

## 最終報告

### 研究テーマ 継精子エピゲノム情報の理解と次世代の健康への展開

研究代表者：大隅典子 東北大学大学院医学系研究科・教授

共同研究者：稲田仁 国立精神・神経医療研究センター・研究員

吉川貴子 東北大学大学院医学系研究科・講師



## 1. 研究の背景と達成目標

### 【研究背景】

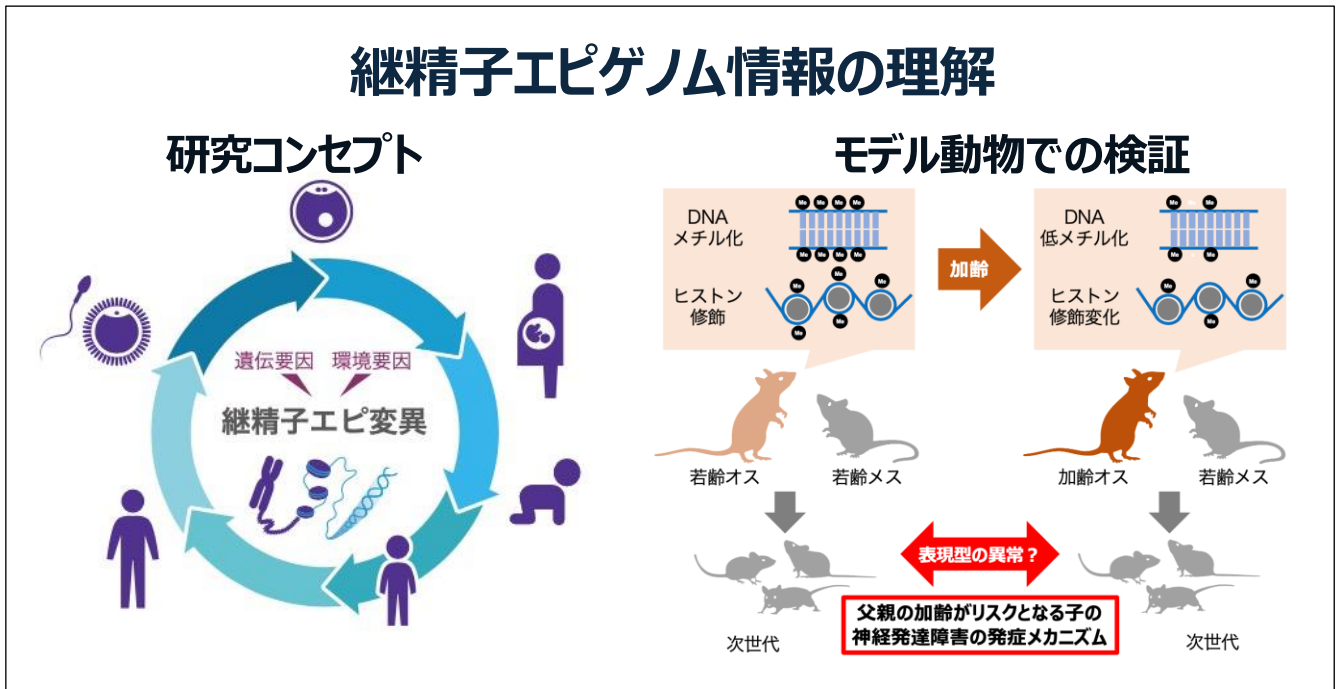
本邦における出生数は、2023年にはついに76万人を切り、8年連続して減少し、過去最小となった。少子化の背景には、種々の社会的・経済的要因がある一方で、子どもを持つ両親の年齢の上昇は直接的・生物学的な要因となっている。また近年、神経発達障害（自閉スペクトラム症、学習障害、注意欠陥・多動性障害等）も増加が著しく、就労人口の減少と相まって深刻な社会問題となっている。

