

—総説—

特集：ICSIの可能性と問題点

無精子症関連遺伝子とY染色体微小欠失検出キット Azoospermia Related Genes and the Detection Kit for Y Chromosome Micro Deletion

高 栄哲*・飯島 将司・並木 幹夫

Eitetsu Koh*, Masashi Iijima and Mikio Namiki

金沢大学医薬保健研究域医学系集学的治療分野（泌尿器科学） 〒920-8640 金沢市

*Department of Integrated Cancer Therapy and Urology, Kanazawa University Graduate School of Medical Science,
13-1 Takara-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-8640, Japan*

要旨：無精子症は精子形成に関与する多種多様な遺伝子群の異常で惹起されるが、精子形成責任遺伝子は未だ同定されていない。近年、遺伝子変異動物の作成による精子形成障害を示す例が少なからず報告され、精子形成に関与する遺伝子が多岐にわたることが明らかにされている。本稿では、遺伝子の視点から、減数分裂を特徴とする精子形成過程に深く関与する遺伝子群を概説し、無精子症を呈している疾患群から、その原因遺伝子について鳥瞰する。Y染色体長腕上にはAZF（Azoospermia factor）と呼ばれる精子形成領域が存在する。この領域の構造的特殊性を概観し、染色体内再組換えによる欠失機構を解説する。さらに、われわれが開発した日本人により適したY染色体微小欠失検出キットの開発のコンセプトとその使用方法について概説する。

キーワード：無精子症、Y染色体、AZF、精子形成、相同組み換え

Abstract: Azoospermia is caused by abnormality in the various genes involved in spermatogenesis. However, the crucial genes for spermatogenesis have not yet been identified. Recently, targeted knockout and transgenic mice have been generated and considerable knowledge has been accumulated about their phenotype patterns, and a wide variety of genes are known to be associated with sperm formation. First, we review the meiotic and post-meiotic phases and genes expressed during spermatogenesis. Many genes corresponding to various clinical features of azoospermia exist, and we also review azoospermia related genes from clinical aspects. The AZF (azoospermia factor) regions on the Y chromosome long arm are thought to show a major correlation with spermatogenesis. From the genomic point of view, their deletion due to intrachromosomal recombination is reviewed as a constitutional feature of the Y chromosome. Moreover, we explain how to use a detection kit for the Y chromosome micro deletion which we developed.

Key words: Azoospermia, Y chromosome, AZF, Spermatogenesis, Homologous recombination

はじめに

無精子症は、精子形成に関与する多種多様な遺伝子群の異常で惹起される。近年、遺伝子変異動物の作成によって蓄積されたデータから、精子の分化が多様な遺伝子のネッ

トワークのなかにあり、さまざまな調節を受けていることが明らかにされている。本稿では、精子形成過程に起こる減数分裂の機構とそれに関与する遺伝子群について考察し、無精子症を呈する疾患の様々な臨床像からみえる遺伝子群について概説する。一方、ゲノム配列からもY染色体長腕上に精子形成に関与する領域が存在し、AZF（Azoospermia factor）領域と呼ばれている。この領域にある遺伝子のみならず、転写産物が精子分化に関与していると考えられている。2003年にはY染色体全ゲノム配列が確定され、その結果Y染色体には巨大なパリンドローム（回文）構造からなる事が明らかにされ、このパリンドローム構造内にあるさら

（受付 2013年5月7日／受理 2013年6月19日）

別刷請求先：〒920-8641 石川県金沢市宝町13-1 金沢大学
薬保健研究域医学系集学的治療分野（泌尿器科学）

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: kohei@med.kanazawa-u.ac.jp

表1 ほ乳類の減数分裂に関与する遺伝子変異体のフェノタイプ

GENE	Phenotype, function
<i>Spo11</i>	Arrest at zygotene-like stage; topoisomerase-like enzyme required for meiotic DSBs
<i>Dmc1</i>	Arrest at zygotene-like stage; RecA strand invasion protein homolog
<i>Sycp3</i>	Arrest at zygotene; SC protein
<i>Mlh1</i>	Arrest at late pachytene; MutL mismatch repair protein homolog
<i>Pms2</i>	Impairment at pachytene stage and MI; MutL mismatch repair protein homolog
<i>Msh4</i>	Arrest at zygotene-like stage; MutS mismatch repair protein homolog
<i>Msh5</i>	Arrest at zygotene-like stage; MutS mismatch repair protein homolog
<i>Atm</i>	Arrest at zygotene-like stage; protein product of mutated ataxia telangiectasia gene, may play a role in recognition of DNA DSBs
<i>Ddx4h (Vasa homolog)</i>	Arrest at zygotene stage; protein is a member of DEAD-box family of RNA helicases
<i>bSg</i>	Arrest at MI; basigen protein is glycosylated transmembrane protein with immunoglobulin domains
<i>Ccnal (cyclin A1)</i>	Arrest at late pachytene; regulatory cyclin partner of cyclin-dependent kinases
<i>Fus1 (TLS)</i>	Impairment at pachytene; fusion oncoprotein possibly involved in DNA recombination and/or RNA binding
<i>Mybl1 (A-myb)</i>	Arrest at pachytene stage; DNA-binding nuclear protein
<i>Bax</i>	Arrest at pachytene stage; BCL-protein family member that promotes apoptosis
<i>Hsp70-2</i>	Arrest at late pachytene; heat-shock protein regulator of MPF

Andrology in the 21st Century, MEDIMOND Publishing Co., 2001, NJ, USA.

