

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462469

研究課題名(和文)逆行性遺伝学手法を用いた無精子症原因遺伝子群の解析

研究課題名(英文)Analysis of genes related to human azoospermia using a reverse genetics method

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ETV5, SIN3A, PLK4遺伝子に注目し、Sertoli cell-only syndrome (SCOS)による無精子症と正常コントロール群との比較解析を行い、ETV5, PLK4遺伝子はヒトSCOSによる無精子症に関連することを明らかにした。特に、SCOS患者1例にPLK4遺伝子のヘテロの欠失を認め、蛋白の機能解析結果から、中心小体の複製不全による細胞分裂異常が惹起されることが明らかとなり、PLK4はSCOS発生の原因遺伝子になることを示した。さらに、RAD21L遺伝子は減数分裂異常およびSCOSの両方の原因によるヒト無精子症に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether the human ETV5, SIN3A and PLK4 genes are associated with azoospermia by Sertoli cell-only syndrome (SCOS) using mutational analysis in Japanese patients with azoospermia. We found that the two ETV5 variants, SNP2 and SNP3 were associated with susceptibility to SCOS. Mutational analysis of 81 SCOS patients identified one man with a heterozygous 13-bp deletion in the Ser/Thr kinase domain of PLK4. Division of centrioles occurred in wild type PLK4 transfected cells, but was hampered in PLK4 mutant transfectants which also showed abnormal nuclei. Therefore, we concluded that this PLK4 mutation might be a cause of human SCOS. We also detected three polymorphism sites, SNP1, SNP2 and SNP3 in RAD21L gene. Genotype and allele frequencies of SNP2 and SNP3 were higher in the patients with azoospermia by both meiotic arrest and SCOS compared with the control group. These results suggest that ETV5, PLK4 and RAD21L might play critical roles in human spermatogenesis.

研究分野：生殖医学

キーワード：無精子症 遺伝子 セルトリセルオンリー 精子形成 減数分裂異常

1. 研究開始当初の背景

近年の出生数の減少は我が国にとって大きな社会問題となっていることは周知の事実である。その要因として女性の高齢化に伴う妊孕性の低下が指摘されているが、不妊原因の50%は男性に原因があることはあまり認識されていない。

男性不妊の治療に関しては、顕微授精法(ICSI)の臨床への急速な普及により、無精子症例に対しても精巣組織から精子が取得可能な場合は児を得ることが可能となっている(TESE-ICSI)。しかし、精巣に成熟精子が存在しない例では現在有効な治療法はない。男性不妊の遺伝因子に関しては近年の分子生物学的手法を駆使した種々の報告が認められ、特に、Y染色体長腕の微小欠失Azospermia factor region (AZF a, b, c, gr/gr)が精子形成障害に関与することが明らかにされている。しかし、最近の報告では無精子症患者でAZF領域に異常を認める症例はわずか数%程度と推定されている。このように精子形成障害症例の多くに遺伝学的素因が示唆されているものの、精子形成メカニズムや男性不妊の病態はいまだ十分に解明されていない現状にある。

我々は、精子形成に関与する遺伝子はY染色体上以外にも存在すると考え、これまでにSYCP3をはじめとする常染色体上に存在する遺伝子も精子形成に関与すること、また、精子形成障害と各種の遺伝子多型との関連を報告してきた。

また、ノックアウトマウス技法を用いた研究から、これまでに400近いマウス精子形成に関与する遺伝子が同定されているにも関わらず、その遺伝子のうち実際にヒト精子形成に関与する遺伝子は極めて少なく、マウスの成果を直接ヒトに還元することへの限界が存在する。

本研究では、これまでの遺伝子を改変したマウスの成果を基に、ヒトの相同遺伝子を同定し、その解析を行うという従来の研究スタイルを打破し、ヒトの精子形成障害例と正常例の比較から精子形成に関与する遺伝子を網羅的に解析し、その結果同定された遺伝子に関し、マウスを用いて機能解析をすすめる、いわゆる逆行性遺伝学的手法を用い、男性不妊の病態を明らかにしようとするものである。

2. 研究の目的

(1) 研究の目的は、無精子症症例の精巣と正常精巣とのマクロアレイ解析から、ヒト精子形成に関与する複数の遺伝子を同定し、さらにそれらの遺伝子のノックアウトマウスを作製し機能解析を行うという逆行性遺伝学という新しい手法を用い、いまだ明らかにされていない精子形成過程を解明することである。

(2) 本研究の遂行により、侵襲の少ない無精子症原因の診断法の確立、精原細胞から成熟精

子への体外培養系の確立、さらに体外培養下の遺伝子治療への道筋の構築など、男性不妊の病態の解明、治療法の確立に貢献することを本研究の最大の目的とする。

(3) 上記の最終目的を達成するための基礎研究として、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、Sertoli cell only syndrome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から研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) Sertoli cell only syndrome(SCOS)を呈するノックアウトマウス遺伝子の解析

