

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26340021

研究課題名(和文)精子幹細胞の放射線による細胞死誘導の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)The elucidation of mechanisms of the cell death in SSCs induced by radiation

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線は生体成分の水に作用して活性酸素(ROS)を産生させDNA損傷等の悪影響を引き起こす。本研究では精子幹細胞(SSCs)の放射線耐性に関わる分子の同定を行った。その結果、Nox3遺伝子、及びBcl6b遺伝子がSSCsの自己複製に関わる転写因子である事を見出した。SSCsにおいてMapk14又はMapk7遺伝子を活性化させるとNox1遺伝子が誘導されROSが増加した。Mapk14又はMapk7遺伝子をノックダウンしたSSCsを精巣内に移植するとコロニー数が減少した。本研究においてMAPK14-MAPK7-BCL6B経路がROSの産生を介したSSCsの自己複製に重要な役割を果たす事が分かった。

研究成果の概要(英文)：Exposure to ionizing radiation is known to have a strong influence H2O in vivo and induces reactive oxygen species (ROS). ROS makes severe DNA damages. In our study, we identified two molecules involved in the resistance to radiation in spermatogonial stem cells(SSCs). In consequence, we found that Nox3 and Bcl6b are novel molecules involved in the self renewal of SSCs. Activation of Mapk14 or Mapk7 increased the expression of Nox1 and ROS producing. Transplantation of Mapk14 or Mapk7 knocking out SSCs to donor testis resulted in a decrease in the number of colonies of SSCs. These results reveal that MAPK14-MAPK7-BCL6B pathway plays a crucial role in the self renewal of SSCs associated with ROS producing.

研究分野：細胞生物学

キーワード：精子幹細胞 活性酸素

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。申請者のグループは 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 (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、申請者は活性酸素(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 Mapk14(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、申請者は少なくとも次の 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はという 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。ROS は生殖細胞に悪影響を及ぼすと考えられてきたが、最近申請者は 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。

1. 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、申請者は既に p38alpha 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 p38alpha 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たのち、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、p38alpha のシグナル伝達機構を解析するために p38alpha 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。

2. 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 の発生に必要である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 の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。今回の実験では小分子化合物を 96 穴プレートを用いて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。

3. 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 の発生および 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。両方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な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。

4. 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 発生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

26 年度の成果

精子幹細胞(SSCs)及び生殖幹細胞(GSCs)において p53 遺伝子ノックアウト(KO)又はノックダウン(KD)すると放射線照射による細胞死が減少する事を見出した。また、GSCs を用いた放射線に対する細胞応答の解析を行い、放射線照射による細胞死誘導に關与する遺伝子(Trp53inp1, Tnfrsf10b)を見出した。

27 年度の成果

SSCs の放射線耐性に関わる新規ターゲット分子の同定を行った。放射線は生体成分の水に作用して ROS を産生させ DNA 損傷等の悪影響を引き起こす。この事から ROS によって産生される分子の中で SSCs の自己複製制御に関わる分子の同定を行った。その結果、NADPH Oxidase 3(Nox3)が SSCs の自己複製制御に関わる分子である事を見出した。

28 年度の成果

精子幹細胞(SSCs)の放射線耐性に関わる転写因子の同定を行った。その結果、Bcl6b 遺伝子が SSCs の自己複製に関わる転写因子である事を見出した。SSCs において p38 Mapk 又は Mapk7(Erk5)遺伝子を活性化させると Nox1 遺伝子が誘導され ROS が増加した。p38 Mapk 又は Erk5 遺伝子をノックダウンした SSCs を精巣内に移植するとコロニー数が減少した。これらの事から、MAPK14-MAPK7-BCL6B 経路が ROS の産生を介した SSCs の自己複製に重要な役割を果たす事が分かった

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 7 件)

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Matoba S, Morimoto H, Ogura A, Shinohara T. Improved serum-and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biology of Reproduction* 査読有 2014 91 (4) : 88, 1-11.
doi:10.1095/biolreprod.114.122317

Ishii K, Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Niwa O, Takata M, Shinohara T. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b pathway regulates the radiation response of mouse spermatogonial stem cells. *Stem cell Reports*. 査読有 2014 3(4), 676-689.
doi: 10.1016/j.stemcr.2014.08.006

Takashima S, Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Morimoto H, Inoue K, Ogonuki N, Jijiwa M, Takahashi M, Ogura A, Shinohara T. Functional Differences between GDNF-Dependent and FGF2-Dependent Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal. *Stem cell Reports*. 査読有 2015 4(3), 489-502.
doi: 10.1016/j.stemcr.2015.01.010

Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Shinohara T. Enrichment of Mouse Spermatogonial Stem Cells by the Stem Cell Dye Cdy1. *Biology of Reproduction* 査読有 2015 94 (1) : 13 1-10.
doi:10.1095/biolreprod.115.135707

Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. ROS-Generating Oxidase Nox3 Regulates the Self Renewal of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Biology of Reproduction* 査読有 2015 92 (6) : 147 1-10
doi:10.1095/biolreprod.114.127647

Kanatsu-Shinohara M, Morimoto H, Shinohara T. Fertility of Male Germline Stem Cells Following Spermatogonial Transplantation in Infertile Mouse Models. *Biology of Reproduction* 査読有 2016 94 (5) : 112 1-11
doi:10.1095/biolreprod.115.137869

Kanatsu-Shinohara M, Tanaka T, Ogonuki N, Ogura A, Morimoto H, Cheng PF, Eisenman RN., Trumpp A, Shinohara T. Myc-Mycn-mediated glycolysis enhances mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Genes & Development* 査読有 2016 30 (23) 2637-2648
doi:10.1102/gad.287045.116

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 裕子(MORIMOTO, Hiroko)

京都大学大学院医学研究科

遺伝医学講座分子遺伝学分野

特定研究員

研究者番号 : 90540097