

令和元年5月22日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06529

研究課題名(和文)精子エイジングにおける次世代継承のエピジェネティクス

研究課題名(英文)Epigenetics of Next-Generation Inheritance in Sperm Aging

研究代表者

小林 記緒 (Kobayashi, Norio)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10803885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト加齢精子のエピゲノムの特徴と自閉症を含む精神・神経疾患との関連性について検討した。正常精子(132例)と、加齢精子(65例)のDNAメチル化について比較した。その結果、1)年齢と精子数に負の相関を認めた。精子数の減少は、喫煙や運動、食事内容との関連を示した2)乏精子症精子では、多数のインプリント遺伝子のメチル化異常を示した3)遺伝子プロモーター領域で共通のメチル化の違いを示す領域を同定した(高メチル化領域：271領域、低メチル化領域：102)。精神神経発達に関する遺伝子も変化を示した。以上より、ヒト加齢精子ではメチル化の変異が認められ、一部は神経発達との関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、疫学調査では、児の自閉症発症の頻度と父親の年齢が関連するとの報告がみられる。本研究では、ヒト加齢精子のエピゲノム変異と精神神経発達との関連性について検討した。その結果、精子のエピゲノム変異は、運動や栄養、ストレス等と関連することがわかり、適切な指導はエピゲノム変異を予防することや治療法の開発の可能性も予想された。今後、自閉症などの発症メカニズムについて検討することで、疾患発症予防、治療法の開発に繋げるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Several studies have suggested that advanced paternal age has deleterious effects on epigenetic changes. We examined the relationships between DNA methylation in the sperm of advanced age and neurodevelopmental disorders. We found a negative correlation to a sperm count and age. The unique methylation pattern was shown with the aged sperm and associated with neurodevelopmental gene regions. We found that the methylation alternations caused by exercise, smoking, and diets. Our results suggest that the underlying mechanism for the epigenetic changes may be the possibility of transgenerational epigenetic diseases of the male germ line and has the potential to provide new insights into neurodevelopmental disorders.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒト精子 DNAメチル化 エピゲノム

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近のヨーロッパ諸国の大規模なコホート調査により、児の自閉症発症の頻度に父親の年齢が影響していることが報告されている。これには、**加齢による精子の de novo のゲノム変異** (O’Roak BJ et al. Nature. 2012 他) と **エピゲノム変異** (DNA メチル化) (Jenkins TG et al. PLoS Genet. 2014) が影響することが指摘されている。

(2) 動物実験において、精子のエピゲノム変異は、次世代（孫世代）まで受け継がれる可能性も指摘されている。さらに、加齢マウスの仔において、自閉症様行動異常のリスクが高まることも報告されている (Smith RG et al. PLoS One 2009, 他)。

2. 研究の目的

本研究では、加齢によって生じた精子のエピゲノム変異と自閉症を含む精神・神経疾患との関連性について、加齢マウスとヒト精子 DNA を用いて評価することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト加齢精子のエピゲノム異常についての解析

①加齢患者精子の収集と登録：

東北大学医学部産婦人科不妊外来および不妊症専門関連病院を受診し、精液検査を受けた加齢患者（40 歳以上）の精子およびコントロール精子を収集した。精子は、精液検査後の廃棄予定の精子を用いた。

②患者情報の登録：

1) 生活習慣等に関する記述式アンケート調査：

身長、体重、職業、既往症、年収、学歴、喫煙歴、常用薬など 50 項目を実施した。

2) 食物摂取頻度調査票 (FFQ) を用いた食品項目の摂取頻度調査：

すでに再現性と妥当性について検証されている FFQ を用いて、141 の食品項目について摂取頻度を調査した。

③精子形態分類：

WHO マニュアル第 3 版による精子の頭部、頸部、尾部の異常分類を用いた。精子は体細胞の混入がないように、swim-up 法にて、精子細胞のみを回収し、DNA を抽出した。

④精子の DNA メチル化解析：

登録された患者情報に基づき、居住地、生活習慣などをマッチさせた加齢精子群とその対照群について、COBRA 法と RRBS 法を用い、DNA メチル化異常のある遺伝子領域を同定し、メチル化レベルを定量した。

(2) マウス加齢精子モデルの次世代個体の神経行動に及ぼす脳機能の解析

マウスモデルを用い、加齢による精子のエピゲノム変化と次世代個体の自閉症様症状との関連について、まず加齢マウス（18-20 ヶ月齢）と若齢マウス（4-6 ヶ月齢）より採取した精子を用い、DNA メチル化解析を行った。加齢および若齢の父マウスから得られた仔を用いて、脳の各種部位（大脳皮質、小脳、脳幹）の遺伝子発現解析、DNA メチル化解析およびヒストン修飾解析を行い、加齢に伴う精子エピゲノム異常が次世代個体の脳機能に与える影響について評価していく。