①Sertoli cell-only syndromeによる無精子症原因候補遺伝子である ETV5 遺伝子に関する研究

近年、E-twenty-six variant gene 5(ETV5)は転写因子をコードし、ホモ欠失雄マウスは徐々に germ cell が減少し、成長すると完全に germ cell が欠損した SCOS に類似した無精子症を呈することが報告された。そこで我々はこの遺伝子がヒトでも SCOS による無精子症の原因遺伝子になりうるか否か、組織学的に確認された SCOS による無精子症と診断された患者 180 名と 116 名の正常コントロールを対象として解析した。

血液から DNA を抽出し、すべての 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 SIN3A 遺伝子に関する研究

SIN3A 遺伝子は種々の転写因子の co-repressor として注目され Sin3A 遺伝子を不活化した雄マウスは SCOS に類似した無精子症を呈することが報告された。そこで、SCOS による無精子症と診断された 80 名の日本人を対象として解析した。血液から DNA を抽出し、すべての coding region において PCR で増幅後 direct sequencing を施行した。

③SCOS によるヒト無精子症原因候補遺伝子である PLK4 遺伝子に関する研究

Polo-like kinase 4 (PLK4) 遺伝子は中心小体の複製に関与する遺伝子で、ヘテロで変異を有するマウスは肝癌が多発することが報告されている。近年、ヘテロの変異を伴う雄マウスは精巣の germ cell が欠損するヒト SCOS に類似した無精子症の原因であることが明らかとなった。そこで、組織学的に SCOS を呈する無精子症患者 81 名と 948 名の正常コントロールを対象として血液から DNA を抽出し、PLK4 遺伝子の mutation 解析を施行し

た。また、機能解析として、培養 HeLa cell に mutation を認める変異遺伝子をトランスフェクトし、細胞分裂の動態、中心小体の複製に関し免疫組織学的に検討した。

(2) 減数分裂停止による無精子症を呈するノックアウトマウス遺伝子の解析

① ヒト減数分裂停止、SCOS による無精子症の原因候補遺伝子 RAD21L 遺伝子の研究

RAD21L は減数分裂に関与する遺伝子であり、RAD21L 欠損雄マウスは減数分裂停止による無精子症を呈することが報告された。そこで、38 名の日本人減数分裂異常による無精子症患者、140 名の SCOS による無精子症患者および 200 名の正常コントロールを対象として血液から DNA を抽出し、すべての coding region に関して mutation 解析を行った。

(3) cDNA マイクロアレイ解析によるヒト無精子症の原因候補遺伝子の研究

① ヒト SCOS, 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の精巣組織から DNA を抽出し cDNA マイクロアレイにより精子形成障害を誘起する遺伝子群の同定を試みた。

すべての患者およ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) Sertoli cell only syndrome を呈するノックアウトマウス遺伝子の解析

① Sertoli cell-only syndrome による無精子症原因候補遺伝子である ETV5 遺伝子に関する研究

Mutation 解析の結果、mutation は検出できなかったが、coding region 内において 4 カ所の single nucleotide polymorphism (SNP) を検出した。SNP 1 と 2 は exon 2 の 5' untranslated region, SNP3 は exon 7, SNP 4 は intron 11 に存在した。正常コントロール群とアレル、ゲノタイプの出現頻度を比較検討したところ、SNP2, 3 は患者群とコントロール群で出現頻度に統計学的に有意差を認めた (SNP2 $P=0.002$, SNP3 $P<0.001$)。本成績からヒト ETV5 遺伝子は SCOS による無精子症の発生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 SIN3A 遺伝子に関する研究

mutation 解析の結果、SCOS 患者において、SIN3A の mutation や SNP は検出されなかつ

た。本成績から SIN3A 欠損マウスで認められたフェノタイプはヒトには当てはまらず、ヒト SCOS に SIN3A の異常は関与しないことが示唆された。

③ SCOS によるヒト無精子症原因候補遺伝子である PLK4 遺伝子に関する研究

mutation 解析の結果、13bp のヘテロの欠失を 1 例の SCOS 患者に認め、正常群では 1 例も認めなかった。このヘテロの欠失によりセリン・スレオニンキナーゼドメイン (Ser/Thr kinase domain) において premature stop codon が出現し、frame-shift が起きて Ser/Thr kinase domain の大部分と、polo-box domain が欠損することが判明した。

変異 PLK4 遺伝子の機能解析を行ったところ、wild type の PLK4 遺伝子を過剰発現させた HeLa cell では中心小体の増加が認められたのに対し、変異遺伝子を過剰発現させても中心小体の増加は認められなかった。また、免疫組織染色を行った結果、polo-box domain を欠損した変異遺伝子導入細胞では PLK4 が centrosome に局在しないことが明らかとなり、細胞核構造を解析した結果では、変異遺伝子を導入した細胞では核体積の増加など核構造に異常が認められ、細胞分裂に異常が誘起されていることが示唆された。

