

Y 염색체 미세결실과 정자형성장애의 연관성에 대한 연구

삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 성균관대학교 의과대학 산부인과학교실²,
비뇨기과학교실³

이형송¹ · 최혜원¹ · 박용석¹ · 궁미경² · 강인수²
윤종민³ · 이유식³ · 서주태³ · 전진현¹

Relationship between Microdeletions on the Y Chromosome and Defect of Spermatogenesis

Hyoung-Song Lee¹, Hye Won Choi¹, Yong-Seog Park¹, Mi Kyoung Koong², Inn Soo Kang²,
Jong Min Yun³, You Sik Lee³, Ju Tae Seo³, Jin Hyun Jun¹

*Laboratory of Reproductive Biology & Infertility¹, Department of Obstetrics and Gynecology²,
Department of Urology³, Samsung Cheil Hospital and Women's Healthcare Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

Objectives: To estimate the frequency of Y chromosome microdeletions in the Korean population of infertile men and to evaluate the relationship between microdeletion on the Y chromosome and clinical phenotypes of infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia.

Materials and Methods: Genomic DNA was extracted from blood samples collected from 330 infertile men attending the Infertility Clinic at Samsung Cheil Hospital, Korea. Six sequence tagged sites (STSs) spanning the azoospermia factor (AZF) regions of the Y chromosome were amplified by polymerase chain reactions (PCRs).

Results: Microdeletions on Y chromosome were detected in 35 (10.6%) of the 330 infertile men. Most of the microdeletions (91.4%) involved AZFb or AZFc. The high incidence of microdeletions were found in AZFc region (57.1%), but the low in AZFa (8.6%) and AZFb (5.7%). Larger microdeletions involving two or three AZF regions were detected in 28.6% of cases. All patients (6 patients) with deletion of AZFa region showed no germ cell phenotypes, Sertoli cell only syndrome or Leydig cell hyperplasia in histopathologic examinations.

Conclusion: Microdeletions on the Y chromosome, especially, at AZFc/DAZ regions may be the major cause of azoospermia and severe oligozoospermia. We suggest that idiopathic infertile men have genetic counselling and microdeletion analysis on the Y chromosome before IVF-ET and ART program.

Key Words: Y chromosome, Microdeletion, Azoospermia factor (AZF), Genetic counselling

주관책임자: 전진현, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7592, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: junjh55@hanmail.net
연락처: 이형송, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7635, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: hslee99@samsung.co.kr
본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R01-2000-000-00147-0) 지원으로 수행되었음.

심한 정자형성과정의 장애로 인한 남성 불임은 성인 남성의 2%를 차지하고 있으며, 이들 중 대부분은 건강상 다른 문제점은 발견할 수 없다. 또한, 결혼한 부부의 약 10~15% 정도가 불임으로 진단을 받고 있으며, 그 중 50% 이상은 남성 불임이 원인인 것으로 밝혀지고 있다. 남성 불임과 관련이 있는 비정상적인 정자형성의 원인은 감염, 면역학적 요인, 해부학적 기형 또는 화학적 요인 등에 기인한다고 알려져 있으며, 최근에는 유전적 요인이 이러한 원인불명의 무정자증이나 희소정자증의 원인이라는 제안이 많이 나오고 있다.¹⁻⁷ 정자형성과정에 있어서의 유전자 연구의 주된 대상은 Y 염색체로 Tiepolo와 Zuffardi⁸가 Y 염색체 장완 (Yq11)에 존재하는 정자형성에 있어서 중요한 역할을 하는 요소, 즉, *Azoospermia Factor (AZF)*의 존재를 주장하면서 무정자증 환자의 염색체 검사 결과 Y 염색체 장완의 결실과 염색체의 구조적 이상을 관찰하여 보고한 이후 최근까지 많은 연구들이 정자형성과정의 조절과 Y 염색체의 역할에 중점을 두고 이루어져 왔다.