これまで次世代の健康に関して、妊婦の栄養状態や疾病罹患等の母胎の環境因子が着目されてきたが、父親の加齢による低体重出生児が増加や、子どもの自閉スペクトラム症発症リスクの上昇が報告されている。我々の研究室でも、遺伝的背景が均一なマウスを用いて、父親の加齢が遺伝的なリスクと交絡する（影響を与える）因子であること（Yoshizaki *et al.*, EMBO Rep, 2016）や、加齢父由来仔マウス群において発達障害様の「非定型発達」を示す個体が多くなることを見出した（Mai *et al.*, 2022）。我々は、父加齢の次世代への影響に関して、どのような生物学的影響があるのか、その物質的な実体は何かを明らかにするために、精子形成過程の「エピゲノム変化」、いわば「エピゲノム情報のゆらぎ」に着目した。すでにマウスの精子形成過程で、雄性生殖細胞（精祖細胞、精母細胞、精子）における種々のヒストン修飾分子の量が加齢により、変化することを報告し（Tatehana *et al.*, PLoS One, 2020）、また精子DNAにおいて低メチル化領域が増加することを見出した（Yoshizaki *et al.*, EMBO Rep, 2021）。さらに、精子エピゲノム情報（例：ヒストン修飾 H3K79me3）が、定量的に次世代個体の行動の予測マーカーとして活用できる可能性についても特許化している（特許第 6653939 号）。

### 【達成目標】

本研究では、精子等におけるエピゲノム情報の変化が、次世代個体の神経発生に与える影響の解明に挑戦し、「エピゲノム情報のゆらぎ」を調整する「精子アンチエイジング因子」の理解と「精子アンチエイジングドラッグ」の探索を目標とし、以下の3研究項目を遂行した。

- ①マウス精子形成過程におけるエピゲノム関連因子の包括的プロファイリング
- ②継精子エピ変異が次世代個体の神経発生に及ぼす影響の解析
- ③精子アンチエイジングドラッグの探索



## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

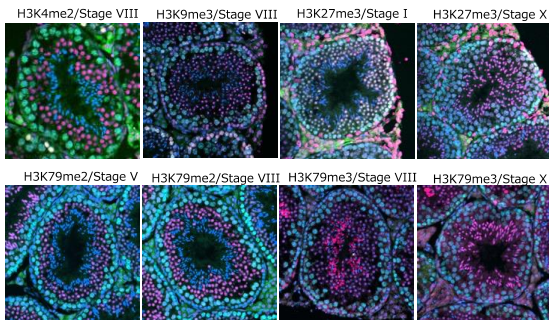
- 神経細胞の分化に重要な転写制御因子 REST にエピトープタグを付与したノックインマウスを作製し、REST が精原細胞で発現していることを明らかにした (Kimura *et al.*, Dev Dyn, 2022)。現時点において特異性の高い抗マウス REST 抗体が市販されていないため、今後 REST の発現組織を解析するうえで、開発したノックインマウスは広く有用なツールとなり、神経疾患や加齢性疾患など REST が関与することが示唆されている疾患の病態解明にも役立つと考えられる。
- マウス精子において、加齢した精子では細胞死関連のマイクロ RNA が優位に蓄積していることを明らかにした (Miyahara *et al.*, Sci Rep, 2023)。本研究の結果は、加齢精子に含まれるマイクロ RNA が次世代の神経発達障害の発症リスクに影響を与える可能性を示すもので、神経発達障害の分子機序の解明、および、リスク診断バイオマーカーや精子アンチエイジング法の開発につながると期待される。東北大学からプレスリリースを行い、日本経済新聞他に記事が掲載された。
- 6,400 の低分子化合物をスクリーニングし、エピゲノム因子 H3K27me2 を低下させる 29 の候補化合物を同定した。「精子アンチエイジングエピドラッグ」開発への第一歩となると期待される。

