

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09543

研究課題名（和文）エピゲノム不妊発症の分子機構解析

研究課題名（英文）Epigenomic regulation and its role in mechanisms of infertility

研究代表者

富澤 信一（Tomizawa, Shinichi）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：00704628

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）：本研究は不妊の発症機序をエピゲノムの観点から解明するものである。ヒストン修飾などのエピジェネティックな因子は生殖細胞の発生に欠かせない。例えば、ヒストン修飾酵素の一つであるKMT2Bが無いと、精子幹細胞分化が障害される。本研究ではKMT2Bが精子形成に与える影響を詳細に解明するために、KMT2Bが制御する2つの遺伝子(Tsga8, Wfdc15a)のノックアウトマウスを作製し、機能解析を行った。すると、両方の遺伝子ともに円形精子細胞以降の精子形成に必須であることが明らかになった。このことから、KMT2Bは精子幹細胞分化にとどまらず、エピゲノムを介して精子形成後半にまで影響を及ぼすと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

男性不妊は不妊症全体の約半数に関与している。ところが、男性不妊の大きな原因となる精子形成不全の発症機序の多くは未解明である。また、エピゲノムの異常がもたらす精子形成への影響は極めて複雑であり、研究途上である。

ヒストン修飾酵素KMT2Bは精子幹細胞において約1000個の遺伝子の発現を制御し、KMT2Bの欠損は精子幹細胞分化の障害を引き起こすことがわかっていたが、その詳細はほとんど明らかではなかった。本研究ではKMT2Bが構築するエピゲノムの詳細と、その制御下にある遺伝子が精子形成に与える影響を明らかにしたもので、不妊症の分子レベルの理解に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：This study aims to understand infertility mechanisms from an epigenetic perspective. Histone modifications are crucial for correct germ cell development. For example, the loss of one of the histone methyltransferases, KMT2B, causes impaired differentiation of spermatogonial stem cells. In this study, to unveil the effect of KMT2B in more detail, knockout mice for two genes targeted by KMT2B, i.e., Tsga8 and Wfdc15a, were analyzed. We found that both of these genes are crucial for spermatogenesis after the round spermatid stage. Therefore, we conclude that KMT2B not only regulates spermatogonial stem cell differentiation but also affects later spermatogenesis through epigenomic regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 生殖細胞 精子形成 幹細胞 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

日本の不妊治療や検査の件数は近年増加傾向にあり、現在不妊症に悩んでいるカップルの割合は4~5組に1組にのぼるとされる。不妊症のおよそ半数には男性不妊が関与していると言われているが、その大きな原因(約4割を占める)の精子形成不全の発症メカニズムは多くが未解明のままである。メカニズム解明が困難な背景には、精子形成が複雑な遺伝子発現制御にもとづく細胞分化と形態の変遷によって成り立っているという事実がある。精子形成は未分化な精子幹細胞の維持や分化に始まり、精母細胞から精子細胞の時期に起きる減数分裂を経て成熟精子が産生されるという多くの段階により達成される。このステップを通してダイナミックに変動する2,000個以上の遺伝子の発現が精子の特有な形態形成に関わっており、関連遺伝子の発現異常は精子形成不全をもたらす。このような膨大な数の遺伝子を緻密に制御する上で欠かせないのが「エピジェネティックな修飾」やそれがつくり出す「エピゲノム」である。エピジェネティックな修飾にはDNAメチル化やヒストン修飾などが含まれ、哺乳類では異なるタイプの修飾を導入するための酵素が多数存在する。精子形成ではどのような酵素やエピゲノムの状態がどのようにして複雑な遺伝子の発現を制御しているのだろうか。この疑問を解明することは精子形成不全や不妊の機序を解明する上で非常に重要であると考えられるため、本研究において詳細に解析することとした。

エピゲノムの状態や、エピジェネティックな修飾酵素が精子形成に重要であることは、マウスを用いた様々な実験結果により少しずつ明らかになってきている。例えば、精子幹細胞が分化する際には一部のヒストン修飾の大規模な変化、すなわち「エピジェネティック・スイッチ」が起きることが観察されている(Shirakawa T. et al., *Development* 2013 140: 3565-3576)。また、ヒストン修飾酵素をコードする *Kmt2b* 遺伝子をノックアウトしたマウスでは、精子幹細胞がほとんど分化できなくなる(Tomizawa S. et al., *Development* 2018 145: dev169102)。KMT2Bは精子幹細胞で約1,000種類の遺伝子において遺伝子発現の活性化に関わるH3K4me3を導入することがわかっている。そのため、当初はKMT2Bが修飾する遺伝子の多くは精子幹細胞分化に必要な遺伝子であることが予想された。ところが、我々の研究により、KMT2Bの標的遺伝子のほとんどは精子幹細胞の分化時には必要とされないが、将来的に発現する遺伝子だということが明らかになった。例えば、精子形成の後半にあたる精子細胞の時期、さらには受精した後の胚発生の時期においてmRNAが発現し始める遺伝子が多く含まれる。これらの事実から、我々はこの現象をKMT2Bによる「プライミング」であると考えた。すなわち、精子幹細胞では将来の遺伝子発現をKMT2Bがヒストン修飾を用いて「準備」しているということである。ところが、プライミングされる遺伝子の多くは詳細な機能が未知であり、KMT2Bによるエピゲノム制御が長期的に与える影響は不明であった。そこで、本研究ではKMT2Bによってプライミングを受ける遺伝子の中でも、特に精子形成において重要な機能を有する可能性の高いものを同定し、それらの機能解析を行うことで、KMT2Bがエピゲノムを通してどのように精子形成に寄与し、不妊に関わっているのかを理解することを目指した。

