

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08136

研究課題名(和文) 精子幹細胞における活性化酸素産生の転写制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the transcriptional regulation of ROS in Spermatogonial Stem cells

研究代表者

森本 裕子 (Morimoto, Hiroko)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：90540097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：活性化酸素(ROS)は生殖細胞に悪影響を及ぼすと考えられている。本研究は精子幹細胞においてROSがどのようなシグナル伝達を行い自己複製を促進するのかを解明する事を目的とし、p38 Mapkの遺伝子欠損マウスを用いて生体内でのNox1の制御機構を解析した。また遺伝子発現解析によりp38 Mapk分子下流のシグナル伝達経路を解明し、ROSの産生を促進する転写因子を機能的に同定した。(I) p38 Mapkの遺伝子欠損マウスの解析、(II) Nox1制御シグナルの同定、(III) ROSにより制御される転写因子の同定、(IV) GS細胞におけるミトコンドリア由来のROSの影響の解析のについて行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞研究ではROSは生殖細胞に悪影響を与えるものであると考えられていた。ROSの過剰をもたらすSod2やNrf2のノックアウトマウスにおいては精子形成が不完全となり不妊となる。男性不妊治療の臨床現場でもROSの抑制が試みられている。ROSが精子幹細胞の自己複製に必要であるという結果は大きな反響があった。しかしこれらの異なるノックアウトマウスが何故異なった表現型を示すのかについては未だ回答が得られておらず、本研究でアプローチする問題は次の大事なステップであると申請者は考えている。このようにROSが精子幹細胞の自己複製に及ぼす影響を解析することは臨床での不妊治療にも影響を及ぼす重要課題である。

研究成果の概要(英文)：We found that the MAPK14/MAPK7/BCL6B pathway creates a positive feedback loop to drive spermatogonial stem cell (SSC) self-renewal via ROS amplification. The activation of MAPK14 induced MAPK7 phosphorylation in cultured SSCs, and targeted deletion of Mapk14 or Mapk7 resulted in significant SSC deficiency after spermatogonial transplantation. The activation of this signaling pathway not only induced Nox1 but also increased ROS levels. Chemical screening of MAPK7 targets revealed many ROS-dependent spermatogonial transcription factors, of which BCL6B was found to initiate ROS production by increasing Nox1 expression via ETV5-induced nuclear translocation. Because hydrogen peroxide or Nox1 transfection also induced BCL6B nuclear translocation, our results suggest that BCL6B initiates and amplifies ROS signals to activate ROS-dependent spermatogonial transcription factors by forming a positive feedback loop.

研究分野：細胞生物学

キーワード：精子幹細胞 活性化酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

精子幹細胞は精子形成の源となる細胞である。精子幹細胞は個体が一生に亘り自己複製分裂を行い、精子を作り続ける基盤となっている。我々は glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) および fibroblast growth factor2 (FGF2) を添加して精子幹細胞を長期間培養する技術を開発し (Kanatsu-Shinohara et al., Biol. Reprod. 69, 612-616, 2003)、この細胞を germline stem (GS) 細胞と名付けた。GS 細胞の樹立により精子幹細胞を大量に回収することが可能となり、その自己複製機構の生化学・分子生物学的解析が可能となった。