ネマ複合体 (synaptonemal complex; SC) を形成する。それらが集合し、そこから姉妹染色体間で再組換えが開始され、パキテン期にはSCの集合が全長にわたる。ディプロテン期はSCが消失し始め染色体が縮小し、消失したのち個々の非姉妹染色体間にキアズマ (Chiasm) と呼ばれる相同染色体間の結合が生じる。形態的にディアキネシス期を経て、前期減数分裂が終了し、第2次精母細胞 (2n) となる (図1)。

(1) シナプトネマ複合体

SCは減数第1分裂前期のパキテン期に出現し、相同染色体の対合や交差・組換えに重要な役割を果たす。シナプトネマ構造は、染色体と結合する部分からなり、SCP3(SC protein 3)とSCP1(SC protein1)という遺伝子が関与する²⁾。これは、ペアホモログ (姉妹染色分体) どうしが、染色体内でdouble-strand DNA break (DSB) に始まり、母方、父方の一部が対合 (synapsis) し、DNA断片を交換する場を提供していると考えられている。このDNAホモログの集合の過程でシナプトネマ構造がみられ、この構造の上で相同染色体間の再組換えが生じる³⁾。相同組換えは1対の姉妹染色体間でのDNAの交換である。

(2) 染色体ペア、ブレイク、リペア

DNAのリペアは、再組換えで必須であり、DBSにはspo11が関与し、再組換えにはRAD51やDMC1などが関与する。減数分裂に関与する遺伝子変異体動物の多くの組織型フェノタイプはザイゴテン期の分化停止を認める。さらに、減数分裂期に関わる遺伝子としては、ユビキチンシステム、癌抑制遺伝子、ヒートショックプロテインなどに分類されている遺伝子も多く、多岐にわたる。

(3) 第2減数分裂

第2精母細胞細胞 (2n) は、1倍体細胞である精子 (円形) を生じる。この時期の遺伝子障害は後期減数分裂障害ともいわれ、臨床的には精細胞のmaturation arrest (成熟障害)

の精巣組織表現型をとる。

(4) 精子完成

精子成熟の段階である。円形精子細胞から、伸長精子細胞から精子にいたる過程である。伸長期精子細胞への分化は核と先体が伸長し、ゲノムが核内に閉じこめられ、効率的な運搬体となる形態変化である。この過程の主なイベントは先体形成と核形成・濃縮化である。さらに、核タンパク質がヒストンからプロタミンへと置換される時期であり、プロタミン2のノックアウトマウスでは奇形精子症となることが知られている⁴⁾。これら一連の各精細胞分化時期特異遺伝子の異常は無精子症を惹起することになる (表1)。

臨床症状からみえる遺伝子

不妊外来で診る無精子症を呈する疾患と遺伝子の関係についてあげた (表2)。

1. カルマン症候群 (Kallman's syndrome)

X染色体短腕上のKAL1遺伝子異常によって視床下部の神経核の欠損をきたし、ゴナドトロピン放出ホルモン合成障害による続発性精巣機能低下症を呈する。臨床症状は、類宦官症や女性化乳房であり、嗅覚異常を伴う。遺伝形式はX染色体連鎖性劣性や常染色体性優性遺伝である。病態は低ゴナドトロピン性性腺機能低下症であり、ゴナドトロピン放出ホルモンやゴナドトロピンを補充することによって、精子の出現も期待できる。

2. アンドロゲン非感受性症候群 (androgen insensitive syndrome; AIS)

1) アンドロゲンレセプター遺伝子の異常

アンドロゲンレセプター (AR) はステロイド結合ドメインとDNA結合ドメインから構成されている。また、ARのE

表2 男性不妊と遺伝子

疾病	関連遺伝子	OMIM	頻度 (欧米)	遺伝様式
1 AZF 関連遺伝子欠失	<i>DAZ</i> (Yq11)	415000 400003		Y-linked
2 カルマン症候群 (Kallman's syndrome)	<i>KAL1</i> (Xp22.3) 1 <i>KAL2</i> (8p12) 2 <i>KAL3</i> (?) 3	308700 147950	1:30000	X染色体劣性 常染色体優性 常染色体劣性
3 アンドロゲン非感受性症候群 (Androgen insensitivity syndrome)	<i>AR</i> (Xq11-q12)	300068	1:60000	X-linked
4 嚢胞線維症	<i>CFTR</i> (7q31.2)	602421	1:2500	常染色体劣性
5 先天性副腎過形成	<i>P450C21</i> (6p21.3)	偽半陰陽型 (202110)	1:5000	常染色体劣性
6 性逆転症候群 (Sex reversal syndrome)	<i>SRY</i> (Yp11.3)	501164	1:25000	Y-linked
7 線毛不動症候群 (Immotile cilia) (カルタゲナー症候群)	<i>DNALI</i> (9p21-p13) <i>DNAH5</i> (5p) 19q13.2, 16p2, 15q13	242650 244400	1:35000	常染色体劣性
8 アッシャー症候群 (Usher's syndrome)	<i>USH1</i> (14q32) <i>USH2</i> (1q41) <i>USH3</i> (3p21-q25)	276900, 270901 608400 606397	1:17000	常染色体劣性
9 バルデー - ビードル症候群 (Bardet-Biedl syndrome)	<i>BBS</i> (11q13, 16q21, 3p12-q13, 15q22.3, 2q31, 20p12, 4q27, 14q32.11)	209900	1:160000	常染色体劣性
10 混合型性腺形成異常症 (Mixed gonadal dysgenesis)	<i>WT1</i> (11p13) <i>DAX1</i> (Xp21.3)	607102 300473	稀	常染色体劣性
11 ミュラー管遺残症候群 (persistent Müllerian duct syndrome)	<i>AMH</i> (19q13.32) <i>AMHR</i> (12q13)	600957 600956	稀	
12 LH/FSH hormone LH/FSH hormone receptor	<i>LHβ</i> (19q13.32) <i>FSHβ</i> (11p13) <i>LHR</i> <i>FSHR</i>	152780 136530 152790 136435	稀	常染色体劣性?
13 5α-Reductase deficiency	<i>SRD5A1</i> (5p15) <i>SRD5A2</i> (2p23)	184753 607306	常染色体劣性	常染色体劣性

OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim> 文献1) 改変.

