

---



---

原 著

---



---

## マイクロアレイ発現解析及び SNP 相関解析による 無精子症感受性遺伝子の限定

岡 田 潤 幸

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
生殖器官制御学分野（産科婦人科学）  
（主任：田中憲一教授）

### Identification of Susceptibility Genes for Azoospermia using Microarray Gene Expression Analysis and SNP Association Study

Hiroyuki OKADA

*Department of Obstetrics and Gynecology,  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
(Director: Prof. Kenichi TANAKA)*

#### 要 旨

【目的】精巢生検（TESE）時に採取した精巢組織を用いたマイクロアレイ発現解析と，ゲノム DNA を用いた SNP 相関解析を組み合わせ，無精子症感受性遺伝子を限定する。

【方法】マイクロアレイ解析には非閉塞性無精子症（NOA）47 症例および閉塞性無精子症（OA）11 例の精巢組織から抽出した RNA を対象とし，Human Oligo 1A（V2）（約 2 万遺伝子，Agilent）を用い，reference として Human Testis Total RNA（BD Biosciences）と比較して遺伝子を限定し，NMF（非負値行列分解アルゴリズム）解析による NOA 症例のサブクラス分類を行なった後，各群間で有意な発現変化を認める疾患感受性遺伝子群を抽出した（Tukey test  $P < 0.01$ ）。

SNP 相関解析では各遺伝子上に約 10kb 間隔で SNP を設定，ABI7900（Applied Biosystem）による Taq-Man 法にてタイピングを行ない，各アレル頻度について患者—対照間での  $\chi^2$  検定を行なった。一次スクリーニングとして患者群（無精子症あるいは精子濃度  $1 \times 10^6/\text{ml}$  以下の重度乏精子症）190 例，正常対照群 190 例（有意水準  $P < 0.1$ ），二次スクリーニングとして患者群 380 例，正常対照群 380 例（有意水準  $P < 0.05$ ），三次スクリーニングとして患者群 475 例，正常対照群 475 例によるハプロタイプ，ディプロタイプ解析を行なった。

Reprint requests to: Hiroyuki OKADA  
Department of Obstetrics and Gynecology  
Niigata University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
1 - 757 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757  
新潟大学大学院医歯学総合研究科産科婦人科学教室  
岡田潤幸

【成績】マイクロアレイ解析の結果、NOA 47症例が3つのサブクラスに分類され、各サブクラス間で有意な発現変化を示す53個の疾患感受性遺伝子を抽出した。SNP相関解析による一次スクリーニングにより8遺伝子、さらに二次スクリーニングによりART3とLOC92196の2遺伝子が限定された(ART3  $p = 0.00061$ ; LOC92196  $p = 0.016$ )。このうちART3遺伝子を対象とした三次スクリーニングの結果、 $P = 0.00017$ と有意差を示すハプロタイプが同定された(case 24.2% vs. control 31.6%,  $\chi^2 = 14.5$ )。さらにディプロタイプ解析では有意ハプロタイプをホモ接合体で持つ無精子症症例において有意に血清テストステロン値が高値を示した( $P = 0.026$ )。

【結論】マイクロアレイ発現解析およびSNP相関解析にてART3が有力な無精子症感受性遺伝子と考えられた。またART3上の有意差を認めるハプロタイプは疾患抵抗性を示し血清テストステロン値と関連する事が示された。

キーワード：男性不妊, 無精子症, マイクロアレイ, SNP相関解析

## 緒言

近年の生殖補助医療のめざましい発展にもかかわらず、不妊原因の約50%<sup>1)</sup>を占めると言われる男性不妊に関連する造精機能障害の原因解明は進んでいないのが現状である。現在の臨床診断では大多数が原因不明の特発性造精機能障害と定義され、精巣生検による顕微授精(ICSI)<sup>2)</sup>の対象となっている。これら原因不明とされる造精機能障害の原因として約10%の患者ではY染色体AZF領域の微小欠損<sup>3)</sup>が認められ、DAZ遺伝子<sup>4)</sup>などの関与が報告されているが、詳細な原因解明には至っておらず、他の領域を含めた全遺伝子領域を網羅した解析が必要と考えられている。

近年マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析は病態の分類、感受性遺伝子の限定、バイオマーカーの検出に有効<sup>5)</sup>とされ、各種疾患を対象に解析が行なわれている<sup>6)</sup>。男性不妊においても精巣組織<sup>7)</sup>あるいは射出精子<sup>8)9)</sup>を用いたマイクロアレイ解析の報告が散見されるが、疾患感受性遺伝子の同定までは至っていない。一方ゲノムDNAを対象とした相関解析として近年SNPを用いた患者対照相関解析が多数報告され、喘息<sup>10)</sup>や高血圧<sup>11)</sup>などのcommon diseaseで成果が報告されている。

今回我々は、精巣組織を用いたマイクロアレイによる発現解析とゲノムDNAを用いたSNP相関解析を組み合わせる疾患感受性遺伝子の限定を

試みた。

## 対象と方法

### 対象

マイクロアレイ・非閉塞性無精子症(NOA)47症例、閉塞性無精子症例(OA)11症例に対して施行された精巣生検(TESE)により得られた精巣組織の一部からRNAを抽出した。

SNP相関解析・無精子症あるいは精子濃度 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の重度乏精子症と診断された患者群475症例について唾液あるいは血液を採取し、ゲノムDNAの抽出を行なった。正常対照群として男性不妊の既往が無く妊孕能のある男性ボランティア合計475症例について唾液を採取し、ゲノムDNAを抽出した。なお本研究は新潟大学ならびに各共同研究施設における倫理委員会にて承認を受けており、検体採取の際は全例インフォームドコンセントの後、文書による同意を得ている。

### 方法

マイクロアレイ解析では、Human Oligo 1A (V2) (約2万遺伝子, Agilent Technologies)を用い、testis referenceとしてHuman Testis Total RNA (BD Biosciences)を利用した。得られた発現データはGeneSpring GX 7.3 (Agilent Technologies)を用いて統計解析を行なった。OA群とtestis ref-

erence で発現差を認めず (2 倍以上), かつ NOA 群と testis reference で 2 倍以上の発現差を認めた遺伝子群について t 検定を行ない  $P$  値  $< 0.05$  を有意水準として遺伝子を抽出した. 抽出された遺伝子発現データを用いて NOA 47 症例の NMF (non-negative matrix factorization: 非負値行列分解アルゴリズム) 解析<sup>12)</sup> を用いたサブクラス分類を行なった. 次に NOA サブクラス間で Tukey test を行い  $P < 0.01$  で有意な発現変化を認める遺伝子群を疾患感受性遺伝子として抽出した. また NOA サブクラス間の臨床データ (年齢, 血清 LH, FSH, PRL, テストステロン, 精巣容量, Johnsen's score) について Kruskal-Wallis test および Post hoc test にて統計解析を行なった.

SNP 相関解析では, マイクロアレイの結果抽出された各疾患感受性遺伝子上に minor allele frequency が 10% 以上の SNP を約 10 kb 間隔に設定し, ABI7900 (Applied Biosystem) を用いて Taq-Man 法にて SNP タイピングを行ない各アレル頻度について患者対照間で  $\chi^2$  検定を行なった. dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>) あるいは JSNP (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/search.html>) などのデータベースで検索し, それぞれの候補遺伝子について minor allele frequency (MAF) が 10% 以上の SNP をタイピングした. MAF が 10% 以上の SNP がデータベース上存在しない遺伝子は解析対象外とした.

まず一次スクリーニングとして患者群 190 例, 正常対照群 190 例を用い有意水準を  $P < 0.1$  として遺伝子の限定を行なった. 一次スクリーニングで有意差を認めた遺伝子については, 二次スクリーニングとして患者群 380 例, 正常対照群 380 例を用い有意水準を  $P < 0.05$  としてさらに限定を行なった. 二次スクリーニングで有意差を認めた遺伝子に関しては三次スクリーニングとして患者群 475 例, 正常対照群 475 例を対象に高密度 SNP を用いたハプロタイプ解析を行なった. SNP 単点解析により得られた  $P$  値には FDR (false discovery rate) 補正を行なった. また linkage disequilibrium (LD) (連鎖不平衡) 解析, ハプロタイプ

およびディプロタイプの推定には SNPalyze (Dynacom) を用いた. ハプロタイプ頻度について患者対照間相関解析を行ない疾患感受性ハプロタイプの同定を試みた. またディプロタイプ解析はホモ接合体, ヘテロ接合体, ヌル型の 3 群に分類し臨床データとの関連を Kruskal-Wallis test および Post-hoc test にて統計解析した.

## 結 果

### マイクロアレイ遺伝子発現データの解析

OA と testis reference 間で発現差を認めず, かつ NOA と testis reference 間において 2 倍以上の発現差を認めた遺伝子は 2611 遺伝子であった (NOA  $>$  OA 902 遺伝子/NOA  $<$  OA 1709 遺伝子). この 2611 遺伝子の発現結果を用いた NMF 解析では, NOA 47 症例は 3 つのサブクラスに分類された {共表形相関係数 (coph) = 0.993}. さらに 3 つのサブクラス間で Tukey-test を行なった結果, 53 遺伝子が有意な発現変化を示していた ( $p < 0.01$ ). Real-time PCR<sup>13)</sup> では 53 遺伝子全てで発現の有意差が確認された (図 1-1, 1-2).

### サブクラス間の臨床背景

NMF 解析によって得られた NOA の 3 つのサブクラスを, 図 1-2 に示す通りサブクラス 1, 2, 3 とし, 各サブクラスおよび閉塞性無精子症を加えた 4 群間で Kruskal-Wallis test による臨床データの比較を行った結果, 血清 LH ( $P = 0.0051$ ), FSH ( $P = 0.0010$ ), PRL ( $P = 0.050$ ), 精巣容量 ( $P = 0.011$ ), Johnsen's score<sup>14)</sup> ( $P < 0.0001$ ) で有意差を認めた. また各群間での分散分析 (Post hoc test) では, Johnsen's score は 4 群間全ての組み合わせで有意差が確認された (表 1).

### SNP 相関解析

NOA の 3 つのサブクラス間で有意な発現差を認めた 53 遺伝子を対象とした一次スクリーニングの結果, ART3, LOC92196, NYDSP-20, PAGE5, TEX14, TKTL1, VCX2, XAGE5 の 8 遺伝子において有意差を示す SNP が存在した (表 2).

