

ヒト無精子症原因候補遺伝子であるヒト MEI1 遺伝子に関する研究

分担研究者 石川 睦男 旭川医科大学病院・病院長

研究要旨

無精子症に代表される男性不妊症は近年の先進国における生活レベルの向上とともに増加傾向にあり、またいくつかの化学物質もその原因のひとつではないかと考えられている。また男性不妊症の原因として遺伝学的素因が示唆されているものの、そのほとんどがいまなお明らかにされていないのが現状である。近年、マウス Meil 遺伝子の異常により、減数分裂停止に起因する無精子症がマウスにおいて引き起こされることが明らかにされた。そこで、我々はヒト MEI1 遺伝子が減数分裂異常に起因するヒト無精子症に何らかの関与をしているのではないかと仮説をもとに、マウス Meil 遺伝子のアミノ酸配列を利用し、ヒト MEI1 cDNA を単離した。またヒト MEI1 はマウス同様精巢特異的に発現していた。組織学的解析により、その原因が減数分裂停止によると判断された 26 名の無精子症患者（アメリカ人 13 名、イスラエル人 13 名）で mutation 解析を施行し、4 つの新たな single-nucleotide-polymorphism (SNP1, 2, 3, 4) を同定した。これらの SNP に関して、無精子症患者群と正常コントロール群においてその頻度を解析したところ、SNP3 および SNP4 においてアメリカ人患者群と正常コントロール群では有意な差を認めた。これらの結果より、ヒト MEI1 遺伝子はアメリカ人の精子形成過程における減数分裂において重要な役割を担っていることが提言された。

【研究協力者】

千石 一雄

旭川医科大学医学部産婦人科学講座教授

田熊 直之

旭川医科大学病院周産母子センター助教授

宮本 敏伸

旭川医科大学医学部産婦人科学講座助手

A. 研究目的

精子形成における減数分裂の欠損は無精子症の重要な原因のひとつである。しかしながら、その詳細はほとんど明らかにされていないのが現状である。特に哺乳動物においてはその傾向は顕著であり、減数分裂における遺伝学的なメカニズムは依然、謎のままである。2000 年マウス Meil 遺伝子の異常により、減数分裂停止による無精子症マウスが形成されることが明らかとなった。本研究において、我々はマウス Meil 遺伝子をもとにヒト MEI1 cDNA を単離し、さらにヒトにおいて減数分裂停止に起因する無精子症とヒト MEI1

遺伝子の関与を解析した。

B. 研究方法

1. GenBank をもとにマウス Meil 遺伝子のアミノ酸配列と相同性を有するヒトゲノム配列にプライマーを設定し、ヒト精巢 cDNA ライブラリーを用いて PCR, 5'RACE 及び 3'RACE 法を施行し、ヒト MEI1 cDNA を単離した。シーケンス解析はセンス、アンチセンスともに数回行った。

2. ヒト MEI1 cDNA を用いてイントロンをはさむ形でプライマーを設定し、クロンテック社のヒト cDNA パネルを用いて合計 15 臓器に関して PCR 法を行い、ヒト MEI1 遺伝子の発現パターンを解析した。

3. ヒト MEI1 遺伝子とヒト無精子症の関係を解析するために、アメリカ人患者 13 名及びイスラエル人患者 13 名、計 26 名の患者 DNA を用いて mutation 解析を施行した。Coding region 内の全てのエクソン及び隣接するイントロンにプ

ライマーを設定し、PCR 及びダイレクトシーケンス解析を施行した。さらに対照群として正常コントロール 121 名も同時にシーケンス解析した。

4. mutation 解析により 4 つの新たな single-nucleotide-polymorphism (SNP1, 2, 3, 4)を同定した。これらの SNP に関して、無精子症患者群と正常コントロール群においてその頻度の差を Fisher's exact test を用いて有意差検定した。

（倫理面への配慮）

本研究に参加したすべての患者及び正常コントロールは全て文章による同意を得た後に血液を採取し、DNA を抽出した。また本研究は大学の倫理委員会の承認後、開始された。

C. 研究結果

我々はマウス Meil 遺伝子のアミノ酸配列をもとに、ヒト MEI1 cDNA を単離した。ヒト MEI1 遺伝子は 16 個のエクソンより構成され、染色体 22q13.2 領域に局在している。ヒト MEI1 遺伝子は 2,714bp と 2,609bp の 2 つの転写体を持っており、それぞれ 642 個と 607 個のアミノ酸をコードしている。2,609bp からなる cDNA はエクソン 7 を alternative splicing により欠いている。ヒト MEI1 遺伝子とマウス Meil 遺伝子はアミノ酸レベルで 77%の相同性を有していた。またヒト MEI1 はヒト精巣組織に優位に発現していた。

