

平成21年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390060
 研究課題名 (和文) 精子形成細胞アポトーシスを誘導させるエピジェネテックス因子の分子的解析
 研究課題名 (英文) Molecular analysis of epigenetic factors involved in the induction of spermatogenic cell apoptosis
 研究代表者
 小路 武彦 (KOJI TAKEHIKO)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：30170179

研究成果の概要：雄性生殖細胞を生み出す精子形成過程では、精子換算で約 25-75%の生殖細胞が失われることに注目し、この自発的細胞死の誘導機構を解析した。特に本過程が DNA からなるクロマチンの規則的な凝集過程であり、その調節破綻が自殺死誘導の原因ではないかと考え、クロマチン凝集に深く関与する DNA のメチル化を独自に開発した HELMET 法により解析し、死を誘導された細胞核では顕著に DNA の非メチル化が生じていることを初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2007 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：分子組織細胞化学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：精子形成細胞・DNA のメチル化・分子組織化学・ヒストン蛋白修飾・免疫組織化学・ヘテロクロマチン化・アポトーシス・初代培養

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の増殖・分化の機構解析は、配偶子を生産するための普遍的過程として種の保存機構、更には生命プログラムの初期化を理解するという観点から必須であり、実際盛んに検討されてきた。一方で哺乳類精子形成過程においては、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いることが知られており、まさにこのアポトーシスから免れる機構の解明は「生命の若返り」機構を理解するうえで極めて重要であると考えられた。しかしながら、これらの極めて頻回に生じる細胞死の解析は雌雄を問

わず未だ不明な点が多い。精子形成過程の場合、特に体細胞分裂を繰り返す精祖細胞及び減数分裂を行う精母細胞では自発的なアポトーシス頻度は高く、その誘導にはミトコンドリア局在蛋白である Bax やチトクローム C の細胞質全体に渡る異常分布の関与を明らかとした。この結果は、種々の精巣障害モデルで、精子形成細胞死の誘導には Fas 系が関与していたのと顕著な差異を示していた。しかしながら、ミトコンドリアのアポトーシス誘導機構を作動させる引き金因子に関しては精子形成細胞では全く不明であった。

一方、精子形成過程は最終的には精子核に

至る段階的且つ規則的なクロマチンの凝集過程であり、この規則的な DNA のヘテロクロマチン化には、DNA 局所のメチル化やヒストンタンパク質のリン酸化及び脱アセチル化等の細胞分化に伴う段階的且つ規則的な変化が必要と思われた。そこで、このヘテロクロマチン化過程の異常がミトコンドリア制御タンパク質の産生に影響しアポトーシス誘導因子の放出に連なると仮説した。

本研究テーマの精子形成細胞アポトーシスの誘導機構は、内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）により細胞死が増大することから先進諸国で観察された成人男子での精子半減との関係で注目を集めており社会的な興味からも重要視されていた。更に再生医学に必要な多分化能細胞の供給源として精子形成幹細胞の有効性が報告され、積極的な幹細胞の単離と培養条件の確立が急務となっていたが、その際に自発的な細胞死を抑え且つ幹細胞としての全遺伝子発現能力を保持させることが必要であった。本研究では幹細胞の維持並びに精子形成に於いて適切なヘテロクロマチン形成が必須であることを踏まえ、ヘテロクロマチン化に重要と考えられている種々のエピジェネティックな制御機構の関与を検討する点、再生医学の領域に於いても画期的な貢献をもたらすものと期待された。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では DNA のメチル化やヒストン蛋白の修飾によるこれらのエピジェネティックな調節機構の破綻が精子形成細胞アポトーシス誘導の細胞内因子となる可能性を *in vivo* 及び *in vitro* で検討することを目的とした。更に、DNA のヘテロクロマチン化には、ヘテロクロマチンプロテイン-1 α (HP1 α) の関与が知られるので、その免疫組織化学的検索を行い、また RNA サイレンス機構の一部であるマイクロ RNA (miRNA) の関与も示唆されているので、その産生に関わる Argonaute タンパク質の発現動態も併せ検討することとした。

