OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト雄性不妊に関わるY染色体領域AZFaのマウス精子形成における機能解析
Author(s)	松村, 貴史
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72336
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　松村貴史　　）	
論文題名	ヒト雄性不妊に関わるY染色体領域AZFaの マウス精子形成における機能解析

論文内容の要旨

現在、日本を含む先進諸国では不妊症が大きな社会問題になっている。国立社会保障・人口問題研究所の統計調査によると日本では、約6組に1組のカップルが不妊といわれている。世界保健機関（WHO）の報告では、その約半数に男性不妊が関与している。男性不妊の主な原因は造精機能障害や性機能障害、精路の閉塞など様々だが、厚生労働省による2015年の調査では、日本の男性不妊の原因として最も多くを占める（82.4%）のは造精機能の障害である。顕微授精といった生殖補助医療技術の発展により、不妊男性においても、精巣または精液から数匹の精子が回収できれば子供を望むことができるものの、精巣の精細管の中で精子形成が途中で停止し、半数体の精細胞や精子が回収できない場合や、生殖細胞が完全に喪失し支持細胞であるセルトリ細胞しか観察されない「セルトリ細胞遺残症候群（Sertoli -cell-only syndrome: SCOS）」では、有効な治療法は未だ確立されていない。

1970年代よりこのような男性不妊患者の1割程度で、Y染色体上の特定の領域に微小欠失が見られることが報告されている。「無精子症領域（azoospermia factor region: AZF region）」と名付けられたこの領域は、*AZFa*、*AZFb*、*AZFc* の3か所が知られている。筆者はその中でもSCOS発症に関わるとされる*AZFa*領域に着目した。*AZFa*領域は、ヒトとマウスの間でよく保存されており、*USP9Y*、*DDX3Y*、*UTY*の3遺伝子がコードされているが領域の欠失によるSCOS発症のメカニズムは未だ明らかになっていない。これまでに、健常男性でも*USP9Y*のコード領域が欠失しているケースが報告されている他 、*Uty*遺伝子欠損（knockout: KO）雄マウスは生殖能力に異常を示していないことから著者は、残るDDX3YがSCOSに関わる分子ではないかと考えた。

そこで、テーマ1として、近年登場したCRISPR/Cas9システムを用いて*Ddx3y*のKOマウスを作製し、その精子形成の解析を行った。予想に反して作出した*Ddx3y* KOマウスの精巣では、正常な精子形成が観察された。さらに、野生型の雌マウスとの交配試験で*Ddx3y* KOマウスから得られた産仔の平均数は、野生型雄マウスと同程度であった。

次に著者は、X染色体に存在する*Ddx3y*のホモログ、*Ddx3x*が機能を代償している可能性を検証するため、*Ddx3x*、*Ddx3y*のダブルノックアウト（DKO）マウスの作製と解析を試みた。その過程で、*Ddx3x*が胚発生に重要な遺伝子であり、KOマウスが胎生致死となることが明らかとなった。胎生致死を示すdKOマウスの精子形成を調べるために、ES細胞を用いたキメラマウスでの解析を行った。この解析法では、欠損すると胎生致死を示す遺伝子のKO ES細胞を野生型マウスの8細胞期に注入してキメラマウスを作製すると、野生型の細胞により胎生致死が回避できることを利用する。この時著者が所属する研究室で樹立された全身で*Egfp*遺伝子を発現するES細胞を用いることでEGFP蛍光により、キメラマウス精巣内でKO ES細胞由来の生殖細胞を判別し、その挙動を観察することができる。DKO ES細胞株を樹立し、野生型の胚盤胞に打ち込むことで作製した雄のキメラマウスの精巣を観察したところ、緑色蛍光を持つ精子が観察された。更に野生型の雌とキメラマウスの交配から、変異アレルが次世代に伝わることが確かめられたことから、*Ddx3x*、*Ddx3y*の欠損は精子形成異常を引き起こさないことが示された。

一方SCOS患者では、*AZFa*領域内の複数の遺伝子にまたがる欠失がみられることから、1遺伝子のみのKOマウスでは、残り2つの遺伝子が機能を補完して、精子形成不全がみられない可能性、また、*Azfa*領域内の非遺伝子領域内に精子形成に重要な役割を果たす領域がある可能性を考えた。これらの可能性を検証するため、テーマ2として*Azfa*領域の3遺伝子全てを含む領域を欠失させたKOマウスを作製し、精子形成を観察することにした。

著者らの研究から、CRISPR/Cas9システムでは、2種類のsgRNAを用いてsgRNA間の領域欠損を誘導することができ、特に、受精卵と違って一度に数十～数百クローンを処理できるES細胞の系を用いることで効率的に変異体を得ることが可能であることが明らかとなっている。そこで*Usp9y*と*Uty*に設計したsgRNAを用いて360 kbに及ぶ*Azfa*領域欠失マウスを作製しその精子形成を解析したところ、性成熟した*Azfa*欠失雄マウスの精巣内では精子形成に異常は見られず、*Azfa*欠失雄マウスと野生型雌マウス交配させたところ、野生型に匹敵する数の産仔が得られた。その一方*Azfa*欠失マウスでは、マウス特異的な（ヒトには存在しない）*Ddx3y*の常染色体パラログ、*D1pas1*の発現量が

上昇していた。*D1pas1*は、*Ddx3y*と87%の遺伝子相同性を持ち、ヒトDDX3Yとも89%の遺伝子相同性を持つ、精巣特異的に発現する遺伝子である。

以上のことから、ヒトにおいてSCOSの原因因子と考えられる*Azfa*領域は、マウスにおいては精子形成に必須ではないことが明らかとなった一方、マウス特異的な*Ddx3y*のパラログ遺伝子である*D1pas1*が、*Azfa*領域欠失により欠失した機能を補償している可能性を提示した。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　松村　貴史　）		
	(職)	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	伊川　正人
	副 査　教授	辻川　和丈
	副 査　教授	水口　裕之

論文審査の結果の要旨

本研究は、男性不妊患者で欠失が見られるY染色体のAZFa領域とその関連遺伝子について、CRISPR/Cas9システムを利用して遺伝子変異マウスを作製し、昨日の解析を試みたものである。

I. AZFa領域の中でも、精子形成に関わることが最も予想されるDdx3y欠損マウスは、野生型と同様に正常な精子形成を示し、平均産仔数にも低下は見られなかった。

II. Ddx3yのX染色体ホモログであるDdx3x欠損マウスは、精巣にてDdx3yの機能を補償している可能性が示唆されるが、着床後の胚発生異常から胎生致死になることが明らかになった。そこでDdx3x、Ddx3yの両方を欠損した生殖細胞の分化を解析するため、GFPを発現するES細胞を用いてゲノム編集を行い、両アレルに変異が導入されたKO-ES細胞からキメラマウスを作製した。キメラマウスのGFP陽性細胞に注目することで、両欠損生殖細胞が受精能を持つ精子まで分化することを観察した。

III. 360 kbにまたがるAZFa領域全体を欠失したマウスを作製し、その精子形成を観察した結果、AZFa欠失マウスは正常な精子形成を示した。

IV. AZFa領域欠失マウスでは、マウス特異的なDdx3yパラログであるD1pas1の発現が上昇した。このことから、D1pas1がAZFa領域欠失にて失われた機能を補償している可能性を見出した。

以上、本論文は、CRISPR/Cas9システムを用いて数種類の変異マウス系統を作製し、ヒトで重要と言われるAZFa領域がマウスでは不必要なものであることを証明したものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。