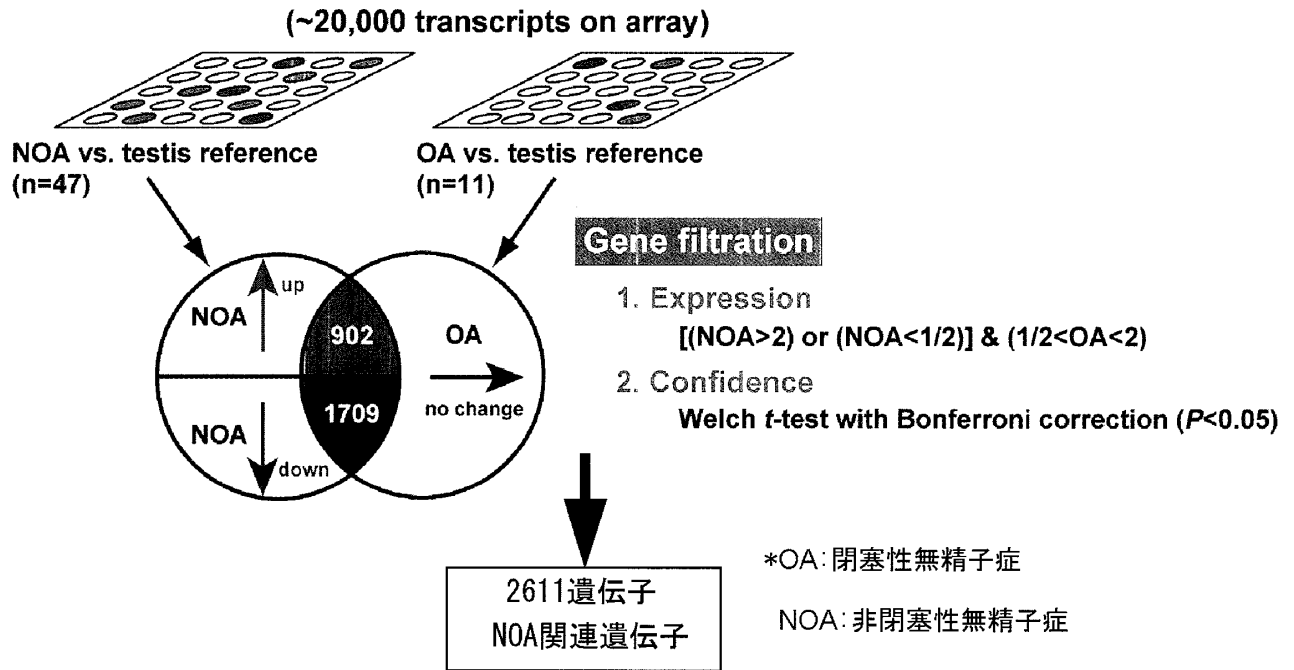


図1-1 マイクロアレイによる遺伝子抽出

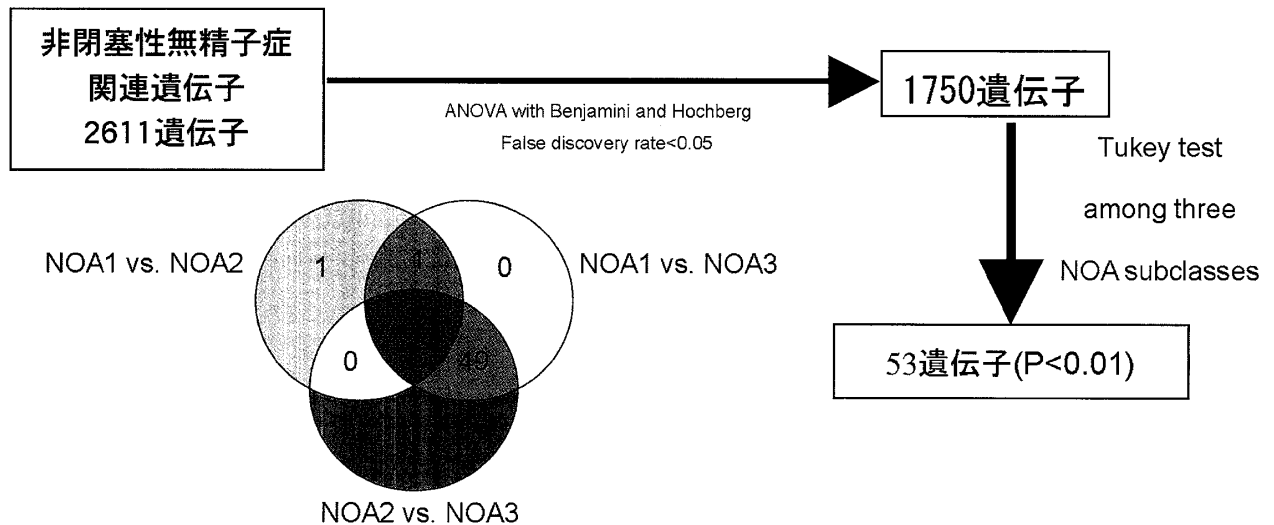
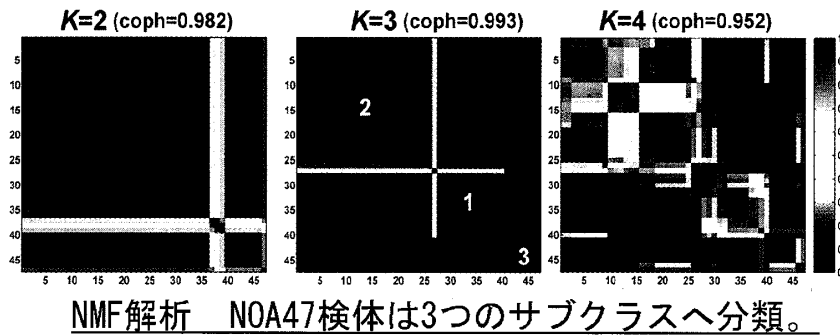


