

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05046

研究課題名（和文）始原生殖細胞の発生を制御するRNA分子機構とその破綻による腫瘍発生のメカニズム

研究課題名（英文）Regulatory mechanism on the development of primordial germ cells and the mechanism of tumor development due to its disruption

研究代表者

鈴木 敦 (Suzuki, Atsushi)

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：60467058

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,900,000円

研究成果の概要（和文）：マウス始原生殖細胞は、稀に精細管内で精子への分化経路から逸脱して多能性細胞へと転換し、その後に様々な分化してテラトーマを形成することがある。しかしながら、生体内でこのような現象が起こる分子機構は未だに不明である。我々は、RNA結合タンパク質Dead end1の欠損が129系統マウスにおいて精巣テラトーマの発症を誘発することを見出した。一方で、生後精子形成過程におけるDead end1の欠損は精巣テラトーマの発症を起こさず、精原細胞の減少を引き起こした。以上より、精巣テラトーマ発症には始原生殖細胞におけるDead end1の機能が関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本件研究はマウス始原生殖細胞特異的に発現するRNA結合タンパク質Dead end1とその結合タンパク質の欠損が、129系統マウスにおいて精巣テラトーマを高確率で発症することを示した。これは、始原生殖細胞の発生を制御するRNA分子機構の破綻が腫瘍発生の引き金となることを示しており、今後、Dead end1の分子機能を明らかにすることで腫瘍発生の分子機構が明らかになる可能性がある。また、ヒトの精巣腫瘍とマウス精巣テラトーマは共通の遺伝子が原因となることがあることから、マウス精巣テラトーマ発症の分子機構の解明はヒト精巣腫瘍発症の分子機構解明へとつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Mouse primordial germ cells occasionally deviate from the differentiation pathway to sperm and convert into pluripotent cells in the seminiferous tubules, and then variously differentiate to form teratomas. However, the molecular mechanism by which such a phenomenon occurs in vivo is still unknown. We found that a deficiency of the RNA-binding protein Dead end 1 induces the development of testicular teratoma in 129 strain mice. On the other hand, the deficiency of Dead end 1 in the postnatal spermatogenesis process did not cause the development of testicular teratomas and caused a decrease in spermatogonia. From the above, it was shown that the function of Dead end 1 in primordial germ cells is involved in the onset of testis teratoma.

研究分野：動物生命科学

キーワード：精巣テラトーマ 精原細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マウスの生殖細胞は受精後 6.5-7.5 日目に胚体外に少数の細胞集団として発生し、将来の生殖巣へと増殖しながら移動する。生殖巣に到達すると体細胞からのシグナルを受けて性分化を開始し、メスにおいては直ちに減数分裂に移行するのに対して、オスにおいては細胞周期が停止する。しかしながら、精巣に到達した始原生殖細胞は、稀に精細管内で初期胚様細胞へと転換し、三胚葉成分の混在する精巣性テラトーマを形成する。この過程は、単能性の生殖細胞が多能性の細胞へと初期化される過程を含むが、生体内でこのような現象が起こる分子機構は未だに不明である。

一つの手がかりが 129 系統マウスに存在する。129 系統マウスは精巣性テラトーマを高頻度で発症するマウス系統である (Stevens LC and Little CC. *PNAS*. 1954)。その発症率は、一般的なマウス系統においては 1 万匹に 1 匹程度であるのに対して、129 系統では約 1% にもなる。さらに、自然発症変異 *Ter* をホモで持つマウス個体は、始原生殖細胞の数が劇的に減少して生後に不妊となるが、129 系統マウスに限ってはこれに加えて精巣性テラトーマが約 95% の確率で発症することが知られている (Noguchi T and Noguchi M, *J Natl Cancer Inst*. 1985)。*Ter* は始原生殖細胞特異的に発現する RNA 結合タンパク質 *Dead end1* の 1 塩基置換であり、未成熟終始コドンが作成されることによって *Dead end1* の null 変異となると考えられている (Youngren KK, et al. *Nature*. 2005)。しかし、*Ter* は短い *Dead end1* 変異タンパク質を生成するとの主張もあり (Zechel JL, et al. *BMC Genet*. 2013)、*Dead end1* 遺伝子にもたらす影響はいまだに不明であった。

上記のように、*Dead end1* は精巣テラトーマの発症機構を解析する上で鍵となる分子である。我々は、これまでに、始原生殖細胞特異的に発現する RNA 結合タンパク質である *Nanos2* と *Nanos3* が *Dead end1* と結合することを明らかにしていた (Suzuki A, et al. *EMBO Rep*. 2016)。しかしながら、それらの欠損マウスにおける精巣テラトーマ発症の有無については、今だに不明であり、129 系統マウスにおける *Dead end1* との遺伝学的な相互作用の解析が必要であった。

