



Nagoya City University Academic Repository

| | |
|---------|---|
| 学位の種類 | 博士 (医学) |
| 学位記番号 | 第 1009 号 |
| 氏名 | 西尾 英紀 |
| 授与年月日 | 平成 26 年 3 月 25 日 |
| 学位論文の題名 | <p>Distinctive Changes in Histone H3K4 Modification Mediated via Kdm5a Expression in Spermatogonial Stem Cells of Cryptorchid Testes (停留精巣の精子幹細胞における Kdm5a 発現を介した特異的なヒストン H3K4 修飾の変化)</p> <p>Journal of Urology, in press</p> |
| 論文審査担当者 | <p>主査： 中西 真 副査： 高橋 智, 郡 健二郎</p> |

論文内容の要旨

【背景と目的】男性不妊症の主因の一つとして、造精機能障害があるが、精子形成の機序は未だ明らかではない。正常の精子形成では、未分化精細胞が精原細胞へ分化し、さらに精母細胞、精子細胞へと進行することで、思春期以降の恒常的な精子供給を可能としている。私たちは、停留精巣において、精子幹細胞活性の低下、精子幹細胞の分化障害、妊孕性低下がみられることをこれまでに報告し、造精機能障害の原因として、精子幹細胞の前駆体である未分化精細胞から精子幹細胞への分化障害があることを提唱した。今回これらの結果を踏まえ、精子幹細胞への分化機構を明らかにするために、精子幹細胞分化障害のモデルとしてラット停留精巣を用い、停留精巣と正常精巣との発現差を認める遺伝子を同定し、その機能解析を行なった。

【方法】研究(1) 妊娠 S-D ラット (妊娠 14-20 日) に抗アンドロゲン剤である flutamide 7.5mg を連日腹腔内投与し停留精巣モデルラットを作成した。生後 9 日目のラット停留精巣 (UDT 群) と正常精巣 (Control 群) で発現差を認める遺伝子の検索のためマイクロアレイ解析を行なった。研究(2) マイクロアレイ解析にて、停留精巣で発現亢進していた遺伝子の中で、ヒストン脱メチル化酵素である *Kdm5a* (*lysine (K)-specific demethylase 5A*) 遺伝子に着目し、生後 3 日目から 18 日目までの停留精巣と正常精巣における *Kdm5a* の発現差について定量 RT-PCR・Western Blotting で評価した。また発現局在についての評価のため免疫染色を行った。研究(3) ヒストン H3K4 抗体を用いて、生後 3 日目から 18 日目までの正常精巣および停留精巣のメチル化状態を評価した。研究(4) 精子幹細胞の細胞株である GC-1 細胞へ *Kdm5a* を遺伝子導入し、精子幹細胞分化に関与する遺伝子の発現変化を定量 RT-PCR で確認した。

【結果】(1) 生後 9 日目のラット停留精巣で高発現する 24 遺伝子を同定した。その 24 遺伝子の中で、(2) *Kdm5a* は停留精巣において、生後 3 日目から 9 日目にかけて発現の増加を認め、その後は 18 日目にかけて徐々に減少傾向を認めた。さらに生後 9 日目において正常精巣と比較して、停留精巣で有意に高発現していた ($p < 0.005$)。 *Kdm5a* は、精細管内における精細胞の支持細胞である Sertoli 細胞や間質細胞である Leydig 細胞には発現を認めず、有糸期の未分化精細胞、精原細胞、精母細胞のそれぞれの核に発現を認めた。(3) 生後 9 日目の停留精巣において H3K4me2/me3 の発現低下を認めた。(4) *Kdm5a* を強発現させた GC-1 細胞において、精子幹細胞分化に関わると過去に報告された *Esr2*、*Neurog3*、*Pou5f1*、*Ret*、*Thy1* の有意な発現亢進を認めた ($p < 0.005$)。

【考察】私たちは、精子形成過程において、精子幹細胞の前駆体である未分化精細胞から精子幹細胞への分化が重要と考えており、ラットでは生後 9 日目にみられることを過去に報告した。その成果をもとに、本研究では、生後 9 日目に停留精巣で高発現する *Kdm5a* を同定した。*Kdm5a* はヒストン H3K4 の脱メチル化酵素であり、同時期における停留精巣で H3K4 が低メチル化状態であった。これらの結果から、ヒストン修飾を介して精子幹細胞分化に関わる遺伝子発現が変化することで、精子幹細胞分化が調節されることが示唆された。つまり塩基配列によらない、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構が、初期の精子形成過程においても存在する可能性について初めて示した。

