

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09202

研究課題名（和文）造精機能障害に対するエピゲノム創薬を目指したヒストン修飾酵素Kdm5aの機能解析

研究課題名（英文）The elucidation of the mechanism of Kdm5a, the histone-modifying enzyme, aimed at epigenetic drug discovery for testicular dysfunction

研究代表者

西尾 英紀（Nishio, Hidenori）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・助教

研究者番号：10621063

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マウス精原細胞の培養株であるGC-1細胞にKdm5aベクターを導入し、Kdm5aによる遺伝子発現変化をマイクロアレイで網羅的に検索した。さらに、その遺伝子発現データをIPAソフトウェアを用いて解析し、Kdm5a強制発現により活性の変化を認めるパスウェイを検索した。IPA解析により、活性化を認めたパスウェイ“Actin Cytoskeleton Signaling”に含まれるRetは、Gfr 1とともに精子幹細胞に存在し、GDNFのリガンドとして自己複製に必須であることから、Kdm5aはRetの発現を制御し、GDNFシグナルを介して精子形成障害に関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、造精機能障害モデルである停留精巣ラットで発現亢進するKdm5a遺伝子が高発現することによって、精子形成に関連する遺伝子群の発現異常が生じることが明らかとなった。男性不妊症における造精機能障害の原因は明らかでないため、造精機能障害を回復する根本的な治療法は存在しないが、この精子形成に関連する遺伝子群に対する治療薬の開発により、今後の男性不妊症に対する新規治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Mouse spermatogonial GC-1 cells were transfected with Kdm5a expression vectors. We performed a microarray analysis to clarify the underlying regulatory mechanisms of Kdm5a overexpression. Moreover, we identified the pathways that were altered by Kdm5a expressions using the IPA (Ingenuity Pathways Analysis) software. The IPA showed a Kdm5a-activated pathway of the “Actin Cytoskeleton Signaling,” which included Ret. Because RET receptors colocalize with Gfra1 in the spermatogonial stem cells and Gdnf- signaling via the RET-tyrosine-kinase/Gfra1 receptor complex is required for spermatogonial stem cell self-renewal, it is suggested that Kdm5a regulates the differentiation from gonocytes to spermatogonia via activation of the “Actin Cytoskeleton Signaling” pathway.

研究分野：小児泌尿器科学

キーワード：造精機能障害 ヒストン修飾 エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

停留精巣は出生男児の約 4-8%にみられ、約 40%に造精機能障害がみられる。ヒト停留精巣患者の組織学的解析から、停留精巣では未分化精細胞から精子幹細胞への分化能が低下していることを私たちが世界で初めて発見した。

さらに私たちは妊娠母体ラットへ抗アンドロゲン剤を投与することにより作製した停留精巣ラットを造精機能障害モデルとして確立した。このラット停留精巣で発現亢進する遺伝子をマイクロアレイで検索し、ヒストン修飾酵素 Kdm5a を同定した。Kdm5a はヒストン H3K4 の脱メチル化酵素であり、クロマチン構造をダイナミックに変化し、エピジェネティックに遺伝子発現を制御する。私たちは生後 9 日目のラット停留精巣で Kdm5a が発現亢進し、H3K4 が脱メチル化されていることを報告した。

近年、幹細胞の分化制御遺伝子のプロモーター領域に幹細胞特異的なヒストン修飾がおこることが明らかとなり、この修飾が幹細胞の多能性維持に重要な役割を果たすことが示された。しかし、精子幹細胞分化におけるヒストン修飾の機構は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、Kdm5a のエピジェネティックな作用が、どのように造精機能障害に関わっているのかを明らかにするため、Kdm5a の機能解析を行い、造精機能障害のメカニズムを解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Kdm5a強制発現系におけるマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

マウス精原細胞の培養株であるGC-1細胞にKdm5aベクターを導入し、Kdm5a強制発現系を確立した。Kdm5aによる遺伝子発現変化を網羅的に検索するため、Gfpのみを強制発現させたベクター、Kdm5a-Gfpを強制発現させたベクターをそれぞれGC-1細胞へトランスフェクションし、それぞれの遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて解析した。

#### (2) IPAによるCanonicalパスウェイ解析

上記(1)で得た遺伝子発現データをIPAソフトウェアを用いて解析し、Kdm5a強制発現により活性の変化を認めるパスウェイを検索した。

### 4. 研究成果

#### (1) Kdm5aの強制発現下において、2倍以上の発現亢進を認めた1394遺伝子、0.5倍以下の発現低下を認めた1216遺伝子を同定した(表1,2)。発現亢進した遺伝子のうち、エピゲノムに關与する遺伝子を探索し、DNAメチル化に關与するTet1 (tet methylcytosine dioxygenase 1) や、ヒストン修飾に關与するScml2 (Scm polycomb group protein like 2)に着目した。