ヒト MEI1 の mutation 解析にて Open Reading Frame (ORF)内に 4 つの新たな single-nucleotide-polymorphism (SNP1, 2, 3, 4)を検出した。

アメリカ人患者 13 名と 61 名のアメリカ人正常コントロール群では SNP3 及び SNP4 のアレルの頻度に有意な差を認めた。しかしながらイスラエル人患者 13 名とイスラエル人正常コントロール群 60 名では全ての SNP において有意差を認めなかった。

D. 考 察

我々はヒト MEI1 cDNA を単離し、またマウス Meil との比較では、ORF 内での核酸レベルでは 61%またアミノ酸レベルでは 77%の相同性を認めた。ヒト MEI1 は 2 つの転写体からなり 2 つのアミノ酸をコードしている。これはマウス Meil 遺伝子でも同様である。

マウス Meil 遺伝子のエクソン 12 の部分的欠失もしくは完全欠失により、フレームシフトが生じ不完全なアミノ酸が形成され、結果マウス精子形成において減数分裂停止が起こり、減数分裂後に出現する round spermatid, elongated spermatid などが全く認められず無精子症を呈する。

我々はヒト MEI1 の coding region において 4 つの SNP を同定した。アメリカ人患者とコントロール群の比較では SNP3 及び SNP4 のアレルの出現頻度に有意な差を認め、これよりこれらの領域がアメリカ人の精子形成ことにその減数分裂に重要役割を担っていることが示唆された。

E. 結 論

本研究はヒト MEI1 遺伝子の SNP がヒト精子形成阻害に関与していることを示す最初の報告である。しかしながら、そのメカニズムは、依然謎のままである。我々の研究成果はヒト無精子症原因の分子メカニズムを解明する手助けとなるものであり、今後他の民族及びより多くの患者においてヒト MEI1 遺伝子の解析が望まれる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato H, Miyamoto T, Yogev L, Namiki M, Koh E, Hayashi H, Sasaki Y, Ishikawa M, Lamb DJ, Matsumoto N, Niikawa N and Sengoku K. Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human

azoospermia by meiotic arrest. (submitted to
J. Hum. Genet.)

2. 学会発表

1. 佐藤恒、宮本敏伸、千石一雄、石川睦男
ヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト MEI1
の同定およびその解析
第14回産婦人科分子内分泌談話会（山梨）
（2005年10月20日）

2. 佐藤恒、宮本敏伸、堀川道晴、千石一雄
ヒト無精子症の原因遺伝子であるヒト MEI1
の同定および無精子症症例における解析
第58回日本産科婦人科学会（横浜）（2006
年4月24日予定）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
なし。

2. 実用新案登録
なし。

3. その他
特記すべきことなし。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
山田秀人	前期破水	山口 徹、北原光夫	今日の治療指針2005版	医学書院	東京	2005	894

