

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860210

研究課題名(和文) 精子幹細胞自己複製分裂におけるMyc遺伝子の役割の解明

研究課題名(英文) The function of Myc family genes in self-renewal of spermatogonial stem cells

研究代表者

田中 敬 (Tanaka, Takashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40579265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の一生にわたる精子産生は、安定して自己複製分裂をする精子幹細胞によって維持されている。しかし転写制御など分子機構の詳細は未だ明らかでない。そこで本研究では他の組織幹細胞の増殖を促進する転写因子のMyc遺伝子に注目してその役割を調べた。

まず培養精子幹細胞においてMyc遺伝子が重要な役割をもつことが分かった。この知見は試験管内培養法がまだ確立していない他動物の精子幹細胞培養に対してMyc遺伝子の導入が有効な可能性を示す。またさらに本研究ではMyc遺伝子が生体内の精子幹細胞でも重要な役割をもつことを示した。これは現在も原因が分かっていないヒトの不妊症の研究に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Self-renewal of spermatogonial stem cells is central in mammalian spermatogenesis. Although many genes, which are necessary for normal functions of spermatogonial stem cells, have been identified, transcriptional regulation remained unclear. In this study, the functions of Myc family genes, the transcription factors which stimulate proliferation of stem cells in other tissues, were examined. As expected, Myc genes were found to be necessary for normal proliferation of cultured spermatogonial stem cells and for normal spermatogenesis in vivo. These results indicate that Myc overexpression may improve the proliferation of cultured spermatogonial stem cells in other animals and that ablation of Myc genes can cause male infertility.

研究分野：幹細胞

キーワード：幹細胞 生殖細胞 精子形成 精子幹細胞 Myc

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の精子形成は精原細胞の増殖、減数分裂、半数体精子細胞の形態変化の3つの過程で構成される。中でも精子幹細胞の自己複製分裂は個体が一生に渡り精子を作り続ける基盤となる。申請者のグループは GDNF および 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 M et al., *Biology of Reproduction* 69, 612-616, 2003)、精子幹細胞の自己複製機構の分子生物学的解析を可能にした。この培養技術を用いて Akt が精子幹細胞の自己複製分裂に作用することを明らかにし (Lee J et al., *Development* 134, 1853-1859, 2007)、H-Ras あるいは CyclinD2/E1 の発現誘導によりサイトカインシグナルの再構築に成功した (Lee J et al., *Cell Stem Cell* 5, 76-86, 2009)。しかしこの機構で転写因子がどのように機能するかは明らかでない。これまでに FGF2 が MEK を活性化し、MEK が転写因子 Ets1 および Bcl6 の発現を誘導して自己複製分裂に機能することが分かったが (Ishii K et al., *Development* 139, 1734-1743, 2012)、Akt など他のシグナルで制御される転写因子は検討されておらず、精子幹細胞の自己複製分裂における転写因子機能の全貌は明らかでない。

Myc 遺伝子は細胞死や増殖、代謝など様々な細胞機能を制御する転写因子であり、神経幹細胞や血液幹細胞などの組織幹細胞や多能性幹細胞の自己複製分裂の制御に重要である。血液幹細胞では Myc 遺伝子が欠損すると自己複製が促進されて分化が抑制され、逆に Myc 遺伝子の過剰は自己複製を抑制し分化を促進する。生殖細胞では N-myc が腫瘍化された精原細胞株 C18-4 の増殖を促進する (Braydich-Stolle L et al., *Developmental Biology* 304, 34-45, 2007)。しかし C18-4 は外来のサイトカインがなくても増殖する上、幹細胞としての機能をもっていないため、N-myc が本当に精子幹細胞の自己複製分裂を促進するか明らかではない。