4. 研究成果

(1) ヒト加齢精子のエピゲノム異常についての解析

1) ヒト精子の収集

まず、大学倫理審査の承認を得て、研究を開始した。次に、患者精子の収集と登録を行った。東北大学医学部産婦人科不妊外来及び不妊症専門関連病院を受診し、精液検査を受けた患者の精子 (221 例の精子) を収集した。精子は、精液検査後の破棄予定の精子を用いた。さらに、患者情報の登録を行った。生活習慣等に関する記述式アンケート調査では、身長、体重、職業、既往歴、年収、学歴、喫煙率、常用薬など 50 項目を実施し、食物摂取頻度調査票 (FFQ) を用いた食品項目の摂取頻度調査も実施した。精子形態検査は、WHO マニュアル第 3 版より分類し (正常群 191 例 (>20×10⁶/ml)、乏精子症群 30 例)、swim-up 法にて精子細胞のみを回収し、DNA を抽出したものを表 1 にまとめた (表 1)。

	正常精子 (n=191)	乏精子症精子 (n=30)	P-value
Physical parameters			
Age (year)	35.48±0.40	36.77±1.18	0.422
Height (cm)	171.18±0.40	172.17±1.23	0.818
Body weight (kg)	70.89±0.80	70.58±1.72	0.909
BMI (kg/m ²)	24.17±0.25	23.82±0.54	0.634
Sperm parameters			
Volume (ml)	3.30±0.11	3.13±0.36	0.27
Motility (%)	54.40±1.26	26.90±4.22	< 0.001 **
Malformation (%)	57.37±0.75	69.40±2.20	< 0.001 **

表 1 ヒト精子の基本情報と精子性状

2) 加齢とメチル化異常の関係

196 例の精子 (乏精子症は 30 例) の男性患者の年齢、生活習慣などの交絡要因を加味し、COBRA 法によりインプリント遺伝子の DNA メチル化レベルを解析した。その結果、年齢が増加する程、精子の DNA メチル化異常の頻度は上昇した。(図 1-1) さらに、精子数が少ない乏精子症患者精子では、およそ 70% に DNA メチル化異常を認めた。年齢と精子数に負の相関があったことに加え、喫煙や運動不足も DNA メチル化変異に関連することが明らかとなった (図 1-2)。DNA メチル化異常を示した精子は、出生率の低下や流産率の上昇を示した (図 1-3)。

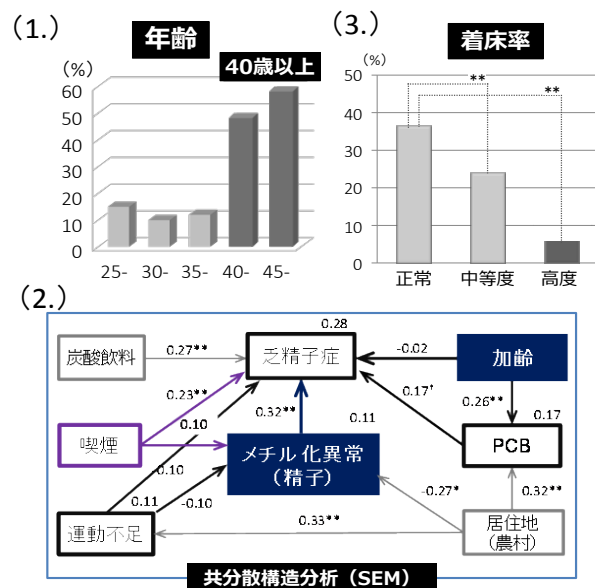


図 1 ヒト精子のメチル化異常に関する要因

3) RRBS 法によるメチル化変異の特徴

乏精子症とメチル化異常の特徴を明らかにするため、乏精子症精子をランダムに 12 例、正常精子を 8 例選別した。RRBS 法にて網羅的なメチル化の解析を行い、5 リード以上カバーされた 1,033,310 の CpG サイトについて検討した。乏精子症精子では、多数のインプリント遺伝子のメチル化の異常が認められた (図 2)。