具体的には、正常及びエストロゲン様環境ホルモン物質投与による障害マウス精巣切片に於いて、DNA のメチル化局所を同定するため、メチル化の有無で活性が異なる制限酵素で段階的に処理し、その切断末端をターミナルデオキシヌクレオチダーゼ (TdT) により異なる蛍光色素で標識する。この染色結果と生殖細胞の分化段階を比較検討し、DNA のメチル化レベルと細胞分化の関連を解析すると共に、アポトーシス細胞との関連を検討する。同様にヒストンタンパク質のリン酸化やアセチル化部位を認識する特異抗体や HP1 α に対する抗体を用いて免疫組織化学を行い、上記と同様に分化段階及びアポトーシス

との関連を明らかにする。Argonaute 発現に関しては、タンパクレベルと mRNA レベルで検討する。続いて、ミトコンドリア移行タグを付けた YFP を発現するベクター (pEYFP-Mito) を電気穿孔法で正常精巣に *in vivo* 導入し、その後酵素的に分散した生殖細胞をセルトリ細胞層上で我々が既に改良を重ねてきた培養条件にて初代培養を行う。この方法では主として精祖細胞が標識されるので、培養経過を追って蛍光陽性細胞を追跡することにより、特定の細胞のクローナルな増殖・分化・死の誘導を解析する。

3. 研究の方法

1) 正常成熟雄マウス (ICR) 並びにアポトーシス誘導剤としてジエチルスチルベストロール (DES) (100 ng と 20 mg/Kg 体重) を皮下投与したマウスを作製し、精巣を摘出した。環境ホルモン物質の投与は、既に確立したプロトコルに従い 5 日毎に 4 回 corn oil に溶解後皮下注射し、最初の処理後 20 日目で屠殺する。得られた精巣はパラホルムアルデヒド固定後凍結或いはパラフィンブロックとした。同様に正常新生仔精巣の試料も作成した。

2) 上記パラフィン切片を、DNA のメチル化局所を解析するため、プロテイナーゼ K による適切な DNA の露出化反応後、まず-CCGG-の CG 間を切る制限酵素 *Hpa* II で処理し、後にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) による 3'-OH へのジゴキシゲニン化 ddUTP の付加反応を行わせる。続いて真中の C がメチル化していても切断できる *Msp* I で消化し、続いて上記と同様に TdT によりビオチン化 dUTP で末端標識する。その後ジゴキシゲニンは、FITC 標識抗ジゴキシゲニン抗体にて検出し、ビオチンはローダミン標識抗ビオチン抗体を用いてシグナルを検出した。これらの結果を共焦点レーザー顕微鏡で解析することにより片方或いは両者の分布を、A 型、In 型、及び B 型精祖細胞核はもとより精母細胞、精子細胞核で検討した。また、精母細胞はそれぞれ減数分裂前期の種々の段階で、精子細胞はステップ毎に検討した。

3) 正常精巣では、ステージ XI-XII に生殖細胞アポトーシスが頻発するので、この精細管を中心として上記方法にてアポトーシス細胞でのメチル化部位の局在パターンを検討した。この場合はミラー切片を用い、一方のスライドでアポトーシス細胞の初期から鋭敏に検出可能である TUNEL 法を行い、他方のスライドで 2) と同様にしてメチル化部位を検出し、TUNEL 陽性細胞に注目してメチル化部位の局在と頻度について検討した。また、TUNEL 染色とメチル化及び非メチル化部位染色を同一切片上でも行い両者の関係を直接

的に検討した。

4) ヘテロクロマチン化に関与することが示唆されている、ヒストン H3 タンパク質のリン酸化やアセチル化並びに HP1 α を正常並びに DES 処理精巣の凍結及びパラフィン切片に於いて免疫組織化学的にその核内分布と細胞分化に伴う変化及びアポトーシス細胞との関連を検討した。また、ヘテロクロマチン形成に miRNA による RNA サイレncing 機構の関与が指摘されているので、miRNA 合成に必要な Argonaute タンパクを市販の抗体 (抗ヒト Argonaute-2 抗体) を用いて、正常並びに DES 処理精巣のパラフィン切片に於いて免疫組織化学を行った。またその mRNA 発現をチミン二量体化法を用いての非放射性 in situ hybridization により検討した。

5) 新たに樹立したセルトリ細胞株を feeder layer とし、新生仔精巣からコラゲナーゼ消化により精細管を単離し、続いてトリプシン処理により分離した精祖細胞の初代培養を行い、その増殖・分化・死の動態を経時的に観察した。増殖細胞は BrdU の取り込みで、またアポトーシスの同定はアネキシン V 染色により検討した。