図1-2 NMF解析に基づくNOAサブクラス分類と候補遺伝子の抽出

表 1 OA (閉塞性無精子症) と NOA (非閉塞性無精子症) の 3 つのサブクラス間の臨床背景

	OA	サブクラス 1	NOA サブクラス 2	サブクラス 3	P-VALUE**
N	11	13	27	7	
年齢	33.3(25-57)	37.5(27-52)	34.4(24-47)	33.0(26-40)	$9.4 \times 10^{-2}$
血清 LH(mIU/ml)	4.5(1.3-9.0)	13.6(5.2-20.8)*#1	7.2(4.0-13.0)	5.9(5.3-7.0)	$5.1 \times 10^{-3}$
血清 FSH(mIU/ml)	10.1(3.6-31)	34.5(19.0-53.3)*#2	28.3(19.0-39.3)*#3	22.7(12.6-28.6)	$1.0 \times 10^{-3}$
血清 T(ng/ml)	6.0(5.1-7.0)	2.8(1.4-4.7)	4.1(2.4-5.8)	4.7(2.0-7.3)	$1.2 \times 10^{-1}$
血清 PRL(ng/ml)	5.5(3.6-8.3)	7.7(4.3-9.8)	9.3(5.2-13.5)	14.4(13.3-15.4)*#4	$5.0 \times 10^{-2}$
精巣容量(cm)	14.8(8.7-20)	5.6(3.9-8.5)*#5	7.4(6.6-8.5)*#6	6.5	$1.1 \times 10^{-2}$
Johnsen's score	7.9(5.1-9.0)	1.9(1.0-4.0)*#7	2.2(1.0-6.0)*#8	4.0(2.0-6.5)*#9	$<1.0 \times 10^{-4}$

\*Post-hoc test \*\*Kruskal-Wallis test

#1 P&lt;0.05 (NOA1vsOA/NOA1vsNOA2/NOA1vsNOA3) #2 P&lt;0.05 (NOA1vsOA) #3 P&lt;0.05 (NOA2vsOA) #4 P&lt;0.05 (NOA3vsOA)

#5 P&lt;0.05 (NOA1vsOA) #6 P&lt;0.05 (NOA2vsOA) #7 P&lt;0.05 (NOA1vsOA/NOA1vsNOA3) #8 P&lt;0.05 (NOA2vsOA/NOA2vsNOA3)

#9 P&lt;0.05 (NOA3vsOA)

さらに 8 遺伝子を対象とした二次スクリーニングの結果, ART3 および LOC921966 の 2 遺伝子において SNP と疾患との間に有意な相関が確認された. ART3 遺伝子は解析した 6 SNP 中 5 SNP で有意差を認め, intron11 に存在する rs6836703 の SNP において  $P = 0.00061$  と最も強い有意差を認めた (case 41.4%, control 32.8%,  $\chi^2 = 11.7$ ). 一方 LOC92196 遺伝子は exon3 のアミノ酸置換を伴う rs9869 の SNP で  $P = 0.016$  と有意差を認めたものの, その他の解析 SNP では有意差は認めなかった.

以上より ART3 遺伝子を有力候補遺伝子として以下の三次スクリーニングおよびハプロタイプ解析を行なった (表 3).

#### ART3 遺伝子ハプロタイプ解析

ART3 遺伝子を対象に 18 SNP を用いた三次ス

クリーニングを行なった結果, SNP 単点解析では 18 SNP の全てで  $P < 0.05$  の有意差を認め, intron9 に存在する SNP (rs7436462) において  $P = 0.00052$ , FDR (false discovery rate) 補正值 = 0.0094 と強い有意差を認めた (case 39.6% vs. control 31.8%,  $\chi^2 = 12.1$ ) (表 4).

上記の 18 SNP を用いてハプロタイプの推定を行ない, 頻度の高い上位 10 ハプロタイプについて患者対照相関解析を行なった結果, 最も頻度の高いハプロタイプである Hap1 (CAGTCGTTGGCAGCTGA) において  $P = 0.00017$  と強い有意差を認めた (ハプロタイプ頻度 case 24.2%, vs. control 31.6%,  $\chi^2 = 14.5$ ) (図 2, 3).

#### ART3 遺伝子のディプロタイプ解析

上記の Hap1 に関して, ディプロタイプが推定可能であった無精子症 127 症例をホモ接合体, へ

表2 一次スクリーニングで有意差のある SNP を持った 8 遺伝子 (患者群 190 例 vs. 正常対照群 190 例)

Gene	rs ID	Sequence interval		Localization	Variation	Minor allele frequency		$\chi^2$	p-value*
		position	average			case	control		
<b>ART3</b>	rs9995300	-2520	<u>9169</u>	5'-upstream	A/G	41.3%	36.7%	1.68	0.19
	rs17001357	12048		intron3	C/T	40.5%	42.8%	0.31	0.58
	rs11097230	19801		Intron3	A/G	34.0%	36.8%	0.52	0.47
	rs6836703	34283		intron11	G/A	42.9%	36.6%	3.15	<b>0.076</b>
	rs1128864	37726		exon12-non-synonymous	T/C	39.5%	36.1%	0.92	0.34
	rs6840007	43329		3'-downstream	A/T	34.7%	31.9%	0.69	0.41
<b>LOC92196</b>	rs4254463	-5901	<u>8834</u>	5'-upstream	G/A	19.5%	15.0%	2.37	0.12
	rs908404	2538		intron1	T/C	19.3%	14.4%	2.86	<b>0.090</b>
	rs9869	11757		exon3-non-synonymous	C/T	18.4%	13.5%	3.00	<b>0.083</b>
	rs10016	20600		3'UTR	G/A	10.8%	8.9%	0.54	0.46
<b>NYD-SP20</b>	rs3829957	-3785	<u>11108</u>	5'-upstream	C/T	42.1%	36.2%	2.49	0.11
	rs2318035	12022		intron5	A/G	42.9%	36.1%	3.24	<b>0.072</b>
	rs1488689	22797		exon6-non-synonymous	A/G	41.6%	35.3%	2.90	<b>0.089</b>
	rs17822627	31572		exon9-synonymous	T/C	41.3%	34.7%	3.24	<b>0.072</b>
	rs2318033	40646		3'-downstream	A/T	42.9%	36.8%	2.64	0.10
<b>PAGE5</b>	rs2148982	2260	<u>4055</u>	intron3	C/T	30.1%	24.5%	0.68	0.41
	rs5913800	5332		3'-downstream	A/G	29.5%	22.3%	1.28	0.26
	rs5914276	8924		3'-downstream	C/G	29.9%	23.7%	1.43	0.23
	rs11091394	14424		3'-downstream	A/G	31.7%	21.3%	3.44	<b>0.064</b>
<b>TEX14</b>	rs686425	-7314	<u>11394</u>	5'-upstream	G/A	47.0%	46.0%	0.03	0.86
	rs302874	1420		intron1	C/T	47.2%	46.2%	0.03	0.86
	rs302865	12439		intron1	C/T	45.0%	44.4%	0.01	0.93
	rs446613	19870		intron1	A/C	47.4%	50.3%	0.45	0.50
	rs1631237	34721		intron1	C/T	46.3%	47.3%	0.04	0.84

