

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	水無瀬 学
学位論文題目			
<b>Single-nucleotide polymorphisms in the human <i>RAD21L</i> gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia caused by meiotic arrest and Sertoli cell-only syndrome</b>			
(減数分裂停止及びSertoli cell-only syndromeに起因する日本人無精子症患者におけるヒトRAD21L遺伝子の解析に関する研究)			
共著者名			
宮本敏伸, 宮川康, 飯島将司, 上田寛人, 西條泰明, 並木幹夫, 千石一雄			
<i>Human Fertility</i>			
2017, Vol 20, Issue 3, Pages 217-220			
研究目的			
<p>現在、我が国において挙児希望を有するカップルの約15%が不妊に悩まされている。不妊症の原因は多岐にわたるものの、24%は男性側になんらかの原因がある男性因子、また24%は男性、女性の双方に原因があるとされており、不妊の約半数は男性因子がなんらかの関与をしている [1]。一般に精液検査を複数回施行し、無精子症と診断されたケースでは、泌尿器科医とタイアップし、詳細な問診の上、理学所見、内分泌学的検査、精巣の超音波検査、さらには染色体検査などが施行される。</p> <p>男性不妊の約10%は閉塞性無精子症(Non-obstructive azoospermia: NOA)に起因するとされており、それらは精巣生検の組織型により、精子低形成、減数分裂停止meiotic arrest (MA) 及びSertoli cell-only syndrome (SCOS) に分類される。無精子症の遺伝学的な要因として、これまで染色体異常、Y染色体上の微小欠失およびY染色体上のいくつかの遺伝子の変異および欠失が報告されている [2]。</p> <p>また、精子形成過程において、ときに減数分裂の異常により無精子症が引き起こされるとされているが、現在までその詳細なメカニズムは明らかにされていない。近年、マウスRad21遺伝子のノックアウトマウスが報告され、その表現型は発達上正常であるものの、</p>			

雄のhomomutantは減数分裂停止により無精子症となり不妊を呈することが報告された[3-5]。

今回、ヒトRAD21L遺伝子の変異や多型が減数分裂異常に起因する無精子症に関与しているのではないかと仮説を立て、ヒトRAD21L遺伝子変異解析を行った。

## 材 料 ・ 方 法

本研究は旭川医科大学の倫理委員会の承認を得たのち、全ての患者及び健常者に文章によるインフォームドコンセントを取得したのちに解析を開始した。全ての患者は染色体異常を伴わないこと、炎症、外傷などの要因がないことは確認されており、病理学的にMAに起因する無精子症と診断された38名の患者を対象とした。さらに140名のSCOSによる日本人無精子症患者、コントロール群として妊孕性が確認されている200名の日本人健常者においても解析をおこなった。全ての患者及び健常者から末梢血を採取し、Wizard™ Genomic DNA Purification Kit を用いて、Genomic DNAを抽出した。

ヒトRAD21Lの遺伝子の全てのcoding region および隣接するイントロン部位にprimerを設定し、MA群においてNested PCRを行い、得られたPCR産物をQIAquick PCR Purification kit により精製した。得られたDNA産物をもとにダイレクトシーケンス法を行い、変異解析を施行した。

上記にて多型を認めた領域をSCOS群140名及び正常コントロール群200名においても同様にダイレクトシーケンス解析を行い、ゲノタイプ及びアレルの出現頻度を統計学的に解析し、有意差を検討した。

## 成 績

MAに起因する無精子症患者38名において、ヒトRAD21L遺伝子の全てのcoding region においてダイレクトシーケンス解析を行った。その結果、明らかなmutationは検出されなかったものの、以下の3つのsingle nucleotide polymorphism (SNP)、SNP1: c.454C>A (Exon 4)、SNP2: c.1268A>C (Exon 10)、SNP3: c.1610G>A (Exon 14)を同定することができた。SNP1は既知の多型(rs755285899)であり、日本人の頻度は不明だが東アジアでのアレル頻度は、0.2311と高いものであった。

上記3つのSNPに関してMA群と正常コントロール群でゲノタイプ及びアレルの出現頻度を比較検討したところ、SNP2及びSNP3においてともに統計学的に有意な差を認めた ( $p<0.01$ )。またSNP1ではゲノタイプ、アレルの出現頻度ともに有意差を認めなかった ( $p>0.05$ )。次にこれらのSNPに関し同様にSCOS群と正常コントロール群においてゲノタイプ及びアレルの出現頻度を比較検討したところ、やはりSNP2及びSNP3においてともに統計学的に有意な差を認めた ( $p<0.01$ )。SNP1ではMA同様、両者に有意差を認めなかった ( $p>0.05$ )。