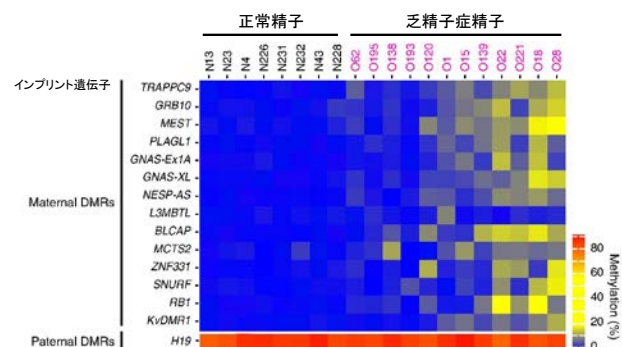


図 2 インプリント異常と乏精子症精子

さらに、プロモーター領域のメチル化の違いを認め、乏精子症で高メチル化を示す領域(271)、低メチル化を示す(102)を同定することに成功した(図3)。これらの変異のある領域を染色体上にマッピングすると染色体19番に多い傾向が認められたが、すべての染色体上に変異がみられた(図4)。また、変異の大きな領域に注目すると、精子形成に関わる遺伝子群に加え、器官形成やシナプス形成に関わる遺伝子が多いことが判明した(図5)。精神・神経発達との因子として報告されている遺伝子への変異も認められた(図6)。これらの結果より、精子数の少ない乏精子症精子では、メチル化異常の頻度および程度が大きいことが示唆された。

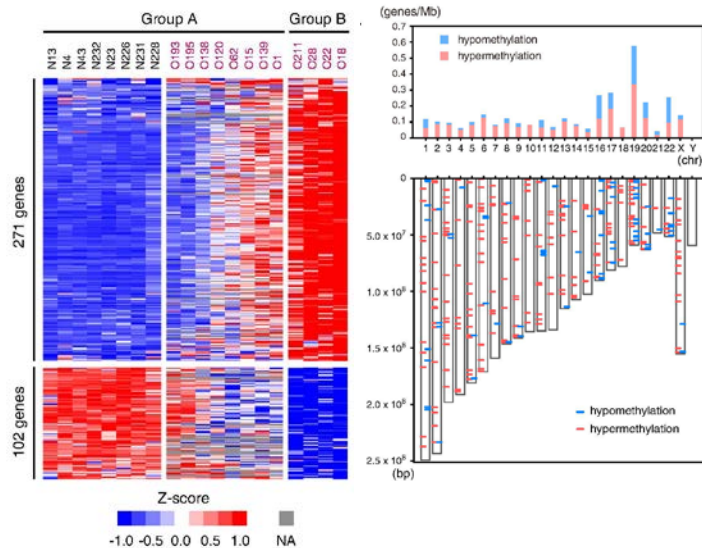


図3 乏精子症にみられるメチル化変異領域

図4 メチル化異常を示す染色体部位

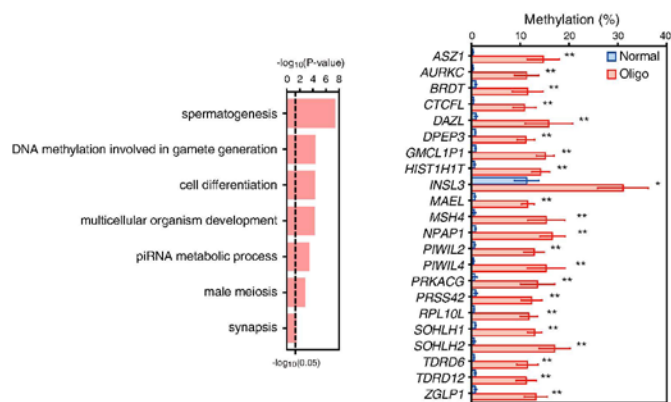


図5 メチル化異常と遺伝子機能との関連

以上の結果より、加齢によりDNAメチル化の異常がもたらされること、精子のDNAメチル化異常が受精後の妊娠率や出生率に影響を及ぼすことを明らかにした。また、これらの成果は、**Scientific Reports** 誌に投稿し、掲載された(Kobayashi N et al. 2017)。

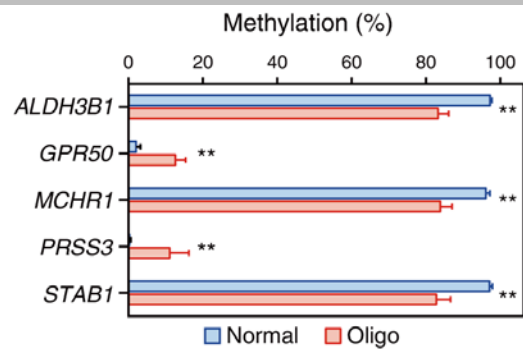


図6 精神神経関連遺伝子のメチル化変異

(2) マウス加齢精子モデルの次世代個体の神経行動に及ぼす脳機能の解析

加齢マウス(ICR)と、若齢マウス(ICR)の精子についてRRBS法にてメチル化解析を行った。RRBS法にて、加齢マウスでは、19領域に高メチル化領域と、6領域に低メチル化を認めた。また高齢精子から誕生したマウスでは、E14.5で大脳皮質が菲薄化している特徴がみられた。また、RNA-Seqによる遺伝子発現を検討すると、胎児発育に関連する遺伝子と、自閉症に関連する遺伝子に有意な差を認めた。現在、この事実が正しいかどうかマウスの系統を変え、同様の検討を行っている。また、加齢および若齢の父マウスから得ら