クソン1にはCAGのトリプレットリピート領域が存在し、この伸張(ポリグルタミン病)が重篤な神経疾患の原因となるゲノム病の一つである。また、軽度の伸張によって男性不妊症を惹起するという報告も散見する。一方、完全型AISとして、精巣性女性化症がある。ARの機能欠如によるが、ステロイド結合領域の突然変異例が多い。不完全型AISであるライフェンスタイン症候群は部分的なARの不全と考えられている。表現型は女性型からはじまり、生殖機能のみ欠落した男性不妊症まで、多岐にわたる。

2) 5α還元酵素type2欠損症

男性化作用の強力な5αジヒドロテストステロン(DHT)に変換する酵素の異常であり、受容体以前のアンドロゲン不応症である。本疾患はARに異常がなく、DHTが低値である。外陰部異常など男性仮性半陰陽で幼児期に受診する場合が多い。

3) 嚢胞線維症

米国では白人出生児に頻度が高いにもかかわらず、アジア-白人の混血では、その1/10の割合まで低下する。人種差が大きく、わが国での頻度は少ない。責任遺伝子は染色体7番長腕に位置する嚢胞性線維性膜貫通調節因子(CFTR)と考えられ、常染色体劣性遺伝形式をとる。CFTRは、サイクリックAMP調節塩素チャンネルと考えられている。先天的両側精管欠損症の症例では、精巣組織は正常である場合が多いので、TESEによって精子が採集可能である。

4) 性逆転症候群 (sex reversal syndrome)

染色体は46, XXで女性型であるが、精巣を有し、表現型が男性である。Y染色体短腕上に存在する性決定因子であるSRYがX染色体上や常染色体上に移動し、精巣が分化発生すると考えられてきたが、病態は一様でないようである。小児期には尿道下裂、停留精巣が、思春期以降では二次性徴

障害、男性不妊、女性化乳房などを呈する。本疾患は知能障害や行動異常が比較的少なく低身長が多いとされる。

5) 線毛不動症候群 (immotile cilia syndrome)

線毛不動症候群は精子線毛のダイニン腕の1つあるいは両方の欠損による運動障害である。反復性副鼻腔・肺感染、男性の不妊症を特徴とする遺伝性疾患である。カルタゲナー (Kartagener) 症候群は、気管支拡張症と慢性の副鼻腔炎を伴い、全内臓逆位症。線毛の動きの障害、呼吸気道上皮における線毛粘液移送の障害を伴う。電子顕微鏡における、ダイニン腕の内外両側欠損である。症状は通常乳幼児から始まり、中耳炎、副鼻腔炎、気管支炎、肺炎を繰り返す。診断は鼻粘膜生検により線毛の動きや超微形態異常を確認する。

アッシャー (Usher's) 症候群は先天性聴力障害と遅発性色素性網膜変性症を2大徴候とする。内耳の有毛細胞、光受容体、精子などの線毛の異常により、前庭障害、男性不妊、時に精神発達遅滞や精神病を伴う。

6) 混合型性腺形成異常症 (mixed gonadal dysgenesis)

線条性腺と低形成性の精巣とをあわせてもつ。その表現型はターナー症候群の女性型から、尿道下裂や異常精巣を有する表現男性型まで多様であり、腔と未熟な子宮が存在する。性染色質が陰性で、45, X/46, XYのモザイクであることが多い。遺伝子異常はWT1, DAX1などが考えられているが、詳細は極めて複雑である。

7) ミュラー管遺残症候群 (persistent Müllerian duct syndrome)

ミュラー管抑制因子の作用不全により男性に女性内生殖器が遺残している疾患の総称。表現型は男性であり、染色体は46, XYである。ミュラー管由来の臓器(卵管、子宮、膈上1/3)が認められる。妊孕性のある症例も報告されている。二次性徴は正常であるが、停留精巣が多く、精管は子宮に入り込んで入ることが多い。

8) LH/FSH hormone 受容体の変異

LH (黄体化ホルモン) とFSH (卵胞刺激ホルモン) ホルモンレセプターの突然変異は極めて少ないとされ、Single nucleotide polymorphism (SNP) が不妊症に関与しているとされている。

9) 遺伝子異常の多様性

DNA塩基配列に直接関与しないエピジェネティックな調節、SNPなどの多型性、ゲノムの再組換えなどによる遺伝子異常が生じる可能性も念頭に入れる必要がある。

ゲノム病としての男性不妊症

1. ヒトゲノムとレトロファクター

ヒトへ進化したわれわれは、そのゲノム内に進化の痕跡を残している。遺伝子を構成する塩基配列は全ゲノム中わずか3%に過ぎないが、イントロンや遺伝子の発現に関わる塩基配列も高々30%に過ぎない。ゲノム内のリピート(繰り返し)配列はヒトゲノムの大部分を占め、その5-10%程度はきわめて相同性が高い。さらに、1 kb以上のサイズで2コピー以上をもつものはゲノム配列の5-7%程度と見積も

