

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12764

研究課題名(和文) 仔マウスの行動に対する雄生殖細胞の次世代継承エピゲノム変化に関する研究

研究課題名(英文) Epigenetic changes of male germ line cells affecting behavior of offspring in mice

研究代表者

大隅 典子 (OSUMI, Noriko)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00220343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Pax6遺伝子変異ヘテロ接合(Sey)雄マウスより得られた精子と、若齢の野生型雌マウス卵子を人工授精して得られた仔マウスにおいて、精子の由来が若齢か高齢によって、リスク因子を受け継いだSeyマウスの行動の表現型が異なることを明らかにした。また、野生型マウスの若齢および高齢の精子のメチル化について全ゲノム解析を行うことにより、高齢精子において若齢精子と異なるDNAのメチル化領域(DMRs)を同定した。DMRsの近傍には神経機能や神経細胞に關与する遺伝子が濃縮されていることがわかり、父加齢によるDMRsの成立が子孫の発達障害のリスクとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Young or aged sperm cells of Pax6 mutant heterozygous (Sey) mice were fertilized in vitro with young wild type (WT) female eggs to obtain offspring. Comprehensive behavior analyses showed different phenotypes in Sey offspring derived from young or aged sperm compared with WT littermates. DNA methylome analyses on the whole genome of sperm obtained from young or aged WT revealed differentially methylated regions (DMRs) in the aged sperm. These DMRs were enriched with GO terms involved in neuronal functions and neurons, suggesting that paternal aging may cause neurodevelopmental disorders via establishing the DMRs.

研究分野：神経発生学

キーワード：加齢精子 エピゲノム変化 DNAメチル化 ターゲットメチローム

1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症の発症機序として、高い遺伝一致率から遺伝的要因が大きいことが示唆されてきたが、他にも母体の感染や薬物暴露、父の高齢化などの非遺伝的要因が関与することが報告されている。また最近、心理的ストレス環境や栄養不良は精子のエピゲノム変化を引き起こすばかりでなく、これらを経験した雄に由来する仔は表現型の異常を示す個体の多いことが報告された。このような事象は、雄の経験した環境の影響がエピゲノム情報として精子に記録され、その一部は何らかの機構を介して発生の過程を通じて維持されることを示唆している。このような背景から、次世代個体の表現型に影響する情報としての精子エピゲノムの重要性に着目が集まりつつある。

2. 研究の目的

本研究は、マウスをモデルとして、父加齢の次世代への影響とその背景となるエピゲノム変化について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

若齢および高齢の野生型もしくは *Pax6* 遺伝子変異ヘテロ接合雄マウスと、野生型の雌マウスに由来する仔マウスを用いて、行動解析を行う。精子エピゲノムの様態を解析するために、若齢および高齢の精子のメチル化について全ゲノム解析を行う。

4. 研究成果

父加齢以外の要因を限りなく排除するため、若齢および高齢の *Pax6* 遺伝子変異ヘテロ接合雄マウス精子と、野生型の雌マウス卵子を人工受精させて得られたに由来する仔マウスを用いて各種行動テストを行ったところ、父方より *Pax6* 遺伝子変異を受け継いだ仔マウスにおいて、父が若齢の場合には音声コミュニケーションの異常が、父が高齢の場合には多動傾向が認められた。すなわち、同じ遺伝的リスク因子を受け継いだ場合でも、父の加齢程度によって、仔の表現型が異なることが明らかとなった。これは世界で初めての報告であり、大学よりプレスリリースを行い、新聞報道等に繋がった。

父加齢によるエピゲノム変化のメカニズムについて探索するため、若齢および高齢野生型マウス精子を用いて、精子ゲノムの CpG 領域を選択的に濃縮した後に包括的な DNA メチル化解析を行うことにより、高齢由来の精子において変化する DNA メチル化領域を効率的に検出する手法を試みた。その結果、従来法の 100 分の 1 の総リードで、1x 以上のカバレッジでは 8 割程度、10x 以上のカバレッジでは 5 割程度のマッピング効率となり、大幅な改善が認められた。精子ゲノム全体でのメチル化レベルは若齢精子 (4 検体) では

