

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15173

研究課題名(和文) エピゲノム変異導入による精子形成異常の誘発と遺伝子間転写調節機構の変化

研究課題名(英文) Effect of epigenetic aberrations on germ cells and interchromosomal coordination of gene expression in mouse spermatogenesis

研究代表者

小路 武彦 (KOJI, Takehiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：30170179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成過程では全DNAのメチル化レベルは変化しないが、CCGG配列のメチル化は分化に従って増大した。5-azadC投与によるDNAの低メチル化は精祖細胞のアポトーシスを誘導する事が判明した。一方ヒストンH3のアセチル化も分化により変化するが、HDAC阻害剤バルプロ酸やSAHAを投与した所、精子細胞死を誘導するフェニルブチル酸と異なり精祖細胞死が誘導され薬剤による差意が認められた。更に、Dnmt1をノックダウンするとDNAメチル化の低下と精母細胞で染色体分布異常が見出された。PGK1とPGK2遺伝子間の距離をin situ PCR法で検討したが、切片での解析ではデータの安定性に難が認められた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we found a gradual increase of CCGG methylation till step 11-12 spermatids in normal mouse spermatogenesis unlike the case of 5-methylcytosine (5MC). To mimic the level of DNA methylation, we injected 5-azadC into mice and found that hypomethylation leads to induce spermatogonial apoptosis. Since acetylation pattern of histone H3 was known to change depending upon differentiation stage of germ cells, we examined the effect of HDAC inhibitors such as valproic acid and SAHA on spermatogenesis. Unlike Na phenylbutylate, spermatogonial apoptosis was induced, indicating the different mechanisms among drugs. When Dnmt1 was knock-downed by shRNA vector transfection, the expression of 5MC was markedly decreased, accompanying abnormalities in chromosomal distribution in pachytene spermatocytes. However, the analysis of the distance between PGK1 and PGK2 genes by in situ PCR was not successful in tissue sections, indicating a better use of isolated germ cells.

研究分野：分子解剖学

キーワード：DNAメチル化 ヒストン修飾 アポトーシス PGK1 PGK2 in situ PCR 精子形成過程 マウス精巢

1. 研究開始当初の背景

種の保存に必須な「生命の若返り」、則ち受精に向けた生命プログラムの初期化を理解する上で、生殖細胞特有な増殖・分化・死過程の制御機構の解明が必要と思われる。哺乳類精子形成過程に於いては、生殖幹細胞である精祖細胞から精母細胞、そして精子細胞へと連続的に増殖・分化するが、成熟精巣では精子換算で約 25-75%の生殖細胞がアポトーシスにより恒常的に消失しており、この頻回なアポトーシスが遺伝子組み換えを伴う生命プログラムの初期化の失敗を反映しているものと考えられる。これまで我々は、人為誘導された生殖細胞死では Fas/Fas ligand 系を介するが、最終的には正常精巣でのアポトーシス同様ミトコンドリアへ細胞死誘導シグナルは集約されることを明らかにし、国内外の他施設での精子形成障害研究の方向性の確立に貢献した。しかし、生殖細胞死誘導をミトコンドリアに発動させる「引き金」が未だに明白ではない。

一方、精子形成過程は最終的に精子核に至る規則的なクロマチンの凝集、則ちヘテロクロマチン化の過程であり、エピゲノム因子の関与が予想される。しかし、具体的に DNA のメチル化やヒストン修飾がどの様に精子形成細胞の分化過程に関与しているかは明らかではなかった。最近我々は、細胞単位で DNA の塩基配列特異的なメチル化部位を視覚化する新たな方法論、HELMET 法を独自に開発し (Koji 他 (2008) *Histochem Cell Biol* 130:917)、CCGG 配列等に関する DNA メチル化レベルの分化段階依存的な変化を見出し、これまでの知見 (Oakes 他 (2007) *Dev Biol* 307:368) の矛盾点を明らかにしつつあり、アポトーシス細胞での顕著な脱メチル化も世界で初めて報告した。更に、転写調節と密接な関係が知られるヒストン H3 のメチル化、アセチル化、リン酸化に関しても分化段階で大きく変化し (Song 他 (2011) *Acta Histochem Cytochem* 44:183)、その人為操作で精子細胞アポトーシスが生じることも見出した (Dai 他 (2014) *Histochem Cell Biol* 143:209)。しかし、ゲノムワイドなエピジェネティック因子の変動が精子形成過程に与える影響の全分化段階を見渡した網羅的な検討は皆無で、数十年前に作られた先入観が跋扈する世界となり、生殖細胞の全分化能獲得の機構解析にも弊害となっている。

