

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06445

研究課題名(和文)精子幹細胞における酸素代謝制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of oxygen metabolism regulation in Spermatogonial Stem cells.

研究代表者

森本 裕子 (Morimoto, Hiroko)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：90540097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では以下の項目について研究を行なった。(1)精子幹細胞の酸素応答機構の解析(2)精子幹細胞のROS産生機構の解明(3)酸素応答で制御される標的遺伝子の機能同定(4)酸素応答と代謝制御に関わるHif1a及びc-Mycの解析。以上の研究結果より、Nox1遺伝子を欠損した未分化な精原細胞において低酸素応答と代謝制御に関わるHif1a遺伝子の発現が減少している事がわかった。低酸素においてHif1a遺伝子によってc-Myc遺伝子の活性化とCdkn1a遺伝子の発現抑制が起こっていても細胞の増殖が減少する事、更にROSの由来と酸素応答のバランスが精子幹細胞の自己複製には重要である事がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで精子幹細胞の自己複製におけるROSの役割については我々のグループが最先端の研究成果を報告してきた。他の研究グループではROSについての研究はなされていない。自己複製における低酸素の役割については血液幹細胞やES細胞などでは報告されているものの、通常は低酸素が幹細胞の増殖を刺激する方向で働くのに対して、GS細胞は増殖の低下が起こる。恐らく酸素に対する反応性が精子幹細胞では異なっていることが予想される。その意味で、今回の低酸素のGS細胞のROS発生や自己複製分裂に対する影響の解析は他の幹細胞との比較の上でも、これまでの研究を取りまとめる意味でも重要なステップであり、ユニークなものである。

研究成果の概要(英文)：In this study we have done 4 subjects.(1)mechanism of ROS hypoxic response in spermatogonial stem cells (SSCs).(2)mechanism of ROS production in spermatogonial stem cells.(3) Target genes which works under hypoxic response.(4)HIF1A and CMYC genes whose deficiency exacerbated self-renewal efficiency. We report the critical role of oxygen on ROS-induced self-renewal. NOX1-derived ROS were significantly reduced, and Nox1-deficient SSCs proliferated poorly under hypoxia but normally under normoxia. NOX1-derived ROS also influenced hypoxic response in vivo because Nox1-deficient undifferentiated spermatogonia showed significantly reduced expression of HIF1A, a master transcription factor for hypoxic response. Hypoxia-induced poor proliferation occurred despite activation of MYC and suppression of CDKN1A by HIF1A, whose deficiency exacerbated self-renewal efficiency. These results underscore the importance of ROS origin and oxygen tension on SSC self-renewal.

研究分野：精子幹細胞

キーワード：活性酸素

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により ES 細胞や成体内の幹細胞は解糖系に依存していることが明らかになってきた。一方、酸素を利用してエネルギーを産生するミトコンドリアの代謝経路は抑制されているため、ミトコンドリアで多く産生される ROS が幹細胞では著減していると考えられている。過剰な ROS は細胞に悪影響を与え、老化やがん化を引き起こすため、幹細胞の維持には嫌気性代謝が必須であるという考え方が広く受け入れられつつある。

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。我々のグループは 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 (*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。我々は ROS 産生を担う Nox1 遺伝子 KO マウスを用い、精子幹細胞の自己複製に 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 (*Cell Stem Cell* 12, 774-786, 2013)。GS 細胞に過酸化水素を添加すると自己複製分裂が亢進し、逆に ROS 阻害剤を投与するとその分裂を阻害した。ROS が発生すると p38 mapk を活性化され、逆に p38 mapk の阻害剤である SB203580 を添加すると、自己複製分裂は抑制された。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に必要であることが分かった。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から、精子幹細胞についての我々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、精巣内では精子幹細胞は低酸素状態にあること、過剰な ROS はこの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。