AZF를 밝혀내고자 하는 여러 연구가 진행되는 가운데 Ma 등⁹은 interval 6에 존재하는 유전자, *YRRM1*과 *YRRM2*이 RNA recognition motif를 가지고 있으며 초기 정자형성과정에 있어서 RNA processing이나 translational control의 기능을 수행할 것이라 주장하였으나, 그 기능이 확실하게 밝혀지지 않고 Y 염색체의 여러 곳에 존재하고 있어 AZF로서의 의문이 제기되었다. Reijo 등¹⁰은 정자형성과 관련이 있는 새로운 유전자인 *Deleted in Azoospermia (DAZ)*를 보고하였으며, 이 유전자는 *YRRM1*과 *YRRM2*와 마찬가지로 RNA binding motif를 갖는 단백질로서 고환에서만 특이적으로 발현되는 단백질임을 밝혀내었다. 그 후 Vogt 등³은 AZFa, AZFb와 AZFc로 명명한 3개의 subregion을 제안하였으며, 이 3 subregion의 미세결실 양상과 정자형성장애 사이의 상관관계에 대해 보고하였다. 이들은 AZFa region의 결실은 Sertoli cell only syndrome (SCOS)과 연관이 있으며, AZFb region의 결실은 maturation arrest (MA)와 서로 관련이 있다고 주장하였다. 그러나, 다른 연구자들은 이러한 미세결실 부위와 조직학적인 결과와의 연관관계에 대해 부정적인 보고를 한 바 있다.^{10,11}

현재까지 Y 염색체 결실과 고환 기능 저하와의

관계가 확실히 밝혀지지 않고 있지만, 남성 불임의 원인과 예후를 밝히기 위해 미세결실 screening은 남성 불임 환자의 진단에 널리 사용되어지고 있다. 또한, 최근 난자세포질내 정자직접주입법 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI)과 고환조직 정자채취술 (testicular sperm extraction, TESE)의 발달로 인하여 남성 불임이 어느 정도 극복되어지고 있다. 미세결실이 있는 남성의 경우 정자내 Y 염색체 상의 미세결실이 그의 남아에게 유전된다는 보고가 있으므로, 고환조직 정자채취술과 난자세포질내 정자직접주입법 등 보조생식술을 사용하는 부부의 경우 Y 염색체 미세결실 검사를 통하여 추후 아들의 불임 가능성에 대한 상담과 정보가 필요할 것으로 생각된다.^{12,13}

본 연구에서는 Y 염색체 장완에 존재할 수 있는 미세결실을 탐지하는 방법인 STS-based mapping strategy를 이용한 중합효소연쇄반응 방법으로 한국인 남성 불임 환자를 대상으로 하여 Y 염색체의 미세결실 빈도를 조사하고, 미세결실 부위와 정자형성 장애와의 관련성을 분석하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

연구 대상은 2000년 1월부터 2002년 8월까지 삼성제일병원에 내원한 남성 불임 환자 중 정액 검사 결과 비폐쇄성 무정자증이나 희소정자증 ($<2 \times 10^6/ml$)으로 확인된 330명의 남성 불임 환자를 대상으로 Y 염색체 미세결실 검사를 수행하였다. 음성 대조군으로는 10명의 여성을, 양성 대조군으로는 가임 남성 30명을 대상으로 하였다.

2. STS Primers

Y 염색체의 미세결실 분석을 위해 사용한 primers는 Vollrath 등¹⁴과 Reijo 등^{2,20}에 의해 보고된 여러 primers 중에서 Lee 등⁴이 보고한 한국 불임 남성에서 결실 빈도가 높게 나타난 sY84 (AZFa region), sY129, sY134 (AZFb region), sY254, sY255 (AZFc region, *DAZ*)을 사용하였다 (Figure 1 and Table 1). 또한, 중합효소연쇄반응의 양성 대조군으로 Y 염색체에 존재하는 SRY 유전자 특이적인 primer 쌍을 사