そこで申請者が培養精子幹細胞である Germline Stem (GS) 細胞において Myc ファミリー遺伝子の c-myc, N-myc, L-myc の発現を調べると、GS 細胞でも c-myc および N-myc が発現していた。さらに精子幹細胞の自己複製因子である GDNF, FGF2 の添加により GS 細胞の c-myc および N-myc のタンパク質発現が誘導された。これらのことより申請者は c-myc, N-myc の協調作用が精子幹細胞の自己複製分裂を促進するという仮説を立てた。精子幹細胞は非対称性の分裂をせず、自己複製分裂と分化細胞を生み出す分裂のどちらかの分裂を行うが、本研究では Myc 遺伝子が精子幹細胞の自己複製分裂を促進するか否かを明らかにし、また Myc 遺伝子がどのような分子機構で制御されているか、

Myc 遺伝子の標的遺伝子は何かを明らかにする。

2. 研究の目的

精子幹細胞の分裂には自己複製分裂と分化細胞を生み出す分裂の2つのタイプがある。本研究では「Myc 遺伝子が精子幹細胞の自己複製分裂を促進する」という仮説を検証して精子幹細胞における Myc 遺伝子の役割を解明する。以下の2点を明らかにする。

(1) GS 細胞の自己複製分裂における Myc 遺伝子の役割

Myc 遺伝子が GS 細胞の自己複製分裂機構を促進するか否か調べ、その分子機構を明らかにする。

GS 細胞自己複製シグナルによる Myc 遺伝子発現制御

GDNF, FGF2 による GS 細胞の自己複製シグナルにおいて Myc 遺伝子の発現がサイトカインで制御されるか、またどのような経路で制御されるかを明らかにする。

Myc 遺伝子による GS 細胞の自己複製分裂制御

Myc 遺伝子の過剰発現が GS 細胞の自己複製分裂を促進するかどうか、また Myc 遺伝子の欠損により自己複製分裂が阻害されるかどうかを明らかにする。

Myc 遺伝子が GS 細胞の自己複製分裂を制御する機構

GS 細胞における Myc 遺伝子の標的遺伝子を同定し、Myc 遺伝子が GS 細胞の自己複製分裂を制御する機構を明らかにする。

(2) 生体内精子幹細胞における Myc 遺伝子の役割

Myc 遺伝子が生体内精子幹細胞の自己複製分裂を促進するか明らかにするため、生体内精子幹細胞で Myc 遺伝子を欠損させて自己複製分裂が阻害されるか検証する。

Myc 遺伝子の生体内幹細胞における発現 c-myc および N-myc が生体内精子幹細胞で発現しているか明らかにする。

Myc 遺伝子による生体内精子幹細胞の自己複製分裂制御

Myc 遺伝子の欠損により生体内精子幹細胞の自己複製分裂が阻害されるか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) GS 細胞の自己複製分裂における Myc 遺伝子の役割

Myc 遺伝子が GS 細胞の自己複製分裂機構を促進するか否か調べ、その分子機構を明らかにする。

GS 細胞自己複製シグナルによる Myc 遺伝子発現制御

予備実験により、GS 細胞では Myc ファミリー遺伝子のうち c-myc と N-myc が発現することが分かっている。また GS 細胞では自己複製

製因子である GDNF, FGF2 が c-MYC, N-MYC タンパク質の発現を誘導することが示された。さらに本研究では GDNF および FGF2 のどちらが MYC タンパク質発現を誘導するか調べる。また Myc 遺伝子は細胞周期調節因子により mRNA 分解やタンパク質翻訳制御を受ける可能性がある。そこでサイトカイン刺激から mRNA およびタンパク質の発現タイムコースを調べ、Myc 遺伝子発現の抑制機構があるかを明らかにする。

また精子幹細胞の自己複製分裂ではサイトカインが Akt や Mek, p38 などのリン酸化酵素シグナル経路を活性化する。どのリン酸化酵素経路が Myc 遺伝子を制御するかを明らかにするため、Akt, Mek, p38, JNK の選択的阻害剤あるいはロックダウンベクターを GS 細胞に導入し、定量 RT-PCR とウエスタンブロットで c-myc および N-myc の mRNA およびタンパク質発現が抑制されるか調べる。

