

令和元年6月18日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08156

研究課題名(和文) DNAメチル化による、精巣幹細胞に必須な転写因子を介した幹細胞分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Dissection of the regulatory mechanisms of male germ stem cell by DNA methylation mediated through transcription factors

研究代表者

大保 和之 (Ohbo, Kazuyuki)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70250751

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)：我々は、エピジェネティクスの視点から精巣の幹細胞を俯瞰する研究を行ない、いくつものエピゲノム因子が変化するエピジェネティック・チェックポイントの存在を発見した。このポイントで変化する、多くの転写因子が作用するseed enhancerを同定するとともに、同じくこのポイントでDNAメチル化が上昇する部位の核内配置と遺伝子発現の変化を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子を、個体の一生作り続ける元となる細胞は、精子幹細胞と呼ばれている。精子幹細胞が分裂する際の制御は、サイトカインなど、シグナル分子を介した研究が盛んである。しかし、本研究では、まったく異なる視点となるエピジェネティクスの仕組みから、精子幹細胞を俯瞰した。特に、既に取得しているDNAメチル化模様の結果に、新たにEnhancerやSuper enhancerのヒストン修飾であるH3K4me1, H3K27acの修飾部位をゲノムワイドに決定する共に、幹細胞から分化開始時に大きく変化する部位が核内でどのように位置を変えるのか観察した。

研究成果の概要(英文)：We previously identified the epigenetic checkpoint where various epigenetic factors and modifications are changed during male germ stem cell differentiation. In this study, we identified the seed enhancers that showed drastic changes during the male germ stem cell differentiation. We also observed chromosomal localization of the genomes where DNA methylation levels were up-regulated during the stem cell differentiation.

研究分野：組織学、幹細胞学、エピジェネティクス

キーワード：生殖細胞 幹細胞 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

体の中には2種類の幹細胞がある。一つは、ES細胞やiPS細胞に代表される胎児型の多能性幹細胞で、体の3胚葉成分全てに分化する能力を持っている。一方、血液、消化管、精巣に代表される成体の組織には、消費される組織の恒常性を保つために、成体型の組織幹細胞が存在し、個体の一生、幹細胞を維持しながら、不足する分化細胞を補う。これら幹細胞は、自己複製するか分化するかを、フィードバック機構などからの情報を元に制御している。これまで造血系などで、過剰な幹細胞の増幅が、幹細胞の枯渇を引き起こすことが示されており、この幹細胞維持機構の破綻は生体の死に繋がる(Yamada et al. Cell Cycle. 2013)。精巣においては、最初の1個の細胞をAs精原細胞と呼び、これが幹細胞であると信じられてきた。As精原細胞は、細胞間橋で繋がりながら分裂を繰り返す。分裂した細胞は、鎖の数に合わせて、2個の細胞をApr精原細胞、4個以降の細胞をAal4, Aal8精原細胞...と呼称する。これまでのこの領域の幹細胞研究の中心は、Asを始めとする未分化性が高いと思われる細胞に、特異的に発現しているマーカーや、未分化性が高い細胞を増幅させるサイトカインの探索を行い、それらを用いて、幹細胞とはどのような細胞であるか解析するものであった。その結果、幾つもの未分化マーカーや増殖因子も同定され、精巣の幹細胞の体外培養も可能となった。その一方で、As精原細胞のみ発現する特異的マーカーはほとんどなく、Asばかりでなく、Apr、Aal精原細胞まで発現するものがほとんどであり、さらに、その双方の発現が一致せず、逆にどれが本当の幹細胞なのか混沌とした状態になっている。また、これまで2、3種類の、As精原細胞のみに発現するマーカーが同定されている。しかし、それらはAs精原細胞の一部にしか発現しておらず、これが、幹細胞がAs精原細胞の一部だけであることを意味しているのか不明である。さらに、麻酔下の生きたマウスを用いた、GFPでラベルされた精原細胞のタイムラプス顕微鏡による解析の結果、精原細胞の鎖が干切れAs精原細胞が新たに生まれることが示された(Hara et al. Cell Stem Cell. 2014)。これらの証拠から、As精原細胞ばかりでなく、もっと分裂した細胞も幹細胞として均一な『幹細胞のプール』として存在している可能性がある、と、我々のグループも含めて提唱している(Shirakawa et al. Development. 2013)。