2. 研究の目的

本研究では精子幹細胞がどのようにして酸素環境を感知し、ROS 量を一定に調節するのか、またその過程においてどのような分子を活性化し、自己複製を促進するのかについての分子機構は明らかにする。これは我々のグループが樹立した GS 細胞を使ったものである点で学術的に独自のものであり、最初に発見した ROS との幹細胞の関係を解析して繋がってきた一連の研究を進展させたという点で創造性が高い。具体的には 1) 体細胞の酸素濃度感知に関わる Hif1a 分子が生殖細胞でも同様な役割を果たすのかを明らかにすると共に、2) これらの分子が ROS の産生に及ぶ経路を分子レベルで同定する。更に、3) 酸素応答に関わる遺伝子群を機能的に同定し、4) 酸素レベルのモニターに重要な分子である Hif1a とその下流分子であり酸素レベルと代謝をリンクする c-Myc 遺伝子に着目し、酸素応答が精子幹細胞の代謝に及ぼす影響を明らかにする。

具体的には 1) 体細胞の酸素濃度感知に関わる Hif1a 分子が生殖細胞でも同様な役割を果たすのかを明らかにすると共に、2) これらの分子が ROS の産生に及ぶ経路を分子レベルで同定する。更に、3) 酸素応答に関わる遺伝子群を機能的に同定し、4) 酸素レベルのモニターに重要な分子である Hif1a とその下流分子であり酸素レベルと代謝をリンクする c-Myc 遺伝子に着目し、酸素応答が精子幹細胞の代謝に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 精子幹細胞の酸素応答機構の解析

a) 精子幹細胞の酸素環境応答の解析

GS 細胞を低酸素 (1, 5% O₂) と通常酸素濃度 (20% O₂) の環境で培養し、幹細胞活性と表現型について確認する。幹細胞の分画と分化細胞との分画で CellRox を用いて flow cytometry により活性酸素種を定量すると共に Mitotracker 染色により mitochondria の局在と量を調べ、mitochondria 関連遺伝子の発現の変化を調べる。更に flux analyzer を用いて mitochondria 代謝と解糖系への依存の変化を調べ解糖系と自己複製の関連を検討する。

b) 低酸素で培養された精子幹細胞の幹細胞能解析

1, 5, 20% の O₂ で培養された GS 細胞における Hif1a 遺伝子、c-Myc 遺伝子の発現動態を解析する。幹細胞活性に及ぼす影響を解析するために、細胞を不妊マウスの精巣内へ移植を行う。2 ヶ月後に生着コロニー数を測定し、酸素濃度と幹細胞の関係を明らかにする。

2) 精子幹細胞の ROS 産生機構の解明

予備実験において FGF2, GDNF を添加した場合に ROS を産生する遺伝子群の発現が大規模に変化することが分かっている。この変化は特に Nox 遺伝子群で顕著である。そこで、Nox 遺

伝子群の機能を明らかにするために、これらの遺伝子の cDNA および shRNA を発現するレンチウイルスを作成し、GS 細胞に感染させ、その ROS 産生及び GS 細胞の増殖に及ぼす影響を解析する。具体的にどのシグナル経路が自己複製と ROS 発生に關与するかを明らかにするため自己複製シグナル分子 (Akt、Mek 等) 及び下流の転写因子 (Etv5 等) の遺伝子編集による機能欠損及び過剰発現を同時に並行して行い、Real-time PCR により Nox 遺伝子群の発現動態に及ぼす影響を定量的に解析する。

3) 酸素応答で制御される標的遺伝子の機能的同定

低酸素及び ROS による増殖応答に關与する遺伝子を調べるため、1, 5, 20%酸素存在下で培養された GS 細胞、過酸化酸素を添加した GS 細胞、ROS 産生の低下した Nox1 欠損 GS 細胞から mRNA を回収し、マイクロアレイ/RNA シークエンス解析による網羅的な遺伝子発現解析を行う。同定した候補遺伝子については Real-time PCR により確認を行う。

4) 酸素応答と代謝制御に關わる Hif1a 及び c-Myc の解析

Hif1a 及び c-Myc conditional KO マウスの精巢細胞に in vitro で Cre 発現アデノウイルスを感染させ遺伝子破壊を行い、移植アッセイを行う。2 ヶ月後にコロニー数をカウントし、幹細胞活性を比較する。さらに精子分化に及ぼす影響を免疫組織化学により解析する。上記の実験と並行して、Hif1a 及び c-Myc conditional KO マウスから GS 細胞の樹立する。

