

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20101

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素Kdm5aの造精機能における作用機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of Kdm5a, the histone demethylase, in the testicular function

研究代表者

西尾 英紀(Nishio, Hidenori)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：10621063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Kdm5aを強制発現させたマウス精原細胞培養株で、Tet1、Btc、Scml2の発現が亢進し、Wnt1、Sox6、Sox8の発現が低下していた。ヒストンH3K4me3抗体を用いたChIP-qPCR assayで、Kdm5aを強制発現させたGC-1細胞でScml2の発現が亢進していた。

さらに、ヒト停留精巣におけるKDM5Aの発現とメチル化状態についての二重蛍光免疫染色の検討では、KDM5Aが強く発現している細胞では、H3K4me2/me3の発現が減少し、H3K4me1の発現が亢進していた。以上の結果より、Kdm5aがヒストン修飾を介して精子形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated Kdm5a-gfp expression vectors and transfected the vector into GC-1 cells, which is a mouse spermatogonial cell line. By using microarray analysis, we identified genes that were altered by Kdm5a expression. The microarray analysis revealed high expression levels of Tet1, Btc, and Scml2, and low expression levels of Wnt1, Sox6, and Sox8 in cells transfected with Kdm5a-gfp. The ChIP-qPCR assay with H3K4me3 antibody showed that the expression level of Scml2 was higher in the Kdm5a-transfected cells.

Moreover, human undescended testes were evaluated by double immunofluorescence staining. The expression of H3K4me2/me3 decreased in the cells which KDM5A expressed strongly, while the expression of H3K4me1 increased in the cells which KDM5A expressed weakly. Therefore, we suggest that Kdm5a is involved in differentiation in the early stages of spermatogenesis by simultaneous regulation of gene expressions by demethylating histone H3K4.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ヒストン修飾 精子幹細胞 エピジェネティクス

### 1. 研究開始当初の背景

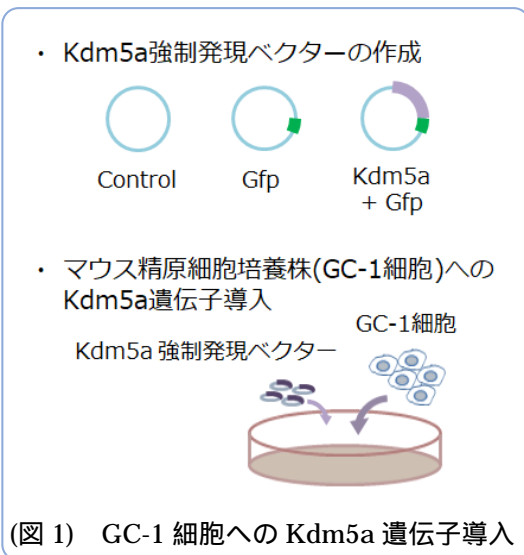
造精機能障害の主な原因に、未分化精細胞から精子幹細胞への分化障害が挙げられる。正常の精子形成では、未分化精細胞から精子幹細胞である精原細胞、精母細胞、そして精子へと分化する。私たちは、停留精巣を造精機能障害のモデルと考え、幹細胞の分化障害時期を特定し、かつ時期特異的に発現変化する Kdm5a 遺伝子を同定することに成功した。

### 2. 研究の目的

Kdm5a は脱メチル化酵素で、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子発現調節を行う。しかし、精子形成過程におけるエピジェネティックな遺伝子の発現メカニズムはほとんど未解明である。そこで本研究では、精細胞分化機序の解明のため、ヒストン修飾のマスター遺伝子である Kdm5a の機能解析を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) Kdm5a 強制発現ベクターを作成し、マウス精原細胞培養株である GC-1 細胞に Kdm5a を遺伝子導入した (図 1)。Kdm5a に制御される遺伝子の網羅的な探索のため、Kdm5a を遺伝子導入した GC-1 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。