Myc 遺伝子による GS 細胞の自己複製分裂制御

精子幹細胞において Myc 遺伝子が自己複製分裂を促進するかを明らかにするため、GS 細胞に c-myc, N-myc 発現レンチウイルスベクターを感染させ、*in vitro* の増殖が亢進されるか調べる。さらに他個体精巣への移植アッセイを行って精子幹細胞頻度と精子形成能を解析し、GS 細胞の精子幹細胞頻度が上がるか検討する。また Myc 遺伝子コンディショナル欠損マウス精巣から GS 細胞を樹立し、Cre 発現アデノウイルスベクターを感染させる。得られた Myc 遺伝子欠損 GS 細胞の *in vitro* 増殖を調べ、他個体精巣への移植アッセイを行う。これにより Myc 遺伝子の欠損が GS 幹細胞の自己複製分裂を阻害するか明らかにする。c-myc と N-myc それぞれの欠損に加え、c-myc, N-myc 同時欠損の影響を調べる。

Myc 遺伝子が GS 細胞の自己複製分裂を制御する機構

MYC タンパク質の機能は 1) 転写活性化因子 MAX との複合体形成による転写活性化、2) 転写活性化因子 MIZ1 との結合による MIZ1 不活性化に分けられる。本研究では MYC タンパク質の分子機能を明らかにするため MAX との結合が抑制される omomyc 変異体、MIZ1 との結合が抑制される c-mycV394D 変異体を用いる。Myc 変異体を GS 細胞にそれぞれ過剰発現させて増殖変化を調べ、どちらの分子機能が精子幹細胞の自己複製分裂を制御するか明らかにする。

他の細胞種において Myc 遺伝子は基底膜との結合に重要な Integrin や細胞周期調節因子 Cyclin, CDK1 など様々な標的遺伝子をもつことが知られる。精子幹細胞でも Integrin 1 が幹細胞と基底膜の結合に重要である。

また CyclinD2/E1 が自己複製分裂を促進し、CDK1 である p21, p27 の過剰は自己複製分裂を抑制する。これらの遺伝子が精子幹細胞に

おける Myc 遺伝子の標的遺伝子であるか明らかにするため、Myc 遺伝子欠損 GS 細胞と野生型 GS 細胞の mRNA 発現を定量的 PCR で比較する。

(2) 生体内精子幹細胞における Myc 遺伝子の役割

Myc 遺伝子の生体内幹細胞における発現 c-myc および N-myc の抗体と精子幹細胞マーカーである GFRA1, E-Cadherin などの共染色を行い、Myc 遺伝子が生体内の精子幹細胞で発現しているか明らかにする。

Myc 遺伝子による生体内精子幹細胞の自己複製分裂制御

Myc 遺伝子が生体内精子幹細胞の自己複製分裂を促進するかを明らかにするため、Myc 遺伝子欠損マウスを利用する。c-myc 欠損マウス、N-myc 欠損マウスはともに胎生致死となるため精子幹細胞における機能を解析できない。そこで本研究では c-myc および N-myc のコンディショナル欠損マウスと出生後の雄生殖細胞特異的に Cre リコンビネースを発現する Stra8-Cre トランスジェニックマウスを交配し、成体の精子形成細胞特異的に c-myc および N-myc を欠損するマウスを作製する。c-myc と N-myc は redundant な機能を持つことが知られているため、c-myc と N-myc を同時に欠損するマウスも併せて作製する。

変異マウス精巣細胞の精子幹細胞頻度を移植アッセイで調べ、精子幹細胞頻度が減少するか明らかにする。

4. 研究成果

(1) GS 細胞の自己複製分裂における Myc 遺伝子の役割

GS 細胞自己複製シグナルによる Myc 遺伝子発現制御

RT-PCR および Western blot により、GS 細胞では Myc ファミリー遺伝子のうち c-myc と N-myc が発現することが分かった。さらに GDNF および FGF2 添加により c-myc mRNA の転写と C-MYC/N-MYC タンパク質の発現が誘導されることが示された。さらに MYC タンパク質を分解にはたらくことが知られる Fbxw7 遺伝子欠損 GS 細胞では MYC タンパク質が増加していたことから、MYC 遺伝子はタンパク質分解による発現制御を受けることが分かった。

