

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20077

研究課題名(和文) 精巣体積低下を伴う無精子症の原因の解明 - X染色体遺伝子の網羅的解析 -

研究課題名(英文) Genetic cause of azoospermia with small testes - Comprehensive analysis of the X chromosome -

研究代表者

飯島 将司 (Iijima, Masashi)

金沢大学・附属病院・助教

研究者番号：70749168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：精巣体積5ml以下の無精子症患者12例の末梢血リンパ球由来のDNAを用いて、マイクロアレイでX染色体の網羅的解析を行った。4 x180Kのマイクロアレイで全染色体をカバーしつつ、X染色体にプローブ間距離が661bpになるように高密度にプローブを設定した。計36個のコード遺伝子を含む領域でコピー数の優位な増加、減少を認めた(増加33個、減少3個)。2症例以上で共通してコピー数の増減を認めた領域を10認め、その領域内に14のコード遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子は精巣の発育および精子形成の候補遺伝子の可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A comprehensive microarray analysis of the X chromosome was carried out using DNA derived from peripheral blood lymphocytes of 12 azoospermia patients with testicular volume of 5 ml or less. While covering all chromosomes with a 4 x 180 K microarray, the probes were designed at high density so that the distance between the probes was 661 bp on the X chromosome. We found significant copy number variant in the region containing 35 coding genes (33 increase, 3 decrease). There were 10 regions including 14 coding genes that showed copy number variant in common in more than two cases. It was suggested that these genes may be candidate genes for testicular growth and spermatogenesis.

研究分野：泌尿器科

キーワード：無精子症 X染色体

1. 研究開始当初の背景

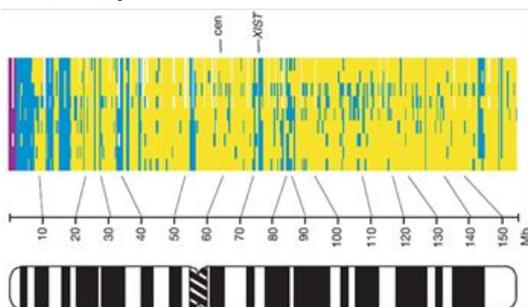
男性不妊症の原因として乏精子症、無精子症に代表される造精機能低下が最も多いが、生殖補助医療の発展に伴い精巣精子採取術によりごく少数でも精子を得ることができれば顕微授精により拳児を得ることができる時代となった。しかし、無精子症患者における精巣精子採取術での精子採取率は 30-40%程度にとどまっており、これは現時点でのこの治療法の限界ともいえる。造精機能障害の原因の大半は不明であり、これが治療法の進歩を妨げている原因でもある。

【Y 染色体微小欠失】

現在明らかにされている原因としてクラインフェルター症候群に代表とされる染色体核型異常と Y 染色体微小欠失があげられる。これらはヨーロッパアンドロロジー学会やヨーロッパ泌尿器科学会のガイドライン [1-2] においても無精子症患者で検査することが推奨されている。Y 染色体微小欠失の原因として Y 染色体の ampliconic sequence と呼ばれる 10-100kb 以上にわたって 99.9% 相同な配列の集団によって構成される領域があげられる。この構造的特徴のため染色体内相同再組み換えを起こすことで様々なパターンの欠失を来すことが知られており、我々は Y 染色体微小欠失を検出するための検査キットを開発し社会的貢献を果たした実績がある [3]。これら Y 染色体微小欠失を来している患者は特徴的な身体所見は認めず事前に予測することは不可能である。

【クラインフェルター症候群】

クラインフェルター症候群は通常精巣容積が 5ml 以下と極めて小さく、ある程度結果を予測した上で検査を行うが、予想に反して正常核型 (46,XY) であるということが時に経験される。同様の表現型であることから類似した機序が関与している可能性が考えられるが、現在までにこの原因を明らかにした報告は認められない。クラインフェルター症候群は 47,XXY の核型で示される通り余剰 X 染色体が原因となり表現型異常を来すが、通常は余剰 X 染色体は不活化を受けているため多くの X 染色体上の遺伝子は発現しない [4]。しかし、図 1 に示すよう一部の遺伝子が不活化を免れているため [5-6]、これら遺伝子群の数的異常が表現型異常を来していると考えられている。



【図 1】

X 染色体 (ヒト、女性) の不活性化の状態 624 の遺伝子が検査され、黄色は不活性化されている遺伝子、水色は不活性化を免れている遺伝子、紫色は偽常染色体領域を示す [5]。

【X 染色体の特徴】

X 染色体には 1098 の遺伝子が存在するがそのうち 99 が精巣特異的に存在していることから X 染色体が精子形成に重要な役割を持っていることは明らかである。さらには X 染色体と Y 染色体は共通の起源から発生したと考えられており、X 染色体にも上述した ampliconic sequence が存在し、この領域の遺伝子は精細胞に優位に発現している [7]。すなわち、X 染色体の ampliconic 領域に存在し、X 染色体不活性化を免れている遺伝子群がコピー数異常を来すことでクラインフェルター症候群に類似した表現型を来していると思定している。

2. 研究の目的

精巣容積が極めて小さい無精子症患者をみるとクラインフェルター症候群をまず疑うが、染色体検査を行うと 46,XY であることがしばしば経験される。クラインフェルター症候群は余剰な X 染色体がその表現型異常を来しており、同様の表現型を来していることからこのような症例では X 染色体遺伝子の関与が強く疑われる。X 染色体は Y 染色体と同様に繰り返し配列を多く認め、欠失・重複を起こしやすい染色体であり、Y 染色体の微小欠失は無精子症の原因としてよく知られる。X 染色体にも精巣特異的に発現する遺伝子が多く、同様の機序で遺伝子のコピー数異常を来していることが強く疑われるため、これを究明するため今回の研究を立案した。

3. 研究の方法

過去に得られた血液 DNA サンプル 2400 例から精巣容積が両側とも 5ml 以下で、正常核型、Y 染色体微小欠失を認めず、精子形成障害の原因として明らかかなものを認めない 102 例を候補として選択した。X 染色体の遺伝子のコピー数を網羅的に調べるため、4 x180K のカスタムマイクロアレイで全染色体をカバーしつつ、X 染色体遺伝子を網羅的に調べられるように X 染色体ではプローブ間距離が 661bp になるように設定して array CGH を行った。

4. 研究成果

4 例についてまず解析を行い、全例とも問題のないクオリティで解析可能であることを確認したが、1 例は染色体数異常の疑いがありその後確認したところクラインフェルター症候群であることが判明した。3 例で合計

22 のコーディング遺伝子領域のコピー数バリエーションを検出した。

3 例全てで共通している変化を認めた領域に含まれる遺伝子が 3 つ (MAP3K15, BCOR, EFBN) 2 例のみ共通した変化を認めた領域に含まれる遺伝子が 5 つ (MAOA, MAGED2, SNORA11, MAGT1, TMLHE) 確認された。その他のノンコーディング領域も含めると多数の共通変化を認めた領域を認めた。追加で 8 症例について array CGH を行い、全て解析可能であったが 1 例クラインフェルター症候群であることが確認された。クラインフェルター症候群の 2 例を除く 10 例で検討したところ、計 36 個のコード遺伝子を含む領域でコピー数の優位な増加、減少を認めた。増加：MAP3K15, MAGEB10, BCOR, DDX3X, MAOA, CCDC22, FOXP3, GAGE10, MAGED2, SNORA11, AR, OPHN1, YIPF6, STARD8, EFNB1, PJA1, MAGT1, PASD1, PRRG3, FATE1, CNGA2, MAGEA4, CABRE, MIR452, HAUS7, BGN, ATP2B3。減少：DMD, OPN1LW, OPN1MW2, OPN1MW, TEX28, FLNA, PLXNA3, LUZP4, TMLHE。

それぞれの増減を認めた領域を UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly で確認し、領域内に intron しか認めない MAP3K15, DMD, BCOR, MAOA, MAGT1, TMLHE を除く 29 の遺伝子 (増加：MAGEB10, DDX3X, CCDC22, FOXP3, GAGE10, MAGED2, SNORA11, AR, OPHN1, YIPF6, STARD8, EFNB1, PJA1, PASD1, PRRG3, FATE1, CNGA2, MAGEA4, CABRE, MIR452, HAUS7, BGN, ATP2B3。減少：OPN1LW, OPN1MW2, OPN1MW, TEX28, FLNA, PLXNA3, LUZP4。)について検討した。各遺伝子ごとの遺伝子座、コピー数の変化を認めた症例の数と増減を下記表に記す。

遺伝子	遺伝子座	変化あり症例数	コピー数の増減
MAGEB10	Xp21.3	1	
DDX3X	Xp11.4	1	
CCDC22	Xp11.23	1	
FOXP3	Xp11.23	1	
GAGE10	Xp11.23	2	
MAGED2	Xp11.21	2	
SNORA11	Xp11.21	2	
AR	Xq12	1	
OPHN1	Xq12	1	
YIPF6	Xq12	1	
STARD8	Xq13.1	1	
EFNB1	Xq13.1	3	
PJA1	Xq13.1	2	
LUZP4	Xq23	1	
PASD1	Xq28	1	
PRRG3	Xq28	1	
FATE1	Xq28	1	
CNGA2	Xq28	1	

MAGEA4	Xq28	1	
CABRE	Xq28	1	
MIR452	Xq28	1	
HAUS7	Xq28	2	
BGN	Xq28	2	
ATP2B3	Xq28	1	
OPN1LW	Xq28	6	
OPN1MW2	Xq28	6	
OPN1MW	Xq28	6	
TEX28	Xq28	6	
FLNA	Xq28	1	
PLXNA3	Xq28	1	

これらは精巣の発育および造精機能に影響を及ぼす候補遺伝子と考えられるが、特に 2 症例以上で認められた遺伝子 GAGE10, MAGED2, SNORA11, EFNB1, PJA1, HAUS7, BGN, OPN1LW, OPN1MW2, OPN1MW, TEX28 は有力な候補と考えられる。

これら候補遺伝子の各組織での発現量を GTEX (<https://gtexportal.org/home/>) で確認すると、その他臓器に比べて精巣での発現が比較的多い群 (GAGE10, OPN1LW, OPN1MW2, OPN1MW, TEX28)、中等度の群 (MAGED2)、比較的低い群 (SNORA11, EFNB1, HAUS7) に分類することができた。

以上の結果より GAGE10, OPN1LW, OPN1MW2, TEX28 の遺伝子が精子形成に関与している可能性が示唆された。本研究の仮定では X 染色体上の遺伝子の重複が精子形成および精巣容積に影響を与えると考えており、その仮定に従えば GAGE10 が条件を満たすと考えられる。OPN1LW, OPN1MW2, TEX28 はコピー数が減少していたため仮定とは異なるが精子形成に影響を及ぼす遺伝子である可能性があると考えられた。

【参考文献】

- [1] Krausz, C., et al. (2014). "EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013." *Andrology* 2(1): 5-19.
- [2] A. Jungwirth (chair), T. D., G.R. Dohle, A. Giwercman, Z. Kopa, H. Tournaye, C. Krausz (2013). "Guidelines on Male Infertility."
- [3] Iijima, M., et al. (2014). "New molecular diagnostic kit to assess Y-chromosome deletions in the Japanese population." *Int J Urol* 21(9): 910-916.
- [4] Monkhorst, K., et al. (2009). "The probability to initiate X chromosome inactivation is determined by the X to

autosomal ratio and X chromosome specific allelic properties." PLoS One 4(5): e5616.
[5] Carrel, L. and H. F. Willard (2005). "X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females." Nature 434(7031): 400-404.
[6] Carrel, L., et al. (1999). "A first-generation X-inactivation profile of the human X chromosome." Proc Natl Acad Sci U S A 96(25): 14440-14444.
[7] Mueller, J. L., et al. (2013). "Independent specialization of the human and mouse X chromosomes for the male germ line." Nat Genet 45(9): 1083-1087.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 将司 (IIJIMA, Masashi)
金沢大学・附属病院・助教
研究者番号: 70749168

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号:

(4) 研究協力者

田嶋 敦 (TAJIMA, Atsushi)