一方、我々は、遺伝子で幹細胞を同定することにこだわらず、より高次に遺伝子発現制御をコントロールするエピジェネティクスの視点から、幹細胞を俯瞰する研究を行ってきた。その結果、AsとAal精原細胞の間では、エピゲノムは調べた限り変化は認められなかったが、その代わりに、Aal精原細胞からA1精原細胞、即ち、マーカー的には、膜型チロシンキナーゼであるc-Kitが発現する分化段階で、急激に、いくつものエピゲノムが変化することを明らかにし、その時期をエピジェネティック・チェックポイントと名付けた。(Shirakawa et al. Development, 2013)その変化するエピゲノムとして、DNAメチル基転移酵素、H3K9me2修飾と、それを介在する酵素であるGLP、H3K9me3修飾などが観察された。これらの結果から、精巣の成体の幹細胞の存在様式は、これまで言われていたAs精原細胞のみが幹細胞であるという説とは異なり、c-Kitが発現する以前の、As、Apr、Aal精原細胞全てに幹細胞としての能力が残っているのではないかと、という仮説を立て、その検証を行うこととした。

## 2. 研究の目的

我々は、幹細胞が、'自己複製する'か'分化するか'の決断過程に、ゲノム修飾がどのように関与しているか、精巣幹細胞システムをモデルに一貫して研究を行ってきた。その研究の最大の質問は、エピジェネティック・チェックポイントにおいて、ゲノム修飾は、幹細胞活性の喪失を引き起こすのにどのように働くのであろうか、という点である

最近、ES細胞分化に伴い変遷するSeed enhancerが、H3K4me1やH3K27Ac(アセチル化)などのゲノム修飾の有無により網羅的に追跡可能であることが示された(Factor et al. Cell Stem Cell. 2014)。多能性幹細胞におけるSeed enhancerは、特定の組織に運命決定されると、多くの転写因子結合領域を持ち、細胞の性質や特性の違いをよく反映すると言われるSuper enhancer領域となるものが多々ある。そこで、精子幹細胞におけるSuper enhancer

について、我々が見出したエピジェネティック・チェンクポイントにおいて、急激に変化する部位を同定することを目的とした。また、遺伝子発現を抑制するヒストン修飾 H3K9me2 も、エピジェネティック・チェンクポイントで大きく変化するゲノム修飾である。この修飾は、台形状にゲノム上に挿入される特徴があり、その挿入領域は、核膜との接触に必要であるという報告がなされている。そこで、本研究において、エピジェネティック・チェンクポイントにおいて、急激に変化する同部位を同定することを目的とした。

近年、核内には遺伝子発現が活性化される領域、不活性化される領域といった構造的テリトリーの存在が証明されている (Cremer et al. Curr Opin Cell Biol. 2006)。そこで、Super enhancer や H3K9me2 の修飾を受ける場所や、それが存在する染色体の核内局在が、エピジェネティック・チェンクポイントにおいて、変化するのかを検証することが、本研究の最終目的である。

### 3. 研究の方法

#### (a) 成体精巣からの、幹細胞、前駆細胞分画の純化

成体の精巣より、幹細胞活性を持つ精原細胞分画を、GFR 1 (GDNF 受容体 鎖) プロモーター制御下に GFP を発現するマウスを用い、[ GFP 陽性 c-Kit 陰性分画 ] として、また幹細胞活性を喪失した精原細胞分画を Neurogenin3 プロモーター制御下に GFP を発現するマウスを用い、[ GFP 陽性 c-Kit 陽性分画 ] として純化した。これらの細胞分画は、セルトリ・ライディッヒ各細胞を始めとする体細胞は混じらず高純度であることは、定量的 PCR にて各細胞種の遺伝子発現パターンを調べ確認した。