### 2. 研究の目的

#### (1) 129 系統マウスにおける *Dead end1*, *Nanos2*, *Nanos3* の精巣テラトーマ発症率の解析

上記の通り、*Ter* 変異は *Dead end1* の null 変異か、それとも短い *Dead end1* 変異タンパク質を生成するかは不明であった。それに加えて、*Dead end1* 結合タンパク質である *Nanos2*, *Nanos3* との関連も不明であった。そこで、129 系統マウスにおいて *Dead end1*, *Nanos2*, そして *Nanos3* との遺伝学的な相互作用の解析を行った。

#### (2) 精子形成過程における *Dead end1* の機能解析

*Dead end1* のコンベンショナル・ノックアウトマウスは始原生殖細胞の数が減少して不妊となることに加え、129 系統においては精巣テラトーマが発生する。一方で、*Dead end1* は生後の精子形成過程において制限細胞に発現するが、精巣テラトーマ発症との関連も含めて機能には不明であった。そこで、精子形成過程における *Dead end1* の機能解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1)-1. *Dead end1* 欠損マウスの作製と C57BL6, MCH(ICR), 129Sv/J への戻し交配

*Dead end1* のコンベンショナル・ノックアウトマウスを作製し、C57BL6、MCH(ICR)、そして 129Sv/J の 3 系統へと戻し交配を行なった。交配は少なくとも 8 世代行い、その後ヘテロ同士を交配して生まれた子供の精巣テラトーマの発症率を解析した。

#### (1)-2. 129 系統の *Nanos2* と *Nanos3* のそれぞれの欠損マウスの作製

*Nanos2* と *Nanos3* の欠損マウスを作製し、129 系統マウスに 8 世代以上戻し交配すると同時に、129 系統の *Dead end1* 欠損マウスと交配してダブル欠損マウスを作製し、精巣テラトーマの発症率を解析した。

#### (2)-1. 精子形成過程における *Dead end1* タンパク質の発現解析

抗 *Dead end1* 抗体を用いて Wholemount 精細管免疫染色法で *Dead end1* 発現細胞特定した。また、切片免疫染色で精巣における *Dead end1* 発現細胞を特定した。

#### (2)-2. 生後特異的な *Dead end1* 欠損マウスの作製

薬剤誘導型 *Dead end1* 条件付き欠損マウスを用いて、生後 4 週齢から 5 日間連続で薬剤 (タモキシフェン) を投与することで生後特異的な *Dead end1* 欠損マウスを作製した。

#### 4. 研究成果

(1) 129 系統 *Dead end1* 欠損マウスは精巣テラトーマを発症する

C57BL6、MCH(ICR)、129Sv/J のそれぞれの系統において、*Dead end1* 欠損マウスの精巣テラトーマ発症率を解析した (表 1)。その結果、C57BL6/J はヘテロ欠損とホモ欠損の両方において精巣テラトーマの発症は見られなかったが、129Sv/J 系統においてはヘテロ欠損で 28.8%、ホモ欠損で 92.6% の発症率を示した。これは、*Ter* 変異とほぼ同じ発症率であった。また、MCH(ICR) 系統においてはホモ変異においてのみ 10.2% の発症率を示した。

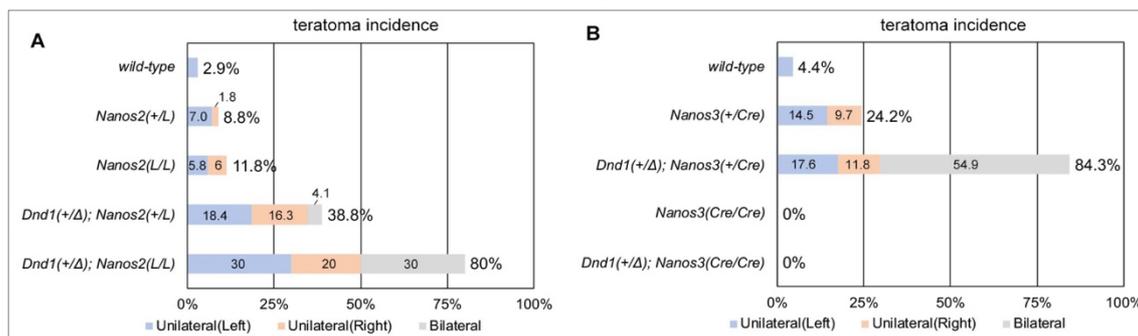
**表 1. *Dead end1* の遺伝子型と B6, MCH, 129 系統マウスにおける精巣テラトーマ発症率**