2. 研究の目的

不妊症の中でも精子形成不全を原因とする例において、エピゲノム制御機構がどのようにかわるかを明らかにすることが本研究の目的である。これまでに、我々はエピゲノムを構築する因子の一つであるKMT2Bが精子幹細胞の分化に必須であることを明らかにした。さらに、KMT2Bが精子幹細胞において、精子形成後半などの時期で発現する、将来的に必要な可能性のある遺伝子に予めH3K4me3を導入することによって、それらの遺伝子を準備していることが考えられた。そこで、本研究ではKMT2Bの強い制御下にあり、精子形成後半において特異的に発現する遺伝子を同定し、詳細な機能解析を実施することを試みた。これを行うことで、精子幹細胞で構築される複雑なエピゲノム機構の仕組みと、それが広範な精子形成にどのように寄与するかを明らかにすることができる。また、KMT2Bは胚性幹細胞などの他の幹細胞においても重要な機能を有することから、本研究の成果は他の組織の分化制御機構にも知見をもたらすことが期待できる。

3. 研究の方法

以前我々は *Kmt2b* ノックアウトマウスから樹立した精子幹細胞培養株(GS細胞)を用い、ゲノム全体的なトランスクリプトーム解析(RNA-seq)およびヒストン修飾解析(ChIP-seq)を実施した。そのデータを詳細に解析することで、本研究では *Kmt2b* 欠損時にmRNAやH3K4me3の状態が大きく減少する遺伝子(KMT2Bの強い制御下にある遺伝子)を複数同定した。さらに、そのようにして見出した遺伝子 *Tsga8* と *Wfdc15a* について、それぞれの遺伝子機能の解析を行うために、CRISPR-Cas9法を用いたノックアウトマウスの作製を行った。得られた2種類のノックアウトマウスは妊孕性試験に供し、受精能の検討を実施した。併せて、それぞれのマウスから精巣や精巣上体を摘出し、免疫染色により精子形成能への遺伝子欠損の影響の可否や生殖細胞への影響を調べたほか、精巣組織や一部の精子形成細胞からmRNAを抽出しRNA-seqを実施した。RNA-seqのデー

タからは各遺伝子のノックアウトにより影響を受ける遺伝子の同定を行い、どのようなメカニズムでそれらの遺伝子が精子形成に関与するかをバイオフィオマティクスの解析手法を用いて調べた。

4. 研究成果

本研究では、*Kmt2b* 欠損 GS 細胞の RNA-seq と H3K4me3 ChIP-seq データを解析することで、KMT2B が精子幹細胞において制御する 2 種類の機能未知遺伝子 *Tsga8*, *Wfdc15a* を同定した。これらの遺伝子は *Kmt2b* 欠損 GS 細胞でプロモーター領域の H3K4me3 と mRNA レベルの両方の減少を示したものである。その後、まず *Tsga8* 遺伝子の機能解析を行うために CRISPR-Cas9 によるノックアウトマウスの作製を行った。*Tsga8* は X 染色体にコードされる遺伝子であり、精子形成において円形精子細胞から伸長精子細胞の時期に発現することがわかっていた核内タンパク質であるが、その機能は全く未知であった(Uchida et al., *Biol Reprod.* 2000 63: 993-9)。我々の解析から、*Tsga8* は精巣以外の組織では発現が低いことから、精子形成特異的な遺伝子であるとわかった。ノックアウトマウスの表現型を解析したところ、精巣の重量が野生型に比べて有意に減少したが、それ以外の組織における目立った異常は確認されなかった。さらに妊孕性試験の結果からは、*Tsga8* 欠損の雄マウスは完全な不妊を示したことで、精子形成に何らかの異常があることが考えられた。そこで免疫組織学的な解析を実施すると、*Tsga8* 欠損精巣では円形精子細胞から伸長精子細胞に移行する時期の細胞に顕著な形態形成異常が認められたため、不妊の原因が精子細胞の発生障害であると明らかになった。さらに、円形精子細胞を用いた RNA-seq のデータでは、*Tsga8* 欠損において X 染色体遺伝子の発現が減少していた。通常、円形精子細胞の時期には X 染色体の多くの遺伝子が活性化するという現象が知られており、これが精子形成に必須であると言われている。つまり、*Tsga8* が存在しないと、この X 染色体活性化が正常に誘導されないことになる。さらに、伸長精子細胞が成熟する過程で起きる染色体の凝集化も *Tsga8* 欠損では十分でないことがわかったため、このプロセスにも重要な役割をしている可能性が考えられた。このように、*Tsga8* は精子幹細胞において KMT2B による H3K4me3 修飾を受けるが、実際にはより後の精子細胞期に発現し始め、その時期の核内において必須の働きをしているということが言える。一方で、*Tsga8* がコードするタンパク質には既知のドメイン構造がなく、今後の研究によりどのような分子メカニズムで精子細胞の核内制御を担っているかが解明されることが期待される。*Tsga8* に関する本研究での成果は論文にまとめ、国際誌において発表した(Kobayashi et al., 2021 *Development* 148: dev196212)。