表2 続き

Gene	rs ID	Sequence interval		Localization	Variation	Minor allele frequency			
		position	average			case	control	$\chi^2$	p-value*
(TEX14)	rs302843	41430		intron2	A/G	44.8%	50.5%	1.39	0.24
	rs2611782	51460		intron2	C/T	46.3%	47.8%	0.10	0.75
	rs591200	63515		intron2	C/T	40.2%	43.0%	0.33	0.57
	rs9898626	71197		intron5	C/G	47.1%	44.4%	0.38	0.54
	rs302854	85804		intron10	T/C	46.3%	47.3%	0.05	0.83
	rs8072873	100367		intron15	G/C	24.7%	27.9%	0.76	0.38
	rs6503870	110398		exon20-non-synonymous	T/C	46.6%	47.0%	0.00	0.96
	rs1267542	114726		intron22	T/C	45.7%	52.4%	1.57	0.12
	rs3803751	119060		intron24	T/C	24.6%	28.4%	1.18	0.28
	rs1267545	122507		intron26	A/G	45.6%	49.2%	0.57	0.45
	rs1974586	128685		intron29	C/T	24.6%	30.7%	3.14	<b>0.077</b>
	rs2333332	138362		3'-downstream	C/T	48.6%	49.7%	0.04	0.84
	rs714959	140815		3'-downstream	T/C	21.6%	18.3%	1.05	0.30
	rs12453459	145125		3'-downstream	T/C	47.7%	41.2%	2.72	<b>0.099</b>
TKTL1	rs631	-8147	<u>9582</u>	5'-upstream	G/A	23.1%	19.0%	0.70	0.40
	rs6655282	12986		intron6	G/A	11.2%	4.9%	4.13	<b>0.042</b>
	rs766420	20834		intron9	C/G	22.5%	20.0%	0.21	0.65
	rs2872817	24848		3'UTR	A/G	26.7%	23.2%	0.43	0.51
	rs5945413	30181		3'-downstream	A/T	26.2%	23.1%	0.33	0.57
VCX2	rs12395480	-2816	<u>4044</u>	5'-upstream	C/T	16.4%	20.0%	0.59	0.44
	rs1058239	1228		exon3-non-synonymous	G/C	6.4%	1.7%	4.18	<b>0.041</b>
XAGE5	rs4543711	5279		Intron4	A/G	5.3%	11.0%	3.37	<b>0.066</b>

表3 二次スクリーニングで有意差のある SNP を持った 2 遺伝子 (患者群 380 例 vs. 正常対照群 380 例)

Gene	rs ID	Sequence interval		Localization	Variation	Minor allele frequency			p-value*
		position	average			case	control	$\chi^2$	
ART3	rs9995300	-2520	<u>9169</u>	5'-upstream	A/G	40.7%	34.6%	5.60	<b>0.018</b>
	rs17001357	12048		intron3	C/T	41.5%	46.4%	3.50	0.061
	rs11097230	19801		Intron3	A/G	32.9%	40.1%	7.79	<b>0.0053</b>
	rs6836703	34283		intron11	G/A	41.4%	32.8%	11.7	<b>0.00061</b>
	rs1128864	37726		exon12-non-synonymous	T/C	39.3%	33.2%	5.53	<b>0.019</b>
	rs6840007	43329		3'-downstream	A/T	34.5%	28.4%	6.16	<b>0.013</b>
LOC92196	rs4254463	-5901	<u>8833</u>	5'-upstream	G/A	18.1%	16.7%	0.46	0.50
	rs908404	2538		intron1	T/C	17.9%	16.1%	0.69	0.41
	rs9869	11757		exon3-non-synonymous	C/T	19.7%	14.8%	5.85	<b>0.016</b>
	rs10016	20600		3'UTR	G/A	9.8%	10.0%	0.00	0.99

テロ接合体, ヌル型で持つ 3 群に分類し, 各臨床データとの関連を Kruskal-Wallis test あるいは Post-hoc test で検討した結果, ホモ接合体の患者ではヘテロ接合体, ヌル型と比較して有意に血清テストステロン値が高かった (Post-hoc ホモ接合体 vs.ヘテロ接合体;  $p = 0.0041$ , ホモ接合体 vs.ヌル型;  $p = 0.026$ ) (図 4).

## 考 察

マイクロアレイの遺伝子発現データを用いた NMF 分類は, 本邦でも肺小細胞がんのサブクラス分類に NMF 解析を用いて予後と有意な相関を認めた報告<sup>12)</sup>があり, 病態の分類に有用な解析方法と考えられる. 本研究でも NMF 解析によるサブクラス分類が精細管における造精機能の指標となる johnsen's score と強く相関する事が示され, 網羅的な遺伝子発現解析が男性不妊の病理学的な重症度を反映する事が確認された.

