様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　６ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：２２７０１
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）
研究期間：2019～2023
課題番号：１９ＫＫ０１８３

研究課題名（和文）最新のシングルセル及び超微量ヒストン修飾解析による、エピゲノム不妊分子機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of epigenome infertiity mechanism by the state-of-art single cell and ultrtrace histone modification methods

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）　　14,200,000円

研究成果の概要（和文）：精子幹細胞は、不完全な細胞分裂により細胞間橋が存在した分裂様式をとる。それ故、１個の精原細胞のみが幹細胞で、２個以上繋がった精原細胞は幹細胞活性を喪失した前駆細胞と考えられてきた。その一方でゲノムワイドな遺伝子発現解析の進捗やマーカースタディーにより、未分化な精原細胞の不均一性が具体的に示され始めた。本研究では、最新の包括的シングルセル解析であるscNMT法を海外から取り入れ、未分化精原細胞の実態解明に応用した。また、H3K4のメチル化酵素群の存在が報告されている。これらの分子群の未分化精原細胞における機能解析を、これら分子群を網羅的に遺伝子改変している海外のグループとの共同研究にて行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
日本の研究領域は、欧米中国との格差が広がっている。特に次世代シークエンサーの出現後、ゲノムワイドにヒストンやDNA修飾、遺伝子発現の情報が入手可能となり、エピゲノム研究が急速に進歩を遂げた。さらに少ない材料からのエピゲノム解析も急速な進歩を見せている。しかし、日本は、この流れに遅れを取っていることは否めない。そこで、最先端のシングルセルマルチオミックス研究と、ES細胞を材料にH3K4me3修飾を中心に精力的な研究を行っている高い研究レベルをもつグループとの国際共同研究を行い、その成果を私どもが長年行っている精子幹細胞研究に反映させ、より高いレベルの研究へと結びつけた。

研究成果の概要（英文）：Spermatogonial stem cells adopt a mitotic mode in which intercellular bridges are present due to incomplete cytokinesis. Therefore, only one spermatogonia is a stem cell and two or more connected spermatogonia are considered progenitors that have lost their stem cell activity. On the other hand, advances in genome-wide gene expression analysis and marker studies have begun to reveal the heterogeneity of undifferentiated spermatogonia. In this study, the scNMT method, the latest comprehensive single-cell analysis, was adopted from overseas and applied to elucidate the actual situation of undifferentiated spermatogonia. The existence of a group of H3K4 methyltransferases has also been reported. The functional analysis of these molecules in undifferentiated spermatogonia was carried out in collaboration with an overseas group that had extensively genetically modified these molecules.

研究分野：発生学

キーワード：幹細胞　エピジェネティクス　精子形成

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

精子形成細胞の役割は、ひとえに、種を途絶えさせないよう正確に異常のないゲノム、エピゲノム（DNA やヒストンの修飾に代表されるゲノム修飾）の両方の情報を、精子という極めて特殊な形態形成をとげた細胞を用いて次世代に伝播することにあり、その絶え間ない精子形成の根幹を維持しているのが精子幹細胞である。私どもは、精子形成後期に起こる減数分裂、さらには世代を超えて受精後に必須な遺伝子群の発現を制御するゲノム修飾の一部が、すでに精子幹細胞のレベルで挿入されていることを見出していた[1)]。さらに、それが上手くいかない場合は、幹細胞集団から前駆細胞へと、最初の分化段階を遂げる時点で細胞を殺し精子を作らせないようにする仕組みがある可能性を見出していた[1)]。この仮説が正しければ、精子幹細胞におけるゲノム修飾の大きな生理的役割として、『次世代の健康な個体発生、生存を保証するための精子の品質管理機構の一つとして機能している。』という全く新しい概念に行き着く。しかし、これまでの解析は、細胞を少なくとも数万個集めて行った『集団』の『平均の解析』の結果であり、近年言われている幹細胞の不均一性や階層性を考慮すると、連続性が不確かであるので、包括的なシングルセルレベルでの解析が必要と考えた。そこで、高い技術力と先進的なシングルセル解析手法を開発している海外の研究グループとの共同研究を企画した。また、精子幹細胞の特定のゲノム修飾を見ただけでも様々な酵素が介在している可能性が高い。そこで、このような酵素を積極的に探索している海外のグループとの共同研究を行うことにより効率的に精子幹細胞分化に関わる酵素の同定と機能解析を進めることを企画した。

２．研究の目的

生殖細胞は、細胞分裂後も不完全な細胞分裂により繋がって増殖することから、最初の１個（As 精原細胞）のみが幹細胞と信じられ、2 個以上の精原細胞(Apr 精原細胞)は、前駆細胞と考えられてきた[2)]。一方、ここ 20 年の間に未分化精原細胞の様々な特異的マーカー遺伝子が同定され、As 精原細胞であっても、マーカーが相互に重ならない As 精原細胞の実態が報告され、As 精原細胞のみをとっても亜集団に別れる可能性が考えられている。As 精原細胞ばかりでなく、さらに分裂が進んだ精原細胞においても不均一性が指摘されている。