られている⁵⁾。このようなリピート配列は、レトロトランスポゾンなどが原動力となり、霊長類へ進化した時期に一気に感染増大したと考えられ、いわゆる「がらくた」配列と考えられてきた。ヒトゲノムに散在するこの「がらくた」配列、すなわちリピート配列間で、相同再組み換え (homologous recombination) が頻繁に生じ、DNAの再構成 (rearrangement) が生じていると考えられている⁶⁾。ゲノム上の欠失は塩基配列の相同性と同方向である条件を満たせば再組換えが生じる可能性がある。一般には、姉妹染色体間で行われているが、ハプロイドであるY染色体内でも再組換えが生じることが報告されている⁷⁾。相同再組み換えに必要な相同塩基配列は、直接リピートなら300-500 bpの97%以上の同一配列をもち、最低でも約200-300 bp必要である⁵⁾。

2. Y染色体の構造の特殊性

Y染色体のサイズは約50-60 Mbであり、X染色体の1/3の大きさに過ぎない。性染色体両端には偽常染色体領域 PAR (pseudoautosomal region) が存在し、サイズの異なる性染色体ペアの対合を保証している。また、PARを除いた部分は、真性クロマチン (euchromatine) 部と異質クロマチン (heterochromatine) 部とからなる。

真性クロマチン部は約24 Mbであり、短腕上に8 Mb、長腕上に14 Mbのサイズをもち、遠位側にはAZFが存在する。異質クロマチン部はセントロメア部の約1 Mbの領域と長腕遠位側にある約40 Mbの部分であり、そのサイズには多型が存在する。真性、異質クロマチン部両者をあわせた領域を、MSY (men specific region of Y) と称している。MSYの塩基配列はモザイク状であり、その由来から X-transpose, X-degenerate, ampliconic の3領域に分類されている。Y染色体特異領域は ampliconic 領域であり、パリンドローム構造をもち、99%以上の極めて高い塩基相同性と繰り返し配列をもつ⁷⁾ (図2)。

1) パリンドローム (palindrome) 構造とは (図3a)

パリンドローム構造とは回文構造である。これは、相同配列が、対になり向かいあっている。Y染色体の ampliconic 領域には8つのパリンドローム構造 (P1~P8) があり、そのサイズは真性クロマチン全体の約半分弱をしめる。とくに、P1~P3はさらに小さなサブアンプリコンに分割され、パリンドローム複合体を形成している。これらの対配列間の相同性は99.9%以上である。

2) ゲノム内のリピート配列の機能

染色体間再組換えは相同体とのペア間で生じる。一般に姉妹染色体間 (inter-chromosomal) で再組換えが行われるのみならず、同一染色体内 (intra-chromosomal) の相同部間においても、相同組み換え (homologous recombination) が頻繁に生じている。すなわち、対染色体のないY染色体内でも再組換えが行われている。これは、Y染色体内で変異配列に対する修復機構があり、染色体維持に大きな役割を果たしている。

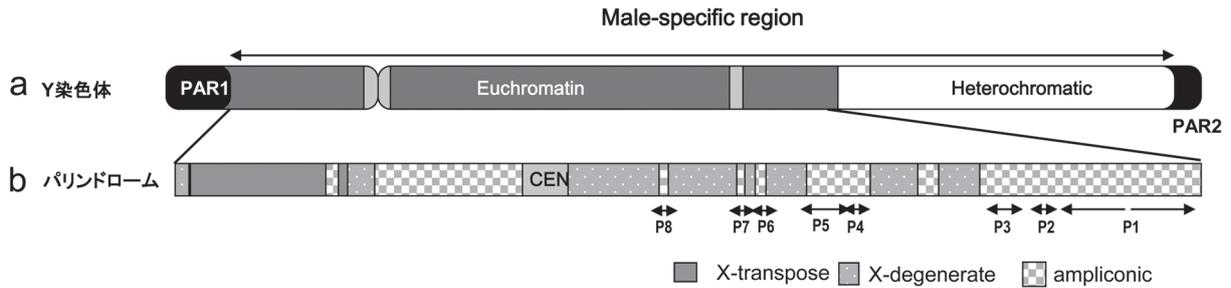


図2 Y染色体とパンドローム構造
Y染色体はX-transpose, X-degenerate, ampliconicの3領域に分けられ, ampliconic領域がY染色体特異的であり, P1-P8のパンドローム構造がある。

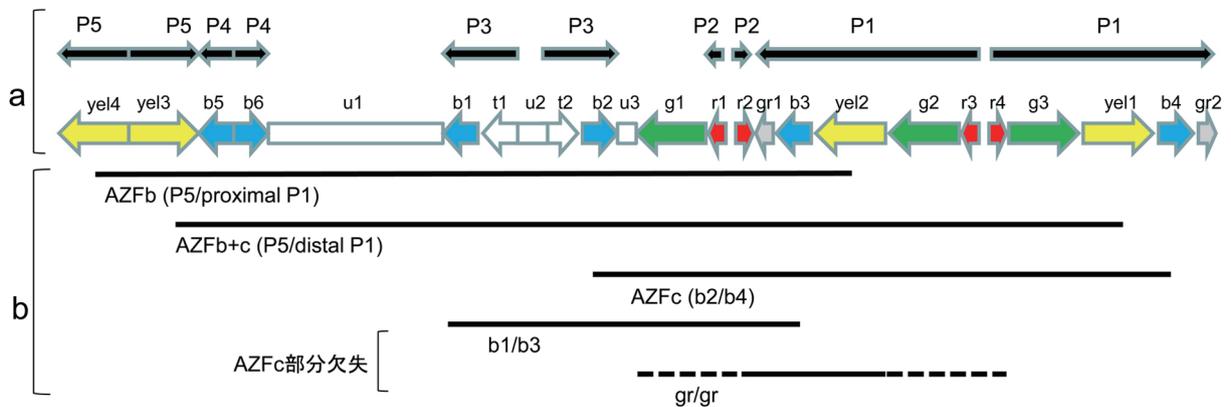


図3 Y染色体長腕サブアンプリコンとAZF
a: パンドローム (P) 構造内に, さらにサブアンプリコンがパンドローム構造を構成している. b; blue, g; green, gr; gray, r; red, yel; yellow.
b: パンドローム構造を考慮したAZF (azoospermia factor) 欠失
(例 P5/proximal P1とは, yel4 (P5)とyel2 (Proximal P1)の再組換えにより生じたAZFb欠失. b2/b4とは, サブアンプリコンb2とb4の再組換えにより生じたAZFc欠失.)