(2) 結果(1)の候補遺伝子の中でエピジェネティックに発現制御される遺伝子に着目し、それらの遺伝子の Kdm5a によるメチル化状態

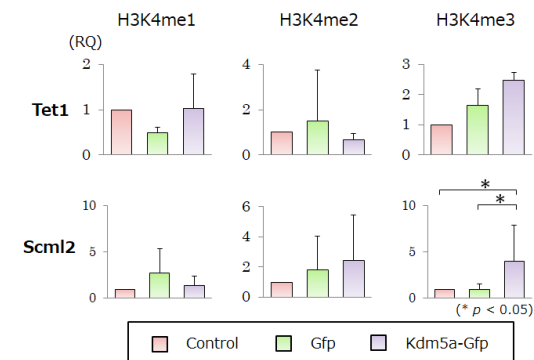
の変化について、ヒストン H3K4 抗体を用いて ChIP-qPCR assay で検討した。

(3) ヒト停留精巣と下降精巣の精巣組織を用いて、定量 RT-PCR による KDM5A および精細胞分化の関連遺伝子 (*ESR1*, *ESR2*, *GDNF*, *GFRA1*, *KIT*, *KLF4*, *MYC*, *NANOG*, *PGR*, *POU5F1*, *RET*, *THY1*) の発現について検討した。またヒト停留精巣の組織を用いて、KDM5A の発現局在と、ヒストン H3K4 のメチル化状態について二重免疫染色を用いて検討した。

### 4. 研究成果

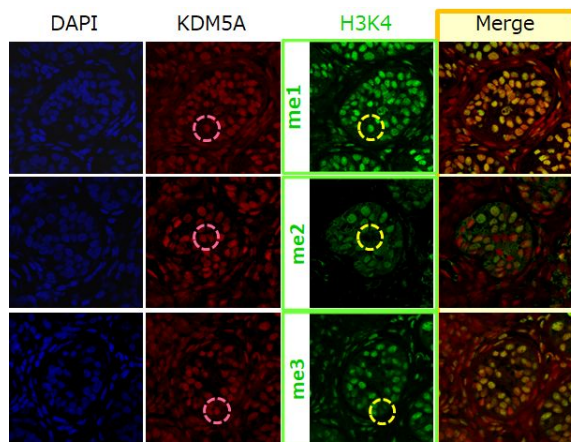
(1) Kdm5a 強発現により、Tet1 (Fold change; FC=19.4)、Btc (FC=19.4)、Scml2 (FC=16.4) が発現亢進し、Wnt1 (FC=108.2)、Sox6 (FC=26.7)、Sox8 (FC=26.4) 遺伝子の発現低下を認めた。

(2) GC-1 細胞において Kdm5a を強制発現しても、Tet1 遺伝子のメチル化状態の変化を認めなかったが、Scml2 については、H3K4me3 で発現亢進を認めた (図 2)。



(図 2) H3K4me1/me2/m3 による ChIP-qPCR assay

(3) ヒト停留精巣では、KDM5A の発現(1.54倍)が亢進し、また精細胞分化の関連遺伝子である *ESR2* の発現(1.50倍)も亢進していた ( $p < 0.05$ )。またヒト停留精巣組織において、KDM5A が発現亢進している細胞では H3K4me2 (ジメチル) および H3K4me3 (トリメチル) の発現が低下し、H3K4me1 (モノメチル) の発現が亢進していた (図 3)。