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
岸 玲子、佐田文宏、西條泰明	内分泌かく乱物質によるヒトへの影響—疫学研究の現状と課題	保健医療科学	54	7-16	2005
岸 玲子、佐田文宏、西條泰明、水上尚典、櫻木範明、遠藤俊明、石川睦男	内分泌かく乱化学物質の小児への影響—尿道下裂・停留精巣など先天異常と乳幼児の神経発達に関する疫学研究	周産期学シンポジウム	23	27-33	2005
岸 玲子、佐田文宏、西條泰明、倉橋典絵、加藤静恵、中島そのみ、佐々木成子	内分泌かく乱化学物質の小児への影響に関する疫学研究—現状と課題	日本衛生学雑誌	61	19-31	2006
倉橋典絵、笠井世津子、西條泰明、佐田文宏、岸 玲子	内分泌攪乱物質曝露に関する疫学研究の実験と課題—特に尿道下裂と停留精巣について	日本衛生学雑誌	60	15-22	2005
Kurahashi N, Sata F, Kasai S, Shibata T, Moriya K, Yamada H, Kakizaki H, Minakami H, Nonomura K, Kishi R	Maternal genetic polymorphisms in CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 and the risk of hypospadias	Mol Hum Reprod	11	93-98	2005
Kurahashi N, Kasai S, Shibata T, Kakizaki H, Nonomura K, Sata F, Kishi R	Parental and neonatal risk factors for cryptorchidism	Med Sci Monit	11	CR274-283	2005
Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Kato EH, Morikawa M, Minakami H, Kishi R	Caffeine intake, CYP1A2 polymorphism and the risk of recurrent pregnancy loss	Mol Hum Reprod	11	357-360	2005
Nakajima S, Saijo Y, Kato S, Sasaki S, Uno A, Kanagami N, Hirakawa H, Hori T, Tobiishi K, Todaka T, Nakamura Y, Yanagiya S, Sengoku Y, Iida T, Sata F, Kishi R	Effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on mental and motor development in Japanese children at six months	Environ Health Perspect			in press [Online 15 December 2005]
Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh, Nakajima S, Ishizuka M, Fujita S, Kishi R	Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects	Mol Hum Reprod			in press
Moriya K, Kakizaki H, Tanaka H, Furuno T, Higashiyama H, Sano H, Kitta T, Nonomura K	Long-term cosmetic and sexual outcome of hypospadias surgery: Norm-related study in adolescent	J Urol			in press
Ishizuka M., Lee, J.J., Masuda, M., Akahori F., Kazusaka A., Fujita, S.	CYP2D related metabolism in animals of the Canioidea super family — The species difference	Vet Res Comm			in press
Jinno A, Maruyama Y, Ishizuka M, Kazusaka A, Nakamura A, Fujita S	Induction of cytochrome P450-1A by the equine estrogen equilenin, a new endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand	J Steroid Biochem Mol Biol	98(1)	48-55	2006
Sakai N, Saito K, Kim HS, Kazusaka A, Ishizuka M, Funae Y, Fujita S	Importance of CYP2D3 in polymorphism of diazepam p-hydroxylation in rats	Drug Metab Dispos	33(11)	1657-60	2005
Muzandu K, Shaban Z, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S	Nitric oxide enhances catechol estrogen-induced oxidative stress in LNCaP cells	Free Radic Res	39(4)	389-98	2005
Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara Y, Kazusaka A, Fujita S	Effect of components of green tea extracts, caffeine and catechins on hepatic drug metabolizing enzyme activities and mutagenic transformation of carcinogens	Jpn J Vet Res	52(4)	185-92	2005
Ishizuka M, Takasuga T, Senthilkumar K, Tanikawa T, Fujita S	Accumulation of persistent organochlorine pollutants and polybrominated diphenyl ether in wild rats, and toxicogenomic analyses of their effects	Organohalogen compound	67	2435-2436	2005
Muzandu K, El Bohi K, Shaban Z, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S	Lycopene and beta-carotene ameliorate catechol estrogen-mediated DNA damage	Jpn J Vet Res	52(4)	173-84	2005
El Bohi KM, Sabik L, Muzandu K, Shaban Z, Soliman M, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S	Antigenotoxic effect of Pleurotus cornucopiae extracts on the mutagenesis of Salmonella typhimurium TA98 elicited by benzo[a]pyrene and oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells	Jpn J Vet Res	52(4)	163-72	2005
Shaban Z, Soliman M, El-Shazly S, El-Bohi K, Abdelazeez A, Kehelo K, Kim HS, Muzandu K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S	AhR and PPARalpha: antagonistic effects on CYP2B and CYP3A, and additive inhibitory effects on CYP2C11	Xenobiotica	35(1)	51-68	2005 Jan
Nikaidou S, Ishizuka M, Maeda Y, Hara Y, Kazusaka A, Fujita S	Effect of catechins on mutagenesis of Salmonella typhimurium TA 102 elicited by tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH)	J Vet Med Sci	67(1)	137-8	2005