#### (2) IPAソフトウェアを用いたCanonicalパスウェイ解析で、"Protein Kinase A Signaling" のパスウェイが活性化されていた。このパスウェイには精子幹細胞の自己複製に重要であるRet遺伝子が含まれていた。また、"Actin Cytoskeleton Signaling" や "Ga12/13 Signaling" などのパスウェイが不活性化されていたが、これらのパスウェイは精子形成に關連していなかった(次項の図1)。

(表1) 発現亢進した遺伝子

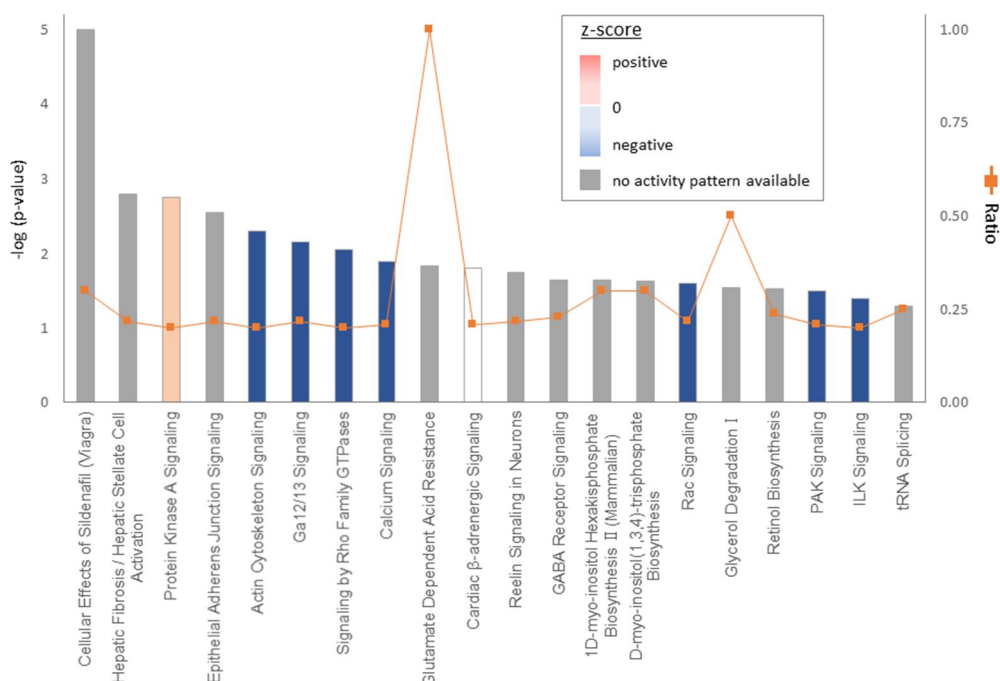
ProbeName	GeneSymbol	GeneName	Fold change
A_65_P10506	Kdm5a	lysine (K)-specific demethylase 5A	102.811
A_66_P136302	Rasgrf2	RAS protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2	51.555
A_52_P385801	Spock2	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	43.987
A_55_P2107696	Mrgpra6	MAS-related GPR, member A6	21.333
A_55_P2122997	Tet1	tet methylcytosine dioxygenase 1	19.445
A_51_P138429	Btc	Betacellulin, epidermal growth factor family member	19.430
A_55_P2003803	Scml2	sex comb on midleg-like 2	16.399
A_66_P126147	Spink5	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	14.967
A_51_P484978	Cblc	Casitas B-lineage lymphoma C	13.598

(SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray Kit)

(表 2) 発現低下した遺伝子

ProbeName	GeneSymbol	GeneName	Fold change
A_55_P2106911	Wnt1	wingless-type MMTV integration site family, member 1	108.203
A_55_P2927371	Gucy2f	guanylate cyclase 2f	61.561
A_52_P628171	Nfatc2	nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 2	44.159
A_55_P2076196	Mup17	major urinary protein 17	61.477
A_51_P427828	Mlip	muscular LMNA-interacting protein	29.489
A_51_P454374	Tlx2	T cell leukemia, homeobox 2	26.844
A_52_P284996	Sox6	SRY (sex determining region Y)-box 6	26.737
A_52_P269667	Sox8	SRY (sex determining region Y)-box 8	26.402
A_52_P368339	Sp3	trans-acting transcription factor 3	24.962