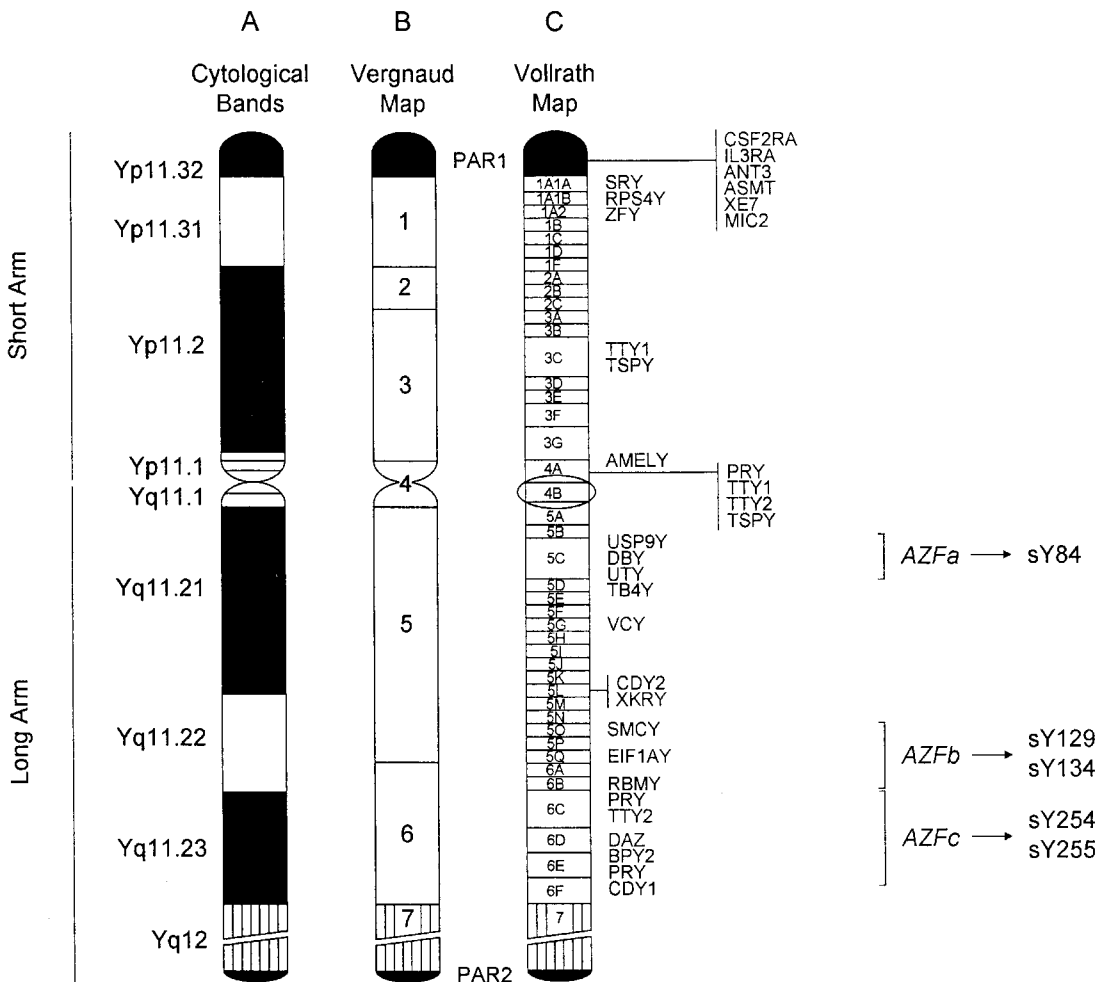


Figure 1. A. Representation of the cytological bands of the Y chromosome. B. The seven intervals of the Vergnaud map of the Y chromosome (Vergnaud *et al.*, 1986), where intervals 1~4 span the short arm and the centromere, intervals 5 and 6 span the euchromatic region, and interval 7 spans the heterochromatic region. C. The 43 interval map of the Y chromosome (Vollrath *et al.*, 1992). The list of genes mapped to the Y chromosome, the location of the AZF regions and the STS markers used in this study are shown.

용하였다. 이들 각 primer 쌍들은 (주) Bioneer에 의뢰, 합성하였다.