6) チトクローム C 酸化酵素のサブユニット VIII 由来のミトコンドリア局在化配列をもつ yellow fluorescent protein (YFP) を発現する遺伝子ベクター pEYFP-Mito をエレクトロポレーション法により新生仔精巣の精細管に様々な実験条件で遺伝子導入し、精祖細胞を蛍光標識した。この標識生殖細胞を分離し、初代培養系でその挙動を観察した。

4. 研究成果

1) CCGG 配列のメチル化部位と非メチル化部位をイソゾマーである制限酵素 *Hpa* II と *Msp* I で切断し、その切断部位を TdT を用いてハプテン化し免疫組織化学的に検出する方法の開発を行い、最終的に切片上で同時に視覚化し、且つ両者の存在量を定量出来る HELMET (histo endonuclease-linked detection of methylated DNA sites) 法として発表した (Histochem Cell Biol 130: 917-925, 2008)。また特許申請も行った。

2) 上記方法を用いてマウス精巣切片を解析した結果、核当たりの CCGG 配列の非メチル化部位数とメチル化部位数の比は、生殖細胞の分化段階に依存して大きく変動し、特に TUNEL 陽性アポトーシス細胞では顕著に非メチル化が起こっていることが判明した。本知見は、アポトーシスと DNA メチル化との直接的な関係を初めて示したものである。

3) マウス精巣切片で、特にヒストン H3 に着目してその修飾状態検討したところ、Ser⁽¹⁰⁾ のリン酸化は精祖細胞分裂期及び精母細胞の減数分裂 diakinesis 期のみ陽性であり、それは Lys⁽⁹⁾ のアセチル化とも一致した。

Lys⁽¹⁸⁾ 及び Lys⁽²³⁾ のアセチル化は分化段階依存的な変化を示した。HP1 α 発現は Ser⁽¹⁰⁾ のリン酸化及び Lys⁽⁹⁾ のアセチル化陽性細胞と一致したが、これらのシグナルとアポトーシス細胞との関係は認められなかった。尚、抗ヒト Argonaute-2 抗体を用いた免疫組織化学並びに in situ hybridization による検討では、マウス精巣に於いて有意な発現を認めなかった。

4) 今回新奇に開発された精子形成細胞初代培養系に於いては、feeder layer の株化セルトリ細胞上で精祖細胞から精子細胞への分化が認められ、更にアネキシン V 染色などによりアポトーシスシグナルは細胞間橋で連結した細胞間で伝播しないことが見出された。本培養系での生殖細胞分化過程の解析はこれからであるが、少なくとも数週間の培養が初めて可能となり今後の成果に期待がもてる。

5) pEYFP-Mito をエレクトロポレーション法により in vivo で精巣に遺伝子導入し、その細胞内でのミトコンドリアの動態及び細胞運命との関係を検討し、それらの結果を種々のミトコンドリアマーカと比較検討した結果、ミトコンドリア集団は多様でありその一部がアポトーシス誘導に関与することが判明した。また、方法により遺伝子導入された精祖細胞を分離し、上記により初代培養を行ったところ、経時的な観察が可能であることが判り、今後の in vitro でのミトコンドリアと細胞分化及び死の誘導機構の解析が飛躍的に進むことが期待された。

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 23 件)

1. Matsumoto K, Nagayasu T, Hishikawa Y, Tagawa T, Yamayoshi T, Abo T, Tobinaga S, Furukawa K, Koji T (2009) Keratinocyte growth factor accelerates compensatory growth in the remaining lung after trilobectomy in rats. J Thorac Cardiovasc Surg, 137; in press. 査読有

2. Koji T, Kondo S, Hishikawa Y, An S, Sato Y (2008) In situ detection of methylated DNA by histo endonuclease-linked detection of methylated DNA sites: a new principle of analysis of DNA methylation. Histochem Cell Biol, 130; 917-925. 査読有

3. Nakagawa T, Kajitani T, Togo S, Masuko N, Ohdan H, Hishikawa Y, Koji T, Matsuyama T, Ikura T, Muramatsu M, Ito T (2008) Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via

trans-histone cross-talk with H3K4 di- and trimethylation. *Genes Dev*, 22; 37-49. 査読有