ART ファミリー遺伝子はヒストン等の標的蛋白のアルギニン残基に対してモノ ADP リボシル化をもたらすことにより標的蛋白の失活化を起こす事が知られる<sup>15)16)</sup>. ART ファミリー遺伝子と男性不妊との直接的な関連を示す報告は認められないが, ラットモデルにおいてはモノ ADP リボース合成系がゴナドトロピン-テストステロン系に制御されるという報告がある<sup>17)</sup>. しかし, ART3 はその相同性から ART ファミリーに属するが, 実際 ADP リボシル化活性が無い事が報告され<sup>15)16)18)</sup> その機能は依然未知の部分が多い. ART3 遺伝子上に設定した全 18SNP を用いた LD (連鎖不均衡) 解析の結果, 18 SNP は同一ブロック内に存在し, 強い連鎖不均衡の関係にあることが予想された. またハプロタイプ解析により Hap1 は患者群で 24.2%, 正常対照群で 31.6% と, 患者群で頻度が低いことより, 疾患抵抗性に作用する protective haplotype であると考えられる.

血清テストステロン値は男性不妊症例において,



表 4 ART3 遺伝子上の解析した全 18 SNP (患者群 475 例 vs. 正常対照群 475 例)

No.	rs ID	Sequence		Variation	Minor allele		$\chi^2$	p-value	FDR correction
		position	Localization		frequencies(Case)	frequencies(Control)			
1	rs13111494	-10376	5'upstream	T/C	37.0%	42.5%	5.44	0.015	<b>0.025</b>
2	rs9995300	-2520	5'upstream	A/G	40.6%	35.9%	4.32	0.038	<b>0.040</b>
3	rs4859609	3333	intron2	A/G	38.3%	43.2%	4.60	0.032	<b>0.036</b>
4	rs7666159	3941	intron2	T/C	54.2%	48.7%	5.59	0.018	<b>0.025</b>
5	rs4859611	5562	intron2	T/C	44.1%	48.9%	4.31	0.038	<b>0.038</b>
6	C_25986791_10	7070	intron2	G/A	36.0%	30.7%	5.94	0.015	<b>0.023</b>
7	rs17001357	12048	intron3	C/T	40.9%	45.8%	4.76	0.029	<b>0.037</b>
8	rs17001364	13478	intron3	T/C	37.6%	31.3%	7.97	0.0048	<b>0.022</b>
9	rs7675618	15549	intron3	G/A	36.3%	30.5%	6.97	0.0083	<b>0.017</b>
10	rs11097230	19801	intron3	A/G	32.9%	39.2%	7.42	0.0065	<b>0.020</b>
11	rs12331871	27635	intron8	T/G	38.4%	43.4%	4.72	0.030	<b>0.036</b>
12	rs17001390	28316	intron8	C/T	36.0%	30.2%	7.16	0.0075	<b>0.017</b>
13	rs7436462	32278	intron9	A/G	39.6%	31.8%	12.1	0.00052	<b>0.0094</b>
14	rs6836703	34283	intron10	G/A	41.5%	34.3%	10.1	0.0015	<b>0.014</b>
15	rs4241586	35506	intron10	T/C	38.7%	44.6%	6.66	0.0098	<b>0.018</b>
16	rs1128864	37726	exon11	T/C	39.9%	33.9%	7.19	0.0073	<b>0.019</b>
17	New	37857	exon11	G/A	34.9%	29.7%	5.77	0.0056	<b>0.020</b>
18	rs14773	37861	3'UTR	A/C	44.8%	37.9%	9.55	0.0020	<b>0.012</b>

造精機能障害を予測する有用な血清マーカーの一つであり、非閉塞性無精子症においては一般に血清テストステロン値が低下する傾向にある<sup>19)</sup>。前述の ART3 遺伝子上の protective haplotype がホモ接合体である場合、無精子症症例において血清テストステロン値が有意に高値を示すことは、

この protective haplotype が疾患感受性と関連していることを示唆するものと考えられる。今後の課題として ART3 遺伝子の機能に与える protective haplotype の影響と、ART3 遺伝子の造精機能およびテストステロン合成系への関与、ART3 に関連する遺伝子群の同定が必要である。