次にリン酸化酵素シグナルによる Myc 遺伝子制御を調べた。選択的阻害剤を添加して Myc 遺伝子発現を解析すると c-myc は Akt, p38, Mek いずれの制御も受けなかったが、これに対して N-myc は p38 により mRNA 発現が誘導されることが分かった。

Myc 遺伝子による GS 細胞の自己複製分裂制御

GS 細胞への c-myc, N-myc 過剰発現実験を行った結果、c-myc 遺伝子の過剰発現により GS 細胞が細胞死を起こす一方で N-myc 遺伝子

過剰発現では GS 細胞の増殖が亢進されることが分かった。

さらに計画通り Myc 遺伝子コンディショナル欠損精巣より GS 細胞を樹立することに成功した。Myc 遺伝子欠損 GS 細胞の増殖を調べると、n-myc 欠損により GS 細胞の増殖が阻害されたため、GS 細胞の増殖に N-myc 遺伝子が重要であることが分かった。

Myc 遺伝子が GS 細胞の自己複製分裂を制御する機構

Myc 欠損 GS 細胞に対するレスキュー実験の結果、omomyc 変異体ではレスキュー効果が観察されなかったため、Myc による増殖促進効果は MAX 依存的に起こっていると考えられた。

さらに Myc 遺伝子欠損 GS 細胞では CyclinD/E の mRNA およびタンパク質発現が減少していることから、Myc 遺伝子は Cyclin を標的にしてそれを正に制御していることが示された。

以上の結果から、1)自己複製因子 GDNF、FGF2 により Myc 遺伝子の発現が正に制御されていること、2) Myc 遺伝子は細胞周期を促進する遺伝子の発現を増加することで培養精子幹細胞の増殖を促進することが示された。したがって培養精子幹細胞の増殖には Myc 遺伝子が重要な役割をもっていることが示唆される。これらの知見は試験管内培養法がまだ確立していない他動物の精子幹細胞培養に対して Myc 遺伝子の導入が有効な可能性を示すものである。

(2)生体内精子幹細胞における Myc 遺伝子の役割

c-myc 欠損、N-myc 欠損、c-myc/N-myc 同時欠損精巣細胞の移植アッセイで精子幹細胞機能を調べたところ、c-myc 欠損および N-myc 欠損では異常がなくコントロールの細胞と同じ頻度で正常な精子形成コロニーが観察された。しかしながら c-myc/N-myc 同時欠損の場合はコロニーの頻度はコントロールと変わらなかったものの、分化が著しく阻害されていた。

さらに Stra8-Cre マウスを利用した生殖細胞特異的 N-myc 欠損マウス精巣を解析すると、この精巣では正常な精子形成が観察されるものの精巣重量が減少することが示された。

以上の結果より Myc 遺伝子欠損により自己複製分裂および分化の分裂がどちらも阻害されることが分かった。

これらの結果は Myc 遺伝子が生体内でも精子幹細胞機能を支える重要な役割をもつことを示す。したがって現在も原因が分かっていないヒトの不妊症についても、Myc 遺伝子が関与している可能性を示すものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Takashima S, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Morimoto H, Inoue K, Ogonuki N, Jijiwa M, Takahashi M, Ogura A, Shinohara T. (2015) "Functional Differences between GDNF-Dependent and FGF2-Dependent Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal." *Stem Cell Reports* 4, 489-502. (査読あり) DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.01.010.

(2) Takashima S, Hirose M, Ogonuki N, Ebisuya M, Inoue K, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Nishida E, Ogura A, Shinohara T. (2013) "Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1." *Genes Dev* 27, 1949-1958. (査読あり) DOI : 10.1101/gad.220194.113.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~molgen>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田中 敬 (TANAKA TAKASHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40579265

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし