

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	宮 川 博 榮
学 位 論 文 題 目			
Single-nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with Sertoli cell-only syndrome (Sertoli cell-only syndrome による日本人無精子症患者群とヒト SEPTIN12 遺伝子の多型解析に関する研究)			
共 著 者 名			
宮本敏伸、 高栄哲、 辻村晃、 宮川康 、西條泰明、 並木幹夫、 千石一雄			
Journal of Andrology Published Ahead of Print June 2, 2011			
研 究 目 的			
<p>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、その背景として不妊症カップルが増加傾向にあることは一般にはあまり認識されていない。不妊症の原因として女性の社会進出などによる結婚年齢の高齢化など社会的な要因が存在するものの、その原因の約半数は男性因子であるといわれている。ヒト無精子症の原因として染色体異常、Y染色体の部分欠失さらにはその遺伝子変異により無精子症を引き起こすいくつかの原因遺伝子が同定されているものの、そのほとんどは現在まで明らかにされていないのが現状である。一方、マウスにおける精子形成メカニズムはノックアウトマウスに代表される実験結果よりヒトに比べ解明が進んでいる。しかし、それらの知見がヒトにおいて還元されているケースはあまりにも少ない。その原因として、まずヒト疾患原因遺伝子の同定には逆行性遺伝学的アプローチが必要な点、さらに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いことが挙げられる。そこで近年ではヒト疾患遺伝子をダイレクトに同定することが試みられている。2006年 Lin らは Sertoli cell-only syndrome (SCOS) 患者の精巣組織と正常成人精巣組織を用いてマイクロアレイ法を行い、SCOS 患者の精巣においてその発現が低下している遺伝子をいくつか同定した(1)。そこで我々はヒト SCOS の原因遺伝子を同定するために、そのうちの一つであるヒト SEPTIN12 遺伝子に着目し、日本人無精子症患者特に組織学的に SCOS と診断された患者群において解析を行った。</p>			

## 材 料・ 方 法

対象は、大学の倫理委員会で承認を得た後、全て文章によりインフォームドコンセントを得た SCOS の日本人患者 100 名と正常コントロール群 140 名であり、全て血液から Genomic DNA を抽出した。正常コントロール群は全員自然妊娠が確認されており、SCOS 患者は 20 以上の精巣標本を使用し病理医と泌尿器科医により組織学的に診断された。また臨床検査上、明らかな精巣障害がある場合や感染後、精路通過障害、下垂体機能不全などによる無精子症はこの研究から除外した。また染色体分析では全ての患者は 46 XY の正常核型を示し、Y 染色体の微小欠失も認めなかった。

SEPTIN12 遺伝子の Full-length cDNA 配列を BLAST によってヒューマンジェノミックシークエンスと比較し、すべてのエクソン・イントロンボーダーを同定し、coding region の全てのエクソン及び隣接するイントロンをシークエンス解析するためにプライマーを設定した。First PCR 及び Nested PCR を施行し、得られた PCR 産物は QIAquick PCR Purification kit を使用して精製し、ダイレクトシークエンス解析を行った。

SCOS 患者群において検出された single nucleotide polymorphism (SNP) に関して 140 名のコントロール群においてもシークエンスを行い、患者群及びコントロール群においてゲノタイプ、アレルの出現頻度を統計学的に比較検討した。

## 成 績

100 名の SCOS 患者 DNA を用いて、SEPTIN12 遺伝子の mutation 解析を行ったところ、エクソン 2, 4, 5 において合計 8 つの SNP (SNP1-SNP8) を検出した。このうち SNP1 (192T>C) のみ既知のものであり、それ以外は全て今回新たに検出されたものであった。同定された 8 つの SNP のうち、SNP2: 204G>C (Gln38His) 及び SNP5: 422C>A (Thr111Lys) のみアミノ酸の置換を認めた。100 名の日本人 SCOS 患者及び正常コントロール 140 名において、8 つの SNP に関してそれぞれゲノタイプ、アレルの出現頻度を比較検討したところ、SNP3, SNP4 及び SNP6 においてゲノタイプ、アレルの出現頻度ともに統計学的な有意差を認めた ( $P<0.001$ )。加えて SNP3 及び SNP6 においては正常コントロール群では 1 名も多型が検出されなかった。ハプロタイプ解析を行ったところ、患者群とコントロール群において有意な差を認めなかった ( $p>0.05$ )。

## 考 察

2006 年、Lin らがヒト SEPTIN12 遺伝子は SCOS 患者の精巣組織で発現が低下していることをと報告した(1)。そこで我々は本研究においてヒト SEPTIN12 遺伝子の変異及び多型が SCOS 患者の発症に関与しているのではないかとの仮説のもとに解析を行った。100 名の日本人 SCOS 患者を解析し、SEPTIN12 の coding region 内に 8 つの SNP を検出した。しかしながら、本研究においてはダイレクトに SCOS を引き起こすと確信させるような mutation は検出することができなかった。

しかし、SNP3 (210G>A), SNP4 (225G>A) 及び SNP6(423G>C) の出現頻度は患者群とコントロール群で有意な差を認めた。これらの知見からエクソン2における 210 及び 225nt のアデニン、さらにはエクソン4における 423 nt のシトシンおよびその隣接する領域が日本人患者の精子形成の阻害に関与しているであろうことが示唆された。しかしながら、コードされるアミノ酸は変化しないため、そのメカニズムは明らかではない。今日までエクソンに隣接するイントロン領域における SNP がエクソンのスプライシングを変化させるとの報告がいくつかなされている。また、ヒト RET 遺伝子の UTR 領域の SNP がヒルシュスプラング病の発症に関与しているなどの報告がある(2)。今回検出された SNP のもつ役割について今後さらなる研究が必要と思われる。

近年、減数分裂停止による無精子症など他の組織型による無精子症患者の精巣組織においてもヒト SEPTIN12 の発現レベルが低下していること、またマウスにおいて Septin12 遺伝子のキメラマウスのほとんどのオスは精子数の減少などの原因により不妊を呈することが明らかにされた (3)。よって今後ヒト SEPTIN12 遺伝子に関して他の組織型による無精子症患者の解析、乏精子症患者における解析等が必要と考えられる。

## 結 論

本研究により、ヒト SEPTIN12 遺伝子がヒト精子形成に重要な役割を担うこと、さらにはその SNP が日本人無精子症患者、特に SCOS の発症に深く関与していることが示唆された。




### 引用文献

1. Lin YH, Lin YM, Teng YN, Hsieh TY, Lin YS, Kuo PL. Identification of ten novel genes involved in human spermatogenesis by microarray analysis testicular tissue. *Fertil Steril.* 2006; 86:1650-1658.
2. Sribudiani Y, Metzger M, Osinga J, Rey A, Burns AJ, Thapar N, Hofstra RM. Variants in RET associated with Hirschsprung's disease affect binding of transcription factors and gene expression. *Gastroenterology.* 2011; 140: 572-582.
3. Lin YH, Lin YM, Wang YY, Yu IS, Lin YW, Wang YH, Wu CM, Pan HA, Chao SC, Yen PH, Lin SW, Kuo PL. The expression level of Septin12 is critical for spermatogenesis. *Am J Pathol.* 2009; 174: 1857-1868.

### 参考論文

1. Miyamoto T, Tsujimura A, 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.* 2009; 11: 623-628.

# 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	宮川 博栄
審査委員長 神崎 秀宏 			
審査委員 平石 一雄 			
審査委員 清水 恵子 			
学位論文題目			
Single-nucleotide polymorphisms in the SEPTIN12 gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with Sertoli cell-only syndrome			
(Sertoli cell-only syndromeによる日本人無精子症患者群とヒト SEPTIN12 遺伝子の多型解析に関する研究)			

## 学位論文審査結果の要旨

以下に、宮川博栄氏による学位論文の審査結果の要旨を述べる。

不妊症の原因の約半数は男性側に因子があるとされている。ヒト無精子症の原因のひとつであるSertoli cell-only syndrome (SCOS) 患者の精巣組織において、正常な成人精巣組織に比べて発現が低下している遺伝子がいくつか同定されており、SEPTIN12遺伝子もそのひとつである。本論文は、SCOS患者と正常成人男性において、血液からGenomic DNAを抽出し、SEPTIN12遺伝子の解析を行ったものである。遺伝子の解析はすべて科学的に適切な方法で行われており、また患者と正常コントロール群の比較解析でも、研究施設の倫理委員会の承諾を得てから適切な方法を用いて行われている。

得られた結果の主たる点は、SCOS患者DNAを用いたSEPTIN12遺伝子のmutation解析において、エクソン2, 4, 5において合計8つのSNP (SNP1-SNP8) が検出され、このうち既知のSNP1を除いたSNP2からSNP8までの7つは今回新たに検出されたものであること、SNP3, SNP4, SNP6のゲノタイプとアレルの出現頻度はSCOS患者群と正常コントロール群の間で有意差があることである。

ヒトの精子形成に関与する遺伝子異常についてはいまだ不明な点が多いが、本研究はヒトSEPTIN12遺伝子のSNPがSCOSの発症に関与することを示した論文であり、学術的価値はきわめて高いと判断される。また、本論文は宮川博栄氏の十分な学問的知識に裏打ちされたものであり、学位論文としてふさわしい内容であると判断する。