33.3%-34.6%、高齢精子 (9 検体) では 27.7%-36.2% となり両群間で同等であった。MOABS を用いて高齢精子において有意に変化している DAN メチル化領域 (differentially methylated regions; DMRs) を探索したところ、約 100 のゲノム領域が DMRs として検出された。興味深いことに、これらの DMRs の近傍に存在する遺伝子の GO を解析したところ、学習や神経機能に関与するものが有意に濃縮されていることが明らかとなった。また、モチーフ解析により DMRs に特異的に結合しうると思われる転写制御因子の結合配列が濃縮していることが見出されたことに加え、ChIP-seq データベース (ChIP-Atlas) を用いた検索からも DMRs に結合する候補分子として同じ転写制御因子が最上位にリストされた。

以上より、高齢による精子 DNA メチル化の変化が何らかの生物学的機構に基づいている可能性が示唆された。さらに、DMRs の近傍には学習や神経機能に関与する遺伝子が濃縮されていることより、加齢による DMRs の成立が子孫の発達障害や精神疾患のリスクとなる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

1) Yoshizaki, K., Furuse, T., Kimura R., Tucci, V., Kaneda, H., Wakana, S., Osumi, N.: Paternal aging affects behavior in Pax6 mutant mice: a gene/environment interaction in understanding neurodevelopmental disorders. PLoS ONE, 11(11), e0166665, 2016. 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pone.0166665

2) Sakayori, N., Tokuda, H., Yoshizaki, K., Kawashima, H., Innis, S.J.M., Shibata, H., Osumi, N.: Maternal nutritional imbalance between linoleic acid and alpha-linoleic acid increases offspring's anxious behavior with a sex-dependent manner in mice. Tohoku J Exp Med, 240(1), 31-37, 2016. 査読有.
DOI: 10.1620/tjem.240.31

3) Matsumata, M., Inada, H., Osumi, N.: Fatty acid binding proteins and the nervous system: Their impact on mental conditions. Neurosci Res 102, 47-55, 2016. 査読有.
DOI: 10.1016/j.neures.2014.08.012

4) 大隅典子: 神経新生の分子機構と脳機能: 精神神経疾患の治療・介入へのターゲット. 心身医学 56(6), 571, 2016. 査読無.
<http://jglobal.jst.go.jp/public/201602227605314016>

5) 大隅典子、木村龍一：エピゲノムの遺伝(6)精子形成過程におけるエピゲノム修飾と次世代への影響. *Bio Clinica* 31(5), 470-474, 2016. 査読無.
<http://jglobal.jst.go.jp/public/201602285122474322>

6) 大隅典子：自閉症モデルとしての齧歯類母子分離超音波発声. *ベビーサイエンス* 15, 13-14, 2016. 査読無.
<http://www.crn.or.jp/LABO/BABY/LEARNED/15.html>

7) Sakayori, N., Kikkawa, T., Tokuda, H., Kiryu, E., Yoshizaki, K., Kawashima, H., Yamada, T., Arai, H., Kang, JX, Katarigi, H., Shibata, H., Innis, S.M., Arita, M., Osumi, N.: Maternal dietary imbalance between omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids impairs neocortical development via epoxy metabolites. *Stem Cell*, 34(2), 470-482, 2015. 査読有.
DOI: 10.1002/stem.2246

8) Kimura, R., Yoshizaki, K., Osumi, N.: Dynamic expression patterns of Pax6 during spermatogenesis in the mouse. *J Anat* 227(1), 1-9, 2015. 査読有.
DOI: 10.1111/joa.12318

9) Osumi, N., Guo, N., Matsumata M., Yoshizaki, K.: Neurogenesis and sensorimotor gating: bridging a microphenotype and an endophenotype. *Curr Mol Med*, 15(2), 129-137, 2015. 査読有.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25732150>

[学会発表] (計 15 件)

1) 吉崎 嘉一、小池 佐、木村 龍一、吉川 貴子、沖 真弥、稲田 仁、松居 靖之、河野 友宏、大隅典子：父加齢が次世代の行動に影響を与えるエピジェネティックなメカニズム：新たな自閉スペクトラム症モデルの提案. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、長崎大学坂本キャンパス (長崎県長崎市)、2017 年 3 月 28 日

2) 大隅典子：個性の生まれる源に関する生物学的考察、JST CREST「認知ミラーリング」キックオフシンポジウム、東京大学先端科学技術研究センター (東京都目黒区)、2017 年 3 月 26 日

3) 大隅典子：父加齢による次世代個体の行動への影響：エピジェネティックな背景と神経発達障害モデルの可能性、第 90 回日本薬理学会年会、長崎ブリックホール・長崎新聞