3. Genomic DNA의 분리

환자의 말초혈액을 항응고제 EDTA가 처리된 vacuum tube에 채취한 후 3000 rpm으로 원심분리하여 buffy coat만을 분리하여 -70℃에 보관하였다. Genomic DNA는 QIAamp Blood Kit (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA) 또는 Aquapure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 추출하였으며, 중

합효소연쇄반응을 수행하기 전까지 -20℃에 보관하였다.

4. 중합효소연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

중합효소연쇄반응에 사용한 primers는 sY84, sY129, sY134, sY254, sY255, SRY이며 반응은 최종 20 μl에 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 각 0.2 mM dNTP, 20 pmol의 primer 쌍, 0.5 units의 *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim,

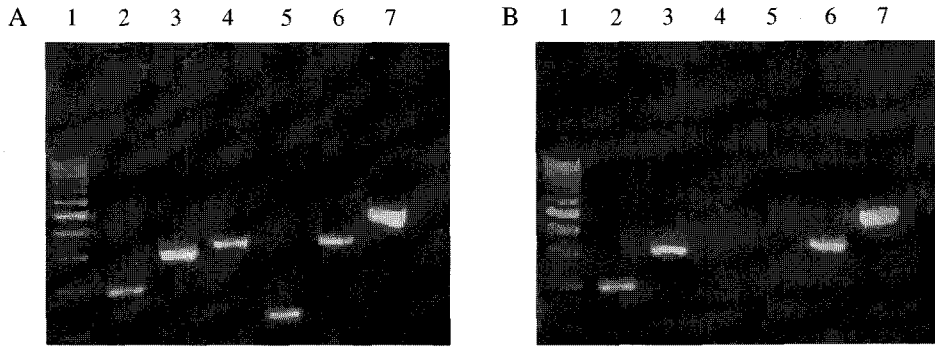


Figure 2. Microdeletion pattern of the AZF region in the normal and azoospermic patient. **A.** Normal fertile man. **B.** Azoospermia patient. Polymerase chain reaction products analyzed on the 2% agarose gel electrophoresis show deletion of sY254 and sY255 in the AZFc region. Lane 1, 100 bp ladder; lane 2, sY129; lane 3, sY134; lane 4, sY254; lane 5, sY255; lane 6, sY84; lane 7, SRY.

Table 1. Primer sequences of Y-chromosome STSs analyzed

| STSs* | Forward | Reverse |
|-------|-----------------------|------------------------|
| sY84 | AgAAgggTCTgAAAgCAggT | gCCTACTACCTggAggCTTC |
| sY129 | AgCTTCAggAggTTCAAAAC | AAgTgggACCTAAgCTACgA |
| sY134 | gTCTgCCTCACCATAAAAACg | ACCACTgCCAAAACTTTCAA |
| sY254 | gggTgTTACCAgAAggCAAA | gAACCGTATCTACCAAAGCagC |
| sY255 | gTTACAggATTcggCgTgAT | CTCgTCATgTgCAgCCAC |
| SRY | gAATATTTCCcgCTCTCCggA | gCTggTgCTCCATTCTTgAg |

* STSs: sequence tagged sites.

Table 2. The incidence of Y chromosome microdeletion in 330 infertile men

| | Total (n=330) | AZFa | AZFb | AZFc | AZFb, c | AZFa, b, c |
|--------------|---------------|---------|---------|-----------|----------|------------|
| Deletion (%) | 35 (10.6) | 3 (8.6) | 2 (5.7) | 20 (57.1) | 5 (14.3) | 5 (14.3) |

Germany), 그리고 50~100 ng의 환자 genomic DNA를 혼합하여 수행하였으며 DNA thermal cycler (Stratagene, USA)에서 처음 94°C에서 2분간 반응한 후 94°C, 40초; 60°C 또는 62°C, 1분; 72°C, 1분의 cycle을 35회 수행한 후 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 증폭산물은 2% agarose gel 전기영동법으로 분석하였으며 결과가 음성으로 나온 환자에 대해서는 증합효소연쇄반응 오류를 배제하기 위하여 3번 이상의 독립적인 반복 실험을 통하여 최종적으로 결과를 확인하였다.