#### (b) 次世代遺伝子解析装置による Super enhancer や他のゲノム修飾箇所の同定

上記、の分画を蛍光細胞分取装置 (FACS) で純化した細胞をクロマチン免疫沈降法用に処理し、目的とするヒストン修飾を特異的に認識する抗体を用いてクロマチン免疫沈降実験を行った。免疫沈降によって得られた DNA を用い、次世代遺伝子解析装置 HiSeq2000 用ライブラリーを作成し、全ゲノムレベルで上記 3 つの修飾をもった領域を同定した。

#### (c) 可視化-核内構造の微細解剖学

幹細胞分化に伴いゲノムの位置取りがどのように動くのか、凍結切片の各標本を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて FISH 法により詳細に観察した。また、2 つの染色体を染める市販のプローブを用いて、幹細胞分化に伴い細胞分裂間期の染色体配置がどのように変化したのか、観察した。

### 4. 研究成果

c-Kit 陰性精原細胞と、c-Kit 陽性精原細胞分画において、*de novo* DNA メチル化酵素の発現は大きく異なるが、これまでに得られている DNA メチル化のデータにおいては、c-Kit 陰性と陽性の分画で、それに見合うほど、劇的な DNA メチル化の違いは認められない。しかし、c-Kit 陰性から陽性へ変わるところで、DNA メチル化レベルが上昇する領域や、逆に下降する領域が認められている。そこで、c-Kit 陰性から陽性へ分化する際に、発現調節領域に相当するゲノム領域のメチル化が上昇する領域、下降する領域、変わらない領域の 3 つを抽出し、その領域に相当するゲノム領域をプローブに、*in situ* 法による核内配置の検討を行った。c-Kit 陰性から陽性になる際に、DNA メチル化が上昇し、その領域の遺伝子発現が上昇する遺伝子 (ヒストン脱メチル化酵素) は、c-Kit 陽性時に、核内配置は、外側から内側に有意に移動した。また、逆に、c-Kit 陰性から陽性になる際に、DNA メチル化が上昇し、その領域の遺伝子発現が下降する遺伝子で、Guanine Nucleotide Exchange Factor 蛋白に属する分子は、核の内側から外側へ移動した。さらに、c-Kit 陰性から陽性になる際に、DNA メチル化が不変な

領域にある、ある ncRNA 遺伝子は、発現レベルは変わらず、その領域も核の外側のままで移動しなかった。核内のゲノムのトポロジーと、その領域の遺伝子発現を調べると、核内の内側に、発現遺伝子が存在することが多いことが知られている。本研究は、全体像の各 1 locus を見ただけに過ぎない。しかし、DNA メチル化が原因か結果かは不明であるが、DNA メチル化/遺伝子発現状態と、核内のその存在領域に関連があることを示唆する結果が得られたのではないかと考えている。また、同時に、以前からの研究の継続として、未分化精原細胞のマーカである *plzf* がコードされている染色体 9 番と、前駆細胞に相当する精原細胞に発現している *c-kit* がコードされている染色体 5 番の、c-Kit 陰性、c-Kit 陽性の各精原細胞における核内での位置取りについて、より多くのサンプルを解析してきた。その結果、c-Kit 陰性、陽性の精原細胞間での、2 つの染色体の核内配置に関する特徴には、統計学的有意差がなかった。即ち、少なくとも、この 2 つの分化状態の違いで、染色体全体の核内配置が大きく変化することは、染色体 5 番、9 番に関しては起こっていないと考えられた。

さらに本研究では、H3K9me2, H3K4me1, H3K27ac の 3 つのクロマチン免疫沈降実験を行った。まず、H3K4me1, H3K27ac の 2 つのクロマチン免疫沈降実験結果から、c-Kit 陰性精原細胞に特異的に存在している Super enhancer、c-Kit 陽性精原細胞にのみ存在している Super enhancer を同定した。現在、詳細な解析を行っているところであるが、今後、この 2 つの、それぞれの Super enhancer 領域が制御する遺伝子群を同定することにより、幹細胞の維持や、分化開始時における、同定した Super enhancer の持つ意義を明らかにしていきたい。また、H3K9me2 のゲノムワイドな解析を行い、現在、c-Kit 陰性、陽性の各細胞群で異なる修飾領域について、幹細胞分化における生理学的意味を探索中である。