5) 精子幹細胞の ROS 産生機構の解明

同定した Nox 遺伝子群の発現変化がどのように mitochondria 由来の ROS 産生と關連するのかを明らかにする。Nox1 による ROS 産生で活性化される Jnk が mitochondria へ移行し、mitochondria の ROS 産生・代謝に影響することが自己複製の増強に關与していると考えられる。Nox1 KO 細胞を用いて、Nox 由来の ROS 産生の低下が自己複製分裂にどう影響するのかを、Jnk の局在異常と mitochondria 活性の変化に与える影響に特に注目し解析する。

6) 酸素応答で制御される標的遺伝子の機能的同定

a) レンチウイルスによる機能的スクリーニング

前年度に同定した低酸素・ROS 応答で誘導される遺伝子群の機能を調べるために、GS 細胞においてレンチウイルスを用いた shRNA による機能阻害の遺伝子ノックダウン(KD)によるスクリーニングと cDNA の過剰発現を行う。このスクリーニングで増殖、代謝活性 (flux analyzer)、幹細胞活性 (移植実験) に影響を及ぼす遺伝子を同定する。

b) 精子幹細胞の自己複製制御因子に対する Nox 遺伝子群の影響の解析

我々は Nox1 による ROS の発生が自己複製に必要であることを明らかにしたが、そのメカニズムは未だ不明である。GS 細胞の自己複製にはサイトカインにより誘導される転写因子と非依存性のものがあるので、いずれの転写因子が ROS の影響を受けるのか、また、ROS 産生や感知にも影響を及ぼすのかを明らかにする。この実験では野生型 GS 細胞に加え、Nox1、Hif1a、c-Myc KO 細胞を用い、低酸素と通常酸素環境下において転写因子の変動を解析し、候補遺伝子の過剰発現及び機能抑制を行い、GS 細胞の増殖に及ぼす影響を解析すると共に、遺伝子導入細胞の flow cytometry により ROS レベルを評価する。

7) 酸素応答と代謝制御に關わる Hif1a 及び c-Myc の解析

得られた候補遺伝子のうち、Hif1a 及び c-Myc KO GS 細胞を野生型 GS 細胞と比較することで、低酸素応答遺伝子のうち Hif1a 及び c-Myc の標的となる遺伝子を更に絞り込む。GS 細胞を用いて陽性結果を得られた遺伝子については、CRISPR-Cas9 システムを用いることにより、生体内での遺伝子破壊を行い、その機能を検証する。

4. 研究成果

幹細胞は嫌気性環境に存在し、活性酸素(Reactive Oxygen Species, ROS)の増加は幹細胞機能に悪影響を与えるとされている。我々は以前自己複製分裂には Nox1 が産生する ROS が必須である事を見いだした。精子幹細胞の酸素・代謝制御機構は他の幹細胞と異なっていると考えられる。しかし精子幹細胞がどのように酸素レベルを感知し、ROS の量を維持しているのかについては未解明である。本研究では精子幹細胞における酸素レベルの感知機構、産生制御、酸素レベルが代謝に及ぼすメカニズムの解明を行なった。

令和2年度は(1)精子幹細胞の酸素応答機構の解析(2)精子幹細胞の ROS 産生機構の解明(3)酸素応答で制御される標的遺伝子の機能同定(4)酸素応答と代謝制御に關わる Hif1a 及び c-Myc の解析について研究を行った。

令和3年度は前年度に同定した Nox 遺伝子群の発現変化がどのように mitochondria 由来の ROS 産生と關連するのかを検討した。更に酸素応答で制御される標的遺伝子の機能的同定を行なった。a) レンチウイルスによる機能的スクリーニング：前年度に同定した低酸素・ROS 応答で誘導される遺伝子群の機能を調べるために、GS 細胞においてレンチウイルスを用いた shRNA による機能阻害の遺伝子ノックダウン(KD)によるスクリーニングと cDNA の過剰発現を行った。このスクリーニングで増殖、代謝活性 (flux analyzer)、幹細胞活性 (移植実験) に影響を及ぼす遺伝子について検討した。b) 精子幹細胞の自己複製制御因子に対する Nox 遺伝子群の影響の解析：以前の研究で Nox1 による ROS の発生が自己複製に必要であることを明らかにしたが、そのメカニズムは未だ不明であった。GS 細胞の自己複製にはサイトカインにより誘導される転写因子と非依存性のものがあるので、いずれの転写因