## 研究成果

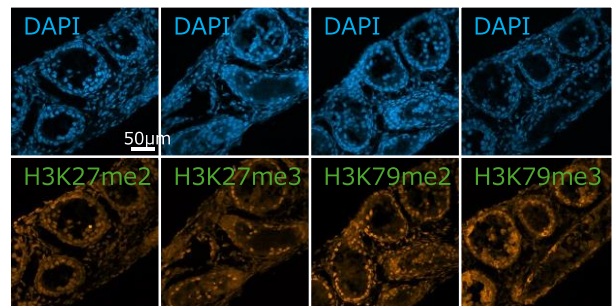
### ①マウス精子形成過程におけるエピゲノム関連因子の包括的プロファイリング

当研究室ではこれまで、精子形成過程において、父親の加齢が DNA メチル化やヒストン修飾といったエピゲノム情報にどのような影響を与えるか、マウスをモデルに研究してきた。その過程において、加齢精子では神経発生に重要な転写抑制因子 REST が結合すると考えられる領域が低 DNA メチル化となっていること、精子形成過程におけるヒストン修飾の変化が、加齢によって影響を受けることを明らかにした。また、未同定の次世代継承精子エピゲノム因子として精子のマイクロ RNA に着目し、マウスの精子に含まれるマイクロ RNA の加齢による変化を網羅的に解析した。月齢 3 ヶ月、12 ヶ月、20 ヶ月のマウスの精子のマイクロ RNA を比較し、加齢によって量が変化していたマイクロ RNA を同定した。その結果、加齢とともに精子の種々のマイクロ RNA が変化していることがわかり、それらの中には神経系に関わる遺伝子、特に自閉症スペクトラム症に関わる遺伝子を制御することが示唆された。さらに、変化したマイクロ RNA には、受精卵へ移行することが報告されているものが含まれていた。したがって、父親の高齢化による精子マイクロ RNA の変化が、子の成長や発達にも影響を与える可能性が示唆された。

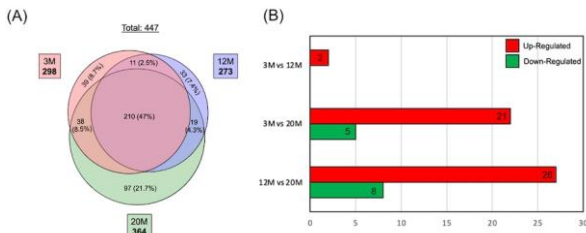
#### 精巣の加齢エピゲノム因子としての修飾ヒストン



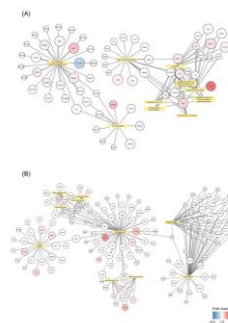
#### 器官培養精巣におけるメチル化ヒストン



#### マイクロRNA Chipによる加齢精子マーカー探索



加齢精子に特徴的なmiRNAを同定！



- 20ヶ月齢以降で精子miRNAの変化大
- 標的遺伝子には細胞死関連多数
- 自閉スペクトラム症との関連 (Miyahara et al. 2023 Sci Rep)

