



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	孤発性非閉塞性無精子症患者115名における網羅的遺伝学的解析〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	村西, 雄貴
Description	配架番号 : 2925
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16433号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95568
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	MURANISHI_Yuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 村西 雄貴

学 位 論 文 題 名

孤発性非閉塞性無精子症患者 115 名における網羅的遺伝学的解析

(Systematic molecular analyses for 115 karyotypically normal men with isolated non-obstructive azoospermia)

【背景と目的】男性不妊は全男性の約 8%が直面する疾患の一つで、昨今出生率の低下する本邦においては解決すべき喫緊の課題である。その中でも非閉塞性無精子症(Non-obstructive azoospermia: NOA)は、男性不妊の 10-15%を占める common disease の一つである。NOA の診断には精液検査により無精子症と診断された男性に対して、精巣内精子採取術 (Testicular sperm extraction: TESE) が実施されるが、これは苦痛を伴う侵襲的な処置であり、特に顕微鏡補助下 TESE (Microdissection TESE: MD-TESE) では術後合併症として精巣萎縮のリスクがある。このため、NOA の診断にはより簡便で非侵襲的な方法が求められている。NOA は、単一疾患としての孤発性 NOA と先天性症候群の一症状としての症候性 NOA に分けられる。孤発性 NOA の病因として、これまでに遺伝学的要因や環境要因の関与が示唆されているが、近年次世代シーケンサーなど、遺伝子検索技術の発展により、特に遺伝学的要因が徐々に明らかになりつつある。既報の研究から、NOA の遺伝学的要因には、染色体異数性、Yq11.2 の無精子症因子 (Azoospermia factor: AZF) 領域の微小欠失、単一遺伝子異常が関与することが明らかになっているが、これらにはいくつかの問題点が存在する。第一に、技術的な困難さもあるが、AZF 領域内の遺伝子領域の重複や複雑なコピー数多型 (Copy-number variation: CNV) が考慮されていない点が挙げられ、第二に単一遺伝子異常による NOA 発症の頻度が、目的とする標的遺伝子が少ないことで過小評価されている可能性が挙げられる。そこで本研究では、46,XY の正常核型を有する孤発性 NOA 男性 115 人を対象に、AZF 領域内の CNV を、Sequenced tagged-site PCR (STS-PCR)および多重ライゲーション依存性プローブ増幅法 (Multiplex ligation-dependent-probe amplification: MLPA) を用いて解析し、微小欠失以外の CNV についても検索した。また、非 Y 染色体におけるヌクレオチド変異を全エクソーム解析 (Whole exome-sequencing: WES) を用いて解析を行い、標的遺伝子について既出の総説 5 編から抽出した 162 の NOA 関連遺伝子に着目して解析した。さらに、標的遺伝子以外の遺伝子についても希少な有害変異がないか検索した。最後に、WES データを用いて最適化シーケンスカーネル関連解析(Optimized sequence kernel association test: SKAT-O)を行うことで、孤発性 NOA 患者に共通する遺伝子変異の蓄積がないか解析した。

【対象と方法】対象患者は正常な 46,XY 核型を有する孤発性 NOA の日本人男性 115 人とした。AZF 領域における CNV は、欧州アンドロロジー学会および欧州分子遺伝学学会 (the European Academy of Andrology and the European Molecular Genetics: EAA/EMQN) ガイドラインに従って STS-PCR で解析を行った。また、AZF 領域内の微小欠失が同定されなかった患者に関して MLPA を用いた追加解析を行った。検出された CNV の病原性については EAA/EMQN ガイドラインに従って評価した。非 Y 染色体