文化ホール (長崎県長崎市)、2017 年 3 月 17 日

4) 木村龍一、吉崎嘉一、小池佐、小池航平、吉川貴子、稲田仁、松居靖久、河野友宏、大隅典子：父加齢による精子の DNA メチル化変化は仔の行動や遺伝子発現に影響する、第 39 回分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016 年 11 月 30 日

5) Kimura R., Yoshizaki K., Koike T., Koike K., Kikkawa T., Inada H., Matsui Y., Kono T. and Osumi N.: Paternal aging-induced differential DNA methylation in sperm: possible transgenerational effects on gene expression and behavior in offspring, *Neuroscience* 2016, San Diego; USA, November 13, 2016

6) Osumi N.: Paternal aging-induced differential DNA methylation in sperm: possible transgenerational effects on gene expression and behavior. *Genome Imprinting Epigenetics and Physiological Functions*, Erice; Italy, 2016 年 10 月 6 日

7) Osumi N.: Paternal aging affects offspring's behavior: its significance and possible underlying transgenerational epigenetics. *The 19th KSBNS Annual Meeting*, Seoul; Korea, 2016 年 9 月 28 日

8) 木村龍一、望月研太郎、吉崎嘉一、稲田仁、松居靖久、大隅典子：雄性生殖細胞系列における Pax6 の発現、第 9 回 Germ Cell の会、東京海洋大学大泉ステーション (山梨県北杜市)、2016 年 7 月 30 日

9) Osumi N.: Paternal aging influences offspring's behavior: its significance and possible underlying epigenetics. 第 39 回日本神経科学大会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)、2016 年 7 月 20 日

10) 木村龍一、吉崎嘉一、小池航平、稲田仁、大隅典子：次世代の自閉症様行動異常に関連する雄性生殖細胞系列のヒストン修飾変化、第 10 回エピジェネティクス研究会、千里ライフサイエンスセンター (大阪府豊中市)、2016 年 5 月 19~20 日

11) 木村龍一、吉崎嘉一、小池航平、稲田仁、大隅典子：雄性生殖細胞系列における Pax6 の発現-Pax6 の新規機能-、第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)、2015 年 12 月 1 日

12) Kimura R., Yshizaki K., Koike K., Inada H., Osumi N.: Crosstalk between paternal

Pax6 mutation and aging accelerates vocal communication. Neuroscience 2015, Chicago; USA, October 21, 2015

13) 大隅典子: Pax6 変異と父加齢の相互作用からみた次世代継承エピゲノム現象による自閉症様行動異常、第 45 回日本神経精神薬理学会・第 37 回日本生物学的精神医学会合同年会、タワーホール船堀（東京都江戸川区）、2015 年 9 月 25 日

14) 大隅典子: 父加齢が次世代の行動に与える影響に関する分子メカニズム：自閉症発症機序の理解に向けて。第 4 回日本 DOHaD 研究会学術集会、昭和大学（東京都品川区）、2015 年 8 月 2 日

15) Kimura R., Yshizaki K., Osumi N.: Dynamic expression patterns of Pax6 during spermatogenesis in the mouse. 第 13 回幹細胞シンポジウム、東京大学伊藤国際学術研究センター（東京都文京区）、2015 年 5 月 30 日

〔図書〕（計 2 件）

1) 大隅典子: 脳の形成と自閉スペクトラム症、テルモ生命科学芸術財団「生命科学 DOKIDOKI 研究室」（監修）いのちの不思議を考えよう 3 脳の神秘を探ってみよう 生命科学者 21 人の特別授業、p134-146、朝日新聞出版、2017.

2) 大隅典子: 脳から見た自閉症～「障害」と「個性」のあいだ。講談社ブルーバックス。254pp. 2016.

〔その他〕

1) 東北大学プレスリリース
「世界初：一遺伝子変異の遺伝的リスクと父の加齢との関係性を説明 ～ 発達障害を理解するための遺伝子-環境因子相互作用の可能性について～」2016 年 11 月 18 日
<http://www.med.tohoku.ac.jp/news/3310.html>

2) 新聞報道
「父の加齢が仔の行動異常に関係」
科学新聞 4 面 2016 年 12 月 2 日付

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大隅 典子 (OSUMI, Noriko)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00220343

(2) 研究分担者

稲田 仁 (INADA, Hitoshi)

東北大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：60419893

吉崎 嘉一 (YOSHIZAKI, Kaichi)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50393161