## ②継精子エピ変異が次世代個体の神経発生に及ぼす影響の解析

父親の年齢が次世代の神経発生に及ぼす影響を解析するために、加齢父および若齢父由来仔マウスの胎仔脳における遺伝子発現の雌雄差に着目して解析を行った。まず若齢父由来の胎齢 11 日の仔マウス胎仔脳では遺伝子発現の雌雄差が少ないのに比して、ニューロンの産生が盛んになる胎齢 14 日齢では雌雄差が拡大していた (Ochi *et al.*, Sci Data, in revision)。そこで、胎齢 14 日齢の加齢父由来仔マウスおよび若齢父由来仔マウスの胎仔脳の遺伝子発現を比較すると、加齢父由来仔マウス胎仔脳で発現が上昇する遺伝子に関して、雄よりも雌の胎仔脳でより多く認められた。したがって、本来発現すべきでないタイミングで遺伝子が発現上昇するという遺伝子発現の乱れが雌でより多く見られ、父加齢というファクターが娘に影響しやすい可能性が示唆された。また、加齢および若齢雄マウスの包括的精子 DNA メチル化解析ならびに加齢父および若齢父由来仔マウス胎仔脳における網羅的遺伝子発現解析により、DNA 低メチル化領域および加齢父由来仔マウス胎仔脳に共通項として、神経発生に重要な転写抑制因子の REST 標的遺伝子が浮上した (Yoshizaki *et al.*, EMBO Rep, 2021) ことから、REST の発現とその標的遺伝子を解析するために、ゲノム編集技術を用いて PA タグで標識した REST ノックインマウスを作出した。このノックインマウスにおいて、REST が胎仔脳における神経幹細胞特異的に発現することを確認した。このマウスを用いて精巣を解析したところ、PA タグを生化学的に検出できることを確認できた (Kimura *et al.*, Dev Dyn, 2022)。精子形成過程において、REST は精祖細胞およびセルトリ細胞特異的に発現すること、さらに加齢に伴い、REST 発現細胞は減少すること、生殖細胞分化で認められる分子マーカーとの局在に関して異常が生じていることを明らかにした。

## 遺伝子発現の雌雄差 加齢によるRESTの発現変化

### E14.5 RNA-seqデータの解析



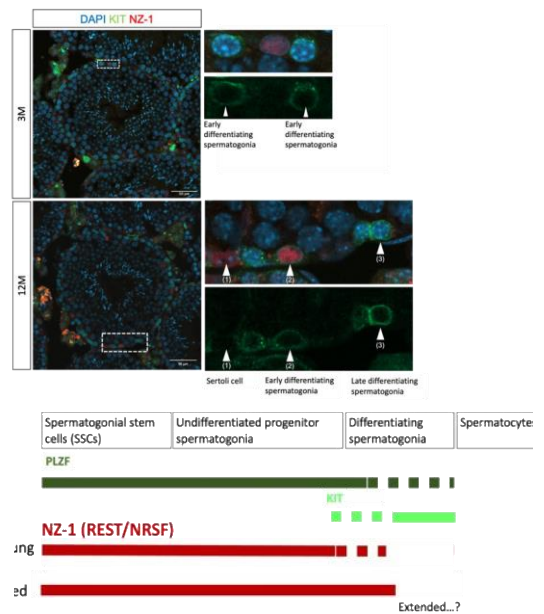
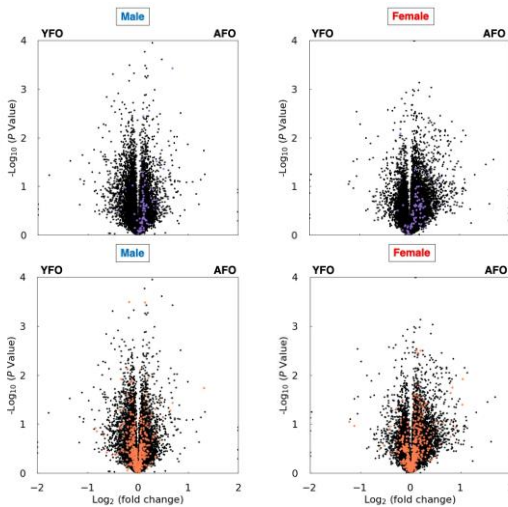
- REST/NRSF Target genes

GGAGCTGTCAGGGTCTGA

- Autosome
- X chromosome (ChX)



加齢父由来仔マウス (AFO、右側) は、若齢父由来仔マウス (YFO、左側) に比して、**雄よりも雌で多数の遺伝子発現が上昇**。なかでも、REST 標的遺伝子 (上) および X 染色体上遺伝子 (下) の発現上昇が興味深い。