4. Xia Z, Abe K, Furusu A, Miyazaki M, Obata Y, Tabata Y, Koji T, Kohno S (2008) Suppression of Renal Tubulointerstitial Fibrosis by Small Interfering RNA Targeting Heat Shock Protein 47. *Am J Nephrol*, 28; 34-46. 査読有

5. Nishioka Y, Miyazaki M, Abe K, Furusu A, Harada T, Ozono Y, Taguchi T, Koji T, Kohno S (2008) Regeneration of peritoneal mesothelium in a rat model of peritoneal fibrosis. *Ren Fail*, 30; 97-105. 査読有

6. Yamamoto-Fukuda T, Terakado M, Hishikawa Y, Koji T, Takahashi H (2008) Topical application of 5-fluorouracil on attic cholesteatoma results in downregulation of keratinocyte growth factor and reduction of proliferative activity. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 265; 1173-1178. 査読有

7. Abe-Yoshio Y, Abe K, Miyazaki M, Furusu A, Nishino T, Harada T, Koji T, Kohno S (2008) Involvement of bone marrow-derived endothelial progenitor cells in glomerular capillary repair in habu snake venom-induced glomerulonephritis. *Virchows Arch*, 453; 97-106. 査読有

8. Nakajima H, Mizuta N, Fujiwara I, Sakaguchi K, Ogata H, Magae J, Yagita H, Koji T (2008) Blockade of the Fas/Fas ligand interaction suppresses hepatocyte apoptosis in ischemia-reperfusion rat liver. *Apoptosis*, 13; 1013-1021. 査読有

9. Nakamura H, Kawakami A, Iwamoto N, Ida H, Koji T, Eguchi K (2008) Rapid and significant induction of TRAIL-mediated type II cells in apoptosis of primary salivary epithelial cells in primary Sjogren's syndrome. *Apoptosis*, 13; 1322-1330. 査読有

10. Kurashige T, Abe K, Furusu A, Miyazaki M, Obata Y, Xia Z, Nakazawa M, Nakazawa Y, Funakoshi S, Harada T, Koji T, Kohno S (2008) Renoprotective effect of azelnidipine in rats. *Biol Pharm Bull*, 31; 2237-2244. 査読有

11. Nagai K, Jinnai I, Hata T, Usui T, Sasaki D, Tsukasaki K, Sugahara K, Hishikawa Y, Yamada Y, Tanaka Y, Koji T, Mano H, Kamihira S, Tomonaga M (2008) Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells. *Int J Hematol*, 88; 551-564. 査読有

査読有

12. Matsuo Y, Nomata K, Eguchi J, Aoki D, Hayashi T, Hishikawa Y, Kanetake H, Shibata Y, Koji T (2007)

Immunohistochemical analysis of connexin43 expression in infertile human testes. *Acta Histochem Cytochem*, 40; 69-75. 査読有

13. Kumar A, Sinha RA, Tiwari M, Singh R, Koji T, Manhas N, Rastogi L, Pal L, Shrivastava A, Sahu RP, Godbole MM (2007) Hyperthyroidism induces apoptosis in rat liver through activation of death receptor-mediated pathways. *J Hepatol*, 46; 888-898. 査読有

14. Kyaw Soe, Hishikawa Y, Fukuzawa Y, Win N, Yin KS, Win KM, Myint AA, Koji T (2007) Possible correlation between iron deposition and enhanced proliferating activity in hepatitis C virus-positive hepatocellular carcinoma in Myanmar (Burma). *J Gastroenterol*, 42; 225-235. 査読有

15. Kawahara I, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Hayashi T, Koji T (2007) The expression of vascular dendritic cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Hum Pathol*, 38; 1378-1385. 査読有

16. An S, Hishikawa Y, Liu J, Koji T (2007) Lung injury after ischemia-reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF-alpha and activation of Bid pathway. *Apoptosis*, 12; 1989-2001. 査読有

17. Nakamura H, Kawakami A, Ida H, Koji T, Eguchi K (2007) Epidermal growth factor inhibits Fas-mediated apoptosis in salivary epithelial cells of patients with primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*, 25; 831-837. 査読有

18. Shukuwa K, Izumi S, Hishikawa Y, Ejima K, Inoue S, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitaoka T, Koji T (2006) Diethylstilbestrol increases the density of prolactin cells in male mouse pituitary by inducing proliferation of prolactin cells and transdifferentiation of gonadotropic cells. *Histochem Cell Biol*, 126; 111-123. 査読有