以上の結果より、常染色体である 4q28 の染色体上に存在する PLK4 遺伝子のヘテロの点突然変異がヒト SCOS の原因となることを明らかにした。PLK4 の異常により細胞分裂に必須な中心小体の機能不全が誘発され、その結果、細胞分裂異常が起き、精子形成を障害することが SCOS 発生要因となりうるということが示唆された。

(2) 減数分裂停止による無精子症を呈するノックアウトマウス遺伝子の解析

① ヒト減数分裂停止、SCOS による無精子症の原因候補遺伝子 RAD21L 遺伝子の研究

RAD21L 遺伝子の解析結果では減数分裂停止による無精子症患者に mutation は認められなかったが、3 箇所 SNP を検出した。正常コントロール群と患者群でアレル、ゲノタイプの出現頻度を検討したところ、SNP2 ($P<0.0016$), SNP3 ($P<0.016$) に有意差を認めた。また SCOS 患者の解析でも mutation は認められず、SNP2, SNP3 のアレル、ゲノタイプの出現頻度は、患者群において有意に高率であった。本成績から RAD21L 遺伝子はヒト精子形成に関連する遺伝子であり、特に、減数分裂停止および SCOS による無精子症の発生に関与していることが示唆された。

(3) 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の研究

①逆行性遺伝学的手法により、ヒト無精子症
関与する遺伝子の同定を試みたが、今回検討
した cDNA マイクロアレイでは SCOS, 減数分裂
異常による無精子症に関与する新たな遺伝子
の同定には至らなかった。

以上の研究成績よりノックアウトマウスでは
SCOS による無精子症の表現系を示す ETV5、
SIN3A, PLK4 遺伝子のうち、ETV5, PLK4 遺伝子
がヒト SCOS による無精子症患者と関連を有
することが明らかとなった。特に PLK4 遺伝子
のヘテロの欠失では中心小体の複製異常によ
って誘起される細胞分裂異常が SCOS の要因
となりうるということが明らかとなった。

また、減数分裂停止による無精子症の表現系
を示す RAD21L 遺伝子はヒトにおいて減数分
裂停止ばかりではなく SCOS による無精子症
の発生に関与することも明らかとなった。

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、無精子症の新たな診断法および治
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 13 件)

- ① G Minase, T Miyamoto, Y Miyagawa, M
Iijima, H Ueda, Y Saijo, M Namiki, K
Sengoku : Single nucleotide
polymerisms in the human RAD21L gene
may be a genetic factor for Japanese
patients with azoospermia caused by
meiotic arrest and Sertoli cell-only
syndrome. Hum Fertility 2017
- ② T Miyamoto, G Minase, T Shin, H Ueda, H
Okada, K Sengoku: Human male
infertility and its genetic causes.
Reprod Med Biol 16:81-88, 2017
- ③ T Miyamoto, Y Bando, E Koh, A
Tsujiura, Y Miyagawa, M Iijima, M
Namiki, M Shina, K Ogata, N Matsumoto, K
Sengoku: A PLK4 mutation in a man with
Sertoli cell-only syndrome. Andrology,
4; 75-81, 2016
- ④ T Miyamoto, G Minase, K Okabe, H Ueda,
K Sengoku: Male infertility and its
genetic causes. Obstet Gynaecol Res,
41:1501-1505, 2015
- ⑤ T Miyamoto, E Koh, A Tsujimura, Y
Miyagawa, G Minase, Y Ueda, M Namiki,
K Sengoku: SIN3A mutations are rare in
men with azoospermia. Andrologia

47:1083-1085, 2015

- ⑥ H Ueda, T Miyamoto, G Minase, K
Sengoku: Single nucleated polymerisms
in ETV5: A risk factor for Sertoli
cell-only syndrome in Japanese men?.
Clinical and Experimental Obstet
Gynecol 2016

[学会発表] (計 10 件)

- ① T Miyamoto, A PLK4 mutation in a man
with Sertoli cell-only syndrome, 第 1
3 回国際人類遺伝子学会、2016 年 4 月 3
日、東京都
- ② 宮本敏伸、男性不妊症と遺伝学的要因、
第 47 回精子研究会、2016 年 6 月 4 日、
秋田
- ③ 宮本敏伸、シンポジウム 男性不妊症原
因遺伝子群、第 34 回日本アンドロロジー学会、
2016 年 6 月 14 日、群馬
- ④ 千石一雄、男性不妊とその要因、第 2 回
滋賀県産科婦人科医学会特別講演、2016 年 9
月 3 日、滋賀
- ⑤ 千石一雄、男性不妊とその要因-産婦人科
の視点から、第 14 回鴨和女性内分泌研究会
特別講演、2015 年 7 月 20 日、京都

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