

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07250

研究課題名(和文)最新のシングルセル解析法を用いた、精巣幹細胞中の真の幹細胞の同定と動態解析

研究課題名(英文) Identification and dynamic analysis of true stem cells in testicular stem cells using the latest single cell analysis method

研究代表者

大保 和之(OHBO, Kazuyuki)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70250751

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)：シングルセル解析は、性格が異なる細胞亜集団の理解に有用な方法論として、急速な進化を遂げている。未分化精原細胞は良く似た性質を持つ細胞集団であるが、マーカー的には不均一であることが分かってきている。この場合、遺伝子発現に加え、DNAメチル化、クロマチンアクセス能の3つの指標を1個の細胞から解析するscNMT法による解析が、より精密な細胞集団の理解に繋がると考え、この方法論の安定的な導入を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結婚の高年齢化と婚姻率の低下が社会問題となっている日本において、拳児希望カップルの10組に1組が不妊であると報告されており、その半分が男性不妊である。男性不妊の原因は、一番元となる幹細胞から精子になるまで様々なステップで起こる。本研究では、幹細胞の異常を見つけるために、まず正常の幹細胞がどのような細胞集団なのか、1個ずつの細胞レベルで明らかにする研究である。

研究成果の概要(英文)：Single-cell analysis is rapidly evolving as a useful technology for understanding cell subpopulations of different character. Undifferentiated spermatogonia are considered as similar type of cells but have been reportedly found to be heterogeneous in terms of marker expressions. In this case, the scNMT method, which analyses three different analyses from a single cell - gene expression plus DNA methylation and chromatin accessibility - is considered to lead to a more precise understanding of the cell population in undifferentiated spermatogonia, and an attempt has been made to introduce this methodology on a stable basis in our laboratory.

研究分野：発生生物学、幹細胞学

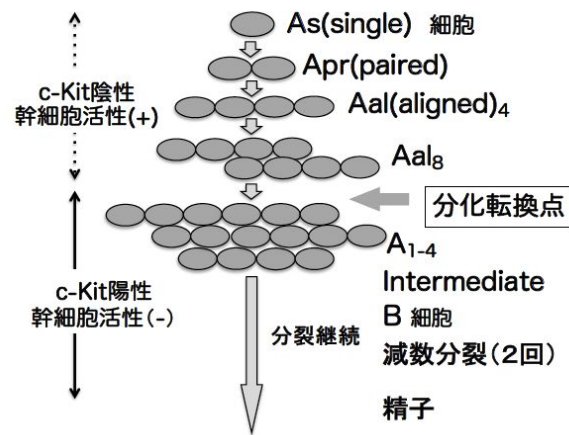
キーワード：組織幹細胞 精子形成細胞 シングルセル解析 エピジェネティクス

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

組織の恒常性は、個体の一生、分化細胞を産生し続ける成体の組織幹細胞により保たれている。精子形成細胞は、不完全な細胞分裂により、細胞間橋で繋がりながらシスト状に分裂する(図1)。そのため、最初の1個の細胞(A-single, As 精原細胞)が、長い間、幹細胞と考えられてきた。その一方で、遺伝子発現解析手法の進歩により、As 精原細胞に発現する多種多様な分子が同定されてきたが、As 精原細胞にのみ発現し、2個シスト状につながる精原細胞(A-paired, Apr 精原細胞)にのみ発現している分子は未だ見つからない。逆に、未分化精原細胞に発現しているマーカーの報告が相次ぐなか、As 精原細胞における、それぞれのマーカーの染色性が不均一であるという報告が集積しつつある。この解釈については、As 精原細胞自身の階層性や、ニッチとの相互作用による影響、細胞周期との関連など、様々な可能性が指摘されており結論をみていない。