19. Ulziibat S, Ejima K, Shibata Y, Hishikawa Y, Kitajima M, Fujishita A, Ishimaru T, Koji T (2006) Identification of estrogen receptor beta-positive intraepithelial lymphocytes and their possible roles in normal and tubal pregnancy oviducts. *Hum Reprod*, 21; 査読有

2281-2289. 査読有

20. Mapendano CK, Kishino T, Miyazaki K, Kondo S, Yoshiura K, Hishikawa Y, Koji T, Niikawa N, Ohta T (2006) Expression of the Snurf-Snrpn IC transcript in the oocyte and its putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain. *J Hum Genet*, 51; 236-243. 査読有
21. Miyazaki M, Obata Y, Abe K, Furusu A, Koji T, Tabata Y, Kohno S (2006) Gene transfer using nonviral delivery system. *Perit Dial Int*, 26; 633-640. 査読有
22. Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J, Inoue S, Kondo T (2006) 17Beta-estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardial H9c2 cells. *J Biol Chem*, 281; 13092-13102. 査読有
23. Murata K, Hayashibara T, Sugahara K, Uemura A, Yamaguchi T, Harasawa H, Hasegawa H, Tsuruda K, Okazaki T, Koji T, Miyanishi T, Yamada Y, Kamihira S (2006) A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J Virol*, 80; 2495-2505. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 小路武彦 (2008) マウス精巣細胞での核小体に於けるリボソーム遺伝子転写産物動態。第 49 回日本組織化学会総会・学術集会。2008 年 10 月 5 日 (長崎)。
2. Koji T (2008) Updated non-radioactive in situ hybridization in cell biology and physiology. XIII International Congress of Histochemistry and Cytochemistry. 2008 年 8 月 24 日 (Gdansk, Poland)。
3. 菱川善隆・小路武彦 (2008) 生殖細胞アポトーシスに於けるミトコンドリア動態変化と ER β 発現の関与。第 17 回日本アポトーシス研究会学術集会。2008 年 8 月 1 日 (京都)。
4. 菱川善隆・小路武彦 (2008) 生殖細胞アポトーシスとミトコンドリア動態。第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2008 年 3 月 29 日 (大分)。
5. 小路武彦 (2008) 電子顕微鏡レベルでの in situ hybridization による核小体に於ける pre-rRNA の局在。第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会。2008 年 3 月 27 日 (大分)。
6. 小路武彦 (2007) 精子形成過程に於けるヒストン修飾解析と DNA メチル化部位局在化法。第 48 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。2007 年 9 月 28 日 (甲府)。

[図書] (計 5 件)

1. 小路武彦 編著 (2009) 永遠の不死；精子形成細胞の生物学。サイエンス社, pp.143.
2. 菱川善隆・小路武彦 (2008) In situ ハイブリダイゼーションの基礎と応用。[組織細胞化学 2008] (日本組織細胞化学会編), 中西印刷, pp.35-49.
3. 小路武彦・江島邦彰・菱川善隆 (2007) ヒトの発生・遺伝・老化。[ビジュアル解剖生理学] (藤本淳監修、藤田守、土肥良秋編), ヌーヴェルヒロカワ, 第 12 章, pp.365-381.
4. 小路武彦 (2007) In situ ハイブリダイゼーション法の基礎と応用。[組織細胞化学 2007] (日本組織細胞化学会編), 学際企画, 東京, pp.79-89.
5. 小路武彦 (2006) 特異的 RNA 分子の発現をみる-利用可能な方法の比較-。[実験医学別冊 染色・バイオイメージング実験ハンドブック] (高田邦昭、斉藤尚亮、川上速人編), 羊土社, pp.108-110.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: DNA メチル化部位の局在検出方法

発明者: 小路武彦・近藤志穂

権利者: 小路武彦・近藤志穂

種類: 特許願

番号: 特願 2008-241679

出願年月日: 平成 20 年 9 月 19 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小路 武彦 (KOJI TAKEHIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

教授

研究者番号: 30170179

(2) 研究分担者

菱川 善隆 (HISHIKAWA YOSHITAKA)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

准教授

研究者番号: 60304276

和泉 伸一 (IZUMI SHINICHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

研究者番号: 40264246

安 樹才 (AN SHUCAI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

研究者番号: 30404213

佐藤 陽子 (SATO YOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・

助教

研究者番号: 50398963