

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791662

研究課題名(和文) 精細胞分化におけるエピジェネティックな転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of epigenetic transcriptional regulation in germ cell differentiation

研究代表者

西尾 英紀(Nishio, Hidenori)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10621063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、精子形成過程における未分化精細胞から精子幹細胞への分化機構を明らかにすることを目的とした。生後9日目のラット停留精巣で高発現するKdm5aを同定した。Kdm5aはヒストンH3K4の脱メチル化酵素であり、同時期における停留精巣でH3K4が低メチル化状態であった。またKdm5aを強発現させた培養細胞で、精子幹細胞分化に関わる遺伝子の発現変化を認めた。これらの結果から、ヒストン修飾を介した遺伝子の発現変化が、精子幹細胞分化を制御する可能性が示唆された。精子形成の初期過程において、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構が存在する可能性について世界で初めて明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：In present study, the aim is to elucidate the mechanism underlying gonocyte transformation to spermatogonial stem cells during spermatogenesis. Kdm5a expression was significantly higher at 9 days postpartum in the undescended testes of experimentally induced cryptorchid model rats than in the normal testes. Since Kdm5a regulates histone H3K4me2/me3 demethylation, H3K4me3/me2 expression levels were decreased in the undescended testes. Moreover, the expression of genes related to spermatogonial stem cell development was induced in spermatogonial cells over expressing Kdm5a. Thus, Kdm5a is likely involved in the transformation of gonocytes into spermatogonial stem cells by transcriptional regulation of specific genes via H3K4 histone modification. This is the first report of epigenetic analysis of germ cell differentiation during early spermatogenesis.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：精子幹細胞 ヒストン修飾 脱メチル化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

男性不妊症の主因の一つとして、造精機能障害があるが、精子形成の機序は未だ明らかではない。正常の精子形成では、未分化精細胞が精原細胞へ分化し、さらに精母細胞、精子細胞へと進行することで、思春期以降の恒常的な精子供給を可能としている。私たちは、停留精巢において、精子幹細胞活性の低下、精子幹細胞の分化障害、妊孕性低下がみられることをこれまでに報告し、造精機能障害の原因として、精子幹細胞の前駆体である未分化精細胞から精子幹細胞への分化障害があることを提唱した。

2. 研究の目的

精子形成過程における未分化精細胞から精子幹細胞への分化機構を明らかにするために、精子幹細胞分化障害のモデルとしてラット停留精巢を用い、停留精巢と正常精巢との発現差を認める遺伝子を同定し、その機能解析を行なった。

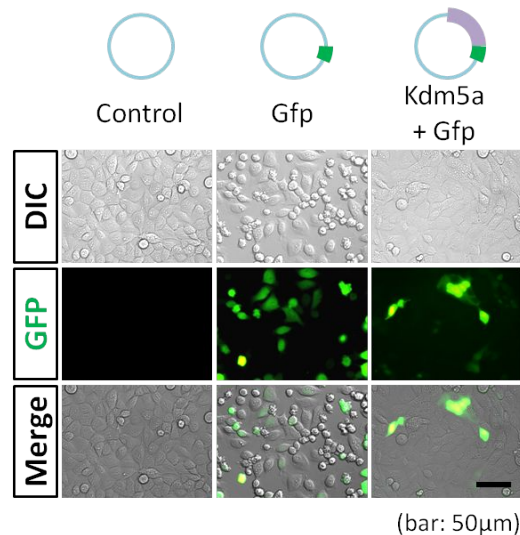
3. 研究の方法

(1) 妊娠 S-D ラット (妊娠 14-20 日) に抗アンドロゲン剤である flutamide 7.5mg を連日腹腔内投与し停留精巢モデルラットを作成した。生後 9 日目のラット停留精巢 (UDT 群) と正常精巢 (Control 群) で発現差を認める遺伝子の検索のためマイクロアレイ解析を行なった。

(2) マイクロアレイ解析にて、停留精巢で発現亢進していた遺伝子の中で、ヒストン脱メチル化酵素である *Kdm5a* (*lysine (K)-specific demethylase 5A*) 遺伝子に着目し、生後 3 日目から 18 日目までの停留精巢と正常精巢における *Kdm5a* の発現差について定量 RT-PCR・Western Blotting で評価した。また発現局在についての評価のため免疫染色を行った。