図1 精子幹細胞の分化



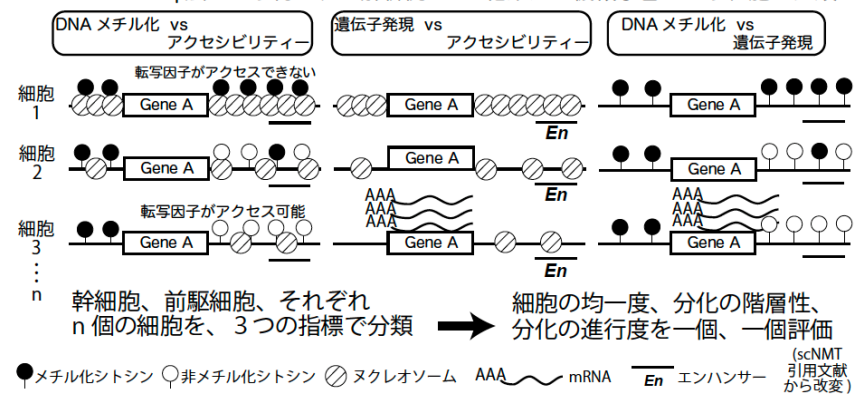
精巢において、精子形成細胞中の幹細胞活性は、精子幹細胞移植法により検証可能である。幹細胞移植法により、新生児期でも成体期共に、精原細胞が、膜型チロシンキナーゼである c-Kit を発現するようになると(A<sub>1-4</sub> 精原細胞) 幹細胞活性を喪失することが明らかになった。さらに、この分化段階において様々なゲノム修飾が一気に挿入されることから、我々は、c-Kit が発現する分化段階を「分化転換点」と呼んでいる(図1)。一方で、c-Kit を発現する以前の精原細胞の中で、幹細胞活性を維持している細胞が、As 細胞、Apr 細胞、4 個以上シスト状につながる精原細胞(A-aligned, Aal 細胞)のどの細胞なのかは不明のままである。そこで、c-Kit を発現していない As 細胞から Aal 細胞を、シングルセルレベルで解析することにより、幹細胞の視点から、これら細胞集団がどのような構成になっているか明らかにすることにより、精子幹細胞の実態を明らかにすることができる。

## 2. 研究の目的

不均一と考えられる細胞集団が、どのような亜集団からなるのか検索する際に、シングルセル解析が、力を発揮すると考えられる。現在の主たるシングルセル解析の手法は、遺伝子発現のみを見る scRNA-sequencing が主流である。しかし、未分化精原細胞集団は、かなり近似した細胞であり、単純な遺伝子発現のみでは、十分な遺伝子発現パターンの違いによる分類ができないのではないかと考えた。そこで、遺伝子発現に加え、DNA メチル化とクロマチン間のスペースの違い(アクセスしやすさの違い)を同時に検出可能な手法である scNMT 法を用いて、未分化精原細胞のマルチオミックスシングルセル解析を行えば、類似性の高い細胞群においても、細胞集団の違いを詳細に解析できると考え、これに挑戦することとした(Clark SJ et al)(図2)。単純な scRNA-sequencing は、近年、多くの研究室で行われ、商業的に様々なキットが販売されるとともに経験が蓄積されている。これに比較すると、シングルセルレベルでのマルチオミックス

ス解析は、申請当時、報告は稀有であり、国内からの報告は皆無に近かった。そこで我々は、いくつかの手法から、scNMT法を採用した。図2にその概略を示す。例えば、細胞1は、DNA 高メチル化、遺伝子発現なし、ア

図2 scNMT-seq 法により得られる解析例 この結果から機械学習により細胞を分類



クセシビリティー小の状態、細胞2は、一部 DNA メチル化、遺伝子発現なし、アクセシビリティー一部大、細胞3は、DNA 低メチル化、遺伝子発現あり、アクセシビリティー大、といったように、3項目について様々な組み合わせによる分類が、1個ずつの細胞で可能となる。これらの結果と、既知の分化マーカーの発現を組み合わせることにより、未分化精原細胞の分化度の異なる細胞の亜集団を同定し、時系列の分化度を考察することが可能となる。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞純化