(SurePrint G3 Human Gene Expression8x60K v2 Microarray Kit)



(図 1) Canonical パスウェイ解析

赤色の棒グラフは活性化されたパスウェイを、青色の棒グラフは不活性化されたパスウェイを示す。Ratio は、パスウェイに含まれる遺伝子に対するマイクロアレイデータに含まれる遺伝子の割合を示す。

マイクロアレイ解析で同定した Tet1 遺伝子は、Nanog 遺伝子のコアプロモーターに結合することが分かっている。Nanog 遺伝子は精子幹細胞の多能性保持に必須であることから、Tet1 は Nanog 遺伝子コアプロモーターに結合し、DNA 低メチル化状態を維持することで自己複製能を保持していることが推察された。

Scml2 遺伝子は、精子形成期のエピゲノム形成を制御するタンパクとして同定された。SCML2 は Polycomb 抑制複合体 1 によるヒストン H2A の Lys119 のユビキチン化を促進することにより、未分化精細胞から精原細胞までの遺伝子発現を抑制する。一方で、減数分裂期の性染色体においては、SCML2 はヒストン H2A の Lys119 のユビキチン化を抑制することにより、エピジェネティックな遺伝子発現を制御することが明らかにされている。私たちの研究より、Kdm5a の強制発現で Scml2 が促進されたことから、初期精子形成過程において、Kdm5a によってヒストン H3K4 脱メチル化が Scml2 の発現を誘導し、Scml2 が H2A のユビキチン化の抑制を介して精細胞分化に関する遺伝子発現制御を行うことが推察された。