精原細胞における遺伝子発現のシングルセル解析は既報が幾つかあり、その多くは遺伝子発現を見たものである。精原細胞は精細管基底膜上を移動していることが知られており、その移動空間は基底膜ばかりでなく、セルトリ細胞や他の生殖細胞とも接触している。従って、精原細胞の遺伝子発現は必ずしも細胞の分化度で変わるばかりでなく、たまたま精原細胞が存在している場所の細胞環境からの入力シグナルに遺伝子発現が左右される可能性がある。従って、１個の細胞から、遺伝子発現だけでなく、DNA メチル化やヌクレオソームのスペーシングの状態を加味した、より大局的な視点で細胞集団の解析を行うことにより精原細胞の亜集団を分類することに挑戦した。

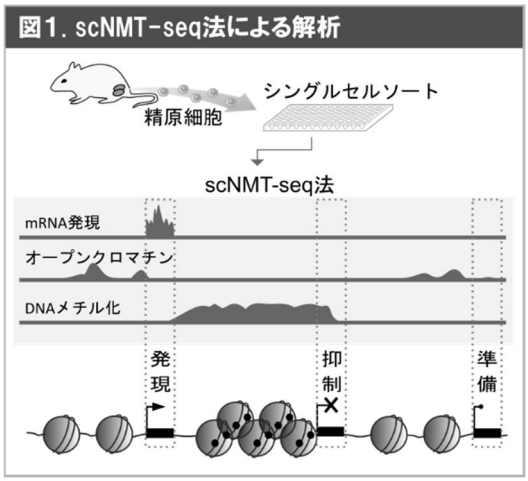
一方、遺伝子発現に密接に関わるヒストン修飾として H3K4me3 修飾が知られている。H3K4me3 は転写開始点やエンハンサーに特徴的であり、ゲノムは低メチル化、ヌクレオソームのスペースはリラックスした状態にある。H3K4me3 修飾酵素は多種類存在するが、その遺伝子座毎の使い分け、細胞種毎の使い分けは明らかでない。酵素毎に特徴ある遺伝子発現パターン形成を引き起こし、細胞集団に不均一性を誘導することも考えらえる。そこで、このような遺伝子発現に密接に関連がある H3K4me3 修飾酵素について、精子幹細胞の分化制御機構の視点で評

価されていない新規酵素の同定を国際共同研究にて進めることを行った。ドイツの国際共同研究グループは、網羅的に H3K4me3 修飾酵素群をノックアウトした ES 細胞を作成している。彼らは、ES 細胞を用いた次世代シークエンサーによるゲノムワイドな解析を行い、これらヒストン修飾酵素の意義について研究を進めている。さらにその中で、これらの ES 細胞から、コンディショナルノックアウトマウスを作出し成体で遺伝子欠損を誘導することにより、体細胞における異常の表現型の解析を行なっている。そこで私どもは、このコンディショナルノックアウトマウスを用い、成体の精巣、特に精子幹細胞における幹細胞の維持、分化制御の視点で、表現型の解析を行う計画を立てた。また、遺伝子欠損を引き起こすと致死になる可能性もあるため、遺伝子欠損誘導を起こす前のマウス精巣から精子幹細胞株を作成し日本側に送付し、細胞レベルで遺伝子欠損を起こし、詳細なゲノムワイドな H3K4me3 修飾とこれに関連する他のゲノム修飾の解析、精子幹細胞、前駆細胞における遺伝子発現解析を国内で行う計画を立てた。

３．研究の方法

(1) 包括的シングルセル解析の方法

精原細胞に特異的に発現する GFP を有するマウス(GFRa1-EGFP および Ngn3-EGFP)を用い、精原細胞集団をセルソーターにてシングルセルソートした。GFRa1 は精子幹細胞に強く発現し、Ngn3 は精子幹細胞が分化型精原細胞に分化前後で発現する遺伝子である。加えて c-KIT (分化型精原細胞に特異的に発現)を指標とし、精原細胞を 96 well プレート上に分取し、scNMT-seq 法 [3]に用いた。96 well プレート上で溶解した細胞由来のクロマチンは GpC メチル化酵素(M.CviPI)で処理することにより、オープンクロマチン領域にメチル化を導入した。その後、オリゴ dT ビーズで mRNA と DNA を分離し、それぞれを精製した後、mRNA からは Smart-seq2 法 [4]による scRNA-seq ライブラリを調整、DNA からは scBS-seq (PBAT)法 [5]によるライブラリを調整した。scBS-seq からはオープンクロマチンの情報と DNA メチル化の情報を同時に取得できる。それぞれのライブラリには細胞ごとに異なるインデックス配列を導入しており、プール後に Illumina 社シークエンサーを用いてシークエンスを行った（**図１**）。

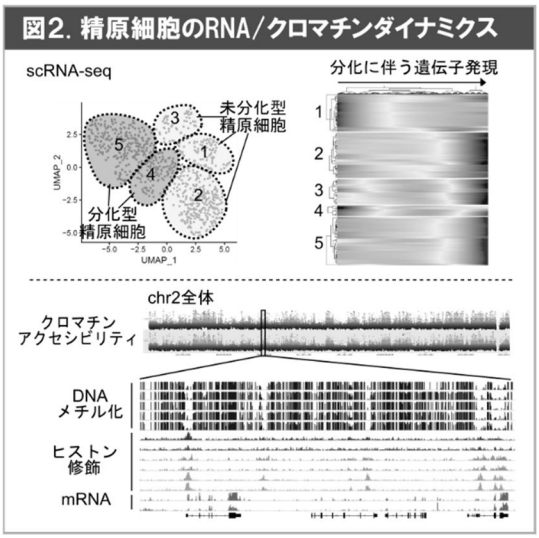


(2) 精子幹細胞分化に影響を与える H3K4me3 修飾酵素の探索方法

精巣の組織学的解析は、生殖細胞の分化段階の同定に専門性が要求される特殊な側面があることが、研究の裾野が広がらない主因である。そこで、私どもは、候補分子の情報提供を受け、正常未分化精原細胞の時期においては、免疫組織学的手法を用い、精子形成細胞の各分化段階のマーカーを用いて分化状況に沿った候補分子の発現を詳細に解析する計画を立てた。また、上述した私どもが持つマウスから、精子幹細胞(GFRa1 陽性 c-Kit 陰性精原細胞)や前駆細胞(Ngn3 陽性 c-Kit 陽性精原細胞)集団を Cell sorter で純化し、western blotting を行うことにより、タンパク質レベルでの発現量の検証を行うこととした。また、ドイツ側のグループには、各種 H3K4me3 修飾酵素を全身でノックアウトをした遺伝子改変マウスから、その精巣を固定包埋後日本に送付してもらい、精子幹細胞、前駆細胞、さらには減数分裂期から精子形態形成の時期に至るまで、正常での発現の組織学的手法を用いた検索と、遺伝子欠損による表現型の解析を行う計画を立てた。さらに、精子幹細胞株を樹立し日本に送付、エピゲノム解析に用いる予定を計画した。

４．研究成果

(1) 包括的シングルセル解析の結果



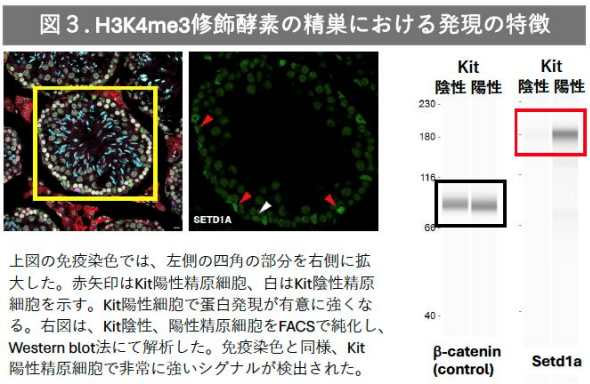
scRNA-seq 解析により、精原細胞を構成する 5 種類の細胞集団を同定することができた。そのうち 3 つは未分化型、2 つは分化型の精原細胞集団である。これらの集団で特異的に発現する遺伝子を調べたところ、既知のマーカー遺伝子(Eomes, Gfra1, Ret, Ngn3, Stra8, Kit など)が予測される集団に発現していることが確認できた。また同時にこれまでに報告のない新規精原細胞マーカー遺伝子も同定した（**図２**）。

さらに、クロマチンアクセシビリティ解析を実施したところ、精子幹細胞集団の方が分化型の集団に比べてオープンな領域が多いことが明らかになった。それらの領域はプロモーターやエンハンサー領域に重複しており、特にエンハンサー領域はヒストン修飾状態との統合的な解析により、遺伝子の種類に応じて異なる状態(active, primed, poised など)を示すことが確認できた。このデータからは、他に未分化から分化に向かう段階でクロマチン状態がダイナミックに変動する領域も同定でき、結合する可能性のある転写因子を推測することができた。

一方で、シングルセルでの DNA メチル化状態を調べたところ、全体的なメチル化レベルの変動は予想よりも小さいことがわかった。そのため、少なくとも精原細胞分化に伴って遺伝子発現を制御する要因は DNA メチル化よりもオープンクロマチンの状態であると考えられた。