(3) ヒストン H3K4 抗体を用いて、生後 3 日目から 18 日目までの正常精巢および停留精巢のメチル化状態を評価した。

(4) 精子幹細胞の細胞株である GC-1 細胞へ *Kdm5a* を遺伝子導入し (図 1) 精子幹細胞分化に関する遺伝子の発現変化を定量 RT-PCR で確認した。

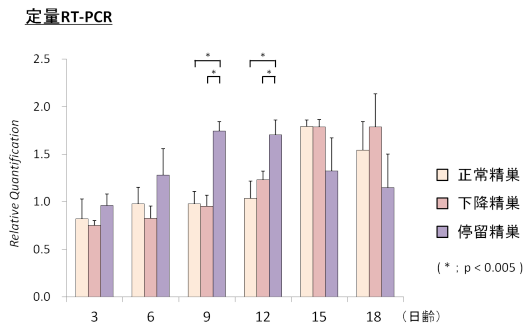


(図 1) GC-1 細胞への Kdm5a 導入

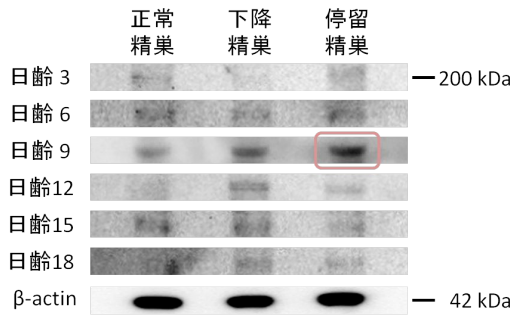
4. 研究成果

(1) 生後 9 日目のラット停留精巢で高発現する 24 遺伝子を同定した。

(2) 停留精巢で高発現する 24 遺伝子の中で、*Kdm5a* は停留精巢において、生後 3 日目から 9 日目にかけて発現の増加を認め、その後は 18 日目にかけて徐々に減少傾向を認めた。さらに生後 9 日目において正常精巢と比較して、停留精巢で有意に高発現していた ($p < 0.005$) (図 2)。 *Kdm5a* は、精細管内における精細胞の支持細胞である Sertoli 細胞や間質細胞である Leydig 細胞には発現を認めず、有糸期の未分化精細胞、精原細胞、精母細胞のそれぞれの核に発現を認めた (図 3)。

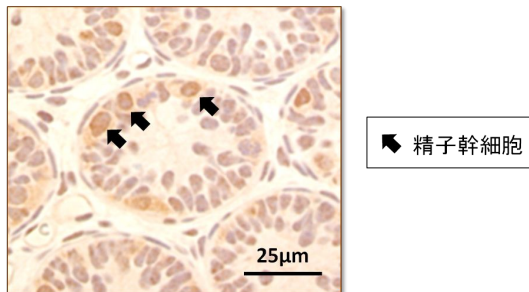


Western Blotting



(図 2) Kdm5a の経時的な発現変化

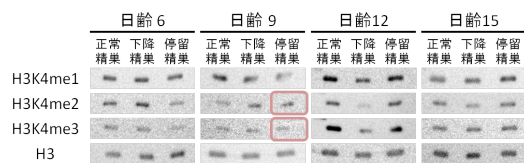
免疫染色(Kdm5a)



(図 3) Kdm5a の局在

(3) 生後 9 日目の停留精巢において H3K4me2/me3 の発現低下を認めた (図 4)。

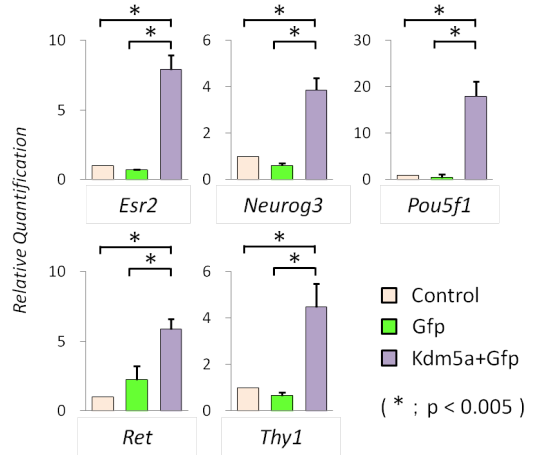
Western Blotting



(図 4) ヒストン H3K4 タンパクの発現変化

(4) Kdm5a を強発現させた GC-1 細胞において、精子幹細胞分化に関わると過去に報告された *Esr2*、*Neurog3*、*Pou5f1*、*Ret*、*Thy1* の有意な発現亢進を認めた ($p < 0.005$) (図 5)。