一方で、*Wfdc15a* はプロテアーゼインヒビターのファミリーに属することが構造から推測されている遺伝子である。ところが、これまでにその遺伝子発現状態や機能に関する報告は全く存在しなかった。我々は KMT2B と *Wfdc15a* の関連性を様々なヒストン修飾情報を元に解析したところ、*Wfdc15a* 遺伝子が精子幹細胞においてプロモーター上に活性型の H3K4me3 を有すると同時に抑制型の H3K9me3 を有する non-canonical bivalent gene と呼ばれる珍しいタイプの遺伝子であることがわかった。このような遺伝子は、幹細胞では通常発現が抑制されているが、細胞分化に伴い抑制型修飾が外れ、活性化することがある。つまり、幹細胞では後々の発現に備えて活性型と抑制型の両方の修飾を持つことによりプライミングされている状態にある。精子形成に沿って *Wfdc15a* を解析すると、精子幹細胞でプライミングされていたプロモーターは精母細胞から精子細胞にかけて H3K9me3 を失い、同時に mRNA が強く発現し始めることが明らかとなった。そこで、*Wfdc15a* 遺伝子のノックアウトマウスの表現型を解析すると、雄のマウスは精巣の重量が減少したうえ、完全な不妊を示した。そこで、ノックアウトマウスの精巣を用いた組織学的解析を行うと、*Wfdc15a* 欠損精巣では円形精子細胞から伸長精子細胞への移行が大きく障害されていた。このことから、*Wfdc15a* は *Tsga8* 同様、精子細胞の形態的な発生に必須の遺伝子であることが明らかになった。次に、*Wfdc15a* 遺伝子ノックアウトマウスの精巣や純化した円形精子細胞を用い、RNA-seq を実施した。その結果、*Wfdc15a* が存在しない精子細胞や精巣全体の組織では正常と比較して様々なプロテアーゼやプロテアーゼ関連遺伝子の発現が異常になり、さらには多くの炎症因子の発現が活性化した。この現象から、*Wfdc15a* は精巣で発現する数百種類のプロテアーゼネットワークの恒常性維持に重要であり、これを通して自然免疫システムの維持にも必要であることが示唆されたといえる。今後、より詳細な解析により *Wfdc15a* 遺伝子がどのようにして精子細胞のプロテアーゼ因子の恒常性や自然免疫に関与しているかが明らかになることが期待される。この研究成果は、現在論文としてまとめ、国際誌に投稿中である(Tomizawa et al.)。

本研究では KMT2B が精子幹細胞のエピゲノムプライミングを介し、*Tsga8* と *Wfdc15a* という 2 種類の遺伝子を制御することを見出し、さらにそれらの遺伝子が円形精子細胞の時期にそれぞれ異なる側面で必須の働きをしていることを示した。つまり、精子幹細胞におけるエピゲノムの構築が与える広範な影響が、二次的に精子形成機構に働くという新たなカスケードを示すことができた。これらの知見が今後の男性不妊の原因解明につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 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 dev196212
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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

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128回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomizawa S, Kobayashi Y, Fellows R, Suzuki Y, Ogura A, Ohbo K
2. 発表標題 Spermatogonial chromatin priming for spermiogenic and post-fertilization development
3. 学会等名 The International Symposium "Totipotency and Germ Cell Development"（国際学会）
4. 発表年 2022年

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 programming
3. 学会等名 第127回 日本解剖学会総会・全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuki Kobayashi, Shin-ichi Tomizawa, Michio Ono, Kazushige Kuroha, Tatsukata Kawagoe, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Narumi Ogonuki, Kimiko Inoue, Shogo Matoba, Nobuhisa Mizuki, Atsuo Ogura, Kazuyuki Ohbo
2. 発表標題 Regulation of spermatogenesis by Knt2b-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

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

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