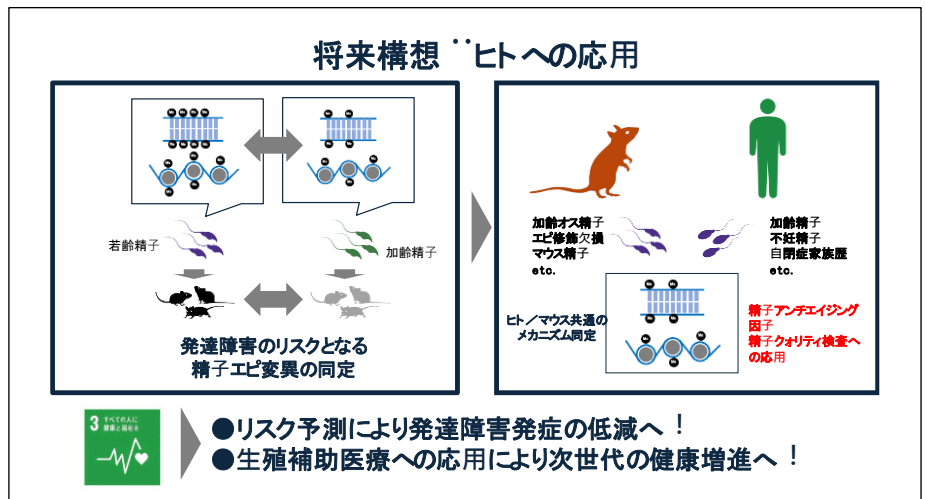
精子幹細胞において加齢に伴い REST 発現が延長

### ③精子アンチエイジングドラッグの探索

精子アンチエイジングドラッグの探索培養細胞株を用いたハイスループット低分子化合物スクリーニングを行った。はじめに、修飾ヒストンの量を定量的に検出できる測定系を確立した。マウス NIH/3T3 細胞を 384 ウェルプレートに播種し、メチル化酵素または脱メチル化酵素の阻害剤存在下で培養、各種修飾ヒストン (H3K27me2, H3K79me2, H3K27me3, H3K79me3) に対する免疫染色を行い、阻害剤非存在下での各種修飾ヒストン量と比較した。核の DAPI 染色による蛍光強度で細胞数を標準化した後、各修飾ヒストンの蛍光シグナル強度を細胞イメージアナライザーで測定・比較した結果、阻害剤存在下で、H3K27me2 および H3K27me3 について 50%~300%のシグナル強度変化を検出できた。つぎに、自動細胞分注装置、微量液体分注機、蛍光プレートリーダーを用いて、640 化合物/回のハイスループット化を達成した。生命科学・創薬研究支援基盤事業 (BINDS) より分譲された 6,400 の低分子化合物を添加した培地で培養した後、H3K27me2 の免疫染色を行い、染色蛍光強度を指標にスクリーニングを行った。H3K27 脱メチル化酵素阻害剤 (GSK J4) またはメチル化酵素阻害剤 (Tazemetostat) をポジティブ対照、溶媒の DMSO をネガティブ対照として用いた。一次スクリーニングにおいて、H3K27me2 シグナルを低下または上昇させる候補化合物を、それぞれ 285 化合物および 126 化合物、それぞれ同定した。二次スクリーニングにおいて、H3K27me2 シグナルを約 80%に低下させる 29 の化合物を同定した。

### 3. 今後の展開

今回の研究で明らかにされた精子加齢の影響を受けるマイクロ RNA といった加齢エピゲノム因子が次世代の脳発達にどのように関与するか解析を進めるとともに、これまでに報告した加齢に影響を受ける修飾ヒストンや DNA メチル化など、他の加齢エピゲノム因子の解析を継続し、次世代継承精子エピゲノムの新分野を展開する。また、加齢エピゲノム因子 H3K27me2 を低下させる候補化合物の生体内における機能・標的分子の解析を進め、加齢した精子のエピゲノムを「巻き戻せる」ような「精子アンチエイジングエピソード」の開発へ繋げ、加齢精子クオリティの改善や次世代の発達障害発症リスク低減するための臨床プログラムへの応用を目指す。



