

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07132

研究課題名（和文）精原細胞の自己複製と分化のバランスを制御するヒストン修飾の役割

研究課題名（英文）Histone modifications in regulating the balance between self-renewal and differentiation of spermatogonia

研究代表者

小沢 学（Ozawa, Manabu）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80608787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：ヒストン脱メチル化酵素であるFbx11の精子形成における機能を明らかにすることを目的として、生殖細胞特異的Fbx11ノックアウト(Fbx11 cKO)マウスを作成し解析を行った。その結果、Fbx11cKOマウスでは、精原細胞の自己複製には大きな影響は見られない一方で、精原細胞の分化が著しく抑制され不妊になることが明らかになった。さらに、Fbx11 cKOマウスの精原細胞では、mTORC活性の低下が起こり分化が抑制されていることが明らかになった。以上の結果から、Fbx11はmTORシグナルを介して精原細胞の分化を調節するという新規のモデルが提唱された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝達しうる唯一の細胞系譜であり、その発生を制御する分子基盤を明らかにすることは基礎科学的に極めて興味深い分野であると同時に、不妊・不育が大きな問題となっている今日において社会的にも希求性の高い研究である。本研究では、ヒストン脱メチル化酵素Fbx11がmTORシグナルを介して精原細胞の分化を調節することを明らかにしており、エピジェネティクス制御を介した精原細胞のホメオスタシス維持機構を理解する上で重要な知見となる。さらに、本研究の成果は新たな不妊治療技術を開発するための一助となることも期待できる。

研究成果の概要（英文）：Aim of the project is to clarify the function of Fbx11, a histone demethylase, in spermatogenesis. We have generated and analyzed germ cell-specific Fbx11 knockout (Fbx11 cKO) mice. The results showed that Fbx11 cKO mice were infertile due to marked suppression of spermatogonial differentiation, while self-renewal of spermatogonia was not significantly affected. Furthermore, the poor ability for spermatogonial differentiation in Fbx11 cKO was due to a reduction of mTORC activity in spermatogonia. These results suggest that Fbx11 regulates spermatogonial differentiation through mTOR signaling.

研究分野：実験動物学

キーワード：精子形成 精原細胞 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝達しうる唯一の細胞系譜であり、その発生を制御する分子基盤を明らかにすることは基礎科学的に重要であるとともに、不妊・不育が大きな問題となっている今日において社会的にも希求性の高い研究であるといえる。近年、ヒストンや DNA のエピジェネティックな修飾による遺伝子発現制御機構に注目が集まっている。生殖細胞の発生過程および精子形成過程においてエピジェネティックな修飾が著しく変動することが明らかになっており、エピジェネティクスを制御する遺伝子をロックアウトしたマウスモデルのオスの多くが不妊の表現型を示すことから、この制御機構が生殖細胞の正常な発生あるいは持続的精子形成において不可欠な調整機構であることが強く示唆される。申請者は精子形成を制御するヒストンのエピジェネティクスの役割に明らかにすることを目的として研究を遂行しており、これまでに **H3K4** および **H3K36** の選択的脱メチル化酵素である **Fbx10** を欠損するマウスを用いた研究から、このマウスでは精原細胞に早期加齢が生じ、月齢の進行に伴い精子形成障害が有意に増加することを報告している。本申請で着目する **Fbx11** はこの **Fbx10** のホモログであり、同様に **H3K4** および **H3K36** を特異的に脱メチル化することが報告されている。申請者の予備解析の結果、**Fbx11** は精原幹細胞を含む未分化精原細胞において高発現していることが確認され、精子形成に何らかの役割を果たしていることが予想されるが、全身で **Fbx11** を欠損したマウスが胎生致死であったことから、精子形成における **Fbx11** の機能的役割の詳細はこれまで明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

申請者らは、生殖細胞における胎生期の生殖細胞特異的に **Cre** を発現する **Nanos3Cre** マウスと **Fbx11 flox** マウスを交配させることで生殖細胞特異的 **Fbx11** 欠損マウス (**Fbx11 cKO**) を作成し表現型の予備解析を行ったところ、**Fbx11 cKO** マウスの精巣では減数分裂期以降の分化段階の精細胞がほとんど存在せず不妊になることが明らかになった。その一方で、興味深いことに精原細胞はむしろ **cKO** マウスの精細管において **Control** と比較して著しい増加を示していた。この結果は、精原細胞の自己複製と分化のバランスが **Fbx11** の欠損により破綻し、過剰な自己複製の亢進あるいは著しい分化抑制が生じていることを示唆している。そこで、本研究では「**Fbx11** を介したヒストンのエピジェネティクス制御が精原細胞における自己複製から分化への移行を制御する」という仮説を設定しその検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) **Fbx11** 欠損精原細胞の自己複製能および分化能を詳細に解析するための **in vitro** モデルとして、生殖細胞特異的に **Cre** を発現する **Nanos3Cre** マウスと **Fbx11 flox** マウスを交配させて得られる **Fbx11 cKO** の新生仔の精巣より精原細胞を回収し、既往の培養法によって **Fbx11** 欠損 **germline stem cell (GSC)** を樹立し精原細胞における未分化および分化マーカーの変動を **qPCR** およびフローサイトメーターによって **RNA** およびタンパク質レベルで解析した。また、精原細胞の分化を誘導することが報告されているレチノイン酸を培地に添加し培養下で精原細胞の分化を誘導した状態においても同様の解析を行い、**Fbx11** 欠損 **GSC** の自己複製能と分化能を評価した。更に **Fbx11** 欠損 **GSC** を用いて、トランスクリプトーム解析を行った。さらに、発現差の見られた遺伝子について生化学的な手法を用いてその機能解析を行った。更に、トランスクリプトーム解析において発現差の見られた遺伝子について、生化学的な手法を用いてその機能解析を行った。