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
仲田高生、中田彩子、岡田文雄、伊藤里恵、井之上浩一、斉藤真一、中澤裕之	オンライン固相抽出-高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計を用いるヒト血しょう中有機フッ素系化合物の一斉分析法の開発	分析化学	54	877-884	2005
INOUE K., OKADA F., ITO R., KAWAGUCHI M., OKANOUCHEI N. AND NAKAZAWA H.	Determination of perfluorooctane sulfonate, perfluorooctanoate and perfluorooctane sulfonylamide in human plasma by column-switching liquid chromatography - electrospray mass spectrometry coupled with solid phase extraction	J.Chromatogr. B	810	49-56	2004
INOUE K., OKADA F., ITO R., KATO S., SASAKI S., NAKAJIMA S., UNO A., SAIJO Y., SATA F., YOSHIMURA Y., KISHI R. AND NAKAZAWA H.	Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) and Related Perfluorinated Compounds in Human Maternal and Cord Blood Samples: Assessment of PFOS Exposure in Susceptible Population during Pregnancy	Environ. Health Perspect.	112	1204-1207	2004
Yamada H, Sata F, Saijo Y, Kishi R, Minakami H	Genetic factors of fetal growth restriction and miscarriage	Semin Thromb Hemost	31(3)	334-345	2005
Kobashi G, Kato EH, Morikawa M, Shimada S, Ohta K, Fujimoto S, Minakami H, Yamada H	<i>MTHFR</i> C677T polymorphism and Leiden mutation of factor V are not associated with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology in Japanese women	Semin Thromb Hemost	31(3)	266-271	2005
Kobashi G, Hata A, Shido K, Ohta K, Yamada H, Kato EH, Minakami H, Tamashiro H, Fujimoto S, Kondo K	Insertion/ deletion polymorphism of angiotensin-converting enzyme gene and preeclampsia in Japanese patients	Semin Thromb Hemost	31(3)	346-350	2005
Kobashi G, Ohta K, Shido K, Hata A, Yamada H, Minakami H, Tamashiro H, Fujimoto S, Kondo K	The egogram is a potent, independent risk factor for hypertension in pregnancy	Semin Thromb Hemost	31(3)	302-306	2005
Morikawa M, Yamada H, Kato EH, Wada S, Suzuki S, Sakuragi N, Minakami H	Failure of thromboprophylaxis in pregnancy caused by dual deficiencies of protein S and protein C	Semin Thromb Hemost	31(3)	261-265	2005
Morikawa M, Cho K, Kataoka S, Kato EH, Yamada T, Yamada H, Minakami H	Magnetic resonance image findings of placental lake: report of two cases	Prenat Diagn	25(3)	250-252	2005
Yamada H, Morikawa M	Recurrent miscarriage and embryonic loss (letter to the editor)	Hum Reprod	20	2036-2037	2005
Morikawa M, Yamada T, Kataoka S, Cho K, Yamada H, Suzuki S, Sakuragi N, Minakami H	Changes in antithrombin activity and platelet counts in the late stage of twin and triplet pregnancies	Semin Thromb Hemost	31(3)	290-296	2005
Yamada H, Shimada S, Morikawa M, Iwabuchi K, Kishi R, Onoé K, Minakami H	Divergence of natural killer cell receptor and related molecule in the decidua from sporadic miscarriage with normal chromosome karyotype	Mol Human Reprod	11(6)	451-457	2005
Yamada H, Cho K, Yamada T, Minakami H	Early-onset group B streptococcal neonatal infection in the Hokkaido University Hospital during the era of intrapartum antibiotic prophylaxis	Journal of the Hokkaido Obstetrical and Gynecological Society	48(1)	20-22	2005
Kataoka S, Yamada T, Chou K, Nishida R, Morikawa M, Minami M, Yamada H, Sakuragi N, Minakami H	Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasma in early pregnancy	J Clin Microbiol	44(1)	51-55	2006
Morikawa M, Yamada T, Yamada H, Cho K, Minakami H	Prenatal diagnosis and therapy of persistent cloaca : a case report	Fetal Diagn Ther			in press
Morikawa M, Yamada H, Yamada T, Minakami H	Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist on the uterine arteriovenous malformation	Obstet Gynecol			in press
森川 守、山田秀人、平山恵美、片岡宙門、島田茂樹、渡利道子、山田 俊、長 和俊、森本裕二、水上尚典	脊髄損傷合併妊娠の1例	周産期医学	35	427-430	2005
森川 守、山田秀人、山田 俊、平山恵美、島田茂樹、片岡宙門、長 和俊、水上尚典	胎児尿管遺残の1例	周産期医学	35	875-877	2005
山田秀人	妊娠・出産にかかわる疾患の治療と注意点—不育症・習慣流産—「妊産婦と薬物治療—EBM時代に対応した必須知識」	臨床婦人科産科	59(10)	625-627	2005
山田秀人、敦賀律子、平山恵美、古田伊都子、小橋 元、渥美達也、小池隆夫、水上尚典	妊娠中毒症と抗リン脂質抗体、特集：抗リン脂質抗体症候群	産婦人科の実際	54	567-578	2005
山田秀人	血液凝固異常合併妊娠の管理、「産婦人科の実際ハイリスク合併妊婦の増加を考える—キャリアオーバー疾患管理のポイント」	産婦人科の実際	54	1235-1248	2005
山田秀人、島田茂樹、森川 守、西田竜太郎、武田真光、水上尚典	不育症と免疫グロブリン療法	産婦人科治療	91	169-177	2005
長 和俊、岡嶋 覚、内田雅也、上田恵子、小西祥平、山田 俊、山田秀人、水上尚典	慢性肺障害児の栄養管理	周産期医学	35	571-574	2005