#### 4. 発表実績

##### 【主な論文（いずれも査読付き）】

- Miyahara K, Tatehana M, Kikkawa T, **Osumi N**: Investigating the impact of paternal aging on murine sperm miRNA profiles and their potential link to autism spectrum disorder. *Scientific Reports*. 2023 Dec. doi: 10.1038/s41598-023-47878-z.
- Mai L, Inada H, **Osumi N**: Whole-brain mapping of neuronal activity evoked by maternal separation in neonatal mice: An association with ultrasound vocalization. *Neuropsychopharmacology Reports*. 2023 May. doi:10.1002/npr2.12337.
- Inada H, Grace C L, **Osumi N**: A novel feature of the ancient organ: A possible involvement of the subcommissural organ in neurogenic/gliogenic potential in the adult brain. *Frontiers in Neuroscience*. 2023 Mar 1141913. doi:10.3389/fnins.2023.1141913.
- Mai L, Inada H, Kimura R, Kanno K, Matsuda T, Tachibana R O, Tucci V, Komaki F, Hiroi N, **Osumi N**: Advanced paternal age diversifies individual trajectories of vocalization patterns in neonatal mice. *iScience*. 2022 Aug. doi: 10.1016/j.isci.2022.104834.
- Grace C L, Inada H, Hiraoka K, Araki S, Yamanaka S, Kikkawa T, **Osumi N**: The subcommissural organ maintains features of neuroepithelial cells in the adult mouse. *Journal of Anatomy*. 2022 Mar;820- 830. doi:10.1111/joa.13709.
- Kimura R, U Inoue Y, Kikkawa T, Tatehana M, Morimoto Y, Inada H, Oki S, Inoue T, **Osumi N**: Detection of REST expression in the testis using epitope-tag knock-in mice generated by genome editing. *Developmental Dynamics*. 2022 Mar;251(3):525-535. doi: 10.1002/dvdy.417.
- **Osumi N**, Tatehana M: Transgenerational epigenetic information through the sperm: Sperm cells not just merely supply half of the genome for new life; they also seem to transmit additional information via epigenetic modifications. *EMBO Reports*. 2021 Aug 4;22(8):e53539. doi: 10.15252/embr.202153539.

##### 【主な学術講演】

- 大隅典子: 神経発達症の発症機序と高次脳機能障害. **第47回日本高次脳機能障害学会学術集会**. 招待講演. 2023.10.28
- 大隅典子: 神経新生からアプローチする認知症. **第7回日本脳神経外科認知症学会学術総会**. 2022.6.12
- 大隅典子: 父加齢と次世代のニューロダイバーシティ. **日本発達神経科学会第10回学術集会** 基調講演 2021.11.21
- 大隅典子: DOHaD から POHaD へ: 継精子エピ変異の次世代脳発達への影響. **第48回日本毒性学会学術年会** 基調講演 2021.7.8

##### 【和文出版等】

- 大隅典子: 小説みたいに楽しく読める脳科学講義.羊土社.2023年
- 大隅典子: PDOHaD 研究における父加齢と生死のエピジェネティック変異. **DOHaD 先制医療への展開**. 241-246. 金原出版. 2023年
- 大隅典子: 精子を介した世代継承エピジェネティック情報. *Bio Clinica* 37(1) 71-73 .2022年

##### 【東北大学からのプレスリリース】

- 「父親の加齢で精子の質が変化する 加齢マウス精子のマイクロ RNA 変化と次世代の神経発達障害リスク」(2023年12月8日) 日本経済新聞他に記事掲載。
- 「音声コミュニケーションの「個性」はどこから生まれるのか -父親の加齢が新生仔マウスの音声行動に及ぼす影響-」(2022年8月15日) 科学新聞他に記事掲載