定量RT-PCR



(図 5) Kdm5a 強発現による精子幹細胞分化に関連した遺伝子発現変化

本研究では、精子形成過程における未分化精細胞から精子幹細胞への分化機構を明らかにすることを目的とした。生後 9 日目のラット停留精巢で高発現する Kdm5a を同定した。Kdm5a はヒストン H3K4 の脱メチル化酵素であり、同時期における停留精巢で H3K4 が低メチル化状態であった。また Kdm5a を強発現させた培養細胞で、精子幹細胞分化に関わる遺伝子の発現変化を認めた。これらの結果から、ヒストン修飾を介した遺伝子の発現変化が、精子幹細胞分化を制御する可能性が示唆された。精子形成の初期過程において、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構が存在する可能性について世界で初めて明らかにできた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Nishio H, Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Mizuno K, Kojima Y, Kohri K. Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes. J Urol. 191: 1564-72, 2014 (doi: 10.1016/j.juro.2013.10.071), 査

読有

2. [Hayashi Y](#), Mizuno K, Kurokawa S, Nakane A, Kamisawa H, [Nishio H](#), Moritoki Y, Tozawa K, [Kohri K](#), Kojima Y. Extravesical robot-assisted laparoscopic ureteral reimplantation for vesicoureteral reflux: Initial experience in Japan with the ureteral advancement technique. *Int J Urol.* 10: 1016-21, 2014 (doi: 10.1111/iju.12483), 査読有
3. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, [Nishio H](#), Nakane A, Kurokawa S, [Kohri K](#), [Hayashi Y](#). Elucidation of distinctive genomic DNA structures in patients with 46,XX testicular disorders of sex development using genome-wide analyses. *J Urol.* 192: 535-41, 2014 (doi: 10.1016/j.juro.2014.02.044), 査読有
4. Moritoki Y, [Hayashi Y](#), Mizuno K, Kamisawa H, [Nishio H](#), kurokawa S, Ugawa S, Kojima Y, [Kohri K](#). Expression profiling of microRNA in cryptorchid testes: miR-135a contributes to the maintenance of spermatogonial stem cells by regulating FoxO1. *J Urol.* 191: 1174-80, 2014 (doi: 10.1016/j.juro.2013.10.137), 査読有
5. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Moritoki Y, [Nishio H](#), [Kohri K](#), [Hayashi Y](#). Gene expression profile during testicular development in patients with SRY-negative 46,XX testicular disorder of sex development. *Urology.* 82: 1453.e1-7, 2013 (doi: 10.1016/j.urology.2013.08.040), 査読有
6. [Hayashi Y](#), Mizuno K, Moritoki Y, Nakane A, Kato T, Kurokawa S, Kamisawa H, [Nishio H](#), [Kohri K](#), Kojima Y. Can spongioplasty prevent fistula formation and correct penile curvature in TIP urethroplasty for hypospadias? *Urology.* 81: 1330-35, 2013 (doi: 10.1016/j.urology.2013.01.005), 査読有
7. Mizuno K, [Hayashi Y](#), Kamisawa H, [Nishio H](#), Moritoki Y, [Kohri K](#). Expression analysis of the pluripotency marker UTF-1 for determining the applicability of testis-sparing surgery for prepubertal testis tumors. *J Pediatr Surg.* 1: 125-128, 2013, 査読有
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213576613000444>
8. [Nishio H](#), Mizuno K, Moritoki Y, Kamisawa H, Kojima Y, Mizuno H, [Kohri K](#), [Hayashi Y](#). Clinical features and testicular morphology in patients with Kallmann syndrome. *Urology.* 79: 684-6, 2012 (doi: 10.1016/j.urology.2011.10.032), 査読有
9. Mizuno K, Kojima Y, [Nishio H](#), Tozawa K, Mizuno H, [Kohri K](#), [Hayashi Y](#). Transumbilical laparoendoscopic single-site gonadectomy for Turner's syndrome with Y-chromosome mosaicism. *J Pediatr Urol.* 8: e39-42, 2012 (doi: 10.1016/j.jpuro.2012.02.010), 査読有
10. Mizuno K, Kojima Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Moritoki Y, [Nishio H](#), [Hayashi Y](#), [Kohri K](#). Feasible etiology of vanishing testis regarding disturbance of testicular development: histopathological and

immunohistochemical evaluation of testicular nubbins. Int J Urol. 19: 450-6, 2012 (doi: 10.1111/j.1442-2042.2011.02951.x), 査読有