3. Y染色体とAZF (azoospermia factor)

1976年Tiepoloら⁸⁾は, 精子形成障害がY染色体長腕遠位部の欠失により高頻度に出現する事実をあげ, 精子形成に関与する領域AZFの概念を提唱した. 実際, 1993年Maら⁹⁾はRBMY (RNA binding motif on Y), 1995年ReijoらはDAZ (deleted in azoospermia)¹⁰⁾などの精子形成候補遺伝子を同定した. これらの遺伝子は両者ともRNA binding motifをもち, 各遺伝子はパンドロームに対応したコピー数をもつ. さらに, Vogtら¹¹⁾は無・乏精子症患者のY染色体長腕上の微小欠失と精巢の組織表現型を比較した結果, 3領域に微小欠失の集中を明らかにし, AZFa, b, cと分類した. AZFa欠失者の精巢組織型はSertoli cell only syndrome (SCO), AZFb欠失者はmaturation arrestであり, AZFc欠失者は様々な組織型を示していたと報告した. 現在, AZFa, b, c欠失を中心とした分類が臨床的に汎用されている.

4. Y染色体微小欠失が生じる機序

1) AZFaの欠失機序

AZFaの欠失はヒト内在性レトロウィルスHERV (human endogenous retrovirus) によると考えられている. この領域には直接リピート構造をもつ, HERV Iが存在する¹²⁾. HERV Iはヒトへ進化前(ヒトへ進化したのは300~700万年前)の5,000万年前にヒト由来ゲノムに入りこんだと考えられている¹³⁾. 直列リピートの2ヶのHERV15yq1とHERV15yq2は約10 kbであり, 両者の距離は800 kbある. 相同な塩基配列間の相同再組み換えの結果, その間にある遺伝子が欠失した. AZFa領域にはRNAヘリカーゼであるDDX3Yやユビキチン複合体タンパクであるUSP9Y (DDFRY) が報告されている. AZFa領域の欠失は組織学的にSCOの表現型になる.

2) AZFb, cの欠失機序 (図3b)

AZFb, c領域は, P1~P5アンプリコンがパンドローム構造を呈する. 各サブアンプリコンの配列相同性と同方

表3 AZF領域の発現遺伝子

AZFa	<i>DDX3Y (DBY)</i> <i>USP9Y</i>	DEAD Box Y Ubiquitin specific protease 9Y
AZFb	<i>CDY1</i> <i>EIPIAY</i> <i>PRY</i> <i>RBMY</i> <i>JARID1D (SMCY)</i> <i>RPS4Y2</i> <i>XKRY</i> <i>HSFY</i>	Chromo Domain Y1 /2 Essential Initiation Translation factor 1 A Y PTP - BL related Y RNA binding motif Y-linked Jumonji AT-rich interactive domain 1D Ribosomal protein S4 Y linked 2 X - Kell blood group precursor related Y Heat-shock transcription factor Y linked
AZFc	<i>BPY2</i> <i>CSPG4LY</i> <i>DAZ</i> <i>GOLGA2LY</i>	Basic Protein Y2 Chondroitin sulphate proteoglycan 4 like Y Deleted in azoospermia Golgi autoantigen, golgin subfamily A2 Like Y

向性により、相同再組換えが生じる。従来、AZFb, cと分類されている領域には、色塗りされたサブアンプリコン⁷⁾が存在する。旧来のAZFc欠失は、b2 (blue) とb4の再組換えによる欠失である (b2/b2欠失)¹⁴⁾。したがって、染色体内再組換えの結果生ずる欠失である。この領域の遺伝子を表3にあげた。

(1) AZFb (P5/proximal P1) 欠失 (図3b)

AZFbはP5からproximal P1の相同再組換え (homologous recombination) による欠失であり、*HSFM*および*RBMY*が欠失する。これらの遺伝子は、精祖細胞の調節を行っていると考えられている。とくに後者は精細胞特異的のスプライシングコファクターと考えられている。この領域の全欠失はmaturation arrestを惹起すると考えられている。AZFb欠失は、サブアンプリコンによる相同組み換えによる欠失と考えられるが、HERVに関与した部分欠失も報告されている¹⁵⁾。

(2) AZFb+c (P5/distal P1) 欠失

また、P5とdistal P1間との相同再組換えによる欠失はAZFb+c欠失であり、後述するAZFc領域の遺伝子欠失も伴う¹⁶⁾。

(3) AZFc欠失 (b2/b4欠失) (図3b)

b2とb4は塩基相同性 (99.9%以上) と同方向であるので、相同再組換えが生じ、欠失する。*BPY2*, *DAZ*, *CDY2*遺伝子の欠失や転写物が影響を受け、精子形成障害を惹起する。この欠失は約1.8 Mbにも及ぶ。

(4) AZFc部分欠失 (gr/gr欠失)