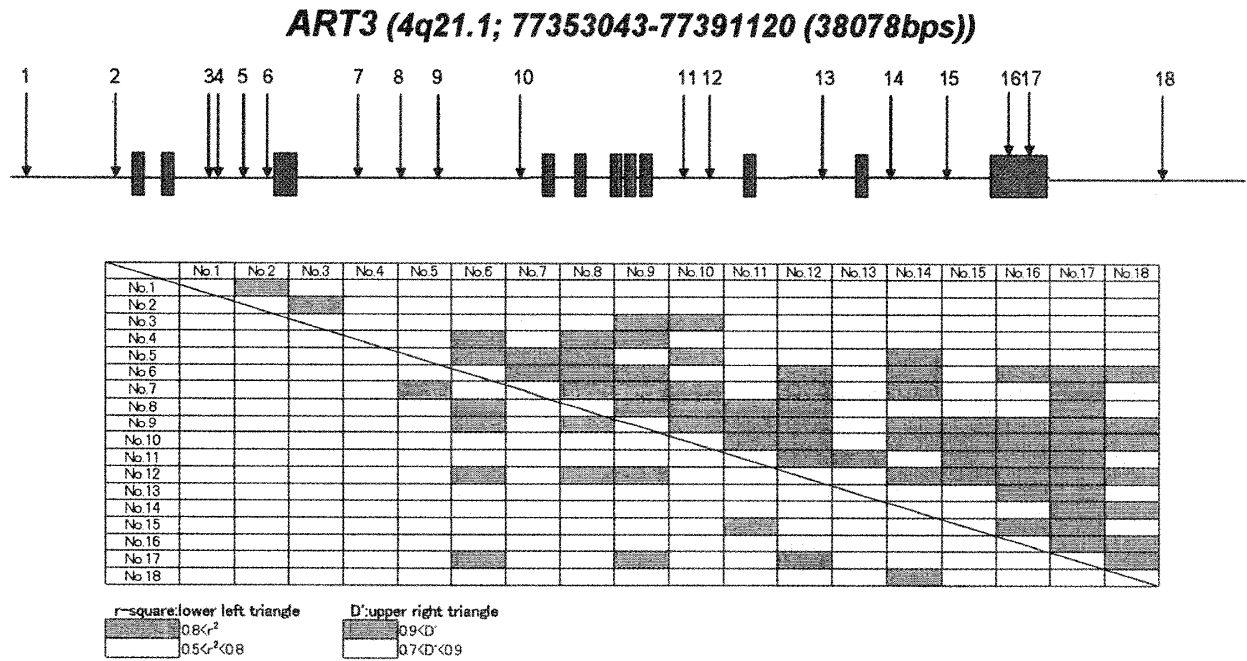


図2 ART3 上の 18 SNP の連鎖不均衡解析

No	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7	No.8	No.9	No.10	No.11	No.12	No.13	No.14	No.15	No.16	No.17	No.18	case freq.	cont.freq.	$\chi^2$	P-value
Hap1	C	A	G	T	C	G	T	T	G	G	G	C	A	G	C	T	G	A	24.2%	31.6%	14.5	$1.7 \times 10^{-5}$
Hap2	T	G	A	C	T	A	C	C	A	A	T	T	G	A	T	C	A	C	27.6%	26.1%	0.85	$3.6 \times 10^{-1}$
Hap3	T	A	A	C	T	G	C	T	G	A	T	C	A	G	T	T	G	A	12.3%	13.4%	0.14	$7.1 \times 10^{-1}$
Hap4	T	G	A	T	C	G	T	T	G	A	T	C	A	G	T	T	G	A	2.9%	3.0%	0.10	$7.6 \times 10^{-1}$
Hap5	C	A	G	T	T	G	C	T	G	A	C	C	A	A	C	T	G	C	3.2%	2.8%	0.16	$6.9 \times 10^{-1}$
Hap6	T	A	A	T	C	G	T	T	G	A	T	C	A	G	T	T	G	A	2.3%	2.2%	0.00	$9.8 \times 10^{-1}$
Hap7	C	A	G	C	C	G	T	T	G	C	C	C	A	G	C	T	G	A	2.4%	2.0%	0.12	$7.3 \times 10^{-1}$
Hap8	T	G	A	T	C	G	T	T	G	A	T	C	A	G	T	C	G	C	1.1%	1.4%	0.10	$7.5 \times 10^{-1}$
Hap9	T	A	A	T	C	G	C	T	G	A	T	C	C	G	T	C	G	C	2.0%	1.1%	1.60	$2.1 \times 10^{-1}$
Hap10	T	G	A	T	C	G	T	T	G	C	C	C	A	G	C	T	G	A	1.0%	1.1%	0.01	$9.2 \times 10^{-1}$

**Legend:**  
 Major-allele (white), Minor-allele (grey)

図3 ART3 上の 18 SNP によるハプロタイプ相関解析 (頻度上位 10 ハプロタイプ)

また本研究において、約 2 万遺伝子を対象とした網羅的なマイクロアレイ解析より限定した遺伝子群から、SNP による患者対照相関解析を行なう事で有力な疾患感受性遺伝子を抽出する事が可能であった。以上より本法は疾患感受性遺伝子の同定を目指す一つの戦略となりうる事が示唆さ