れた仔を用いて、脳の各種部位（大脳皮質、小脳、脳幹）の遺伝子発現解析、DNA メチル化解析およびヒストン修飾解析を行い、加齢に伴う精子エピゲノム異常が次世代個体の脳機能に与える影響について評価していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. Hattori H, Kitamura A, Takahashi F, Kobayashi N, Sato A, Miyauchi N, Nishigori H, Mizuno S, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Kuriyama S, Metoki H, Yaegashi N, Nakai K, Arima T; Japan Environment & Children's Study Group. The risk of secondary sex ratio imbalance and increased monozygotic twinning 1 after blastocyst transfer: data from The Japan Environment and Children's Study. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 17(1):27, 2019. doi: 10.1186/s12958-019-0471-1.
2. Hattori H, Hiura H, Kitamura A, Miyauchi N, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Kyono K, Kagami M, Ogata T, Arima T. Association of four imprinting disorders and ART. **Clinical Epigenetics**. 11(1):21, 2019. doi: 10.1186/s13148-019-0623-3.
3. Sugimura S, *Kobayashi N (co-first author), Okae H, Yamanouchi T, Matsuda H, Kojima T, Yajima, Hashiyada Y, Kaneda M, Kan S, Imai K, Tanemura K, Arima T, Gilchrist RB. Transcriptomic signature of the follicular somatic compartment surrounding an oocyte with high developmental competence. **Scientific Reports**. 7(1):6815, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-07039-5.
4. Hiura H, Hattori H, Kobayashi N, Okae H, Chiba H, Miyauchi N, Kitamura A, Kikuchi H, Yoshida H, Arima T. Genome-wide microRNA expression profiling in placentas from frozen-thawed blastocyst transfer. **Clinical Epigenetics**. 9:79. 2017. doi: 10.1186/s13148-017-0379-6.
5. Kobayashi N, Miyauchi N, Tatsuta N, Kitamura A, Okae H, Hiura H, Sato A, Utsunomiya T, Yaegashi N, Nakai K, Arima T. Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia. **Scientific Reports**. 7:42336. 2017. doi: 10.1038/srep42336.

〔学会発表〕（計 9 件）

1. 小林記緒, 有馬隆博. 第 14 回日本生殖発生医学会学術集会「ヒト胎盤幹 (TS) 細胞の樹立とその細胞特性」大阪. 2019.3.10 招待講演
2. 小林記緒, 有馬隆博、第 63 回日本生殖医学会学術講演会・総会「ART によるエピジェネティクスの変調」2018/9/6-7、招待講演
3. 小林記緒, 有馬隆博、第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会「ヒト胎盤のトロフォブラスト幹細胞の樹立と臨床への応用、仙台国際センター (2018/5/12) 招待講演
4. 第 25 回日本胎盤学会学術集会、「ヒト胎盤栄養膜幹細胞の樹立とエピゲノム特性」、小林記緒、長崎 (11/25/2017) 招待講演
5. 日本人類遺伝学会第 62 回大会「生殖補助医療とヒトインプリンティング疾患」、小林記緒, 樋浦仁, 神戸国際会議場 (11/16/2017) 招待講演
6. 第 35 回日本受精着床学会学術講演会「ART 由来出生児とゲノムインプリンティング」小林記緒, 有馬隆博、米子 (07/20/2017) 招待講演
7. 第 53 回日本周産期・新生児医学会学術集会シンポジウム「ART とエピジェネティクス」、小林記緒, 有馬隆博、横浜 (07/18/2017) 招待講演
8. 第 44 回日本毒性学会学術年会「PCB とヒト精子におけるエピジェネティクス」小林記緒

緒, 有馬隆博 横浜 (7/12/2017) 招待講演

9. IHEC Science Days & Annual Meeting 2017 「Derivation of Human Trophoblast Stem Cells from Blastocysts and Villous Cytotrophoblast Cells」Kobayashi N, Arima T, Okae H, Takahashi S. Berlin, Germany. (12/10/2017-14/10/2017)

〔図書〕 (計 3 件)

1. 小林記緒, 有馬隆博. ゲノムインプリンティング. Science and Practice『産科婦人科臨床』シリーズ1巻「生殖生理」. 中山書店. 2019.4 印刷中
2. Hattori H, Hiura H, Kobayashi N, Takahashi S, Okae H, Arima T. Therapeutic approaches to imprinting diseases. Epigenetics in Human Disease, Second Edition. Academic Press. 6:861-876. 2018
3. Miyauchi N, Kitamura A, Hiura H, Okae H, Kobayashi N, Hattori H, Takahashi S, Arima T. Epigenetic Alterations in Human Sperm. Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics. Springer Nature. 1-16. 2017.

※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。