未分化な細胞集団を GFP でラベルするため、GFRa1 遺伝子座に GFP がノックインされたマウスを用い、c-Kit に対する抗体と二重染色を行い、GFP 陽性 c-Kit 陰性、および、GFP 陽性 c-Kit 陽性の細胞集団を集めた。また、Ngn3 遺伝子発現領域に GFP を挿入したトランスジーンを持つトランスジェニックマウスを用いて、同じく c-Kit との二重染色を行い、GFP 陽性 c-Kit 陰性、および、GFP 陽性 c-Kit 陽性の精原細胞を取得した。ソートは、SONY 社 MA900 セルソーターを用いて、シングルセルソートモードにて、96 穴プレートに細胞を回収した。

#### (2)ライブラリー作成

細胞を溶解後、mRNA は、Smart-seq2 oligo-dT 付き beads にて回収した。genomic DNA (gDNA) を含む lysate は、beads への mRNA 回収時の洗浄操作の度に、DNA 回収用プレートに集めた。scRNA-sequencing の方は、Beads の mRNA から逆転写により cDNA を合成し、ライブラリーを合成した。一方、gDNA は、GpC 配列のシトシンをメチル化する M.CviPI を使用し、アクセス可能なクロマチン領域をメチル化によりラベル後、さらに同サンプルを Bisulfite 処理することにより CpG 配列のシトシンのメチル化領域をチミンに変換した。そして、これらサンプルについても、次世代シーケンサーにて遺伝子配列決定を行うためのライブラリーを作成した。

#### (3)次世代シーケンサー

(2)により得られた各ライブラリーは、次世代シーケンサーを用いて、遺伝子配列を決定した。

#### (4)データ解析

R および Python を用い、scRNA-sequencing のシングルセルクラスタリングおよび、各細胞集団の mRNA、DNA メチル化、クロマチンアクセス能のデータをリンクさせるためのパイプラインを作成した。

### 4. 研究成果

### (1) マルチオミックス・シングルセル解析手法の導入状況

マルチオミックス・シングルセル解析は、非常にコストがかかるため、失敗できない実験系である。従って、本研究のゴールは、予算の関係から、多数の細胞を処理する前段階として、実験手法の十分な検討と技術的習熟を行うことであったが、これを達することができた。具体的に確立された手法を、以下の4ステップに示す。

シングルセルからの RNA、DNA の分離抽出：増幅に必要な十分量の核酸を得ることができた。

RNA を用いての scRNA-sequencing 法による遺伝子発現検索：scRNA-sequencing を実施し、数百個の精原細胞からデータを得ることに成功した。

gDNA を用いてのメチル化、クロマチンアクセス能の同時解析：分離した gDNA をバイサルファイト処理することにより、DNA メチル化とクロマチンアクセス能のデータを取得することができた。

データ解析のパイプラインの確立が終了した。

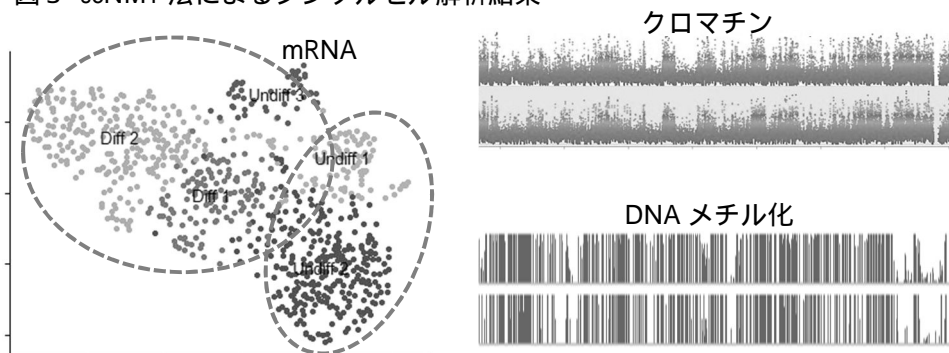
その結果、GFRa1 陽性 c-Kit 陰性の精原細胞を、さらに幾つかの亜集団に分けることができた。今後、信頼度を高めるために処理細胞数を増加させ、信頼度の高い亜集団に分けるとともに、同定された亜集団の代表的分子について、生物学的意義を探索することが必要であるが、本研究の結果も、そのデータの一部となる。