上の遺伝子変異については WES を用いて希少な有害変異に着目して検索した。標的遺伝子は NOA 発症に関連する 162 遺伝子を既出の総説から選出し、その遺伝子内の変異について検索した。また、その他の遺伝子についても、両アレル上に存在するホモ・ヘテロ接合性およびヘミ接合性の希少な有害変異がないか検索した。病原性については、タンパク質を切断する変異、スプライス部位変異、および有害なミスセンス変異に着目した。ミスセンス変異については、Combined Annotation Dependent Depletion (CADD; <http://cadd.gs.washington.edu>) を使用し、20 点以上を有害変異とみなした。最後に、NOA の発症原因となる AZF 領域内の CNV および単一遺伝子変異が確認されなかった 93 人の患者に対して、WES データを用いて SKAT-O を実施することで、患者間で共有される変異遺伝子の蓄積がないか解析を行った。

【結果】AZF 領域内の CNV は患者 63 例で 13 種類確認され、そのうち NOA 発症の決定的要因となっている CNV は完全 AZFa/AZFb 欠失または b2/b4 欠失として 9 例 (7.8%) の患者に認められた。日本および中国の過去の研究と比較すると、本研究の患者群では AZF 領域内の CNV 頻度が高く、特に日本人患者では中国人患者と比較して gr/gr 欠失が高頻度 (36.5% 対 7.1%) であった。新たに報告された gr/gr 三重複、部分 AZFb 欠失、AZFa および AZFc 領域をまたぐ多重欠失も確認された。WES を用いた既知の原因遺伝子/感受性遺伝子/候補遺伝子の変異解析により、6 例において *DMRT1*、*PLK4*、*SYCP2*、*TEX11*、および *USP26* 遺伝子内の病原性変異が確認されたほか、他の遺伝子における複数の病的意義の不明な変異も確認された。その他の遺伝子について、両アレル性のホモ・ヘテロ接合性変異およびヘミ接合性変異に着目すると、73 のホモ接合性変異、204 の多重ヘテロ接合性変異、および 165 のヘミ接合性の有害変異が検出された。その中で造精機能に関連する遺伝子について着目すると、*TAF7L*、*DNAH2*、および *DNAH17* における変異が 3 例の患者に同定された。また、一部の患者では、複数の遺伝子に希少な有害変異を有している症例が認められた。SKAT-O では、患者群において希少な有害変異が有意に蓄積している遺伝子は検出されなかった。

【考察】本研究では、核型正常の孤発性 NOA 患者 115 例の遺伝学的基盤の解明を目的とした。第一段階で行った AZF 領域内の CNV 解析では、gr/gr 欠失が非ハプロタイプ D の日本人男性における NOA リスクを高める可能性が示唆された。また、AZF 領域内の有害な CNV が、孤発性 NOA 症例の少なくとも 8% に寄与していることが明らかとなった。MLPA の有用性も確認され、STS-PCR で見落とされていた CNV の検出が可能であった。ただし、その病的意義については不明であった。第二段階では、162 の NOA 原因遺伝子の変異解析を行い、特に *DMRT1* および *TEX11* の新規変異が NOA 発症における重要な役割を果たしていることが示された。さらに、WES 解析により精子形成に関与する複数の有害変異を同定し、両アレル性およびヘミ接合性変異の重要性が明らかになった。SKAT-O では、有意な遺伝子変異の蓄積が検出されず、孤立 NOA の病因为非常に多様であることが示唆された。これらの結果から、非コード領域や環境要因も NOA 発症に影響を及ぼす可能性が考えられる。本研究の限界として、被験者数が少ないことや日本人男性に限定された点、同定された変異の機能解析が *In silico* で行われていない点が挙げられるが、本研究結果は NOA の病因解明に重要な知見を提供するものである。

【結論】本研究により、孤発性非閉塞性無精子症の病因の多様性が明らかになった。AZF 領域の CNV は日本人患者の半数以上に認められ、そのうち NOA 発症に関わる有害変異が少なくとも約 8% を占めていた。*DMRT1*、*TEX11*、*USP26*、*DNAH2*、*DNAH17*、および他の 3 つの遺伝子における有害な変異が、NOA の原因の約 8% を占めていると考えられた。他の遺伝的変異の役割は限定的である。この疾患の分子基盤の全体像を解明するには、今後両親検体の解析、遺伝学的背景とあわせた患者臨床データの詳細な解析、同定された遺伝子変異の機能解析が必要となる。