(図3) ヒト停留精巢におけるKDM5Aの局在とヒストン H3K4 抗体による二重免疫染色

本研究では、ヒト停留精巢組織でもKDM5Aの発現が亢進していることが判明した。またKDM5Aの発現が亢進している細胞では、ヒストン H3K4 は低メチル化状態だった。さらに Kdm5a を強制発現させた GC-1 細胞で、その他のエピジェネティック関連遺伝子の発現変化を認めたことから、Kdm5a がそれらの発現にも関与し、精細胞分化を制御している可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. [Nishio H](#), [Mizuno K](#), Kato T, [Moritoki Y](#), [Kamisawa H](#), [Kurokawa S](#), Nakane A, Okada A, Yasui T, [Hayashi Y](#). A rare case of epididymal abscess in an infant treated successfully with needle aspiration. *Urol Case Rep.* 13: 26-7, 2017. 査読あり
2. [Mizuno K](#), Kojima Y, [Kurokawa S](#), [Kamisawa H](#), [Nishio H](#), [Moritoki Y](#), Nakane A, Maruyama T, Okada A, Kawai N, Tozawa K, Kohri K, Yasui T, [Hayashi Y](#). Robot-assisted laparoscopic pyeloplasty for ureteropelvic junction obstruction: comparison between pediatric and adult patients-Japanese series. *J Robot Surg.* 11: 151-7, 2017. 査読あり
3. [Kurokawa S](#), [Mizuno K](#), Nakane A, [Moritoki Y](#), [Nishio H](#), [Kamisawa H](#), Kubota Y, Okada A, Kawai N, [Hayashi Y](#), Yasui T. Adrenal neuroblastoma in an adult: Effect of radiotherapy on local progression after surgical removal. *Case Rep Urol.* 2016: 2657632, 2016. 査読あり
4. [Nishio H](#), [Mizuno K](#), [Moritoki Y](#), [Kamisawa H](#), Naiki T, [Kurokawa S](#), Nakane A, Okada A, Yasui T, [Hayashi Y](#). Hemiscrotal agenesis: Pathogenesis and management strategies. *Int J Urol.* 23: 532-6, 2016. 査読あり
5. Hirose M, [Mizuno K](#), [Kamisawa H](#), [Nishio H](#), [Moritoki Y](#), Kohri K, [Hayashi Y](#). Clear cell sarcoma of the kidney distinguished from synovial sarcoma using genetic analysis: a case report. *BMC Res Notes.* 8: 129, 2015. 査読あり
6. Taguchi K, Okada A, Hamamoto S, Iwatsuki S, Naiki T, Ando R, [Mizuno K](#), Tozawa K, Kohri K, Yasui T. Proinflammatory and metabolic changes facilitate renal crystal deposition in an obese mouse model of metabolic syndrome. *J Urol.* 194, 1787-96, 2015 査読あり
7. Taguchi K, Hamamoto S, Okada A, [Mizuno K](#), Tozawa K, [Hayashi Y](#), Kohri K, Yasui T. First case report of staghorn calculi successfully removed by mini-endoscopic combined intrarenal surgery in a 2-year-old boy. *Int J Urol.* 22: 978-80, 2015 査読あり
8. Yasui T, Tozawa K, Ando R, Hamakawa T, Iwatsuki S, Taguchi K, Kobayashi D, Naiki T, [Mizuno K](#),

- Okada A, Umemoto Y, Kawai N, Sasaki S, Hayashi Y, Kohri K. Laparoscopic versus open radical cystectomy for patients older than 75 years: a single-center comparative analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 16: 6353-8, 2015 査読あり
9. **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 査読あり
10. 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*. 21: 1016-21, 2014 査読あり
11. 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 査読あり
12. 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 査読あり
13. Kawai N, Yasui T, Umemoto Y, Kubota Y, Mizuno K, Okada A, Ando R, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Laparoendoscopic single-site partial nephrectomy without hilar clamping using a microwave tissue coagulator. *J Endourol*. 28: 184-90, 2014 査読あり
14. Yasui T, Kobayashi T, Okada A, Hamamoto S, Hirose M, Mizuno K, Kubota Y, Umemoto Y, Kawai N, Tozawa K, Gao B, Kohri K. Long-term follow-up of nephrotoxicity in rats administered both melamine and cyanuric acid. *BMC Res Notes*. 7: 87, 2014 査読あり
- 〔学会発表〕(計 16 件)
1. **西尾英紀**、水野健太郎、加藤大貴、守時良演、神沢英幸、黒川覚史、中根明宏、丸山哲史、林祐太郎、安井孝周：精子幹細胞分化障害におけるヒストン脱メチル化酵素 Kdm5a の同定と機序解明。第 68 回名古屋市立大学医学会総会、2017.12.3、名古屋市
2. **西尾英紀**、水野健太郎、加藤大貴、安井孝周、林祐太郎：停留精巣で高発現する Kdm5a が造精機能障害に及ぼす影響～マイクロアレイ解析、IPA 解析を用いた検討～。第 26 回日本小児泌尿器科学会総会、2017.7.5-7、名古屋市
3. **Nishio H**, Kato T, Mizuno K, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Maruyama T, Hayashi Y, Yasui T. Kdm5a inhibits gonocyte differentiation to spermatogonial stem cells by suppressing Ret gene function via epigenetic regulation. American Urological Association Annual Meeting 2017. 2017.5.12-16, Boston, USA