4. 研究成果

生殖細胞特異的に **Fbx11** を欠損したマウスから **GSC** の樹立を試みたところ、**Control** と比較して同程度の効率で樹立が可能であり、その増殖速度も対照群と比較して有意な差は見られなかった。このことから、**Fbx11** を欠損しても、精原細胞の自己複製能は維持されるということが **in vivo** および **in vitro** において明らかになった。次に、樹立した **GSC** を用いてフローサイトメーターおよび **qPCR** を用いて精原細胞の分化状態を解析した。その結果、**Fbx11** 欠損 **GSC** では **Control** と比較して未分化マーカーの発現が高く、また分化マーカーの有意な発現低下が確認された。この結果から、**Fbx11** 欠損 **GSC** は、より未分化な状態で自己複製をしていることが示唆された。トランスクリプトーム解析の結果、**Fbx11** 欠損 **GSC** では精子形成や減数分裂に関与することが知られている遺伝子群の発現が有意に低下した一方で、細胞周期を亢進することが知られる遺伝子の有意な上昇が観察された。また、**Fbx11** 欠損 **GSC** において、精原幹細胞の分化を促進する **mTOR** シグナルの抑制因子である **Redd1** の発現が亢進していたことから、**Fbx11** 欠損による精原細胞の分化抑制は **mTORC1** の抑制を介した作用であるとの仮説を立て、その検証を行った。その結果、**Fbx11** 欠損 **GSC** では **mTORC1** による活性化ターゲットである **RPS6** のリン酸化が抑制されていること、および新生仔の精巣中においてもリン酸化 **RPS6** 陽性の精

原細胞数の有意な減少が観察された。以上の結果より、**Fbx11** 欠損に起因した精子形成異常は、**mTORC1** の活性化の抑制による精原幹細胞の分化不全に起因するというモデルが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Komura S, Ito Kenji, Ohta ShoUkai Tomoyo, Kabata Mio, Itakura Fumiaki, Semi Katsunori, Matsuda Yutaka, Hashimoto Kyoichi, Shibata Hirofumi, Sone Masamitsu, Jo Norihide, Sekiguchi Kazuya, Ohno Takatoshi, Akiyama Haruhiko, Shimizu Katsuji, Woltjen Knut, Ozawa Manabu, Toguchida Junya, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell-type dependent enhancer binding of the EWS/ATF1 fusion gene in clear cell sarcomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11745-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sasanuma Hiroki, Ozawa Manabu, Yoshida Nobuaki	4. 巻 31
2. 論文標題 RNA-binding protein Ptpb1 is essential for BCR-mediated antibody production	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 157 ~ 166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxy077	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 SENOO Manami, TAKIJIRI Takashi, YOSHIDA Nobuaki, OZAWA Manabu, IKAWA Masahito	4. 巻 65
2. 論文標題 PTBP1 contributes to spermatogenesis through regulation of proliferation in spermatogonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 37 ~ 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2018-109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tribulo Paula, Moss James I, Ozawa Manabu, Jiang Zongliang, Tian Xiuchun (Cindy), Hansen Peter J	4. 巻 153
2. 論文標題 WNT regulation of embryonic development likely involves pathways independent of nuclear CTNNB1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Reproduction	6. 最初と最後の頁 405 ~ 419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/REP-16-0610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 小沢 学, 妹尾 真奈美, 伊川 正人
2. 発表標題 RNA結合タンパク質PTBP1は精原細胞の増殖性を制御することで精子形成に寄与する
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ozawa M, Senoo M, Takijiri T, Yamamoto T, Yamada Y, Ikawa M
2. 発表標題 Polypyrimidine tract binding protein (Ptbp1) expression by Sertoli cells is essential for sperm production
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小沢学、妹尾真奈美、山田泰広、伊川正人
2. 発表標題 RNA 結合タンパク質 PTBP1 は精原細胞の増殖性を制御することで精子形成に寄与する
3. 学会等名 東京大学生命科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小沢学、吉田進昭、伊川正人
2. 発表標題 セルトリ細胞で発現するRNA結合タンパク質Ptbp1は精子形成に不可欠である
3. 学会等名 日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ozawa M, Ikawa M, Yoshida N
2. 発表標題 Polypyrimidine tract binding protein (Ptbp1) expression by Sertoli cells is essential for sperm production
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ozawa M, Kawakami E, Tokunaga A, Sakamoto R, Yoshida N.
2. 発表標題 The histone demethylase KDM2A regulates differentiation of spermatogonia in mice.
3. 学会等名 World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ozawa M, Ikawa M, Yoshida N.
2. 発表標題 Polypyrimidine tract binding protein (Ptbp1) expression by Sertoli cells is essential for sperm production
3. 学会等名 Society for the Study of Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------