결 과

1. 무정자증 환자와 희소정자증 환자에서 Y 염색체 결실의 확인

각각의 primer 쌍을 이용하여 증합효소연쇄반응을 수행한 결과 양성 대조군인 가임 남성으로부터는 각각의 증합효소연쇄반응 증폭산물을 관찰할 수 있었으며, 음성 대조군인 여성으로부터는 어떠한 증폭산물도 관찰할 수 없었다. 전체 330명의 비폐쇄성

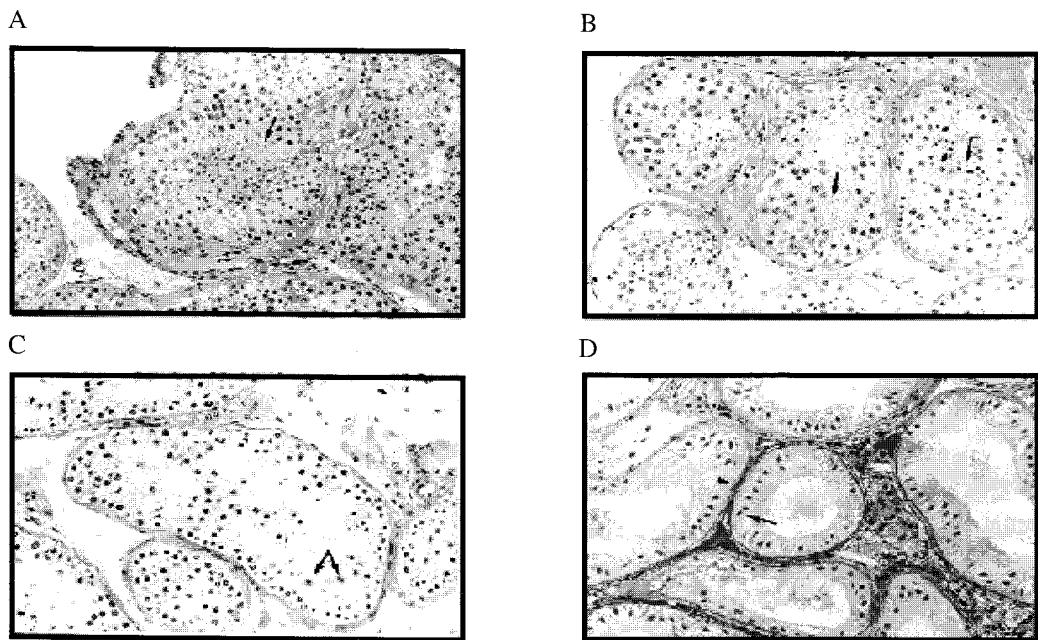


Figure 3. Testicular histology of normal and azoospermic patients. H&E staining (200X). **A.** normal spermatogenesis. Sperm indicated by arrow. **B.** Hypospermatogenesis. Arrow showed sperms. **C.** Maturation arrest. There are reduced numbers of spermatocytes, but no spermatids. Spermatocyte indicated by arrow. **D.** Germ cell aplasia (Sertoli cell only syndrome). Sertoli cell indicated by arrow and seminiferous tubules indicated by arrow head.

Table 3. Testicular phenotypes of histological observations associated with microdeletions restricted to AZFa, AZFb, and AZFc

| | Total | AZFa | AZFb | AZFc | AZFb, c | AZFa, b, c |
|-----------------------------|-------|------|------|------|---------|------------|
| Patients with microdeletion | 35 | 3 | 2 | 20 | 5 | 5 |
| Histological observations | 20 | 3 | 1 | 9 | 4 | 3 |
| SCO | 13 | 3 | | 5 | 3 | 2 |
| MA | 1 | | | 1 | | |
| Hypo | 5 | | 1 | 3 | 1 | |
| Leydig cell hyperplasia | 1 | | | | | 1 |

SCO: Sertoli cell only, MA: maturation arrest, Hypo: (severe) hypospermatogenesis

