

男性不妊の無精子症因子領域トランスジェニックマウスモデル解析

大阪医科大学 泌尿生殖・発達医学講座

小村 和正

1. 諸言

近年の統計では、既婚カップルの約 10%は不妊症と診断され、その半数は男性側の因子に起因しているとされている。さらに、男性不妊症の半数以上は突発性であることが知られており、組織学的に精子形成障害をみとめている。精子形成に関与するゲノム領域は Y 染色体長腕上に存在し、特に無精子症因子 (Azoospermia Factor : AZF) 領域に集中している。われわれは以前よりがん領域研究にてこの領域の欠失がエピジェネティクスに与える影響を研究してきた¹⁾。

現在、Y 染色体を含め全ゲノム塩基配列が明らかとなっているため、塩基配列構造解析より AZF は 3 領域に分類することができる。特に **Amplificomic** 領域は巨大な同一延期配列向き合うような対の回文構造 (パリンドローム) であり、頻回に遺伝子の組み換えが起こっていることが予測されている。本研究では、Y 染色体にて精子形成期に発現しているヒストン脱メチル化酵素である KDM5D が AZF 領域に存在することより、世界で初めて作製を目指している Y 染色体上遺伝子 KDM5D-flox マウスを用いて、その欠失が精子形成に与える影響を明らかにする。

2. 方法

Y 染色体上の AZF と呼ばれる領域は構造的に不安定であり、しばしば欠失や重複などの形の変化が生じることが知られている。これまで主に STS-PCR 法により用いて AZF 領域の変化を解析してきた。その結果、一般男性の約 20%において AZF の欠失が存在しており、無精子症や乏精子症による男性不妊症患者さんで明らかに高いことを確認している。

このことから AZF 領域の欠失は男性不妊症の重要なリスク因子のひとつであることが考えられるが、われわれは、この AZF 領域において精子形成時にアクティブに転写翻訳を受けているヒストン脱メチル化酵素 KDM5D が存在しており、図 1 に示すように、この因子の欠失によりヒストンメチレーションパターン変遷によるトランスクリプトームへの影響が精子形成に大きく影響しているという仮説を証明する実験系の構築を行った。

精子形成能に AZF 因子 KDM5D Deletion が Transcriptome 変遷に与える影響の解析

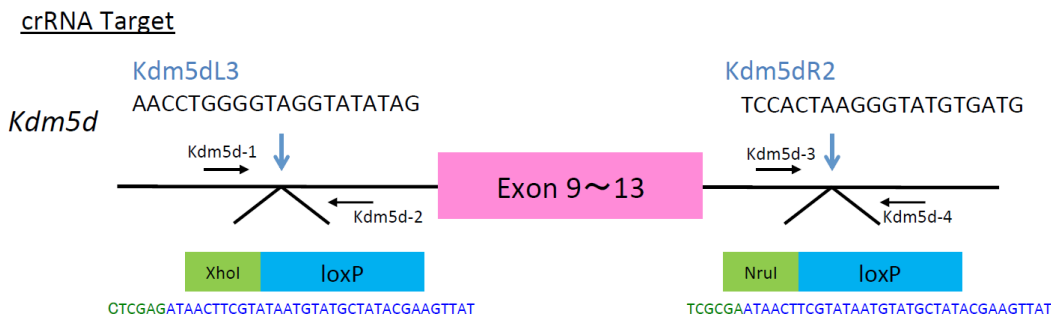


図 1: Y 染色体上の無精子症因子 (Azoospermia Factor: AZF) 領域に encode される lysine demethylase 5D (KDM5D)の欠失が、精子形成能へ与える影響の模式図

3.結果

上記の仮説を証明するために、我々は CRISPR-Cas9 システムにより Step by Step 法にて、世界で初めて Y 染色体上の遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスモデルの作製にとりかかった。KDM5D はリシン特異的ヒストン脱メチル化酵素であり、いくつかの重要な酵素ドメインを有している。図 2 に示すように、もっとも重要な酵素ドメインで知られている JmjC ドメイン Exon9-13 をターゲットとした flox マウス作製をおこなった。

Kdm5d-flox ターゲットとプライマー情報



Short PCR (loxP KIの確認)