最近、我々は ROS 産生を担う NADPH oxidase1 (Nox1) 遺伝子のノックアウト(KO)マウスを用い、精子幹細胞の自己複製には自己複製因子(GDNF, FGF2)の刺激によって生じる ROS が必須であることを見いだした (Morimoto et al., Cell Stem Cell 12, 774-786, 2013)。Nox1 は通常 Cyba, Noxo, Noxa もしくは Rac などの分子と複合体を形成し ROS を産生することが知られている。GS 細胞においては Nox1 遺伝子は FGF2 もしくは GDNF の添加によりその発現が誘導されて来る分子であり、Nox1 遺伝子を short hairpin RNA (shRNA) により発現抑制すると GS 細胞の分裂は停止してしまう。生体内においても Nox1 遺伝子欠損マウスの精巣は野生型よりも小さく、Nox1 遺伝子欠損マウスの精子幹細胞に継代移植を行い増殖刺激を与えると、野生型の細胞よりも自己複製分裂が抑制されていた。ROS の産生を亢進させるため GS 細胞に過酸化水素を添加すると、過剰の過酸化水素の投与は GS 細胞の細胞死を引き起こしたが、低濃度の過酸化水素の添加では精子幹細胞の自己複製分裂が亢進することがわかった。逆に ROS 阻害剤を投与すると GS 細胞の分裂を阻害することから、Nox1 由来の ROS は精子幹細胞の自己複製を促進することが明らかとなった。ROS は通常 p38 Mapk を活性化し、幹細胞に悪影響を与えることが知られている。GS 細胞を用いた場合でも低濃度の ROS による p38 Mapk の活性化は確認された。しかしながら、予想と反し p38 Mapk の阻害剤である SB203580 を添加すると、GS 細胞の細胞分裂は抑制されたのみならず Nox1 遺伝子の発現が抑制された。このことから、ROS の産生による p38 MAPK の活性化は精子幹細胞の自己複製分裂に必要であり、かつ Nox1 遺伝子の誘導による ROS の産生によりポジティブフィードバックを形成することで精子幹細胞の自己複製を促進していることが示唆された。

一般に ROS は生殖細胞に悪影響を与えると考えられていたことに加え、p38 Mapk の亢進は血液や神経系の幹細胞の老化を誘導することから、精子幹細胞についての申請者の観察は予期せぬものであった。これらの結果から精子幹細胞が他の幹細胞とは異なるユニークな ROS 制御機構を持つことが予想される。ROS は精子幹細胞の自己複製に必要である一方で、過剰な ROS は GS 細胞の細胞死を誘導することを鑑みると、精子幹細胞の自己複製には一定量の ROS が保たれることが必要であると予想される。このように GS 細胞の自己複製分裂に ROS が貢献することが明らかとなったが、我々は少なくとも次の 3 つの問題を解決する必要があると考えている。特に上述の p38 Mapk の機能解析実験は GS 細胞を用いた試験管内の実験であったため、

- 1) 生体内でも p38 Mapk は ROS を制御しているのか、
- 2) p38 Mapk がどのようにして Nox1 遺伝子の発現を制御するのか、
- 3) ROS がどのようにして精子幹細胞の自己複製を亢進することが出来るのか、

という 3 点は精子幹細胞における ROS の役割を考える上では未解決の重要な課題である。これら Nox1 由来の ROS 産生に加えて、無視できないのはミトコンドリア由来の ROS である。ミトコンドリア由来の ROS も外来のサイトカインによる刺激により発生することが知られているが、その重要性にも関わらず精子幹細胞における役割は未解明である。Nox 由来の ROS とのクロストークも知られており、これらの別々の由来をもつ ROS がどのようにして GS 細胞の自己複製に使い分けられているのかについて明らかになっていない。

2. 研究の目的

精子幹細胞は精子の源となる細胞である。活性酸素(ROS)は生殖細胞に悪影響を及ぼすと考えられてきたが、最近我々は Nox1 遺伝子による ROS 産生が精子幹細胞の自己複製分

裂に必要であることを見出した。

本研究では精子幹細胞における ROS がどのようなシグナル伝達を行い自己複製を促進するのかを解明することを目的とする。これまでに同定した Nox1 遺伝子の下流で p38 Mapk 活性が Nox1 の発現に必要であることから、p38 Mapk の遺伝子欠損マウスの解析を行うと共に、精子幹細胞の培養系を用いることでマイクロアレイおよび RNA シークエンスにより下流のシグナル伝達経路の解析を行い、ROS の産生を促進する転写因子の機能的同定を目指す。