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】 男性不妊症の主因の一つとして、造精機能障害があるが、精子形成の機序は未だ明らかではない。正常の精子形成では、未分化精細胞が精原細胞へ分化し、さらに精母細胞、精子細胞へと進行する。私たちは、停留精巣における造精機能障害の原因として、精子幹細胞の前駆体である未分化精細胞から精子幹細胞への分化障害があることを提唱した。今回、精子幹細胞への分化機構を明らかにするために、精子幹細胞分化障害のモデルとしてラット停留精巣を用い、停留精巣と正常精巣との発現差を認める遺伝子を同定し、その機能解析を行なった。

【方法】 研究(1) 妊娠 SD ラット (妊娠 14-20 日) に抗アンドロゲン剤である flutamide 7.5mg を連日腹腔内投与し停留精巣モデルラットを作成した。生後 9 日目のラット停留精巣 (UDT 群) と正常精巣 (Control 群) で発現差を認める遺伝子を同定するためにマイクロアレイ解析を行なった。研究(2) マイクロアレイ解析にて、停留精巣で発現亢進していた遺伝子のうち、ヒストン脱メチル化酵素 *Kdm5a* (*lysine (K)-specific demethylase 5A*) 遺伝子に着目し、生後 3 日目から 18 日目までの停留精巣と正常精巣における *Kdm5a* の発現差について定量 RT-PCR および Westernblotting で評価した。また *Kdm5a* タンパク質の精巣内局在については免疫染色で評価した。研究(3) ヒストン H3K4 メチル化抗体を用いて、生後 3 日目から 18 日目までの正常精巣および停留精巣の H3K4 メチル化状態を解析した。研究(4) 精子幹細胞の細胞株である GC-1 細胞へ *Kdm5a* を遺伝子導入し、精子幹細胞分化に関する遺伝子群の発現変化を定量 RT-PCR で確認した。

【結果】 (1) 生後 9 日目のラット停留精巣で高発現する 24 遺伝子を同定した。その 24 遺伝子の中で、(2) *Kdm5a* は停留精巣において、生後 3 日目から 9 日目にかけて発現の増加を認め、その後は 18 日目にかけて徐々に減少傾向を認めた。生後 9 日目においては正常精巣と比較して、停留精巣で有意に高発現していた ($p < 0.005$)。 *Kdm5a* は、精細管内における精細胞の支持細胞である Sertoli 細胞や間質細胞である Leydig 細胞には発現を認めず、有糸期の未分化精細胞、精原細胞、精母細胞の核内に発現を認めた。(3) 生後 9 日目の停留精巣において H3K4 のジメチルおよびトリメチル化の低下を認めた。(4) *Kdm5a* を強発現させた GC-1 細胞において、過去に精子幹細胞分化に関わると報告された *Esr2*, *Neurog3*, *Pou5f1*, *Ret*, *Thy1* の有意な発現亢進を認めた ($p < 0.005$)。

【考察】 生後 9 日目に停留精巣で高発現する *Kdm5a* を同定した。*Kdm5a* はヒストン H3K4 の脱メチル化酵素であり、同時期においては停留精巣で H3K4 が低メチル化状態であった。このことから、ヒストン修飾を介して精子幹細胞分化に関わる遺伝子発現が変化することで、精子幹細胞分化が調節されることが示唆された。

【審査の内容】 主査の中西から、なぜ停留精巣の造精機能障害にエピジェネティック制御が関わっていると考えたのか等 8 項目、第一副査の高橋教授から今回用いた停留精巣モデルでは不妊になるのか? また腫瘍発生が認められるのか等 10 項目、第二副査の郡教授からは腎臓がんの分子標的治療について等の質問があり、すべてに良好な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、泌尿器科学に関する知識を十分有していると考えられた。本研究は、塩基配列によらない、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構が、初期の精子形成過程においても存在する可能性について初めて示したもので、意義のある研究と言える。以上をもって本論文の著者は博士 (医学) の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 中西 真 副査 高橋 智 郡 健二郎