(2) 精子幹細胞分化に影響を与える H3K4me3 修飾酵素の探索結果

研究の計画をたてたところから、コロナ感染の世界的流行が起こった。ドイツ側では動物センターは普段から研究者が入室できない運営で、専任技術員が動物の維持管理を行っている。当時、研究者はもちろん、この専任技術員の勤務が大きく制限されたため、維持マウス数を大幅に減らすことが要求され（受精卵凍結化）、新規遺伝子改変マウス作成の停止が長期行われた。マウスは、一度維持をストップすると再開するためには年単位で時間がかかる。これらの影響によりマウスを用いる国際共同研究は、長い間研究の停滞を避けることができなかった。このような予測外のことが起こったが、まず情報提供をもとに、候補酵素分子について国内でできる研究をスタートさせた。独自に作成した scRNA-seq のリソースデータで検索をすると、Setd1a、Setd1b は、ともに精子幹細胞分画、前駆細胞分画の両方に発現が認められた。次に、特異抗体を用いた免疫染色を行い、Setd1a は、Kit 陰性の精子幹細胞では発現が弱く、Kit 陽性の前駆細胞になると明らかに発現上昇が認められることが明らかとなった（図３）。その後、減数分裂期に発現は速やかに減少した。さらに精子幹細胞分画、前駆細胞分画を前述マウスからセルソーターにて分取した細胞を用いて Western blot 解析を行なった。その結果、図３に示すように、確かに Setd1a は、Kit 陰性の精子幹細胞では蛋白発現が弱く、Kit 陽性の前駆細胞になると強く蛋白のシグナルが認められた（図３）。コロナにより研究が大きく遅



上図の免疫染色では、左側の四角の部分を右側に拡大した。赤矢印はKit陽性精原細胞、白はKit陰性精原細胞を示す。Kit陽性細胞で蛋白発現が有意に強くなる。右図は、Kit陰性、陽性精原細胞をFACSで純化し、Western blot法にて解析した。免疫染色と同様、Kit陽性精原細胞で非常に強いシグナルが検出された。

延したが、現在、候補分子の精子幹細胞株の樹立法を訪独し伝授し、同細胞株を作成中である。

<引用文献>

1) Tomizawa et al., *Development* 145: dev169102. (2018)
2) De Rooij and Russel, *J Androl* 21: 776 (2000)
3) Clark et al., *Nat Commun* 9: 781 (2018)
4) Picelli et al., *Nat Protoc* 9: 171-81 (2014)
5) Clark et al., *Nat Protoc* 12: 534-547 (2017)

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　4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 Tomizawa S, Kuroha K, Ono M, Nakajima K, Ohbo K	４．巻 -
２．論文標題 A behind-the-scenes role of BDNF in the proliferation and survival signaling of spermatogonial stem cells	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Asian Journal of Andrology	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） なし	査読の有無 無
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 Kobayashi Yuki、Tomizawa Shin-ichi、Ono Michio、Kuroha Kazushige、Minamizawa Keisuke、Natsume Koji、Dizdarevi? Selma、Do?kal 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 -
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 －

1．著者名 Kobayashi Y, Tomizawa S, Ono M, Kuroha K, Minamizawa K, Natsume K, Dizdarevic S, Dockal I, Tanaka H, Kawagoe T, Seki M, Suzuki Y, Ogonuki N, Inoue K, Matoba S, Anastassiadis K, Mizuki N, Ogura A, Ohbo K.	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 該当する

〔学会発表〕　計6件（うち招待講演　1件／うち国際学会　0件）

1．発表者名 大保和之，南澤恵佑、尾野道男、中島久仁子、Rachel Fellows、富澤信一
2．発表標題 精子幹細胞分化を制御するエピジェネティックな機構の解析
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 2024年

1．発表者名 大保和之
2．発表標題 エピジェネティックチェックポイントの精子幹細胞分化における意義について
3．学会等名 第４回有性生殖研究会（招待講演）
4．発表年 2024年

1．発表者名 大保和之
2．発表標題 精子幹細胞におけるプライミング機構により制御されているWfdc15aの精子形成における役割
3．学会等名 日本遺伝学会第95回大会
4．発表年 2023年

１．発表者名
富澤 信一、小林 裕貴、Rachel Fellows、鈴木 穣、小倉 淳郎、大保 和之

２．発表標題
Spermatogonial chromatin priming for spermiogenic and post-fertilization development

３．学会等名
第16回エピジェネティクス研究会年会

４．発表年
2023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，鈴木穣，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128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128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
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 (Tomizawa Shinichi) (00704628)	横浜市立大学・医学部・講師 (22701)	
研究分担者	鈴木　絢子 (Suzuki Ayako) (00770348)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授 (12601)	

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