サブアンプリコンg (green) とr (red) は (g1とg2) 間、(r1とr3), (r2, r4) 間の相同再組換えによる欠失を生じる可能性がある。また、それぞれr1, r2, r3, r4のサブアンプリコン内には、*DAZ 1*, *DAZ 2*, *DAZ 3*, *DAZ 4*の遺伝子に関与する領域があり、クラスター *DAZ 1/DAZ 2*と*DAZ 3/DAZ 4*はセットとして振る舞う。gr/gr欠失は、何種類かの再組換えによる欠失の可能性が考えられるが、遺伝子の欠失はないが、量の変動はある。たとえば、g1とg2間の欠失の場合r1, r2にある*DAZ 1*, *DAZ 2*が欠失するがr3, r4にある

DAZ 3, *4*は保存される。もちろん、g3にある*BPY2*や*yel2*にある*CDY*が保存され、欠失する遺伝子、転写物がない。したがって、gr/gr欠失は、約1.5 Mbの大きな欠失にかかわらず、欠失遺伝子がなく、臨床的に大きな異常はないと考えられている¹⁷⁾。ちなみに、わが国のgr/gr欠失は、ほぼ全男性の30%に存在する¹⁸⁾。また、その欠失の大部分は*DAD1/DAZ2*の欠失であるが、妊孕性に影響はない¹⁹⁾。

(5) AZFc部分欠失 (b2/b3欠失)

b2とb3は相同配列であるが方向が逆である。まず、b2/b3の逆位が起こり、この後にgr/gr間で再組み換えが生じb2/b3欠失が生じた。このようにAZFcの部分欠失はさまざまなパターンが存在する。

日本人Y染色体微小欠失検出キットの上市

1. 開発コンセプト

近年のTESEは顕微鏡下に細切精巢内精子採取術 (microdissection TESE, mTESE) を行うことによって、精子回収率を上げている。しかし、不要なTESEも施行され、mTESEの適応を決める検査法が切望されている。現在、文献的にAZFa, AZFb, AZFb+c欠失にTESEの適応はないとされている²⁰⁾。

欧米諸国において、AZF欠失の有無は生殖補助技術を予定している男性患者に対して必須検査である。2004年European Molecular Genetics Quality Network (EMQN)のガイドラインではAZF欠失を6つのsequence tagged-site (STS) マーカーによって検出することが推奨され、Promega社の診断ツールもこれを基に作製されている²¹⁾。

しかし、本邦におけるAZFc領域のSTS検出マーカーであるsY254, sY255は、極めて不安定でありこの両者のみでは多くの疑陽性が生じる²²⁾。また、DNA抽出法やPCRの条件、能率化を図るためマルチプレックスの手法は避けられないノイズ (偽陽性) を伴う。われわれが作製したY染色体欠失検出キットは、このノイズを可能な限り少なくするために至適STSマーカーを再選択し、検査法としてLuminex[®]法を

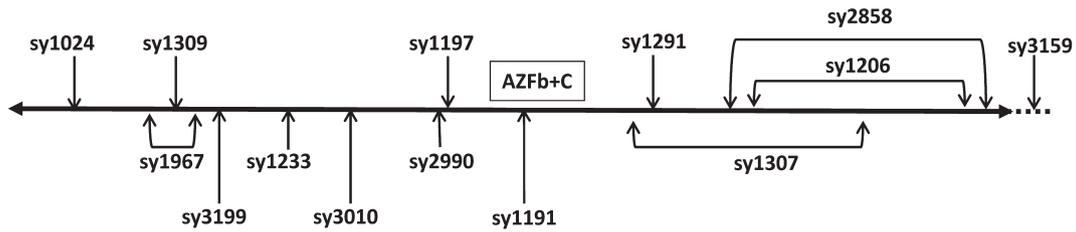


図4 Y染色体欠失キットに用いたSTSマーカーの位置 (AZFb+c領域)

採用した。さらに、AZFの概念に準拠し、次の3つのコンセプトで作製した。1) 日本人の多型を考慮した正確かつ実用的キット 2) 迅速検出かつ廉価なキット 3) Y染色体の特徴であるパンドローム欠失パターンの検出が可能なキットにした。

2. Y染色体及びY染色体上精子形成領域の欠失部位の分析方法

1) マーカーの選択

STSマーカーはWhitehead Institute for Biomedical Research上に公開されているMSY Breakpoint Mapper (<http://breakpointmapper.wi.mit.edu/>) より可能な限りsingle copyのマーカーを選択し、総合的に欠失を判定できるように設計した。X染色体のコントロールプローブを含め21種のSTSマーカーを選択した(図4, 5)。

2) 検出方法

21 multi-plex PCRおよびLuminex X MAP technologyによって安定したマルチプレックスマーカーセットを確定した(図5)。

3) マーカーパターンの確定とvalidation

不妊外来を訪れた2015症例に従来法と新キットで網羅的に検証した。毎年、当施設に送付されるヨーロッパ遺伝学会の外部コントロールDNAによる(EMQN) validationを受けている。

4) どのような欠失を検出できるのか

欠失パターンを従来用いられている4分類とした。歴史的に実績のあるAZFを中心とした欠失分類をY染色体微小欠失(主分類)にし、一般医家向けとした。男性不妊専門外来に対応できる様に、さらに亜分類を参照できるようにした。

(1) Y染色体微小欠失(主分類)

従来のAZF概念とパンドローム間の再組換えの結果生じた欠失を網羅したもので、一般クリニック用に次のような分類で報告される。この主分類は①AZFa, ②AZFb (P5/proximal P1), ③AZFb+c (P5/distal P1), ④AZFc (b2/b4)の4種類とした。図5に微小欠失(主分類)と2013人の男性不妊外来受診した男性の欠失検体数を示した。いずれも感度、特異度とも100%である。