무정자증 환자와 희소정자증 환자를 대상으로 한 실험을 분석한 결과, 35명 (10.6%)이 한 개 이상의 STS에서 Y 염색체의 미세결실을 확인하였다 (Table 2 and Figure 2). 이들 중 AZFb 또는 AZFc region에서 결실을 보이는 경우가 32명 (91.4%)으로 대부분의 미세결실이 AZFb와 AZFc에 집중되어 있는 것

으로 관찰되었으며, AZFa region에만 미세결실이 있는 경우는 3명 (8.6%), AZFb region에만 미세결실이 있는 경우 2명 (5.7%), AZFc region에만 있는 경우 20명 (57.1%), 그리고 2개 이상의 subregion에 걸쳐서 미세결실이 있는 경우는 10명 (28.6%)으로 나타났다.

2. 미세결실 부위와 조직학적 소견

미세결실이 관찰된 35명 중 조직학적 분석이 가능한 20명을 대상으로 Y 염색체 상의 미세결실 부위와 조직학적 소견을 비교 분석해 본 결과 (Figure 3) AZFa region만 결실되어 있는 경우 3명 모두 Sertoli cell only syndrome (SCO)으로 밝혀졌고 AZFa, AZFb, 그리고 AZFc 모두 결실이 있는 3명의 경우 2명은 SCO, 1명은 Leydig cell hyperplasia로 관찰되었다. AZFb region만 결실되어 있는 1명은 severe hypospermatogenesis로 관찰되었고 AZFb와 AZFc가 같이 결실되어 있는 4명의 경우는 3명은 SCO, 1명은 severe hypospermatogenesis로 판명되었다. AZFc만 결실되어 있는 9명을 분석해 본 결과 5명은 SCO, 3명은 severe hypospermatogenesis, 1명은 maturation arrest로 관찰되었다 (Table 3).

고 찰

현재까지 남성 불임 환자를 대상으로 Y 염색체 미세결실 빈도와 유형에 대하여 분석하고 비교한 보고들에서 민족과 지역적 차이 그리고 실험 대상군의 선택 기준에 따라 1~55%의 결실 빈도로 다양하게 발표되고 있다. 그리고 1998년까지 보고된 결과를 종합해 볼 때⁵⁶ 무정자증 환자에서는 약 12.2%의 결실을 보이고 있었으며 희소정자증 환자에서는 약 3.4%의 미세결실 비율이 관찰되었다.¹⁵ 본 연구에서는 330명의 한국인 불임 남성을 대상으로 Y 염색체 미세결실을 조사 분석한 결과 35명 (10.6%)에서 미세결실이 발견되었다. 이러한 미세결실 빈도는 기존의 다른 아시아 민족 집단 (싱가포르, 대만, 일본)을 대상으로 한 분석에서 보고한 3.5~20%의 미세결실 빈도와 유사한 것으로 생각된다.¹⁶⁻¹⁹ 또한, 본 실험의 연구 결과에서도 양성 대조군으로부터는 어떠한 미세결실도 관찰할 수 없었으나 무정자증이나 희소정자증 환자에서는 적지 않은 비율로 미세결실이 관찰된 것으로 보아 정자형성장애는 이런 Y 염색체의 미세결실이 밀접하게 관련되어 있음을 확인할 수 있었다.