子が ROS の影響を受けるのか、また、ROS 産生や感知にも影響を及ぼすのかを検討した。この実験では野生型 GS 細胞に加えて Nox1KO 細胞を用い、低酸素と通常酸素環境下において転写因子の変動を解析した。候補遺伝子の過剰発現及び機能抑制を行い、GS 細胞の増殖に及ぼす影響を解析すると共に、遺伝子導入細胞の flow cytometry により ROS レベルを評価した。次に酸素応答と代謝制御に関わる Nox1 の解析を行なった。これまでの研究結果で得られた候補遺伝子のうち、Nox1KO GS 細胞を野生型 GS 細胞と比較することで、低酸素応答遺伝子の Nox1 の標的となる遺伝子を検討した。GS 細胞を用いて陽性結果を得られた遺伝子については、CRISPR-Cas9 システムを用いることにより、生体内での遺伝子破壊を行い、その機能を検証した。

令和 4 年度は以下の項目について研究を行なった。(4) 酸素応答と代謝制御 : これらに関わる Hif1a 及び c-Myc の解析について研究を行った。得られた候補遺伝子のうち、Hif1a 及び c-Myc KO GS 細胞を野生型 GS 細胞と比較することで、低酸素応答遺伝子のうち Hif1a 及び c-Myc の標的となる遺伝子を更に絞り込んだ。GS 細胞を用いて陽性結果を得られた遺伝子については、CRISPR-Cas9 システムを用いることにより、生体内での遺伝子破壊を行い、その機能を検証した。

以上の研究結果より、ROS により引き起こされる精子幹細胞の自己複製において酸素が重要な役割を担っている事がわかった。Nox1 遺伝子を欠損した未分化な精原細胞において低酸素応答と代謝制御に関わる Hif1a 遺伝子の発現が減少している事がわかった。この事から Nox1 遺伝子由来の ROS は低酸素に影響される事がわかった。また、精子幹細胞において c-Myc 遺伝子を活性化したり Hif1a 遺伝子によって Cdkn1a 遺伝子の発現抑制を起こしても低酸素によって精子幹細胞の増殖が減少する事がわかった。低酸素において Nox1 や Hif1a 欠損の精子幹細胞の増殖が減少するが、Cdkn1a 遺伝子の発現を除く事によって細胞の増殖が回復した。Cdkn1a 遺伝子の欠損した精子幹細胞は低酸素状態ではよく増殖するが、通常酸素濃度ではあまり増えない事がわかった。一方、薬剤によってミトコンドリア由来の ROS を抑えたり、ミトコンドリア特異的トポイソメラーゼの Top1mt を欠損しても精子幹細胞の自己複製には大きな影響をあたえない事がわかった。この結果からミトコンドリア由来の ROS よりも Nox1 由来の ROS の方が精子幹細胞の自己複製に重要な役割を果たしていると考えられる。これらの結果から ROS の由来と酸素応答のバランスが精子幹細胞の自己複製には重要であると考えられる。

これらの結果をまとめて以下の論文に発表した。

An interplay of NOX1-derived ROS and oxygen determines the spermatogonial stem cell self-renewal efficiency under hypoxia. *Genes Dev.* 2021 Feb 1;35(3-4):250-260. doi: 10.1101/gad.339903.120. Epub 2021 Jan 14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Hiroko Morimoto, Narumi Ogonuki, Mito Kanatsu-Shinohara, Shogo Matoba, Atsuo Ogura, Takashi Shinohara	4. 巻 13;16(7)
2. 論文標題 Spermatogonial stem cell transplantation into nonablated mouse recipient testes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports .	6. 最初と最後の頁 1832-1844.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2021.05.013	査読の有無 無
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 Hiroko Morimoto, Takuya Yamamoto, Takehiro Miyazaki, Harumi Ogonuki, Atsuo Ogura, Takashi Tanaka, Mito Kanatsu-Shinohara, Chihiro Yabe-Nishimura, Hongliang Zhang, Yves Pommier, Andreas Trumpp, Takashi Shinohara	4. 巻 35(3-4)
2. 論文標題 An interplay of NOX1-derived ROS and oxygen determines the spermatogonial stem cell self-renewal efficiency under hypoxia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Dev.	6. 最初と最後の頁 250-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.339903.120.	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
---------------------------	-----------------------	----

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