4. **Nishio H**, **Mizuno K**, Kato T, **Moritoki Y**, Umemoto Y, **Hayashi Y**, Yasui T: Gene function analysis of Kdm5a, a histone demethylase, in testicular dysfunction. 第 105 回日本泌尿器科学会総会、2017.4.21-24、鹿児島市
5. **西尾英紀**, **水野健太郎**, **加藤大貴**, **守時良演**, **神沢英幸**, **黒川覚史**, **中根明宏**, **丸山哲史**, **林祐太郎**, **安井孝周**: 精子幹細胞分化におけるヒストン脱メチル化酵素 Kdm5a の同定と機能解析。第 67 回名古屋市立大学医学会総会、2016.12.4、名古屋市
6. **西尾英紀**, **水野健太郎**, **守時良演**, **林祐太郎**, **安井孝周**: 腹腔鏡下膀胱憩室切除術における術中マーキングの有用性。第 30 回日本泌尿器科内視鏡学会総会、2016.11.17-19、大阪市
7. **西尾英紀**, **加藤大貴**, **守時良演**, **林祐太郎**, **安井孝周**: 停留精巣における造精機能障害・悪性化の原因遺伝子の固定～ヒト停留精巣組織を用いたマイクロアレイによる検討～。第 25 回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、2016.6.28-30、京都市
8. **西尾英紀**, **水野健太郎**, **守時良演**, **林祐太郎**, **安井孝周**: 腹腔鏡下切除術を施行した先天性膀胱憩室の 1 例～膀胱鏡下インジゴカルミン注入による切除範囲マーキングの工夫～。第 25 回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、2016.6.28-30、京都市
9. **西尾英紀**, **水野健太郎**, **野崎哲史**, **加藤大貴**, **濱川隆**, **窪田泰江**, **梅本幸裕**, **河合憲康**, **林祐太郎**, **安井孝周**: 腹腔鏡下切除術を施行した小児膀胱憩室の 1 例。第 272 回日本泌尿器科学会東海地方会、2016.6.11、名古屋市
10. **西尾英紀**, **水野健太郎**, **林祐太郎**, **安井孝周**: VUR に対する腹腔鏡手術とロボット手術の比較～膀胱外アプローチ～。第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台市
11. **Nishio H**, **Mizuno K**, Umemoto Y, Sasaki S, Mogami T, **Hayashi Y**, Yasui T: Evaluation of the expression of KDM5A and spermatogenesis-related genes in human cryptorchid testes. 第 104 回日本泌尿器科学会総会、2016.4.23-25、仙台市
12. **西尾英紀**, **内木拓**, **河合憲康**, **安井孝周**: 腎原発未熟神経外胚葉性腫瘍の 1 例。第 18 回名市大病院カンサーボード、2016.1.22、名古屋市
13. **西尾英紀**, **水野健太郎**, **最上徹**, **林祐太郎**, **安井孝周**: ヒト停留精巣における造精機能障害のメカニズムの解明～ヒストン脱メチル化酵素 KDM5A を用いた組織学的検討～。第 24 回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、2015.7.1-3、東京都
14. **西尾英紀**: Young Doctor デイベートコンテスト 尿道下裂; 術前テストステロン投与は是か非か? 投与しない方が良い。第 24 回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会、2015.7.1-3、東京都
15. **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**, **安井孝周**: ヒストンタンパク脱メチル酵素 KDM5A によるヒト停留精巣での造精機能障害機序の解明。第 34 回日本アンドロロジー学会学術大会、2015.6.26-27、福岡市
16. **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、  
2015.4.18-21、金沢市

## 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・助教  
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

林 祐太郎 ( HAYASHI Yutaro )  
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 )