

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18627

研究課題名（和文）精子エピゲノム多様性にもとづいた子孫の疾患素因の分画

研究課題名（英文）Disease predisposition in offspring based on sperm epigenetic variation.

研究代表者

木村 龍一（Kimura, Ryuichi）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：00781759

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、精子DNAメチル化状態の変化が子孫の表現型に影響することを検証するために、DNA脱メチル化薬剤を用いて加齢による精子DNA低メチル化を模倣することを試みた。そのために雄マウスへDNA脱メチル化薬剤を投与し、雌マウスとの交配により得られた仔の表現型を解析したところ、雄の加齢による子孫の表現型への影響を一部模倣することが明らかとなった。その一方で、精子DNAメチル化のパターンはあまり類似していなかったことから、加齢による精子DNAの低メチル化の成立およびDNA脱メチル化薬剤によるDNAの脱メチル化の誘導は、それぞれ異なる機構で生じる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、精子のエピゲノム状態を変化させると子孫の表現型に影響が生じることが明らかとなった。父親の精子形成過程におけるエピゲノム異常が種々の疾患素因を形成する可能性があり、今後の研究により次世代に影響する疾患の新たな治療法や予防法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we attempted to mimic age-related sperm DNA hypomethylation by using DNA demethylating agents to verify that changes in sperm DNA methylation status affect the phenotype of offspring. To this end, we administered DNA demethylating agents to male mice and analyzed the phenotypes of pups obtained by mating with female mice, which revealed that the DNA demethylating agents partially mimicked the effect of male aging on phenotypes of the offspring. On the other hand, the patterns of sperm DNA methylation were not very similar, suggesting that the establishment of hypomethylation of sperm DNA by aging and the induction of DNA demethylation by DNA demethylating agents may occur through different mechanisms.

研究分野：発生生物学

キーワード：経世代エピゲノム DNAメチル化

### 1. 研究開始当初の背景

父親への環境ストレス等の影響がその世代だけに留まらず、精子を介して子孫にも影響する可能性が報告されている (Ng et al., *Nature*, 2010; Dias and Ressler, *Nat Neurosci*, 2014)。実際に、心理的ストレス・薬剤暴露・喫煙・肥満・高齢といった様々な環境要因の影響を受けることにより、精子には DNA およびヒストンタンパク質への化学修飾を介した可逆的な遺伝情報(エピゲノム)の変化が生じる (Wu et al., *Curr Environ Health Rep*, 2015)。近年、この精子エピゲノムは子孫の疾患素因に寄与する因子として着目されつつある (Chan et al., *Biol Psychiatry*, 2018)。

申請者はこれまで、神経発達障害や統合失調症のリスク因子 (Malaspina et al., *Arch Gen Psychiatry*, 2001; Reichenberg et al., *Arch Gen Psychiatry*, 2006) として周知されている父親の加齢に着目し、父加齢が子孫の疾患発症リスクとなる生物学的背景を研究してきた。これまでに遺伝的リスク (Pax6 変異) と加齢が相互作用することで仔マウス行動の表現型発露に寄与することを明らかにしている (Yoshizaki et al., *PLoS ONE*, 2016)。

### 2. 研究の目的

現在までに、我々も含めて複数の研究グループが父加齢により子孫の疾患発症リスクが増加する背景を研究してきたが、未だ分子機構の解明には至っていない。これまでの先行研究では、父親の高齢がもたらす子の疾患リスク因子の実態として、精子 DNA のメチル化異常に起因する可能性が指摘されている。そこで申請者の参画する研究グループでは、高齢 (18 ヶ月齢) マウスの精子における DNA のメチル化状態を網羅的に解析した。その結果、高齢マウスの精子には若齢マウスの精子よりも DNA のメチル化が有意に減少している領域が多数見つかった。したがって、父加齢の影響の一部は、精子の DNA メチル化状態を介して子孫の行動に影響すると考えられる。一方で、父親の高齢がもたらす子の疾患リスク因子の実態として加齢に伴う精子ゲノムの *de novo* 変異も挙げられており、精子 DNA メチル化状態の変化が子孫の表現型に影響する可能性については更なる検証が必要である。

### 3. 研究の方法

本研究では、精子 DNA メチル化状態の変化が子孫の表現型に影響することを検証するために、DNA 脱メチル化薬剤を用いて加齢による精子 DNA 脱メチル化を模倣する。このモデルを用いて精子の DNA メチル化変化と子孫の表現型を関連づけて解析することで、父親の加齢が子孫の疾患素因となる生物学的機構に迫る。

### 4. 研究成果

DNA 脱メチル化薬剤によりマウス精子で DNA 低メチル化が誘導されるか、さらに同薬剤を投与された雄マウスに由来する子孫に表現型変化が生じるかについて検討を行った。まず雄マウスに対する薬剤投与量の検討を行った。DNA 脱メチル化薬剤として 5-aza-2-deoxycytidine を用い、0.05 mg/kg, 0.075 mg/kg, 0.1 mg/kg の濃度で 2 日おきに 7 週間の腹腔内投与をおこなった。投与完了後、精巣を摘出し重量を測定したところ、マウスの体重そのものにはほとんど影響を認めなかったが、精巣重量は DNA 脱メ

チル化薬剤の投与量依存的に減少していた (図 1 A)。また、精巣上部尾部から取り出した精子数も DNA 脱メチル化薬剤の投与量依存的に減少していた (図 1B)。精巣重量の減少については、投与をやめてから 3 ヶ月後には全ての投与群において vehicle 群と同等レベルにまで回復したことから (図 1C)、DNA 脱メチル化薬剤の精子形成への影響は一時的なものであると考えられた。一方で、0.1 mg/kg 投与群では投与をやめてから 3 ヶ月後の精巣重量が vehicle 群よりも小さい傾向にあり (p=0.08)、DNA 脱メチル化薬剤の影響が比較的長期間影響するまたは 3 ヶ月の期間は回復には不十分であるなどの可能性が示唆される。

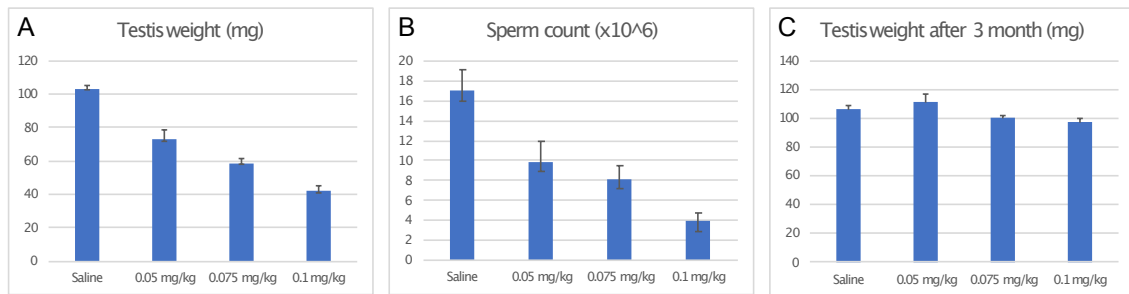


図 1| DNA 脱メチル化薬剤による精子形成への影響. (A) 精巣重量, (B) 精子数, (C) 投与終了 3 ヶ月後の精巣重量.

次に、DNA 脱メチル化薬剤の投与が完了した雄マウスと雌マウスを交配させて子孫マウスを作出した。0.1 mg/kg の投与群では産仔が得られなかったが、vehicle 群, 0.05 mg/kg 群, 0.075 mg/kg 群ではそれぞれ N=32, N=29, N=35 の産仔が得られた。生後 6 日目においてこれらの産仔の体重を計測したところ、投与量依存的に産仔の体重が減少することが明らかとなった (図 2A)。また、マウス母仔間のコミュニケーションを定量するために、生後 6 日目の仔マウスを母マウスから分離し、5 分間に仔マウスから発せられる超音波発声を測定した。その結果、0.05 mg/kg の投与群に由来する仔マウスでは超音波発声の回数が有意に減少していた (図 2B)。

超音波発声の音節パターンを比較すると、DNA 脱メチル化薬剤を投与した雄に由来する仔マウスで特徴的な変化が見られた (図 3A)。そこで、超音波発声の音節パターンを 12 種類に分類し (図 3B)、定量的な解析をおこなった。その結果、0.05 mg/kg の投与群

に由来する仔マウスから発せられた超音波発声は全体的に短い持続時間のものが多く、発せられる音節の種類も減少していた (図 3C)。これらの結果から、雄マウスへの脱メチル化薬剤の投与は子孫の体重減少と超音波発声の量的・質的变化という高齢雄マウス由来の子孫マウスと類似した表現型を引き起こすことが明らかとなった。すなわち、雄マウスへの脱メチル化薬剤の投与は、雄加齢による子孫への影響の一部を模倣すると考えられた。超音波発声の音節パターンを比較すると、DNA 脱メチル化薬剤を投与した

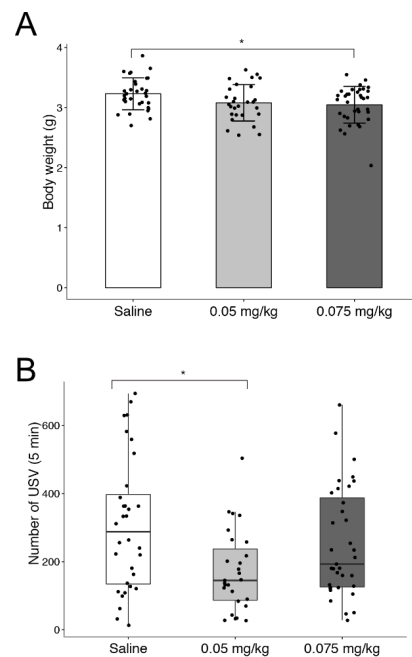


図 2| DNA 脱メチル化薬剤による子孫の表現型への影響. (A) 生後 6 日目の体重, (B) 生後 6 日目の母仔分離超音波発声回数.

雄に由来する仔マウスで特徴的な変化が見られた (図 3A)。そこで、超音波発声の音節パターンを 12 種類に分類し (図 3B)、定量的な解析をおこなった。その結果、0.05 mg/kg の投与群に由来する仔マウスから発せられた超音波発声は全体的に短い持続時間のものが多く、発せられる音節の種類も減少していた (図 3C)。これらの結果から、雄マウスへの脱メチル化薬剤の投与は子孫の体重減少と超音波発声の量的・質的变化という高齢雄マウス由来の子孫マウスと類似した表現型を引き起こすことが明らかとなった。すなわち、雄マウスへの脱メチル化薬剤の投与は、雄加齢による子孫への影響の一部を模倣すると考えられた。

これまでの先行研究により、加齢による精子の低メチル化は精原細胞において生じる可能性を見出している。そこで本研究では、DNA 脱メチル化薬剤の投与が精原細胞のメチル化レベルにどのような影響を及ぼすかについて検討した。そのために、vehicle 群と 0.05 mg/kg 投与群の精巣切片を用いて DNA 脱メチル化の指標である 5hmC の免疫蛍光染色をおこなった。PLZF 陽性の精原細胞における 5hmC の蛍光強度を測定したところ、DNA 脱メチル化薬剤を投与した精巣では、5hmC の蛍光強度が有意に増加していた (図 4A)。精原細胞の集団を PLZF の免疫蛍光強度で分類して解析したところ、5hmC の蛍光強度は PLZF の蛍光強度が低い集団で特異的に増加していることが明らかとなった (図 4B)。したがって、DNA 脱メチル化薬剤は PLZF 弱陽性の分化型精原細胞をより脱メチル化しやすい傾向にあると考えられる。

DNA 脱メチル化薬剤が精子の DNA メチル化状態に及ぼす影響を検討するために、vehicle 群と 0.05 mg/kg 投与群の精子を回収し、脱凝集処理後に免疫細胞染色を行い、DNA メチル化の指標である 5mC の蛍光強度を測定した。その結果、DNA 脱メチル化薬剤を投与された雄マウスの精子は vehicle 群と比較して有意に 5mC 蛍光強度が減少しており、同薬剤投与により精子の DNA 低メチル化が誘導されていることが確認され

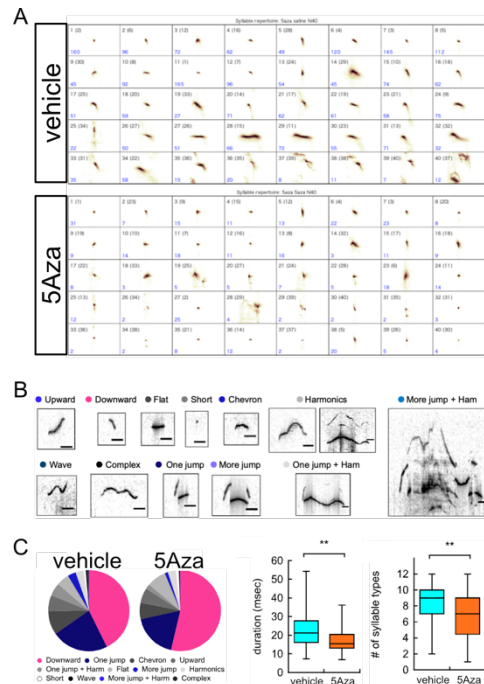


図 3| DNA 脱メチル化薬剤による子孫の超音波発声への影響. (A) 各群に特徴的な音節パターンの比較, (B) 音節の分類表, (C) 音節の定量的解析.

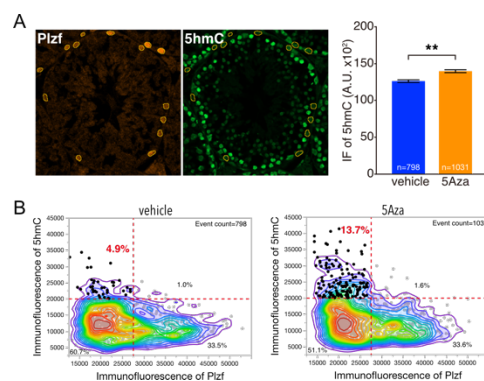


図 4| DNA 脱メチル化薬剤の精原細胞 DNA メチル化レベルへの影響. (A) Plzf 陽性細胞における 5hmC レベルの定量. (B) Plzf 発現レベルと 5hmC レベルによる精原細胞集団の分画.

