

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	茅原 誠
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大博 (医) 第 1799 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
博士論文名	Association of NR3C1/Glucocorticoid Receptor gene SNP with azoospermia in Japanese men (日本人における NR3C1 (グルココルチコイド受容体) 遺伝子多型と無精子症との関連)
論文審査委員	主査 教授 小松 雅明 副査 教授 榎本 隆之 副査 教授 成田 一衛

博士論文の要旨

【背景と目的】

非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia: NOA) の分子生物学的特徴については未だに明らかになっていない点が多い。今回申請者は、遺伝子発現プロファイルを用いたネットワーク解析と SNP ジェノタイピングを組み合わせることで、日本人男性における NOA の疾患感受性遺伝子を同定する事を目的とした。

【対象・方法】

Case 群 (NOA) は精液検査・ホルモン検査・既往歴・診察所見にて NOA と診断した 335 症例、Control 群は生殖補助医療技術を実施しないで挙児を得たことのある健常男性 410 例とした。

今回我々は、先行研究で同定された 2,611 個の NOA 関連遺伝子発現データを Ingenuity Pathway Analysis (IPA) にインポートし、ネットワーク解析を施行し、2つのネットワークを同定した。ネットワークの中心に位置する機能的に重要であると推察される「key gene」を interaction 数>5 の遺伝子と定義し、ネットワークの「key gene」として同定された3つの遺伝子 (NR3C1, YBX2, BCL2) を候補遺伝子として一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 解析を行った。

3つの遺伝子について JSNP (http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html) を利用して TagSNP を検索し、各遺伝子につき、3個ずつ SNP を選択した (NR3C1, rs852977・rs258813・rs6196; YBX2, rs1634382・rs3744405・rs22284; BCL2, rs3744948・rs3810027・rs1564483)。National Center for Biotechnology Information SNP database Biotechnology Information SNP database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) に登録されている日本人の一塩基多型情報を利用し、申請者は、各 SNP の minor allele frequencies が 0.05 以上であることを確認した。これら 9 個の SNP について、Case 群と Control 群との間で関連解析を行い、Genotype 頻度、Allele 頻度について検討した。

SNP 解析は ABI7900HT (Applied Biosystems) を用いて TaqMan 法にてタイピングを行い、Genotype 頻度・Allele 頻度について Case 群-Control 群間で比較検討を行った。比較検討は、 χ^2 乗検定で評価した。

NOA と有意な関連のある SNP の Genotype と精巣でのタンパク質発現との関連性について免疫組

織染色 (ABC 法) で評価した。また免疫組織染色で利用した抗体を用いて Western blotting 法によりタンパク質発現の検証を行った。

【結果】

2,611 個の NOA 関連遺伝子発現データを用いたネットワーク解析により、NOA と関連性を示す 2 つのネットワークを同定した。Network 1 (Endocrine system development and function, lipid metabolism, small molecule biochemistry : score 38) では、*NR3C1* が、Network 2 (Cellular development, reproductive system development and function, cellular function and maintenance : score 36) では、*YBX2*、*BCL2* がネットワークの「key gene」として同定され、この 3 つの遺伝子について SNP 解析を行った。本研究で観察された一塩基多型の頻度は Case 群・Control 群ともに Hardy-Weinberg 平衡にあることを確認した。9 個の SNPs のうち、*NR3C1* 遺伝子の一塩基多型 rs852977 の G allele は、Control 群に比し Case 群で有意に高い頻度であった (オッズ比 3.20; 95% 信頼区間 2.40-4.26; 多重補正後 $P = 5.7e-15$)。その他 8 つの SNPs の Allele 頻度は Case 群と Control 群との間で有意差を認めなかった。

Western blotting (anti-*NR3C1* antibody: ab3578, Abcam) により、NOA で *NR3C1* の発現がある事を確認した。さらに免疫染色による *NR3C1* 遺伝子のタンパク発現は OA (n=8) に比し NOA (n=20) で有意に上昇している事を確認した。しかし、NOA における *NR3C1* のタンパク発現は、rs852977 の Genotype AA (n=10) と Genotype AG (n=4) との間で有意差を認めなかった ($P=0.22$)。

【考察】

グルココルチコイド受容体は免疫や代謝等の調整に重要な役割を果たしている。グルココルチコイドの暴露は精巣内の germ cell のアポトーシスを誘導するとの報告がある一方、グルココルチコイド欠乏は精巣機能に抑制的に働くとの報告もある。例えば、グルココルチコイドに関連する Glucocorticoid-induced leucine zipper gene (*GILZ*) は精子形成に対して重要な遺伝子である事がわかっており、ノックアウトマウスにおいて無精子症となる事が指摘されている。*NR3C1* rs852977 の G allele は精巣内におけるグルココルチコイド作用に影響を与え、造精機能を低下させている可能性がある。

【結論】

NR3C1 遺伝子多型 rs852977 は、日本人男性における非閉塞性無精子症の潜在的なマーカーとなる可能性がある。*NR3C1* risk allele (rs852977 G allele) を合併している症例においては、グルココルチコイド活性の調整が NOA 発症を予防できる可能性があり、今後さらなる研究が必要になる。

審査結果の要旨

本研究では、非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia: NOA) の遺伝子発現ネットワーク解析と SNP ジェノタイピングを組み合わせることにより、日本人男性における NOA の疾患感受性遺伝子を同定することを目的とした。

Ingenuity Pathway Analysis による NOA 遺伝子発現ネットワーク解析により 3 つの遺伝子 (*NR3C1*、*YBX2*、*BCL2*) を候補遺伝子として同定し、それらの一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 解析を行った。その結果、*NR3C1* 遺伝子の一塩基多型 rs852977 の G allele が、Control 群に比し NOA 群で有意に高い頻度であった。また、Western blotting により NOA で *NR3C1* 遺伝子産物 (グルココルチコイド受容体) の発現があること、免疫染色によりグルココルチコイド受容体の発現が閉塞性無精子症群に比し NOA 群で有意に上昇していることを確認した。

本研究から、*NR3C1* 遺伝子多型 rs852977 が日本人男性における NOA の潜在的なマーカーとなる

可能性があること、*NR3C1* risk allele (rs852977 G allele) を合併している症例においてはグルココルチコイド活性の調整が NOA 発症を予防できる可能性があることが示唆された。

上述の新規性を鑑みて、学位論文としての価値を有すると判断した。