

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18386

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素Kdm2aによる精原幹細胞の分化制御機構の解明

研究課題名(英文) The histone demethylase KDM2A regulates differentiation of spermatogonia in mice.

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒストンH3K4/H3K36の脱メチル化 酵素であるKdm2a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Kdm2a KO(Kdm2a cKO)マウスを作成しその解析を行った。その結果、Kdm2a cKOマウスでは未分化精原細胞から分化型精原細胞への移行が著しく抑制され重篤な精子形成不全が起こることを明らかにした。また、Kdm2a cKOマウスの精原細胞を用いたChIP-seqとマイクロアレイ解析の結果から、Kdm2aはmTORCの活性化を制御することにより精原細胞の自己複製と分化のバランスを制御するという新たなモデルが示された。

研究成果の概要(英文)：Modifications of histone residue, known as epigenetics, play important roles for development or differentiation of various types of cells including germ cells. KDM2A, a protein catalyzing demethylation of H3K4 or H3K36, is highly expressed in testis, whereas its roles in spermatogenesis is poorly understood. In this project, we have developed germ cell specific Kdm2a conditional knockout mouse (Kdm2a-cKO) and determined functional roles of KDM2A on spermatogenesis. Germ cell-specific Kdm2a-cKO mouse are totally infertile, and showed drastic abnormality in spermatogenesis, e.g., few sperm could be recovered from epididymis. Further analysis have revealed that mTORC activity, and important signal transduction for inducing differentiation of spermatogonia, is significantly weaker in the Kdm2a-cKO spermatogonia. These results indicated Kdm2a regulates spermatogonial differentiation by modulating mTORC activity.

研究分野：発生工学

キーワード：精原細胞 精原幹細胞 精巢 ヒストン 精子形成 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の個体を構成する細胞は、一部の免疫担当細胞を除いて基本的に同一のゲノムを有している。その一方で、各組織の細胞はそれぞれに特異的な遺伝子発現とそれに基づいた生理機能を発揮しており、分化段階や組織特異的に遺伝子発現を調整する分子機構が、個体の発生やホメオスタシスを維持する上で不可欠である。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。とりわけ、生殖細胞の発生過程ではエピジェネティックの修飾が著しく変動すること、ならびにエピジェネティクスを制御する遺伝子をノックアウトしたマウスモデル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に不可欠であることが強く示唆される。

2. 研究の目的

ヒストンのメチル化は、エピジェネティックな制御を司るキーファクターの一つである。本申請において注目するヒストン脱メチル化酵素 Kdm2a は、ヒストン H3K36 を脱メチル化する。H3K36 のメチル化は近傍の遺伝子の発現を亢進することから、その脱メチル化酵素である Kdm2a は標的遺伝子の発現抑制因子として働くと考えられている。申請者はこれまでに、Kdm2a のホモログ遺伝子であり同様のヒストン脱メチル化活性を持つ Kdm2b/Fbx10(以下 Fbx10 とする)を欠損したマウスにおける精子形成について解析を行い、Fbx10 欠損マウスでは精原細胞に早期加齢が生じ、持続的な精子形成に異常が生じることを突き止めている (Ozawa et al., 2016, Biol Reprod)。一方、定量的 PCR 法を用いた申請者の予備解析の結果、精巣において Kdm2a は Fbx10 よりもさらに高度に発現していることが明らかであるものの、その機能的役割の詳細はこれまでにほとんど明らかにされていない。そこで申請者らは胚齢 7.5 日前後から生殖細胞特異的に Cre を発現する Nanos3Cre マウスと Kdm2a flox マウスを交配させることで Kdm2a conditional KO (cKO) マウスを作成し表現型解析を行ったところ、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を観察した (右図、左側 2 枚、H&E 染色)。その一方で、興味深いことに未分化精原細胞 (PLZF 陽性) はむしろ cKO マウスの精細管において野生型と比較して著しい増加を示した。この結果は、精原幹細胞の自己複製と分化のバランスが Kdm2a 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、本申請では「Kdm2a を介したヒストンのエピジェネシスが精原幹細胞における自己複製と分化のスイッチングを制御する」という仮説を設定しその検証を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1) Kdm2a 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 Kdm2a flox マウスを交配させて得られる Kdm2a 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 Kdm2a 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、Kdm2a 欠損 GSC の自己複製能と分化能を評価した。

2) Kdm2a 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、発現差の見た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

1) 生殖細胞特異的に Kdm2a 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った。このことから、Kdm2a を欠損しても、培養下での自己複製能は維持していることが明らかになった。ついで、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未分化性を解析した。その結果、Kdm2a 欠損 GSC では Control と比較して未分化マーカーの発現が高く、また一部の分化マーカーにおいて有意な低下が確認された。この結果から、Kdm2a 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。

2) トランスクリプトーム解析の結果、Kdm2a 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、Kdm2a 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/Ddit4 の発現が亢進していたことから、Kdm2a 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、Kdm2a 欠損 GSC では mTORC1 の活性化が抑制されていること、および新生仔の精巣中の精原細胞においても mTORC1 シグナルの抑制が観察された。以上の結果より、Kdm2a 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

う新らたなモデルが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Tribulo P, Moss JI, Ozawa M, Jiang Z, Tian XC, Hansen PJ. WNT regulation of embryonic development likely involves pathways independent of nuclear CTNNB1. **Reproduction** 2017;153:405-419

Ozawa M, Fukuda T, Sakamoto R, Honda H, Yoshida N. The Histone Demethylase FBXL10 Regulates the Proliferation of Spermatogonia and Ensures Long-Term Sustainable Spermatogenesis in Mice. **Biol Reprod**. 2016;94:1-11

Ozawa M, Sakatani M, Dobbs K, Kannampuzha-Francis J, Hansen PJ. Regulation of gene expression in the bovine blastocyst by colony stimulating factor 2. **BMC Research Notes** 2016;9:250

Zhang X, Chen H, Wu X, Kodani A, Fan J, Doan R, Ozawa M, Ma J, Yoshida N, Reiter JF, Black DL, Kharchenko PV, Sharp PA, Walsh CA. Cell-Type-Specific Alternative Splicing Governs Cell Fate in the Developing Cerebral Cortex. **Cell** 2016;166:1147-1162

Yang QE, Ozawa M, Zhang K, Johnson S, Ealy AD. The requirement for protein kinase C delta (PRKCD) during preimplantation bovine embryo development. **Reprod Fertil Dev** 2016;28:482-490

〔学会発表〕(計 3 件)

Ozawa M, Kawakami E, Tokunaga A, Sakamoto R, Yoshida N. The histone demethylase KDM2A regulates differentiation of spermatogonia in mice. **World Congress of Reproductive Biology** (2017)

Ozawa M, Ikawa M, Yoshida N. Polypyrimidine tract binding protein (Ptbp1) expression by Sertoli cells is essential for sperm production. **Society for the Study of Reproduction** (2018)

Ozawa M, Fukuda T, Sakamoto R, Honda H, Yoshida N. The histone demethylase FBXL10 regulates the proliferation of spermatogonia and ensures long-term sustainable spermatogenesis in mice. **Society for the Study of Reproduction** (2016)

〔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 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()