た (図 5A)。そこで抽出した精子 DNA の DNA メチル化レベルをバイサルファイト法により解析した。高齢マウスの精子で低メチル化となっている領域の中から Rest 結合モチーフを近傍に有する 11 領域を選定し、それらの領域における DNA メチル化レベルを解析したところ、有意に低メチル化となっていた領域は 1 箇所のみであった (図 5B)。

本研究の結果から、雄マウスへの DNA 脱メチル化薬剤の投与は、雄の加齢による子孫の表現型への影響を一部模倣することが明らかとなった。その一方で、加齢による精子 DNA の低メチル化の成立および DNA 脱メチル化薬剤による DNA の脱メチル化の誘導は、それぞれ異なる機構で生じる可能性が示唆された。

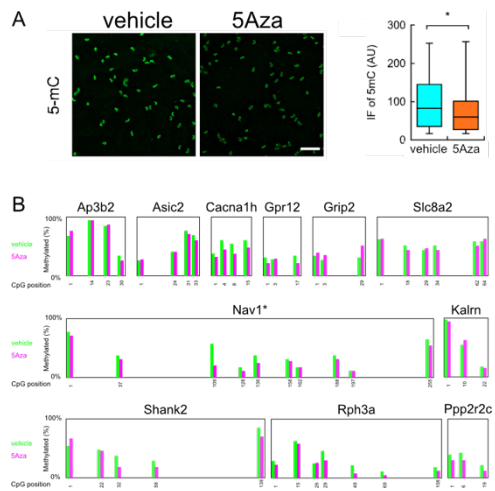


図 5| DNA 脱メチル化薬剤による精子 DNA メチル化への影響. (A) 免疫蛍光染色による精子 5mC の検出 (B) バィサルファイト法による DNA メチル化レベルの定量. \*P<0.05

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 2件）

1. 著者名 Kimura Ryuichi, U. Inoue Yukiko, Kikkawa Takako, Tatehana Misako, Morimoto Yuki, Inada Hitoshi, Oki Shinya, Inoue Takayoshi, Osumi Noriko	4. 巻 251
2. 論文標題 Detection of <sc>REST</sc> expression in the testis using epitope tag knock in mice generated by genome editing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 525 ~ 535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.417	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 Yoshizaki Kaichi, Kimura Ryuichi, Kobayashi Hisato, Oki Shinya, Kikkawa Takako, Mai Lingling, Koike Kohei, Mochizuki Kentaro, Inada Hitoshi, Matsui Yasuhisa, Kono Tomohiro, Osumi Noriko	4. 巻 22
2. 論文標題 Paternal age affects offspring via an epigenetic mechanism involving REST/NRSF	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO reports	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) 10.15252/embr.202051524	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 Tatehana M, Kimura R, Mochizuki K, Inada H, Osumi N	4. 巻 eCollection 2020
2. 論文標題 Comprehensive histochemical profiles of histone modification in male germline cells during meiosis and spermiogenesis: Comparison of young and aged testes in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 15(4):e0230930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0230930	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kimura R., Yoshizaki K., Kikkawa T., Mai L., Oki S., Mochizuki K., Kobayashi H., Inada H., Matsui Y., Kono T., Osumi N.
2. 発表標題 Paternal aging affects to phenotypes of offspring through inheritance of hypomethylated DNA elicited in NRSF/REST binding site
3. 学会等名 14th Asia Epigenome Meeting (AEM) / 3rd Taipei Epigenetics and Chromatin Meeting (TECM) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kimura R., Yoshizaki K., Kikkawa T., Mai L., Oki S., Mochizuki K., Kobayashi H., Inada H., Matsui Y., Kono T., Osumi N.
2. 発表標題 Paternal aging affects to offspring's behavior and gene expression possibly through inheritance of hypomethylated DNA elicited in NRSF/REST binding site
3. 学会等名 International Symposium on Epigenome 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 木村 龍一, 吉崎 嘉一, 大隅 典子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 株式会社 メディカルドゥ	5. 総ページ数 168
3. 書名 遺伝子医学 31号「エピゲノムの経世代影響」	

1. 著者名 木村 龍一, 稲田 仁, 大隅 典子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 70
3. 書名 医学のあゆみ 268巻3号「自閉スペクトラム症発症リスクとエピジェネティクス」	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------