11. Hamamoto S, Tozawa K, Nishio H, Kawai N, Kohri K. Successful treatment of primary malignant lymphoma of the penis by organ-preserving rituximab-containing chemotherapy. Int J Clin Oncol. 17: 181-4, 2012 (doi: 10.1007/s10147-011-0273-8), 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 西尾英紀、水野健太郎、神沢英幸、守時良演、最上徹、林祐太郎、郡健二郎. ヒストンタンパク脱メチル化酵素 KDM5A のヒト造精機能障害への関与. 第 103 回日本泌尿器科学会総会, ANA クラウンプラザホテル金沢 (石川県金沢市), 2015.4.18-21
2. 西尾英紀、水野健太郎、最上徹、林祐太郎. 停留精巣モデルを用いた精子幹細胞分化のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の解明. 第 23 回日本小児泌尿器科学会総会, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市), 2014.7.9-11
3. 西尾英紀、水野健太郎、神沢英幸、守時良演、最上徹、岩月正一郎、梅本幸裕、佐々木昌一、林祐太郎、郡健二郎. ヒストン就職酵素 Kdm5a を介した精子幹細胞分化のエピジェネティック制御機構の解明. 第 33 回日本アンドロロジー学会総会, 軽井沢プリンスホテルウエスト (長野県北佐久郡), 2014.6.12-13

4. Nishio H, Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Mizuno K, Maruyama T, Kojima Y, Kohri K. Distinctive changes in histone H3K4 modification mediated via Kdm5a expression in spermatogonial stem cells of cryptorchid testes. 109th Annual Meeting of the American Urological Association, Orlando(USA), 2014.5.16-21
5. Nishio H, Hayashi Y, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Mizuno K, Maruyama T, Kojima Y, Kohri K. Testosterone treatment prior to hypospadias surgery transiently upregulates VEGFA mediated via AR and causes histological changes in foreskin. 62nd Annual Meeting of the Society for Pediatric Urology, Orlando(USA), 2014.5.16-18
6. 西尾英紀、水野健太郎、神沢英幸、守時良演、坂倉毅、林祐太郎、郡健二郎. 精子幹細胞におけるヒストンタンパク H3K4 の脱メチル化酵素である Kdm5a 遺伝子の機能解析. 第 102 回日本泌尿器科学会総会, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市), 2014.4.24-27
7. Nishio H, Mizuno K, Kurokawa S, Kamisawa H, Imura M, Moritoki Y, Shibata Y, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K. Clinical features and testicular morphology in infantile patients with Kallmann syndrome. 108th Annual Meeting of the American Urological Association, San Diego(USA), 2013.5.4-8
8. Nishio H, Mizuno K, Kurokawa S, Kamisawa H, Imura M, Moritoki Y, Shibata

Y, Nakane A, Kato T, Maruyama T, Kojima Y, Hayashi Y, Kohri K. Jarid1a regulates early stage spermatogenesis by demethylating histone H3 lysine 4. 61st Annual Meeting of the Society for Pediatric Urology, San Diego(USA), 2013.5.3-5

9. Nishio H, Kojima Y, Moritoki Y, Imura M, Kamisawa H, Okada A, Mizuno K, Umemoto Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. The role of Jarid1a in spermatogenesis: Evaluation of transcriptional regulation by histone H3K4 methylation. 107th Annual Meeting of the American Urological Association, Atlanta(USA), 2012.5.19-24
10. Nishio H, Mizuno K, Moritoki Y, Imura M, Kamisawa H, Okada A, Umemoto Y, Kojima Y, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. The histological reaction of foreskin after testosterone treatment prior to hypospadias surgery. 107th Annual Meeting of the American Urological Association, Atlanta(USA), 2012.5.19-24

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西尾 英紀 (NISHIO Hidenori)
名古屋市立大学 医学研究科 研究員
研究者番号 : 10621063

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

郡 健二郎 (KOHRI Kenjiro)

林 祐太郎 (HAYASHI Yutaro)

小島 祥敬 (KOJIMA Yoshiyuki)

水野 健太郎 (MIZUNO Kentaro)

黒川 覚史 (KUROKAWA Satoshi)

神沢 英幸 (KAMISAWA Hideyuki)

守時 良演 (MORITOKI Yoshinobu)