2. 研究の目的

本研究では、正常新生仔及び成熟マウス精巣に於いて、DNA メチル化酵素のノックダウンや DNA メチル化阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-azadC) の腹腔内投与を行い、全分化段階の精子形成細胞の形態学的異常を検討する。また、ヒストン H3 の K9、K18 及び K23 残基のアセチル化に注目し、阻害実験としてヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) の shRNA によるノックダウンを行い、促進実

験としてはヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤である Na フェニルブチル酸 (NaPB)、SAHA 及び valproic acid を腹腔内投与し、上記と同様の検討を行う。クロマチン分布と遺伝子発現調節機能の指標としては、パキテン期の精母細胞の形態学的観察と共に、必要に応じてクロマチン凝集に關与する HP1 局在を免疫組織化学的に検討する。また糖新生系の酵素であり、それぞれ X 染色体と 17 番染色体に存在し減数分裂時に発現が徐々に切り替わるホスホグリセリン酸キナーゼアイソザイム PGK-1 と PGK-2 の遺伝子位置を上記実験系で比較検討する。これらにより、エピゲノム変異に反応する分化段階を同定し、その際の遺伝子局在や転写制御異常の有無を明らかにする。

3. 研究の方法

マウス新生仔及び正常成熟精巣に於いて、DNA メチル化レベルとヒストン H3 のアセチル化及びメチル化に関する修飾状態を HELME 法や免疫組織化学法を用いて検討し、精子形成過程での分化段階特異的なエピゲノム変化を確認する。HELMET 法では、パラフィン切片に於いて、主として CCGG 配列に注目しイソシゾマーである *Hpa* II と *Msp* I を用いて (Koji 他 (2008) *Histochem Cell Biol* 130:917) 行い、非メチル化 CCGG 配列とメチル化された C^{met}CCGG 配列との蛍光二重染色を行う。シグナルは、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM) にて細胞単位で定量的に解析する。ヒストン修飾に関してはその Lys4 及び Lys27 のメチル化と Lys9、Lys18、Lys23 のアセチル化について、特異抗体を用いて酵素並びに蛍光免疫組織化学的に染色し、各分化段階の精子形成細胞毎に染色強度と核内シグナル分布を解析する。クロマチンの分布パターンを検討するためには、DAPI 染色を基本とするが、必要に応じてクロマチン凝集に關与する HP1 の免疫染色を行う。特定の染色体間の位置関係の変化を明らかにするため、示標として X 染色体に存在する PGK1 と 17 番染色体に乗っている PGK2 の遺伝子局在を *in situ* PCR により検討する (Yamamoto-Fukuda 他 (2010) *Am J Pathol* 176:2602)。減数分裂時には、Y 染色体しか持たない精子細胞が形成されることに伴う切り替えとして、PGK1 から PGK2 への発現切り替えが生じる。続いて、*in vivo* で DNA メチル化阻害剤や HDAC 阻害剤の投与及び DNA メチル基転移酵素遺伝子やヒストンアセチル基転移酵素遺伝子に対する shRNA ベクターの電気穿孔法を用いた遺伝子導入によるノックダウンを行い、生殖細胞形成異常の誘発を検討すると共に、PGK1 及び PGK2 遺伝子の局在などを超解像顕微鏡を用いて精査し、エピゲノムの遺伝子間発現調節機構への影響を明らかにする。