現在の課題として、すでに取得している DNA メチル化領域の同定手法は、バイサルファイト法を用いるため、メチル化シトシンとハイドロキシメチル化シトシンの区別がつかない。今後、その区別を行うことにより、真の DNA メチル化の精子幹細胞分化における意義が、正確に理解されると期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 5 件 )

1. Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, Watanabe K, Mizoguchi K, Hoshi I, Nakajima K, Nakabayashi J, Singh S, Dahl A, Alexopoulou D, Seki M, Suzuki Y, Royo H, Peters A. H.F.M, Anastassiadis K, Stewart A.F. and Ohbo K. 査読あり

Kmt2b conveys monovalent and bivalent H3K4me3 in spermatogonial stem cells at germline and embryonic promoters

Development. 145(23). 2018. pii: dev169102. doi: 10.1242/dev.169102.

2. Dong Y, Isono KI, Ohbo K, Endo TA, Ohara O, Maekawa M, Toyama Y, Ito C, Toshimori K, Helin K, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Yamagata K, Kitabayashi I, and Koseki H. 査読あり

EPC1/TIP60-mediated histone acetylation facilitates spermiogenesis in Mice.

Mol Cell Biol. 37(19). 2017. pii: e00082-17. doi: 10.1128/MCB.00082-17.

3. Ohbo K. and Tomizawa S, 査読あり

Epigenetic regulation in stem cell development, cell fate conversion, and reprogramming.

Biomolecular Concepts. 6:1-9. 2015.

doi: 10.1515/bmc-2014-0036

4. Zhou Z, Shirakawa T, Ohbo K, Sada A, Wu Q, Hasegawa K, Saba R. and Saga Y. 査読あり

The RNA binding protein Nanos2 organizes a post-transcriptional buffering system to retain primitive state of mouse spermatogonial stem cells.

Dev Cell. 34:96-107. 2015.

doi: 10.1016/j.devcel.

5. Kubo N, Toh H, Shirane K, Shirakawa T, Kobayashi H, Sato T, Sone H, Sato Y, Tomizawa S, Tsurusaki Y, Shibata H, Saitsu H, Suzuki Y, Matsumoto N, Suyama M, Kono T, Ohbo K. and Sasaki H. 査読あり

DNA methylation and gene expression dynamics during spermatogonial stem cell differentiation in the early postnatal mouse testis.

BMC Genomics. 216:624. 2015.

doi: 10.1186/s12864-015-1833-5.32.

〔学会発表〕(計6件)

1. 小林裕貴 (中8名)大保和之. エピジェネティックな機構を介した精子発生制御メカニズムの解析, 第124回日本解剖学会総会・全国学術総会, 2019年

2. Ohbo K, Tomizawa S, Kobayashi Y, Royo Helene, Peters A. HFM, Anastassiadis K, Stewart A.F.

Kmt2b primes spermatogonia stem cells with monovalent and bivalent chromatin for germline and embryonic development

EMBO Workshop: From Epigenome towards Epi-transcriptome in Cell Fate Choice, 2018年

3. Tomizawa S, Kobayashi Y, Shirakawa T, (中4名) A. astassiadis K, Stewart AF, Ohbo K.

Kmt2b is required for spermatogenesis through both bivalent and monovalent priming of the spermatogonial stem cell epigenome

EMBO Conference: Nuclear structure and dynamics, 2017年

4. 大保和之. シンポジウム“精巣研究の最前線”ゲノム修飾からみた成体精巣幹細胞分化機構. 第121回日本解剖学会総会・全国学術集, 2016年

5. 大保和之. シンポジウム4『配偶子形成・受精・着床の最先端研究』「精子幹細胞分化に関わるゲノム修飾機構の解析」, 第57回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 2016

6. 大保和之. シンポジウム1『生殖細胞の産生制御機構』「エピジェネティクスの視点から見た精原幹細胞分化」, 第60回日本生殖医学会, 2015年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~finemorp/index.html>

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松本 直通

ローマ字氏名：Matsumoto Naomichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。