れた。

結 語

非閉塞性無精子症 47 症例ならびに閉塞性無精子症 11 症例を用いた網羅的マイクロアレイ解析

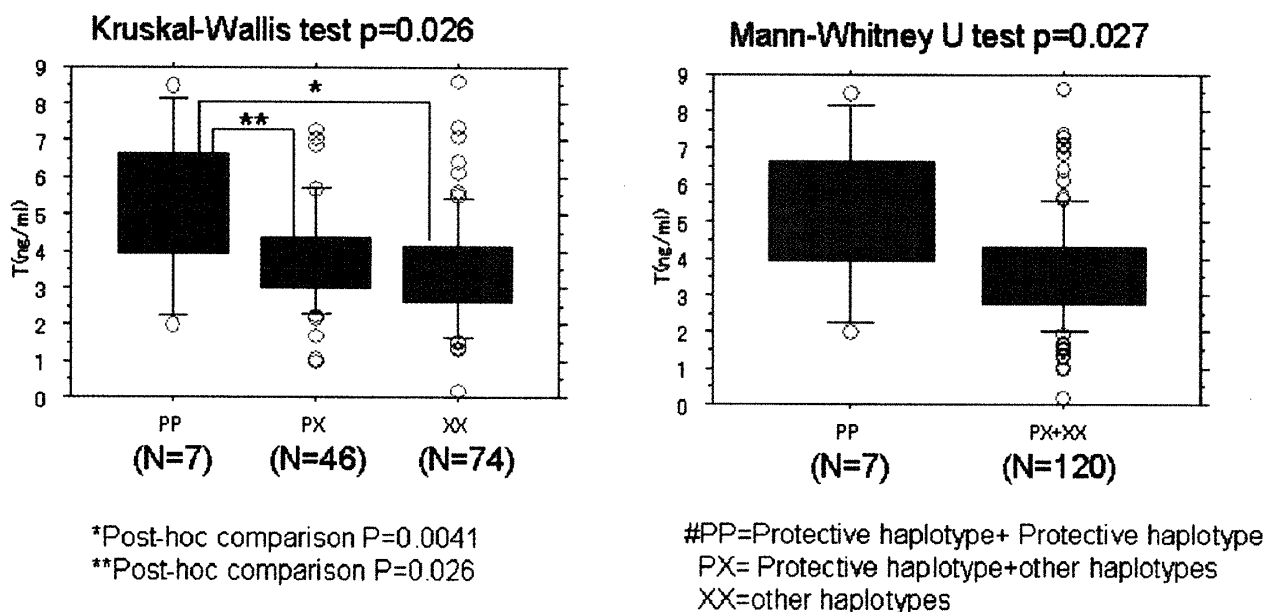


図4 無精子症症例における protective haplotype の diplotype 型と血清テストステロン値の相関

および、男性不妊症例 475 例，正常対照群 475 例のゲノム DNA を用いた SNP 相関解析を行う事により，疾患感受性遺伝子候補として ART3 遺伝子を抽出した。この ART3 遺伝子上に疾患に抵抗的に働くと予想される protective haplotype を見だし，無精子症患者群において protective haplotype をホモ接合体で持つ場合，血清テストステロン値が有意に高値を示す事より，ART3 遺伝子のテストステロン合成系への何らかの関与の可能性が示唆された。またマイクロアレイと SNP による患者対照相関解析を組み合わせる手法は，無精子症にとどまらず様々な疾患の原因遺伝子の同定に有用であると考えられた。

#### 謝 辞

この研究を行うにあたり御指導賜りました東海大学医学部基礎医学系分子生命科学分野・井ノ上逸朗教授，新潟大学大学院医歯学総合研究科生殖器官制御学分野・田中憲一教授，ならびに検体収集にご協力いただいたセントマザー医院・田中温先生，立川総合病院産婦人科・七里和良先生に心から御礼申し上げます。

#### 参 考 文 献

- 1) Feng HL: Molecular biology of male infertility. Arch Androl 49: 19 - 27, 2003.
- 2) Van Peperstraten A, Proctor ML, Johnson NP and Philipson G: Techniques for surgical retrieval of sperm prior to ICSI for azoospermia. Cochrane Database Syst Rev 19; 3 CD002807, 2006.
- 3) Ali S and Hasnain SE: Genomics of the human Y-chromosome. 1. Association with male infertility. Gene 321: 25 - 37, 2003.
- 4) Kuo PL, Wang ST, Lin YM, Lin YH, Teng Yen and Hsu CC: Expression profiles of the DAZ gene family in human testis with and without spermatogenic failure. Fertil Steril 81: 1034 - 1040, 2004.
- 5) Perou CM, Sϕrlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lϕnning PE, Bϕrresen-Dale AL, Brown PO and Botstein D: Molecular portraits of human breast tumours. Nature 406: 747 - 752, 2000.

- 6) Churchill GA: Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 32 Suppl: 490 - 495, 2002.
- 7) Fox MS, Ares VX, Turek PJ, Haqq C and Reijo Pera RA: Feasibility of global gene expression analysis in testicular biopsies from infertile men. *Mol Reprod Dev* 66: 403 - 421, 2003.
- 8) Wang H, Zhou Z, Xu M, Li J, Xiao J, Xu ZY and Sha J: A spermatogenesis-related gene expression profile in human spermatozoa and its potential clinical applications. *J Mol Med* 82: 317 - 324, 2004.
- 9) Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P and Krawetz SA: Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 360: 772 - 777, 2002.
- 10) Jinnai N, Sakagami T, Sekigawa T, Kakihara M, Nakajima T, Yoshida K, Goto S, Hasegawa T, Koshino T, Hasegawa Y, Inoue H, Suzuki N, Sano Y and Inoue I: Polymorphisms in the prostaglandin E2 receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin-intolerant asthma: a candidate gene approach. *Hum Mol Genet* 13: 3203 - 3217, 2004.
- 11) Nakajima T, Wooding S, Sakagami T, Emi M, Tokunaga K, Tamiya G, Ishigami T, Umemura S, Munkhbat B, Jin F, Guan-Jun J, Hayasaka I, Ishida T, Saitou N, Pavelka K, Lalouel JM, Jorde LB and Inoue I: Natural selection and population history in the human angiotensinogen gene (AGT): 736 complete AGT sequences in chromosomes from around the world. *Am J Hum Genet* 74: 898 - 916, 2004.
- 12) Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, Isagawa T, Jones MH, Virtanen C, Shimane M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Ishikawa S, Aburatani H, Nomura H and Ishikawa Y: Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. *Oncogene* 24: 7105 - 7133, 2005.
- 13) Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. *Method* 25: 402 - 408, 2001.
- 14) Johnsen SG: Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone* 1: 2 - 25, 1970.
- 15) Seman M, Adriouch S, Haag F and Koch-Nolte F: Ecto-ADP-ribosyltransferases (ARTs): emerging actors in cell communication and signaling. *Curr Med Chem* 11: 857 - 872, 2004.
- 16) Friedrich M, Grahnert A, Paasch U, Tannapfel A, Koch-Nolte F and Hauschildt S: Expression of toxin-related human mono-ADP-ribosyltransferase 3 in human testes. *Asian J Androl* 8: 281 - 287, 2006.
- 17) Kurokawa T, Fujimura Y, Takahashi K, Chono E and Ishibasi S: Reduction of mono (ADP-ribosyl)ation of histones in rat testis by gonadotropin-testosterone system. *Bio Research commun* 215: 808 - 813, 1995.
- 18) Gustavo G, Braren R, Firner K, Nissen M, Kuhl M, Reche P, Bazan F, Cetkovic-Cvrlje M, Leiter E, Haag F and Koch-Nolte F: The family of toxin-related ecto-ADP-ribosyltransferase in humans and mouse. *Protein Science* 11: 1657 - 1670, 2002.
- 19) Johnson L: Evaluation of the human testis and its age-related dysfunction. *Prog Clin Biol Res* 302: 35 - 60; discussion 61 - 67, 1989.

(平成19年1月15日受付)