IPA 解析により、活性化を認めたパスウェイ "Actin Cytoskeleton Signaling" に含まれる Ret は、Gfr 1 とともに精子幹細胞に存在し、GDNF のリガンドとして自己複製に必須である。そのため、Kdm5a は Ret の発現を制御し、GDNF シグナルを介して精子形成障害に関与する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Nishio H, Mizuno K, Matsumoto D, Kato T, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Maruyama T, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 A novel method of transvesicoscopic ureteral reimplantation of an ectopic ureter with a mate ureter in a duplex kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IJU Case Rep	6. 最初と最後の頁 132-135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iju5.12401	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishio H, Mizuno K, Kato T, Maruyama T, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 40
2. 論文標題 A case of posterior urethral valve identified in an older child by straining to void	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Urol Case Rep	6. 最初と最後の頁 101886
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.eucr.2021.101886	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Maruyama T, Mizuno K, Nishio H, Kato T, Hamakawa T, Ikegami Y, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 Antireflux endoscopic injection therapy in post-pubertal patients via techniques adopted for the dilated ureteral orifice: a retrospective single-center study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Urol	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12894-021-00842-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishio H, Mizuno K, Kawase K, Kato T, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Ando R, Maruyama T, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 6
2. 論文標題 Robot-Assisted Radical Cystectomy for Pediatric Bladder Rhabdomyosarcoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Endourol Case Rep.	6. 最初と最後の頁 461-464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/cren.2020.0116. eCollection 2020.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato T, Mizuno K, Nishio H, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Urodynamic effectiveness of a beta-3 adrenoceptor agonist (vibegron) for a pediatric patient with anticholinergic-resistant neurogenic detrusor overactivity: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Med Case Rep	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-020-02564-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagai T, Mizuno K, Usami M, Nishio H, Kato T, Nakane A, Matsumoto D, Kurokawa S, Kamisawa H, Maruyama T, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Genetic and histopathological analysis of transverse testicular ectopia without persistent Mullerian duct syndrome: two case reports	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Case Rep	6. 最初と最後の頁 233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-020-02559-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato T, Mizuno K, Nishio H, Moritoki Y, Kamisawa H, Kurokawa S, Nakane A, Maruyama T, Ando R, Hayashi Y, Yasui T.	4. 巻 8
2. 論文標題 Disorganization of claudin-11 and dysfunction of the blood-testis barrier during puberty in a cryptorchid rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Andrology	6. 最初と最後の頁 1398-1408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/andr.12788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakane A, Mizuno K, Kato T, Nishio H, Kamisawa H, Kurokawa S, Maruyama T, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Appropriate timing of performing abdominal ultrasonography and termination of follow-up observation for antenatal grade 1 or 2 hydronephrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Urol	6. 最初と最後の頁 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12894-020-00750-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishio H, Mizuno K, Kamisawa H, Nakagawa M, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 Detailed presurgical evaluation of a case of congenital bladder diverticulum	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Urol Case Rep	6. 最初と最後の頁 100905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eucr.2019.100905	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato T, Mizuno K, Nishio H, Iwatsuki S, Nakane A, Akita H, Okamura T, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Appropriate management of high-flow priapism based on color Doppler ultrasonography findings in pediatric patients: four case reports and a review of the literature	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pediatr Urol	6. 最初と最後の頁 187.e1-187.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpuro.2019.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato T, Mizuno K, Nishio H, Moritoki Y, Nakane A, Kurokawa S, Kamisawa H, Maruyama T, Yasui T, Hayashi Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Can lichen sclerosus be diagnosed by preputial appearance or symptoms?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Res Rep Urol	6. 最初と最後の頁 89-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/RRU.S173184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuno K, Kojima Y, Nishio H, Hoshi S, Sato Y, Hayashi Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Robotic surgery in pediatric urology: Current status	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asian J Endosc Surg	6. 最初と最後の頁 308-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ases.12653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Y, Koguchi T, Mizuno K, Sato Y, Hoshi S, Hata J, Nishio H, Hashimoto D, Matsushita S, Suzuki K, Miyagawa S, Hui CC, Tanikawa C, Murakami Y, Yamada G, Hayashi Y, Matsuda K.	4. 巻 201
2. 論文標題 Single Nucleotide Polymorphisms of HAA0 and IRX6 Genes as Risk Factors for Hypospadias	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Urol	6. 最初と最後の頁 386-392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.juro.2018.07.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishio H, Iwatsuki S, Takada H, Kobayashi T, Mizuno K, Okada A, Umemoto Y, Yasui T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Scrotal abscess mimicking as intrascrotal liposarcoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Urol Case Rep	6. 最初と最後の頁 62-64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.eucr.2018.12.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Nishio Hidenori, Mizuno Kentaro, Kato Taiki, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro
2. 発表標題 Kdm5a activates the protein kinase A signaling pathway in mouse spermatogonial GC-1 cells
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020(web開催)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishio Hidenori, Mizuno Kentaro, Kato Taiki, Kamisawa Hideyuki, Kurokawa Satoshi, Nakane Akihiro, Maruyama Tetsuji, Yasui Takahiro, Hayashi Yutaro
2. 発表標題 The patency rate of processus vaginalis is higher in patients with retractile testes than descended testes
3. 学会等名 American Urological Association Annual Meeting 2020(web開催)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西尾英紀
2. 発表標題 造精機能障害に対するエピゲノム創薬を目指したヒストン修創酵素Kdm5aの基礎的研究
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西尾英紀、水野健太郎、内木拓、中根明宏、河合憲康、戸澤啓一、安井孝周、林祐太郎
2. 発表標題 当科における小児精巣腫瘍10例の臨床的検討
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西尾英紀、水野健太郎、林祐太郎、加藤大貴、中根明宏、丸山哲史、戸澤啓一、安井孝周
2. 発表標題 膀胱尿管逆流に対するロボット支援逆流防止術
3. 学会等名 第107回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西尾英紀、水野健太郎、丸山哲史、林祐太郎
2. 発表標題 停留精巣における造精機能の回復を目指した基礎的研究～ヒストン修飾による精子幹細胞分化機序の解明～
3. 学会等名 第28回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 西尾英紀、水野健太郎、安井孝周、林祐太郎
2. 発表標題 ロボット膀胱全摘除を行った膀胱横紋筋肉腫の1例
3. 学会等名 第28回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西尾英紀、水野健太郎、林祐太郎、中根明宏、丸山哲史、安井孝周
2. 発表標題 AYA世代に対応した小児泌尿器科腫瘍の診療
3. 学会等名 第69回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 34. 西尾英紀、水野健太郎、加藤大貴、吉田悟、亀井美智、戸澤啓一、安井孝周、林祐太郎
2. 発表標題 集学的治療を行った小児腎芽腫の1例
3. 学会等名 第69回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西尾英紀、水野健太郎、丸山哲史、林祐太郎
2. 発表標題 停留精巢の基礎研究～エピジェネティックな精子幹細胞分化障害からみた停留精巢における造精機能障害の解明～
3. 学会等名 第27回日本小児泌尿器科学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安井 孝周  (Yasui Takahiro)  (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	林 祐太郎  (Hayashi Yutaro)  (40238134)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	
研究分担者	水野 健太郎  (Mizuno Kentaro)  (70448710)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授   (23903)	
研究分担者	神沢 英幸  (Kamisawa Hideyuki)  (00551277)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員   (23903)	
研究分担者	守時 良演  (Moritoki Yoshinobu)  (50595395)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員   (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------