3. 研究の方法

本研究では p38 Mapk 遺伝子の生体内での役割を解析すると共に、p38 Mapk の下流で働くシグナル伝達経路を明らかにし、どのようにして精子幹細胞の自己複製と ROS 産生が関わるのかの分子メカニズムを明らかにする。さらに ROS によって制御される転写因子を同定し、その機能解析を行う。これらの Nox1 遺伝子についての実験結果をベースとしてミトコンドリア由来の ROS のもつ生物学的な役割に迫る。具体的には以下の 4 つの実験を行う。

- 1) p38 Mapk ノックアウトマウスにおける精子幹細胞の解析
- 2) 小分子化合物ライブラリーを用いたスクリーニングによる Nox1 遺伝子制御シグナル制御分子の同定
- 3) ROS によって制御される転写因子の同定とその機能解析
- 4) GS 細胞における ROS 発生の再構成と Nox 由来 ROS による GS 細胞の増殖への影響の解析

本計画は、(I) p38 Mapk の遺伝子欠損マウスの解析、(II) Nox1 制御シグナルの同定、(III) ROS により制御される転写因子の同定、(IV) GS 細胞におけるミトコンドリア由来の ROS の影響の解析の大きく 4 つの計画に分けられる。(I) p38 Mapk の遺伝子欠損マウスは既に作成しており、このマウスの精子幹細胞の表現型と機能解析を行う。(II) Nox1 の解析については、小分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い Nox1 の発現に影響するシグナル伝達経路を同定する。(III) についてはマイクロアレイにより標的遺伝子の同定を行う。候補遺伝子は GS 細胞への遺伝子導入で機能的に評価する。(IV) についてはミトコンドリア特異的にカタラーゼを抑制した場合の精子幹細胞の自己複製への影響を機能解析する。

p38 Mapk 遺伝子改変マウスの解析

生体内での p38 Mapk の役割を調べるために、我々は既に p38 alpha の conditional KO マウスを阪大(大津欣也博士)より導入している。現在このマウスを精原細胞において Cre を発現する Stra8-Cre マウスと交配して精子形成における p38 alpha の影響を検討する実験を行っている。作成した p38alpha 欠損マウスにおける精子形成の状態は GFRA1(未分化精原細胞マーカー)、KIT(分化型精原細胞マーカー)、SYCP3(減数分裂細胞マーカー)などを用いた免疫組織化学で評価すると共に、交配実験により妊孕性の評価を行う。

Stra8-Cre トランスジェニックマウスとの交配実験では精子形成への影響を見ることができ、精子幹細胞はその数が精巣細胞の 0.02%と極めて少ない上に機能的にしか同定することができないため、移植実験によりその存在を定量的に確認する必要がある。そこで上記の実験に並行して p38 alpha conditional KO マウスを GFP を発現するマウスと交配し、ドナーとしてのマーカーを導入している。交配して生まれてきたホモの conditional KO マウスの精巣細胞をコラゲナーゼおよびトリプシンを用いた酵素処理によりバラバラにし、試験管内で Cre を発現するアデノウイルスを感染させてのち、プスルファン投与になり不妊となったマウスの精細管内へとマイクロインジェクションを行う。移植後 2 ヶ月後に精子幹細胞活性をコロニー数およびホストマウスの精巣において精子形成を含む精細管の数を測定する。

上記の実験に加えて、p38 alpha のシグナル伝達機構を解析するために p38 alpha の conditional KO マウスの精巣から GS 細胞の樹立を行う。この GS 細胞に Cre を発現するアデノウイルスを感染させたのちに、RNA とタンパク質を回収する。RNA はマイクロアレイに使用し野生型と比較することで p38 Mapk の欠損により発現が低下する分子を検索する。

Nox1 制御シグナルの同定

以前の我々の報告で p38 Mapk の inhibitor である SB203580 により GS 細胞の増殖が抑制され Nox1 の発現が低下することを見出した。p38 Mapk が GS 細胞における Nox1 および ROS の発現に必要なことは見いだしているが、我々の予備実験では活性化型 p38 Mapk の強制発現のみでは ROS 産生および Nox1 を発現するには十分でないという結果を得ている。

