

精子幹細胞のアンチエイジング機構の解明

Molecular Analysis of Spermatogonial Stem Cell Aging

課題番号：18H05281

篠原 隆司 (SHINOHARA, TAKASHI)

京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要（4行以内）

Germline Stem (GS)細胞は試験管内では精原細胞として増殖するが、精巣へ移植すると精子へと分化する。GS細胞は活性酸素(ROS)に抵抗性であり、突然変異頻度が体細胞よりも低い。さらに短縮したテロメアを持ったままでも無限に増殖する。このようにGS細胞は独特のアンチエイジング機構を持っており、本研究ではこの分子機構の解明を目指す。

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子形成、幹細胞、老化

1. 研究開始当初の背景

GS細胞は形質転換することなく5年以上にわたり増殖し続けることから、我々はGS細胞のテロメア維持機構に興味を持った。通常の初代培養細胞は継代のうちに、テロメアが短縮し増殖が停止してしまう。GS細胞のテロメアも培養と共に短縮していくが、5年を超えて培養するとテロメア長は1.5~2kb程度で維持されたまま増殖は持続する。GS細胞の研究から明らかになってきた精子幹細胞のもう一つの特徴は reactive oxygen species (ROS) 抵抗性である。体細胞の研究より老化につれてROSの産生が亢進し、このために細胞のDNAを損傷し老化を促進するという老化のフリーラジカル説が提唱された。しかしながら、GS細胞は自己複製分裂にROSを必要とする (Cell Stem Cell 2013;12:774)。また高濃度のROSに暴露するとGS細胞はES細胞や体細胞よりも細胞死に抵抗性があることから、精子幹細胞にはROSの損傷から自己のDNAを守る巧妙な仕組みを持つことが予想される。これらGS細胞を用いた培養実験の結果は精子幹細胞が強いアンチエイジング機構を持つことを示すが、一方で生体内の精子幹細胞の数は老化と共に減少する (Dev Cell 2016;38:248)。精子幹細胞は生体内でも持続的に分裂しており、試験管内では事実上無限に増殖することを鑑みると、細胞分裂自体が幹細胞の減少の原因ではなく、精巣の体細胞からの老化シグナルが老化を誘導している可能性が高い。しかしながら、このような体細胞由来老化誘導シグナルは同定されていない。

2. 研究の目的

本研究は老化精子幹細胞の1) テロメア維持機構、2) DNA修復・ROS耐性機構の解明と3) 精巣体細胞からの老化促進シグナルの同定の三つを目標とする。

3. 研究の方法

1) テロメア維持機構の解明では、GS細胞のテロメアの状態をテロメアFISHや可視化により解析すると共に、その結合因子を同定する。2) DNA修復についてはLacオペロンのリプレッサーであるLacI遺伝子を突然変異レポーターとして持つBig Blueマウスを用いて老化個体内の幹細胞における突然変異頻度も測定する。また相同組み換えもしくはEnd joining活性を比較測定できるコンストラクトをGS細胞に遺伝子導入し、それぞれの活性を評価する。更に精原細胞特異的に発現する転写因子を対象にしBase excision repair (BER)活性を指標としshRNAを用いた遺伝子発現抑制により候補遺伝子を同定する。3) 体細胞からの老化シグナルの同定では様々な老化モデル動物の精巣の遺伝子解析を行い、精子形成とテストステロン量を指標として老化表現型を誘導する分子を同定する。

4. これまでの成果

1) テロメア維持機構の解明

GS細胞は60ヶ月の間培養しても増殖停止が起こらず、DNAメチル化解析を行っても大きな変化を認められなかった。核型も正常であり、テロメア欠損細胞でよく見かけられるテロメア融合像はみられなかった。通常の細胞は一定回数 of 細胞分裂の後には分裂停止が起