Kdm5d-flox Left				制限酵素	loxP KIであれば XhoIで87 + 171 bpに切断
Name	Primer seq	Len(bp)			
Kdm5d-1	TTCATTGTTGCTTTCTGAACATC	WT: 218 flox: 258			
Kdm5d-2	GAATTCATCTGCCAGGGAAA				
Kdm5d-flox Right				制限酵素	loxP KIであれば NruIで88 + 134 bpに切断
Name	Primer seq	Len(bp)			
Kdm5d-3	TGCATGGCTGTGAAGACAAT	WT: 182 flox: 222			
Kdm5d-4	TTGATTATGCCTGGGATTCA				

図 2: リシン特異的ヒストン脱メチル化酵素 KDM5D の jmjC ドメイン (exon9-13) の両端のイントロンへの loxP 配列の挿入の模式図

まず L1-loxP sperm より体外受精を行い、得られた 20 の胚で PCR により Flox 挿入を確認できた 12 の胚に R1-loxP 配列挿入のための CRISPR 処理をおこなった。図 3 に示すように、最終的に RELP、Sequencing により 4 つの fl-fl マウス胚が採取され、F0 マウスとして繁殖に成功した。

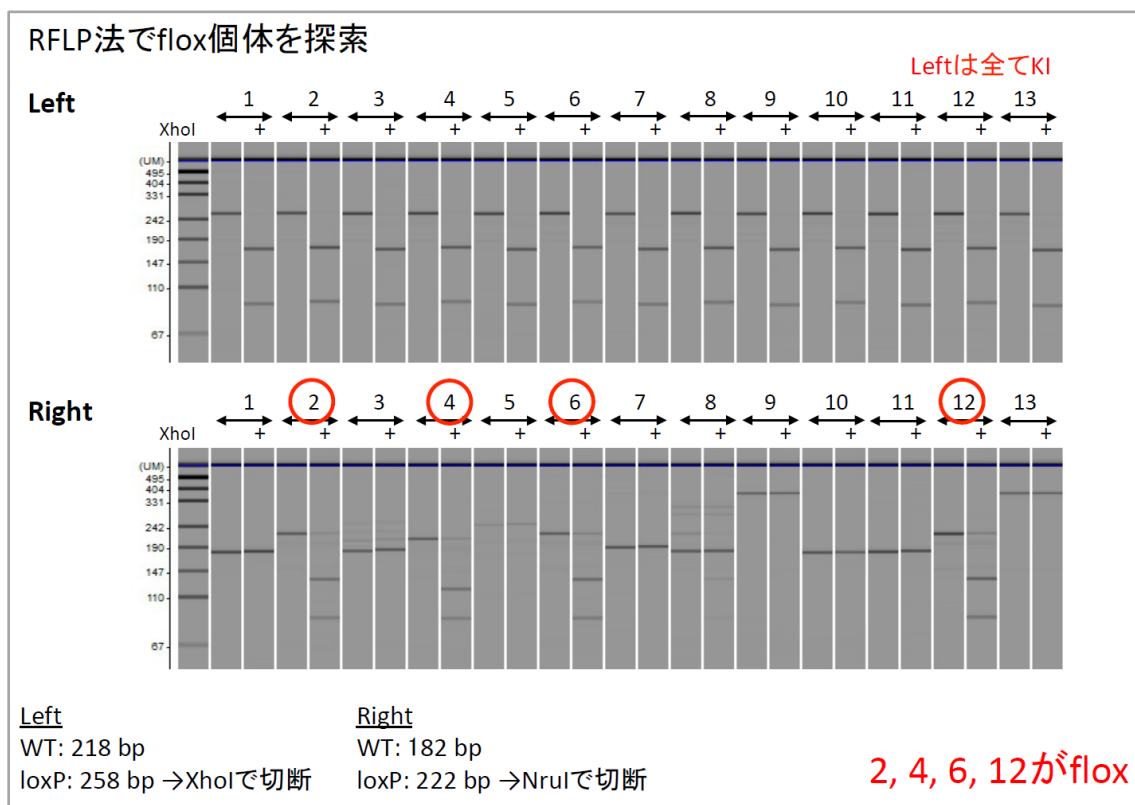


図 3: RELP 法での loxP 配列挿入の確認。最終的に 4 つの fl-fl マウスの樹立に成功した。

4.考察

本研究で樹立に成功した KDM5D-flox マウスは現在までに世界で報告はみられていないため、大変貴重な実験系となる可能性があると考えられる。これを用いて Cre 発現によるフェノタイプの確認を予定している。現在のところ F0 以降のマウス交配で、雌 C57BL/6 との交配では何の以上も認めずに、F3 までの繁殖を完了している。