これらの結果は p38 Mapk と協調して働く分子が存在し、GS 細胞の Nox 遺伝子による ROS 産生を促進していると予想される。そこで p38 Mapk と協調して ROS 産生および Nox1 の発現に必要な分子をさらに同定することで、ROS 産生に関わる分子をより大きなスケールで検索する。今回の実験では 96 穴プレートを用いて小分子化合物の自動スクリーニングを行う。現在のところ、Selleck chemical (476 個)、calbiochem (65 個)もしくは Prestwick 社(1120 個)由来のケミカルライブラリーが入手可能である。このスクリーニングは二段階で行う。まず、第一のステップでは Lucigenin の発光を利用してこれらの薬剤のうち ROS の産生を抑制する分子を同定する。次のステップでは候補分子が実際に Nox1 遺伝子の発現抑制を引き起こすかどうかを調べるために Realtime PCR 法により確認を行う。スクリーニングにより候補遺伝子を選定した後、shRNA および Crispr-Cas9 を発現するレンチウイルスにより GS 細胞における ROS 産生および Nox 遺伝子の発現誘導に及ぼす影響を解析する。もしこれらの分子がキナーゼや転写因子であった場合には活性化型の分子を作成することで Mapk14 と同時に遺伝子導入することで ROS の産生や Nox1 の発現誘導に対する影響を調べる。

ROS によって制御される転写因子の同定

GS 細胞に ROS の抑制剤を添加すると、その増殖は停止することから ROS の下流で活性化する転写因子が存在することが予想される。p38 alpha の下流として働く転写因子は HBP1 をはじめとしていくつか知られているが、我々が shRNA を用いて予備実験を行ったところ、いずれも ROS の発現および Nox1 の誘導に影響するものを見つけることができなかった。したがって、既知の p38 alpha 標的遺伝子とは異なる分子が Nox1 遺伝子の発現誘導に関与している可能性がある。この分子を同定するためにこれまでに樹立した Nox1 欠損 GS 細胞および ROS の inhibitor (例えば、DPI) を野生型の GS 細胞に添加して得られた RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行う。両者で共通して発現が変化する遺伝子に注目し、ROS の影響下にある候補遺伝子を同定する。候補遺伝子の機能解析は当該遺伝子の強制発現を行い、ROS の産生と Nox1 遺伝子の発現誘導の両方を引き起こすものをスクリーニングにより同定する。こうして得られた候補遺伝子が自己複製分裂に必要なものを同定するために、次に候補遺伝子を GS 細胞で shRNA により抑制した場合に ROS および Nox1 の発現低下が起こるかについて検討を行う。この二段階のスクリーニングを経て、候補遺伝子を選別できた場合には、当該遺伝子の Nox1 遺伝子のプロモーター配列への結合能を ChiP 解析により検定し、更にルシフェラーゼアッセイにより機能的にも評価を行う。また、活性化型 p38 alpha を野生型 GS 細胞に導入し、候補遺伝子が p38 Mapk の下流分子として機能しているか否かについても検討する。最終的には Nox1 欠損 GS 細胞へ候補遺伝子を導入し、Nox1 遺伝子欠損細胞の増殖の回復を試みる。目標分子を同定した場合には精子幹細胞の自己複製に必要とされる既知の遺伝子に対する影響を調べるためにゲノムワイドに ChiP シークエンスを行い、標的となる遺伝子を検索する。