4. 研究成果

精子形成過程でのエピゲノムの役割を明

らかにする上で DNA のメチル化とヒストン蛋白の修飾状況並びにその変異による影響を調べる必要がある。本研究では、まず正常精巢での DNA メチル化を検討したところ、免疫組織化学による 5-メチルシトシン(5MC)発現は殆ど変化がなかったが、HELMET 法による CCGG 配列のメチル化レベルは分化の進行に従って増大し、ステップ 11-12 で突然減少に転じ精子では最低となることが判明した。またアポトーシス細胞では CCGG 並びに GATCG 配列のメチル化レベルが激減した。そこで DNA メチル化レベルを低下させる 5-azadC 投与モデルで検討したところ、DNA の低メチル化は精祖細胞のアポトーシス誘導を引き起こすことが判明した。一方、精母細胞では 5-azadC と Dnmt1 の複合体形成が生じ、様々な異常が引き起こされた。更に Dnmt1 をノックダウンすると 5MC の低下と共に、パキテン期精母細胞での染色体分布異常が誘起されることが判明した。

次にアセチル化ヒストン H3 の発現が精子細胞分化段階特異的に変化するので、HDAC 阻害剤バルプロ酸投与の効果調べたところ、H3K9ac を増大させ精子細胞死を誘導する Na フェニルブチル酸と異なり、精祖細胞死を引き起こした。SAHA も精祖細胞死を生じたが、この場合は酸化ストレスによるものであった。一方、HAT のノックダウン実験では、SRC-1、GCN5 及び ELP-3 のうち SRC-1 のみで H3K9ac の消失と後期精子細胞死が生じることが確認された。

更に、エピゲノム変異マウスモデルでクロマチンの分布パターンの変化を検討するため、X 染色体の PGK1 と 17 番染色体の PGK2 遺伝子存在パターンを *in situ* PCR 法で検討したが、切片での解析ではデータの安定性に難が認められ、今後単離生殖細胞の解析の必要性がある。

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 7 件)

1. Liu J, Zhang W, Wu Z, Dai L, Koji T (2018) Changes in DNA methylation of oocytes and granulosa cells accessed by HELMET during folliculogenesis in mouse ovary. *Acta Histochem Cytochem*, 51(2); in press. 査読有
DOI: 10.1267/ahc.17039
2. Zhu K, Deng Y, Weng G, Hu D, Huang C, Matsumoto K, Nagayasu T, Koji T, Zheng X, Jiang W, Lin G, Cai Y, Weng G, Chen X (2018) Analysis of H3K27me3 expression and DNA methylation at CCGG sites in smoking and non-smoking patients with non-small cell lung cancer and their clinical significance. *Oncol Lett*, 15(5); 6179-6188. 査読有

DOI: 10.3892/ol.2018.8100

3. Sasabe R, Sakamoto J, Goto K, Honda Y, Kataoka H, Nakano J, Origuchi T, Endo D, Koji T, Okita M (2017) Effects of joint immobilization on changes in myofibroblasts and collagen in the rat knee contracture model. *J Orthop Res*, 35(9); 1998-2006. 査読有
DOI: 10.1002/jor.23498
4. Abe S, Obata Y, Oka S, Koji T, Nishino T, Izumikawa K (2016) Chondroitin sulfate prevents peritoneal fibrosis in mice by suppressing NF- κ B activation. *Med Mol Morphol*, 49(3); 144-153. 査読有
DOI: 10.1007/s00795-016-0133-8
5. Song N, Endo D, Song B, Shibata Y, Koji T (2016) 5-aza-2'-deoxycytidine impairs mouse spermatogenesis at multiple stages through different usage of DNA methyltransferases. *Toxicology*, 361-362; 62-72. 査読有
DOI: 10.1016/j.tox.2016.07.005
6. Muta K, Obata Y, Oka S, Abe S, Minami K, Kitamura M, Endo D, Koji T, Nishino T (2016) Curcumin ameliorates nephrosclerosis via suppression of histone acetylation independent of hypertension. *Nephrol Dial Transplant*, 31(10); 1615-1623. 査読有
DOI: 10.1093/ndt/gfw036
7. 小路武彦 (2016) 分子局在解析の歴史と展望。[脳の見える化-分子・機能局在編], *Clinical Neuroscience 別冊*, 34(6); 620-624. 査読無

〔学会発表〕(計 17 件)