本実験系では、生まれてくる雄マウスはすべて KDM5D-flox マウスとなる。図 4 に示すように、KDM5D のコンディショナルノックアウトが全身に及ぼす影響が不明であるためにまずは、雌 B6.Cg-Tg (CAG-cre/Esr1*)5Amc/J (Cre-ERT system) マウスでの交配を施行することにより、embryolethal の確認を行う予定であり、その後、時系列的にタモキシフェン投与をおこない精子形成能について詳細に解析をおこなう予定である。

KDM5D-Floxマウスの作製完了による、 自然発症マウスモデルでの男性不妊精子形成能の検討

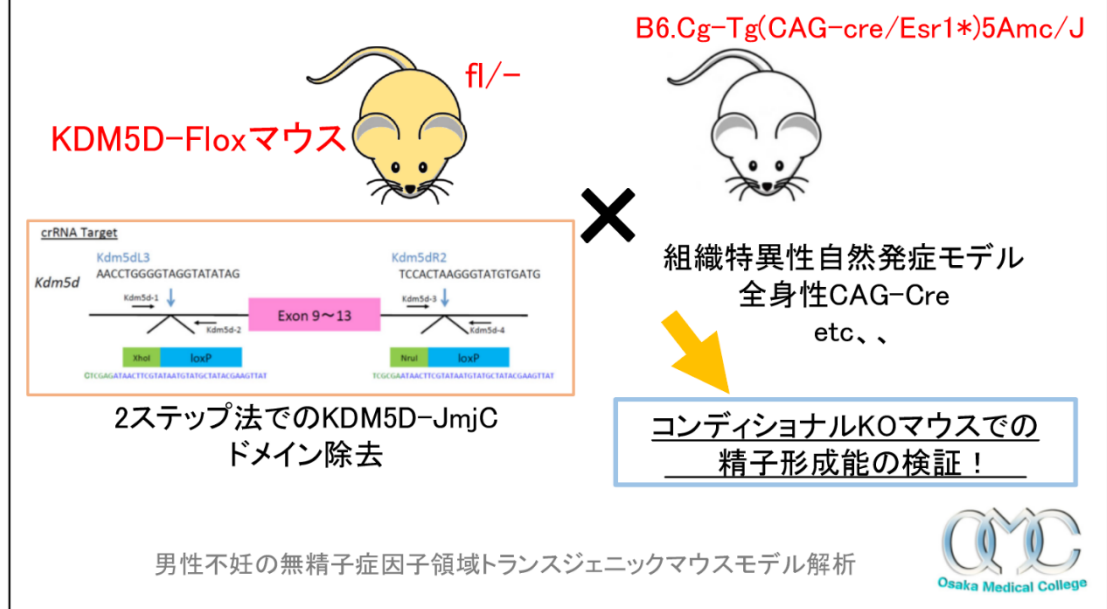


図4: KDM5D-flox マウスによる Cre-ERT system を用いた精子形成能、忍容性能力の確認を雌 B6.Cg-Tg (CAG-cre/Esr1*) 5Amc/J (Cre-ERT system) マウスを使用して行う実験系の模式図

5.結語

今回、大阪難病研究財団の助成をいただき、世界で初めて Y 染色体上 AZF 領域のエピジェネティックファクターである KDM5D-flox マウスの樹立に成功した。このマウスモデルを用いることで、男性不妊の原因解明に新たな知見を得ることに期待してさらに解析を進めている。

6.文献

1) Komura K, Yoshikawa Y, Shimamura T, Chakraborty G, Gerke TA, Hinohara K, et al. ATR inhibition controls aggressive prostate tumors deficient in Y-linked histone demethylase KDM5D. J Clin Invest. 2018 Jul 2;128(7):2979-2995.

7.成果発表

なし