に導入する。全ての 4 つのコンストラクトはシーケンス解析にて確認する。
- 2) 培養後蛋白をそれぞれ抽出し、蛋白の binding assay を行う。この解析には protei/protein interaction, protein/RNA interaction 及び protein/DNA interaction が含まれる。蛋白の機能的な結合領域を免疫沈降、BRET 解析にて同定する。精細管における蛋白の存在部位は imunocytochemistry にて同定される。
- 3) A) 上記にて同定されたヒト無精子症を引き起こす新規遺伝子群に関して、それらの遺伝子が精子形成にどのように携わっているのかそのメカニズムを解析する。前年にすでにマウス cDNA が単離されている。
- 4) B) 単離されたマウス cDNA は Clontech 社のマウス cDNA パネルを用いて PCR 法にてその発現パターンを解析する。精巣特異的な発現を示した cDNA はさらに詳細に解析するため in situ hybridization 及び免疫染色法が施行される。その後、重要と判断された遺伝子のノックアウトマウスを全て作成し、詳細に解析を行う。
- 5) (1) wild type 及びノックアウトマウスからそれぞれ精原細胞及び精母細胞を取り出し、double dimension electrophoresis にて異なる蛋白の発現を解析する。wild type には存在しノックアウトマウスには存在しない蛋白は mass spectrometry にて同定される。蛋白の機能は binding protein, もしくは他の重要な蛋白を翻訳するもしくは転写するといった形で解析される。同様にその機能が細胞内外に蛋白を輸送するものであるか解析する。wild type 及びノックアウトマウスの精巣から抽出された減数分裂期の染色体を調整し、以下のマーカーを使ってダブルラベリングアプローチにて解析する。(2) mutation を検出した患者において平成 22 年度同様機

能解析を行う。(※)

- 6) a. SYCP1 b. SYCP2&3 c. RAD51 d. MLH1  
e. MLH3 f. DMC1 g. CREST
- 7) 以上の研究成果にて論文を作成する。

#### 4. 研究成果

本研究において我々はヒト精子形成とくに減数分裂停止 (MA) に起因する無精子症原因遺伝子としてヒトHORMAD1 遺伝子を同定することができた。またヒト無精子症のうち組織学的に germ cell をまったく有さないいわゆる Sertoli cell-only syndrome (SCOS) の原因遺伝子としてヒトLRWD1 遺伝子の同定に成功した。さらに、MA および SCOS の両方に深く関与している遺伝子としてヒト SEPTIN12 遺伝子を証明した。本研究の成果はいまだ不明な点の多いヒト精子形成における molecular mechanism に何らかの寄与をするものである。

#### 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 7 件)

1. Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Saijo Y, Namiki M, Sengoku K Single-nucleotide polymorphisms in the LRWD1 gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with Sertoli cell-only syndrome. *Andrologia*. 2013 Feb 28. doi: 10.1111/and.12077. [Epub ahead of print]
2. Miyamoto T, Akiba S, Sato N, Fujimura T, Takagi Y, Kitahara T, Takema Y, Iizuka H, Sengoku K. Study of the vulvar skin in healthy Japanese women: components of the stratum corneum and microbes. *Int J Dermatol*. 2012 Dec 11. doi:10.1111/j.1365-4632.2012.05582.x. [Epub ahead of print]
3. Sengoku K, Miyamoto T, Horikawa M, Katayama H, Nishiwaki K, Kato Y, Kawanishi Y, Saijo Y.

Clinicopathologic risk factors for recurrence of ovarian endometrioma following laparoscopic cystectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand*.

2013Mar;92(3):278-84. doi:

10.1111/aogs.12051. Epub 2013 Jan 21.

4. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Horikawa M, Saijo Y, Sengoku K. Single-nucleotide polymorphisms in HORMAD1 may be a risk factor for azoospermia caused by meiotic arrest in Japanese patients. *Asian J Androl*. 2012 Jul;14(4):580-3.
5. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Horikawa M, Saijo Y, Sengoku K. Single nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 gene may be associated with azoospermia by meiotic arrest in Japanese men. *J Assist Reprod Genet*. 2012 Jan;29(1):47-51.
6. Miyamoto T, Tsujimura A, Miyagawa Y, Koh E, Namiki M, Sengoku K. Male infertility and its causes in human. *Adv Urol*. 2012;2012:384520. doi:10.1155/2012/384520.
7. Miyakawa H, Miyamoto T, Koh E, Tsujimura A, Miyagawa Y, Saijo Y, Namiki M, Sengoku K. Single-nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with Sertoli cell-only syndrome. *J Androl*. 2012 May-Jun;33(3):483-7.
8. Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Lee BJ, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kim JH, Yu YS, Matsumoto N. Pathogenic mutations in

two families with congenital cataract identified with whole-exome sequencing. Mol Vis. 2013;19:384-9.

9. Kondo Y, Saitsu H, Miyamoto T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Ryoo NK, Kim JH, Yu YS, Matsumoto N. A family of oculofaciocardiodental syndrome (OFCD) with a novel BCOR mutation and genomic rearrangements involving NHS. J Hum Genet. 2012 Mar;57(3):197-201.

[学会発表] (計 6 件)

1. ヒト精子形成過程におけるヒト SEPTIN12 遺伝子の解析 宮本 敏伸, 宮川 博栄, 岡部 公香, 千石 一雄 (日本生殖医学会、2012年)
2. ヒト精子形成過程におけるヒト SEPTIN12 遺伝子の解析 宮本 敏伸, 宮川 博栄, 千石 一雄 (日本産婦人科学会、2012年)
3. ヒト精子形成過程におけるヒト HOMAD1 遺伝子の解析 宮本 敏伸, 宮川 博栄, 岡部 公香, 千石 一雄 (日本生殖医学会、2011年)
4. ヒト精子形成過程におけるヒト HOMAD1 遺伝子の解析 宮本 敏伸, 宮川 博栄, 岡部 公香, 千石 一雄 (日本産婦人科学会、2011年)
5. ヒト精子形成過程におけるヒト SEPTIN12 遺伝子の解析 宮本 敏伸, 宮川 博栄, 岡部 公香, 千石 一雄 (日本生殖医学会、2011年)
6. ヒト精子形成過程におけるヒト SEPTIN12 遺伝子の解析 宮本 敏伸, 宮

川 博栄, 千石 一雄 (日本産婦人科学会、2011年)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

なし