1. Chojjookhuu N, Ishizuka T, Xu Y, Koji T, Hishikawa Y: Simultaneous detection of multiple mRNAs using FRET based molecular beacon probes by *in situ* hybridization. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2018 年
2. Nandar Tun, Myat Thu Soe, Endo D, Shibata Y, Koji T: Possible involvement of hypoacetylation of histone H3K9 in estrogen-dependent transdifferentiation of LH cells to PRL cells in male mouse pituitary. 第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2018 年
3. Nandar Tun, Myat Thu Soe, Endo D, Shibata Y, Koji T: Possible involvement of hypoacetylation of histone H3K9 in estrogen-dependent transdifferentiation of LH cells to PRL cells in male mouse pituitary. 46th Myanmar Health Research Congress. 2018 年
4. Chojjookhuu N, Ishizuka T, Xu Y, Koji T, Hishikawa Y: Simultaneous detection

- of multiple mRNAs using FRET based molecular beacon probes by *in situ* hybridization. 日本顕微鏡学会第 60 回記念シンポジウム。2017 年
5. 小路武彦: 分子組織細胞化学の最新の進歩と形態学の未来。神奈川歯科大学学会第 52 回総会。2017 年
 6. 柴田恭明・遠藤大輔・小路武彦: マウス精子形成細胞核における PGK 遺伝子座の分布変化と mRNA 発現解析 - In situ PCR 並びに In situ ハイブリダイゼーションを用いて -。第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。2017 年
 7. 小路武彦: 精子形成過程に於けるエピゲノム動態とその意義。第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。2017 年
 8. 遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦: マウス精母細胞に於ける Dnmt1 発現抑制が共同因子の核内発現に及ぼす影響の解析。第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。2017 年
 9. Koji T: Differentiation- dependent changes in DNA methylation and histone H3 acetylation: Possible roles of these epigenetic factors in mouse spermatogenesis. The 12th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry. 2017 年
 10. 小路武彦: エピジェネティック因子:細胞動態の新たな組織細胞化学的パラメーター。第 36 回分子病理学研究会。2017 年
 11. Choi jookhuu N, Ishizuka T, Xu Y, Koji T, Hishikawa Y: Fluorescence resonance energy transfer based molecular beacon probe for in situ hybridization. 第 36 回分子病理学研究会。2017 年
 12. Myat Thu Soe, Nandar Tun, Endo D, Shibata Y, Koji T: Changes in DNA methylation level during liver regeneration after partial hepatectomy in normal and iron-overloaded rats. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2017 年
 13. Nandar Tun, Myat Thu Soe, Endo D, Shibata Y, Koji T: Possible involvement of hypoacetylation of histone H3K9 in estrogen-dependent transdifferentiation of LH/FSH cells to PRL cells in male mouse pituitary. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2017 年
 14. Choi jookhuu N・石塚匠・徐岩・小路武彦・菱川善隆: A new strategy of FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2017 年
 15. 遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦: マウス精母細胞に於ける DNA メチル基転移酵素による染色体ダイナミクスの制御。第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2017 年

16. 遠藤大輔・柴田恭明・小路武彦: マウス精母細胞に於いて染色体動態を制御する Dnmt1 と共同在する核内因子の解析。第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会。2016 年
17. Choi jookhuu N, Ishizuka T, Xu Y, Koji T, Hishikawa Y: A new approach: FRET based molecular beacon fluorescent probe for in situ hybridization. 第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。2016 年

〔図書〕(計 2 件)

1. 小路武彦 (2018) *in situ* ハイブリダイゼーション法とその応用。[ライフサイエンス 顕微鏡学ハンドブック](山科正平、高田邦昭責任編集/牛木辰男、臼倉治郎、岡部繁男、高松哲郎、寺川進、藤本豊土編), 朝倉書店, 東京, pp. 101-106.
2. 小路武彦 (2016) *In situ* hybridization 原理と実際。[組織細胞化学 2016](日本組織化学会編), 中西印刷, 京都, pp. 67-78.

〔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
<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/anatomy3/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小路 武彦 (KOJI, Takehiko)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授
 研究者番号: 30170179

(2) 研究分担者

柴田 恭明 (SHIBATA, Yasuaki)
 長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

講師

研究者番号：80253673

遠藤 大輔 (ENDO, Daisuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

助教

研究者番号：90516288

末松 貴史 (SUEMATSU, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・

技術職員

研究者番号：70264249

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()