GS 細胞におけるミトコンドリア由来 ROS の影響の解析

我々はこれまで Nox 遺伝子が ROS 発現に必要なことは示したが、ROS はミトコンドリアからも産生されており Nox1 由来の ROS がどの程度 GS 細胞の自己複製に影響があるかについては区別して解析できておらず明らかになっていない。そこで Nox 遺伝子がどの程度 GS 細胞における ROS 産生に寄与するかを明らかにするため、Nox1 分子を導入し、ROS の再構成実験を行い、通常のサイトカインにより GS 細胞の増殖誘導を試みた場合と比較する。まず、Nox と複合体を形成する個々の遺伝子の発現誘導を GS 細胞への自己複製因子の添加により realtime PCR により確認する。次に誘導されてきた遺伝子を Nox1 と共に GS 細胞へ導入することで自己複製因子がない状態での ROS 産生を再構成することで ROS 産生に必要な最低限の制御因子を同定する。

さらに、ミトコンドリア由来の ROS とのクロストークがどの程度あるかを調べるために、ミトコンドリア由来の ROS を特異的に染色できる蛍光分子を用いて

- 1) 自己複製刺激を行った際にどの程度ミトコンドリア由来の ROS が発生するか、
- 2) Nox 遺伝子を強制発現した際にどの程度ミトコンドリアの ROS に影響するのかについて検討する。さらに
- 3) ミトコンドリアに局在することができるカタラーゼを GS 細胞に発現させ、ミトコンドリアでの ROS 産生を抑制した場合に精子幹細胞の自己複製がどの程度影響を受けるのかを GS 細胞の増殖により確認する。

4 . 研究成果

本研究において (I) p38 Mapk の遺伝子欠損マウスの解析、(II) Nox1 制御シグナルの同定、(III) ROS により制御される転写因子の同定、(IV) GS 細胞におけるミトコンドリア由来の ROS の影響の解析の 4 つの項目について行った。

まず、(I) p38 Mapk の遺伝子欠損マウスの精子幹細胞の表現型と機能解析を行った。(II)Nox1 の解析については小分子化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行い Nox1 の発現に影響するシグナル伝達経路を同定した。

(III)についてはマイクロアレイにより標的遺伝子の同定を行った。この結果、ROS の産生を促進する候補遺伝子として Bcl6b 遺伝子が見出された。

これらの結果より GS 細胞へ Bcl6b 遺伝子の遺伝子導入を行い機能的に評価した結果、p38 Mapk/Erk5/Bcl6b 経路がポジティブフィードバックを形成している事がわかった。

また、この経路が ROS の産生を介して精子幹細胞の自己複製を行う事がわかった。GS 細胞にて p38 Mapk を活性化すると Erk5 のリン酸化が生じた。また p38 Mapk や Erk5 遺伝子を欠損させた GS 細胞をマウスの精巣に移植すると著しく精子幹細胞の自己複製を阻害する事が分かった。このシグナル経路の活性化は Nox1 を発現させ、さらに ROS の産生を促した。

さらに(IV)ではミトコンドリア特異的にカタラーゼを抑制した場合の精子幹細胞の自己複製への影響の機能解析を行った。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Watanabe S, Shinohara T.	4. 巻 64(6)
2. 論文標題 Reversible inhibition of the blood-testis barrier protein improves stem cell homing in mouse testes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Reprod Dev.	6. 最初と最後の頁 511-522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1262/jrd.2018-093.	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 Morimoto H, Kanastu-Shinohara M, Ogonuki N, Kamimura S, Ogura A, Yabe-Nishimura C, Mori Y, Morimoto T, Watanabe S, Otsu K, Yamamoto T, Shinohara T.	4. 巻 2(2)
2. 論文標題 ROS amplification drives mouse spermatogonial stem cell self-renewal.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance.	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） doi: 10.26508/lisa.201900374.	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 Shinohara T, Kazuki K, Ogonuki N, Morimoto H, Matoba S, Hiramatsu K, Honma K, Suzuki T, Hara T, Ogura A, Oshimura M, Kanatsu-Shinohara M, Kazuki Y.	4. 巻 9(4)
2. 論文標題 Transfer of a mouse artificial chromosome into spermatogonial stem cells genetates transchromosomic mice,	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports.	6. 最初と最後の頁 1180-1191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2017.08.012	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 -

〔学会発表〕 計0件

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