(2) 染色体異常の分析

sY3159はY染色体長腕末端のSTSマーカーである。この

マーカーの欠失は長腕末端に伸びるヘテロクロマチン部の欠失を伴っていると考えられる。したがって、本キットを用いると、①Y染色体欠失, ②Y染色体長腕部分欠失I (AZFa以遠), ③Y染色体長腕部分欠失II (AZFb以遠), ④Y染色体長腕部分欠失III (AZFb以遠), ⑤Y染色体長腕部分欠失IV (AZFb以遠), ⑥Y染色体長腕部分欠失V (AZFb以遠), ⑦Y染色体長腕部分欠失 (AZFb以遠)の7種の欠失として分類した。本分類は主分類の欠失した以降およびヘテロクロマチン部も欠失し、Y染色体長腕の部分欠失をローマ字I~VIとして分類した。臨床表現型は主分類のAZF欠失に対応する。たとえば(AZFb以遠)の欠失は主分類のAZFb欠失に対応する可能性が高い。主分類との違いは、Y染色体遠位側末端にあるヘテロクロマチンの欠失を伴っているかの違いである(製作者らは、Y染色体長腕末端欠失とAZF欠失の表現型が異なる可能性を期待している)。

(3) Y染色体微小欠失(亜分類)

①Ym-1 : (P5+P4) 欠失, ②Ym-2 : (P5+P4) 欠失, ③Ym-3 : AZFb部分欠失, ④Ym-4 : AZFb部分欠失, ⑤Ym-5 : (P3欠失), ⑥Ym-6 : (P1+P2+P3欠失), ⑦Ym-7 : (P1+P2+P3欠失), ⑧Ym-8 : (b1/b3欠失), ⑨Ym-8 : (P3欠失), ⑩Ym-9 : (P3欠失), ⑪Ym-10 : (b2/b3欠失), ⑫Ym-11 : (gr/gr欠失), ⑬Ym-12 : (P1欠失) (製作者らは、再組換えでない、パンドローム単位の欠失による表現型が異なる可能性を期待している)。これらの13種を亜分類とした。

亜分類のコンセプトは、再組換えによる欠失でなくパンドローム単位の欠失を想定している。ただし、⑧, ⑩, ⑫はAZFcの部分欠失であり、すでに確立された欠失であるが、亜分類にした。また、①, ②のように同じ欠失でありながら分類名が同じものは、欠失範囲が異なるものであり、将来再分類できる可能性がある。

(4) Y染色体多型分析

本キットで選択した21のSTSマーカーの多型と考えている。

(5) gr/gr欠失の扱い

sY1291はgr/gr欠失を決めるキーマーカーである。前述したように、このマーカーの欠失は日本人の30%に存在し、AZFc部分欠失があり¹⁹⁾、YハプロタイプDに対応する²³⁾。本キットでは、⑫Ym-11:(gr/gr欠失)の亜分類にした。このマーカーの欠失の有無に関わらず、「Y染色体微小欠失(主

各検体数	1 sy757	2 sy14	3 sy3118	4 sy1251	5 sy1324	6 sy1316	7 sy1714	8 sy1024	9 sy1967	10 sy1309	11 sy3199	12 sy1233	13 sy3010	14 sy2990	15 sy1197	16 sy1191	17 sy1291	18 sy1307	19 sy1206	20 sy2858	21 sy3159	主診断
5	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	AZFa欠失
2	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	AZFa欠失
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	AZFb欠失 (P5/proximal P1)
10	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	AZFb+c欠失 (P5/distal P1)
2	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	AZFb+c欠失 (P5/distal P1)
62	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	AZFc欠失 (b2/b4)
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	AZFc欠失 (b2/b4)

図5 Y染色体微小欠失 (主分類)

1, 欠失なし, 0, 欠失あり. 主診断を4分類とし, それに対する, 欠失検体数を示した (2013例中).
プローブ5-7: AZFa領域, プローブ8-17: AZFb領域, プローブ16-20: AZFc領域.

分類)], 「染色体異常」および他の「Y染色体微小欠失 (亜分類)」を優先させた, syY1291単独欠失をgr/gr欠失すなわち「⑫Ym-11: (gr/gr欠失)」にした.

5) どのような報告書か

(1) 欠失がある場合, 一般医家に対する報告書は,

①AZFa, ②AZFb (P5/proximal P1), ③AZFb+c (P5/distal P1), ④AZFc (b2/b4) の4種のみとなる.

Y染色体長腕遠位側ヘテロクロマチン部欠失を伴う可能性がある場合 (前項2.-4) - (2)), 染色体異常I~VIIが付記される.

(2) Y染色体微小欠失 (亜分類) の報告書は,

Ym-1~Ym-12の12種類になる. 臨床的に意味があるかは現在不明であるが, 諸家らによる今後の臨床症例の積み重ねを期待している. この分類のコンセプトは再組換えによる欠失でなく, パリンドローム単位に欠失していると想定している. したがって, この結果を受け取った場合, まず欠失は存在するが臨床的意味は不明であると解釈すべきである.

(3) Y染色体多型は報告書には反映されない.

6) どのように解釈するか

AZFa, AZFb (P5/proximal P1), AZFb+c (P5/distal P1) 各欠失はTESEの適応がない²⁰⁾. Ym-10欠失, Ym-11欠失, Ym-8欠失はAZFcの部分欠失である. 特にYm-11欠失はgr/gr欠失であり, 多くの症例で報告されると想定される. これら3つのAZFc部分欠失にDAZ欠失はない. DAZ欠失はAZFb+c (P5/distal P1)欠失およびAZFc (b2/b4)欠失のみである.

まとめ

改変動物の進歩により, さまざまシグナル伝達系, 癌関連遺伝子などで精子形成障害が報告されている. 精子形成の減数分裂の異常のみならず, Y染色体の微小欠失は再組換えによって生じるゲノム病であることも認知されている.