### (2) 暫定的な結果からの考察 (図3)

得られた結果において、既知の精原細胞マーカーが予想される亜集団に発現していることが確認でき、それらの遺伝子と DNA メチル化やアクセス能との相関が認められたため、実験手法が再現性高く実施できていることがわかった。本手法では個々の細胞から得られるデータ量が多いため、多数の遺伝子を網羅できる利点があるが、一方で解析できる細胞数は数百個と限られているため、希少な亜集団を詳細に解析するには更に多くの細胞を解析することが望ましいとわかった。また、この実験により新規に同定した遺伝子の検証実験が必要である。

<引用文献> Clark SJ et al. Nat Commun. (2018)9:781

図3 scNMT 法によるシングルセル解析結果



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi Yuki, Tomizawa Shin-ichi, Ono Michio, Kuroha Kazushige, Minamizawa Keisuke, Natsume Koji, Dizdarevic Selma, Dockal Ivana, Tanaka Hiromitsu, Kawagoe Tatsukata, Seki Masahide, Suzuki Yutaka, Ogonuki Narumi, Inoue Kimiko, Matoba Shogo, Anastassiadis Konstantinos, Mizuki Nobuhisa, Ogura Atsuo, Ohbo Kazuyuki	4. 巻 148
2. 論文標題 Tsga8 is required for spermatid morphogenesis and male fertility in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.196212	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 Takada Yuki, Yaman-Deveci Ruken, Shirakawa Takayuki, Sharif Jafar, Tomizawa Shin-ichi, Miura Fumihito, Ito Takashi, Ono Michio, Nakajima Kuniko, Koseki Yoko, Shiotani Fuyuko, Ishiguro Kei-ichiro, Ohbo Kazuyuki, Koseki Haruhiko	4. 巻 148
2. 論文標題 Maintenance DNA methylation in pre-meiotic germ cells regulates meiotic prophase by facilitating homologous chromosome pairing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.194605	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 Fukuda Hiromi, Yamaguchi Daisuke, Nyquist Kristofor, (中9名), Ohbo Kazuyuki, Satake Yuki, Sone Jun, Doi Hiroshi, Morihara Keisuke, Okamoto Tomoko, Takahashi Yuji, Wenger Aaron M., Shioda Norifumi, Tanaka Fumiaki, Matsumoto Naomichi, Mizuguchi Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Father-to-offspring transmission of extremely long NOTCH2NLC repeat expansions with contractions: genetic and epigenetic profiling with long-read sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13148-021-01192-5	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 該当する

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富澤信一、小林裕貴、Rachel Fellows、尾野道男、黒羽一誠、田中宏光、河越龍方、才津浩智、鈴木穰、水木信久、小倉淳郎、大保和之
2. 発表標題 Regulation of male germ cell development through KMT2B-dependent epigenetic programing
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kobayashi Y, Tomizawa S, Ono M, Kuroha K, Kawagoe T, Seki M, Suzuki Y, Ogonuki N, Inoue K, Matoba S, Mizuki N, Ogura A, Ohbo K.
2. 発表標題 Regulation of spermatogenesis by Kmt2b-dependent epigenome in spermatogonial stem cells.
3. 学会等名 第14回エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富澤信一、Rachel Fellows、尾野道男、黒羽一誠、Ivana Dockal、南澤恵佑、鈴木穰、才津 浩智、大保和之
2. 発表標題 Role of a novel protease inhibitor for spermatogenesis and immune homeostasis
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾野道男、Ivana Dockal、Uros Radovic、大保和之、富澤信一
2. 発表標題 Cryptorchidism induces abnormal epigenetic and transcriptional signatures in spermatogonia
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜市立大学医学部組織学ホームページ  
http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~finemorp/index.html

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	富澤 信一  (Shinichi Tomizawa)  (00704628)	横浜市立大学・医学部・講師   (22701)	
研究分担者	尾野 道男  (Michio Ono)  (50264601)	横浜市立大学・医学部・助教   (22701)	

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			
ドイツ	Technische Universitaet Dresden			
英国	Babraham Institute			