Vogt 등³에 의해 제안된 미세결실 부위와 조직학적 소견과의 연관관계, 즉 AZFa에서의 결실은 SCO,

AZFb의 결실은 maturation arrest, 그리고 AZFc의 경우 SCO 또는 hypospermatogenesis와 연관이 있다는 주장을 확인하기 위하여 미세결실이 있는 남성 중 고환조직 생검을 실시한 20명을 대상으로 그 조직학적 양상을 분석하였다. 본 연구에서는 AZFa region만 결실되어 있는 경우 3명 모두 Sertoli cell only syndrome (SCO)으로 밝혀졌고, AZFa region과 함께 AZFb와 AZFc가 동시에 결실이 있는 3명의 경우 2명은 SCO, 1명은 Leydig cell hyperplasia로 관찰되었으며 이들의 경우 고환조직 정자추출법에서도 정자를 찾을 수 없었다. 따라서 AZFa region이 결실되었을 때 대부분 SCO의 조직 형태를 갖고 있으며 정모세포도 없다는 Vogt 등³의 주장과 어느 정도 일치하는 것으로 사료된다. 하지만 AZFb region에서만 결실이 관찰된 1명의 조직학적 소견은 severe hypospermatogenesis로 판명되었고 AZFb와 AZFc가 같이 결실되어 있는 4명의 경우는 3명은 SCO, 1명은 severe hypospermatogenesis로 판명되어 Vogt 등의 주장과는 다른 양상을 나타내었다. AZFc만 결실되어 있는 9명을 분석해 본 결과 5명은 SCO, 3명은 severe hypospermatogenesis, 1명은 maturation arrest로 관찰되어 기존의 보고와 마찬가지로 여러 가지 다양한 조직학적 소견을 보였으며, 일부 조직에서는 정자가 관찰되어 국소적인 정자형성 가능성을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 결실이 일어난 AZF subregion과 정자형성 즉, genotype과 phenotype 사이에는 일부 연관성도 보이나 아직 확실하게 일치하는 어떤 연관관계는 확인할 수 없었다.

이러한 결과들로 미루어 보아 남성 불임 환자의 경우, 특히 TESE와 ICSI 같은 보조생식술을 시행하는 경우, 시술 전 Y 염색체 상의 미세결실 여부와 결실 부위의 조사를 통하여, 정자형성장애의 원인을 확인할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, ICSI를 통해 태어난 남아에게 Y 염색체의 미세결실 유전 가능성과 미세결실이 있는 Y 염색체의 불안정성으로 인한 여러 변이에 대한 충분한 상담과 정보 제공이 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, Vogt P, Keil R, Har-

- greave TB, et al. Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in Azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 29-33.
2. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 1996; 347: 1290-3.
 3. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factor (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-43.
 4. Lee HJ, Lee HS, Song GJ, Byun HK, Seo JT, Kim JH, et al. Analysis of the Azoospermia Factor (AZF) gene on Y chromosome and expression pattern of DAZ gene in Korean infertile men. *Kor J Fertil Steril* 1997; 24: 57-66.
 5. van der Ven K, Montag M, Peschka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G, et al. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 699-704.
 6. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barboux S, et al. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 1998; 13: 302-7.
 7. Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B. Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod* 2002; 17: 17-24.
 8. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34: 119-24.
 9. Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, et al. A Y Chromosome Gene Family with RNA-Binding Protein Homology: Candidates for the Azoospermia Factor AZF Controlling Human Spermatogenesis. *Cell* 1993; 75: 1287-95.
 10. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg S, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics* 1995; 10: 383-93.
 11. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sperm extraction. *Hum Reprod* 1998; 13: 3332-7.
 12. Stuppia L, Gatta V, Calabrese G, Guanciali FP, Morizio E, Bombieri C, et al. A quarter of men with idiopathic oligo-azoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11. *Hum Genet* 1998; 102: 566-70.
 13. Page DC, Silber S, Brown LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum Reprod* 1999; 14: 1722-6.
 14. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, et al. The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258: 52-9.
 15. Simoni M, Kamischke A, Nieschlag E. Current status of the molecular diagnosis of the Y-chromosomal microdeletions in the work-up of male infertility. *Hum Reprod* 1998; 13: 1764-8.
 16. Liow SL, Ghadessy FJ, Ng SC, Yong EL. Y chromosome microdeletions, in azoospermic or near-azoospermic subjectts, are located in the AZFc (DAZ) subregion. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 763-8.
 17. Chang SY, Tsai MY. Detection of azoospermic factor genes in Chinese men with azoospermia or severe oligospermia. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 259-62.
 18. Chiang HS, Wei HJ, Chen YT. Genetic screening for patients with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Int J Androl* 2000; 23 (Suppl 2): 20-5.

19. Tse JYM, Yeung WSB, Ng EHY, Cheng LN, Zhu HB, Teng XM, et al. A comparative study of Y chromosome microdeletions in infertile males from two chinese populations. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 376-83.
-