しかし, 再組換えで説明できない欠失や一般に無精子症であると考えられるAZFb欠失から精子が存在するという報告も散見される. これらの例外をいかに, その機構を説明できるかが今後の検討課題である. さらに, 日本人Y染色体欠失検出キットの作製コンセプトと使用方法を理解し, 普及改善を望むものである.

文 献

- 1) 高栄哲・並木幹夫 (2009): 精子形成関連遺伝子 (特集 臨床アンドロロジーの最近の話題). ホルモンと臨床, 57(1): 59-65.
- 2) Miyamoto, T., Hasuike, S., Yogev, L., Maduro, M.R., Ishikawa, M., Westphal, H. and Lamb, D.J. (2003): Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. Lancet, 362, 1714-1719.
- 3) Lynn, A., Koehler, K.E., Judis, L., Chan, E.R., Cherry, J.P., Schwartz, S., Seftel, A., Hunt, P.A. and Hassold, T.J. (2002): Covariation of synaptonemal complex length and mammalian meiotic exchange rates. Science, 296, 2222-2225.
- 4) Cho, C., Jung-Ha, H., Willis, W.D., Goulding, E.H., Stein, P., Xu, Z., Schultz, R.M., Hecht, N.B. and Eddy, E.M. (2003): Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. Biol. Reprod., 69, 211-217.
- 5) Stankiewicz, P. and Lupski, J.R. (2002): Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. Trends Genet., 18(2), 74-82.
- 6) Lupski, J.R. (1998): Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. Trends Genet., 14, 417-422.
- 7) Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L.G., Minx, P.J., Cordum, H.S., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Silber, S., Oates, R., Rozen, S. and Page, D.C. (2001): The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions

- in infertile men. *Nat. Genet.*, 29, 279–286.
- 8) Tiepolo, L. and Zuffardi, O. (1976): Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.*, 34, 119–124.
 - 9) Ma, K., Inglis, J.D., Sharkey, A., Bickmore, W.A., Hill, R.E., Prosser, E.J., Speed, R.M., Thomson, E.J., Jobling, M., Taylor, K., Wolfe, J., Cooke, H.J., Hargreave, T.B. and Chandley, A.C. (1993): A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell.*, 75(7), 1287–1295.
 - 10) Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L.G., Rosenberg, M., Rozen, S., Jaffe, T., Straus, D., Hovatta, O., Chapelle, A.D.L., Silber, S. and Page, D.C. (1995): Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat. Genet.*, 10(4), 383–393.
 - 11) Vogt, P.H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., Köhn, F.M., Schill, W.B., Farah, S., Ramos, C., Hartmann, M., Hartschuh, W., Meschede, D., Behre, H.M., Castel, A., Nieschlag, E., Weidner, W., Gröne, H.J., Jung, A., Engel, W. and Haidl, G. (1996): Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.*, 5, 933–943.
 - 12) Bosch, E. and Jobling, M.A. (2003): Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. *Hum. Mol. Genet.*, 12, 341–347.
 - 13) Kjellman, C., Sjögren, H.O. and Widegren, B. (1995): The Y chromosome: a graveyard for endogenous retroviruses. *Gene*, 161, 163–170.
 - 14) McElreavey, K., Ravel, C., Chantot-Bastaraud, S. and Siffroi, J.P. (2006): Y chromosome variants and male reproductive function. *Int. J. Androl.*, 29, 298–303.
 - 15) Sin, H.S., Koh, E., Taya, M., Iijima, M., Sugimoto, K., Maeda, Y., Yoshida, A., Iwamoto, T. and Namiki, M. (2011): A novel Y chromosome microdeletion with the loss of an endogenous retrovirus related, testis specific transcript in AZFb region. *J. Urol.*, 186, 1545–1552.
 - 16) Repping, S., Skaletsky, H., Lange, J., Silber, S., Van Der Veen, F., Oates, R.D., Page, D.C. and Rozen, S. (2002): Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am. J. Hum. Genet.*, 71, 906–922.
 - 17) Hucklenbroich, K., Gromoll, J., Heinrich, M., Hohoff, C., Nieschlag, E. and Simoni, M. (2005): Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. *Hum. Reprod.*, 20, 191–197.
 - 18) Y Chromosome Consortium. (2002): A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.*, 12, 339–348.
 - 19) Sin, H.S., Koh, E., Shigehara, K., Sugimoto, K., Maeda, Y., Yoshida, A., Kyono, K. and Namiki, M. (2010): Features of constitutive gr/gr deletion in a Japanese population. *Hum. Reprod.*, 25, 2396–2403.
 - 20) Stahl, P.J., Masson, P., Mielnik, A., Marean, M.B., Schlegel, P.N. and Paduch, D.A. (2010): A decade of experience emphasizes that testing for Y microdeletions is essential in American men with azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil. Steril.*, 94(5), 1753–1756.
 - 21) Simoni, M., Bakker, E. and Krausz, C. (2004): EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. *State of the art 2004. Int. J. Androl.*, 27(4), 240–249.
 - 22) Fukushima, M., Koh, E., Choi, J., Maeda, Y., Namiki, M. and Yoshida, A. (2006): Reevaluation of azoospermic factor c microdeletions using sequence-tagged site markers with confirmed physical positions from the GenBank database. *Fertil. Steril.*, 85, 965–971.
 - 23) Hammer, M.F., Karafet, T.M., Park, H., Omoto, K., Harihara, S., Stoneking, M. and Horai, S. (2006): Dual origins of the Japanese: common ground for hunter-gatherer and farmer Y chromosomes. *J. Hum. Genet.*, 51, 47–58.