こるのに対して、老化したGS細胞は若いGS細胞よりも活発に増殖していた。GS細胞の遺伝子発現解析を行ったところ、老化したGS細胞ではWnt7bの発現が顕著に上昇していることを見出した。クロマチン免疫沈降法によりH3K27残基にメチル化を誘導するPRC2複合体のPhf1, Asxl1分子の発現が低下していることを見出した。その結果、Wnt7bの発現の亢進とJNKの活性化が起こり、下流であるPpargc1aの発現を抑制したためにミトコンドリア量が低下し、老化GS細胞では解糖系の活性が亢進していることが分かった

2) DNA 修復・ROS 耐性機構の解明

精子幹細胞の自己複製因子として Glial cell line-derived neurotrophic factor と fibroblast growth factor 2 が知られているが、これらのサイトカインを GS 細胞に添加すると Mapk14, Mapk7 の活性化が起こり、Bcl6b という転写因子が核内に移行し Nox1 遺伝子を活性化することが ROS 産生の主たる経路であることを明らかにした。この経路をさらに詳細に解析することにより、Nox1 由来の ROS が再びサイトカインシグナルの伝達に必要であった Mapk14 および Mapk7 を刺激するというポジティブフィードバックを形成することで Nox1 の発現を刺激するという ROS の増幅が起こることを見出した。

3) 体細胞からの老化促進シグナルの同定

老化精巣では精子形成レベルが低下し、幹細胞数も減少する。この原因を探索する過程で我々は Cldn11 分子に注目した。Cldn11 欠損マウスは血液精巣閉鎖が破綻しており、精母細胞の段階で精子形成が停止して先天的に不妊となっている。Cldn11 欠損マウスの右精巣細胞を左精巣内へ注入すると、精子形成を再開して子孫を得ることが出来た。これにより血液精巣閉鎖が精子形成に必要なものではないことを証明し、幹細胞の自家移植で疾患を治癒するのに初めて成功した。

5. 今後の計画

1) テロメア維持機構の解明

GS 細胞のテロメア制御に関わるいくつかの候補分子を同定している。この機能解析が次の課題である。

2) DNA 修復・ROS 耐性機構の解明

以前に Nox1 由来の ROS が GS 細胞の自己複製分裂に必要であることを報告したが、Nox1 欠損 GS 細胞を樹立したところ、野生型マウス由来の GS 細胞と同様なスピードで増殖することが分かった。ROS の産生と酸素濃度が密接な関係があるというデータを得ており、両者の関わりを解析している。

3) 体細胞からの老化促進シグナルの同定

2歳のマウス、ラットおよび16歳のマーモセット精巣の遺伝子発現解析を行なった結果、複数の候補遺伝子を得た。我々が独自に開発した生体への遺伝子導入実験系を用いて候補遺伝子の機能解析を行なっている。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Matoba, S., Ogura, A. and Shinohara, T. 2020. Autologous transplantation of spermatogonial stem cells restores fertility in congenitally infertile mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA in press.
2. Shinohara, T. and Kanatsu-Shinohara, M. 2020. Transgenesis and genome editing of mouse spermatogonial stem cells by lentivirus pseudotyped with Sendai virus F protein. Stem Cell Reports in press.
3. Kanatsu-Shinohara, M., Yamamoto, T., Toh, H., Kazuki, Y., Kazuki, K., Imoto, J., Ikeo, K., Oshima, M., Shirahige, K., Iwama, A., Nabeshima, Y., Sasaki, H. and Shinohara, T. 2019. Aging of spermatogonial stem cells by Jnk-mediated glycolysis activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 116, 16404-16409.
4. Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Kamimura, S., Ogura, A., Yabe-Nishimura, C., Mori, Y., Morimoto, T., Watanabe, S., Otsu, K., Yamamoto, T. and Shinohara, T. 2019. ROS amplification drives mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Life Sci. Alliance 2, 2.
5. Watanabe, S., Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Matoba, S., Ogura, A. and Shinohara, T. 2018. In vivo genetic manipulation of male germline stem cells and their microenvironment by adeno-associated viruses. Stem Cell Reports 10, 1551-1564.
7. ホームページ等
http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen/research_summary.html