## 考 案

本研究において、我々はヒトRAD21L遺伝子の変異や多型がMA及びSCOSによる無精子症の発症に関与しているのではないかとの仮説をもとに解析を行った。その結果、明らかな変異を認めることはできなかったが、coding region内に3つのSNPを検出することができた。さらに我々はSNP2 (c.1268A>C (His423Pro)) 及びSNP3 (c.1610G>A (Ser537Asn)) のゲノタイプ及びアレルの出現頻度がMA群とSCOS群において妊孕性が確認されている正常コントロール群と比較して有意な差を認めることができた。SNP2及びSNP3のタンパク質レベルでの機能的な意味は不明であるが、その出現頻度からこの領域がヒト精子形成過程において何らかの関与をしていることが推測された。しかしながら、我々が今回解析した患者数はSCOSにおいて140名、MAにおいて38名と早期の結論を出すには不十分であり今後さらに症例数を増やして解析をする必要性がある。

## 結 論

本研究より、我々はRAD21L遺伝子内に存在する2つのSNP、c.1268A>C とc.1610G>AがMA及びSCOSによる日本人無精子症患者の発症に何らかの関与があることを提言した。しかしながら、その分子生物学的なメカニズムに関しては不明のままである。今後、より多くの同様の日本人患者さらには他の人種も含めた、グローバルな解析が強く望まれる。




## 引用文献

1. Krausz, C., Escamilla, A.R. & Chianese, C. (2015). Genetics of male infertility: from research to clinic. *Reproduction*, 150, R159-174.
2. Miyamoto, T. et al. (2003). Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet*, 362, 1714-1719.
3. Herrán, Y. et al. (2011). The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J*, 30, 3091-3105.
4. Gutiérrez-Caballero, C. et al. (2011). Identification and molecular characterization of the mammalian  $\alpha$ -kleisin RAD21L. *Cell Cycle*, 10, 1477-1487.
5. Lee, J. & Hirano, T. (2011). RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *J Cell Biol*, 192, 263-276.

## 参考文献

1. Miyamoto T., Minase G., Okabe K., Ueda H. & Sengoku K. (2015). Male infertility and its genetic causes. *J Obstet Gynaecol Res*, 41, 1501-1505.
2. Miyamoto T., Minase G., Shin T., Ueda H., Okada H. & Sengoku K. (2017). Human male infertility and its genetic cases. *Reprod Med Biol*, 16, 81-88.
3. Miyamoto T., Koh E., Tsujimura A., Minase G., Ueda Y., Namiki M. & Sengoku K. (2015). SIN3A mutations are rare in men with azoospermia. *Andrologia*, 47, 1083-5
4. Ueda H., Miyamoto T., Minase G. & Sengoku K. (2017). Prenatal diagnosis of a body stalk anomaly by a combination of ultrasonography and foetal magnetic resonance imaging. *J Obstet Gynaecol*, Published Online May 3, 1-2

## 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	水無瀬 学
審査委員長 <u>柿崎 香宏</u>  審査委員 <u>西條 泰明</u>  審査委員 <u>小林 博也</u> 			
学 位 論 文 題 目 Single-nucleotide polymorphisms in the human RAD21L gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia caused by meiotic arrest and Sertoli cell-only syndrome 掲載雑誌： Human Fertility, 2017			
(審査評価・結果のみとし、800字以内で提出すること。)			
以下に、水無瀬 学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要因があるとされており、減数分裂停止 (meiotic arrest : MA) や Sertoli cell-only syndrome (SCOS) による無精子症が含まれる。マウスRAD21L遺伝子のノックアウトマウスでは表現型は発達上正常であるものの、雄のhomomutantはMAにより無精子症となることが報告されている。本論文は、MAおよびSCOSによる無精子症患者と正常成人男性において、血液からGenomic DNAを抽出し、RAD21L遺伝子の変異解析を行ったものである。遺伝子の解析はすべて科学的小および倫理的に妥当な方法で行われている。 解析の結果、MAによる無精子症患者において、RAD21L遺伝子のcoding regionにおいて明らかなmutationは検出されなかったが、3つのSNP (SNP1-SNP 3) が検出され、このうち既知のSNP1を除いたSNP2とSNP3においてゲノタイプとアレルの出現頻度はMAによる無精子症患者群と正常コントロール群の間で有意差が認められた。また、SNP2とSNP3に関し、ゲノタイプとアレルの出現頻度はSCOS患者と正常コントロール群の間で有意差が認められた。 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RAD21L遺伝子内に存在するふたつのSNPがMAおよびSCOSによる無精子症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、本論文は水無瀬 学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。			