BL6		% of affected males			
Genotype	total	unilateral (L)	unilateral (R)	bilateral	
+/+	0% (0/32)	-	-	-	
+/ $\Delta$	0% (0/36)	-	-	-	
$\Delta/\Delta$	0% (0/20)	-	-	-	
MCH		% of affected males			
Genotype	total	unilateral (L)	unilateral (R)	bilateral	
+/+	0% (0/47)	-	-	-	
+/ $\Delta$	0% (0/85)	-	-	-	
$\Delta/\Delta$	10.2% (6/59)	5.1% (3/59)	1.7% (1/59)	3.4% (2/59)	
129		% of affected males			
Genotype	total	unilateral (L)	unilateral (R)	bilateral	
+/+	4.2% (4/97)	3.1% (3/97)	1.0% (1/97)	-	
+/ $\Delta$	28.8% (42/146)	14.4% (21/146)	7.5% (11/146)	6.8% (10/146)	
$\Delta/\Delta$	92.6% (50/54)	9.3% (5/54)	20.4% (11/54)	63.0% (34/54)	

*Dnd1*<sup>+/ $\Delta$</sup>  females were crossed with *Dnd1*<sup>+/ $\Delta$</sup>  or *Dnd1*<sup>+/+</sup> males among BL6, MCH, and 129 strains to test the occurrence of male offspring with at least one testicular teratoma.

(2) *Dead end1* の欠損は精巣テラトーマ発症に関して *Nanos2*, *Nanos3* と遺伝的相互作用する

129 系統の *Dead end1* 欠損マウスを 129 系統 *Nanos2* または *Nanos3* 欠損マウスと交配し、テラトーマ発症率を解析した。*Nanos2* ホモ変異マウスでは 11.8% の発症率であったが、*Dead end1* 変異をヘテロで導入すると 80% へと上昇した (図 1, A)。また、*Nanos3* ヘテロ変異マウスでは 24.4% の発症率であったが、*Dead end1* ヘテロ欠損を導入すると 84.3% へと発症率が上昇した (図 1, B)。以上より、*Dead end1* と *Nanos2* または *Nanos3* は精巣テラトーマの発症に関して遺伝学的に相互作用する。*Dead end1* と *Nanos2*, *Nanos3* がタンパク質レベルで結合することから、両者は結合して精巣テラトーマの発症を抑制する可能性がある。



**図 1. 129 系統マウスにおける *Dead end1*, *Nanos2*, *Nanos3* 変異の精巣テラトーマ発症率**

(3) *Dead end1* は生後の精子形成過程において精原細胞に発現する

Wholemount 精細管免疫染色法を用いて、成熟個体の精細管を抗 *Dead end1* 抗体と抗 PLZF 抗体を用いて免疫染色を行なった (図 2)。その結果、*Dead end1* は PLZF を発現するすべての細胞で発現することが明らかとなった。PLZF は精原細胞に発現するため、*Dead end1* が精原細胞に発現することが明らかになった。

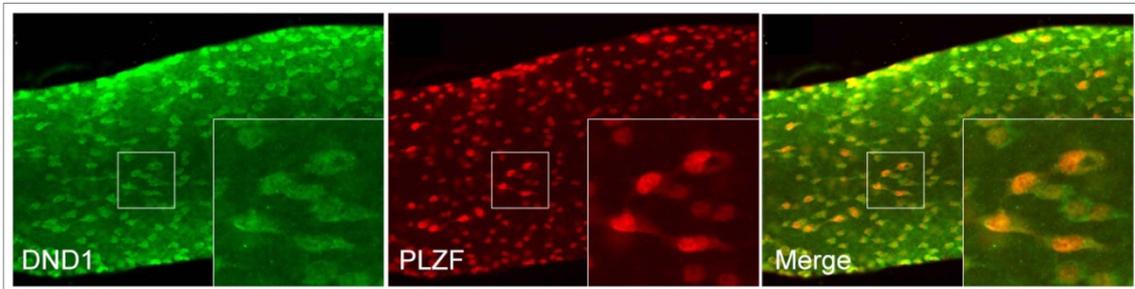


図2. 抗Dead end1抗体と抗PLZF抗体を用いたWholemount 精細管免疫染色の結果

(4) タモキシフェン投与により精原細胞の Dead end1 を除去できる

生後 4 週齢の薬剤誘導型 Dead end1 条件付き欠損マウスにタモキシフェンを 5 日間連続で投与し (図 3A)、5 週齢精巣における Dead end1 タンパク質のはつげんを Western Blotting により解析を行ったところ、その発現は消失していた (図 3B)。また、5 週齢精巣を抗 Dead end1 抗体と抗 PLZF 抗体を用いて切片免疫染色により解析したところ、精原細胞で発現する Dead end1 はタモキシフェン投与により消失することを確認した (図 3C-H)。

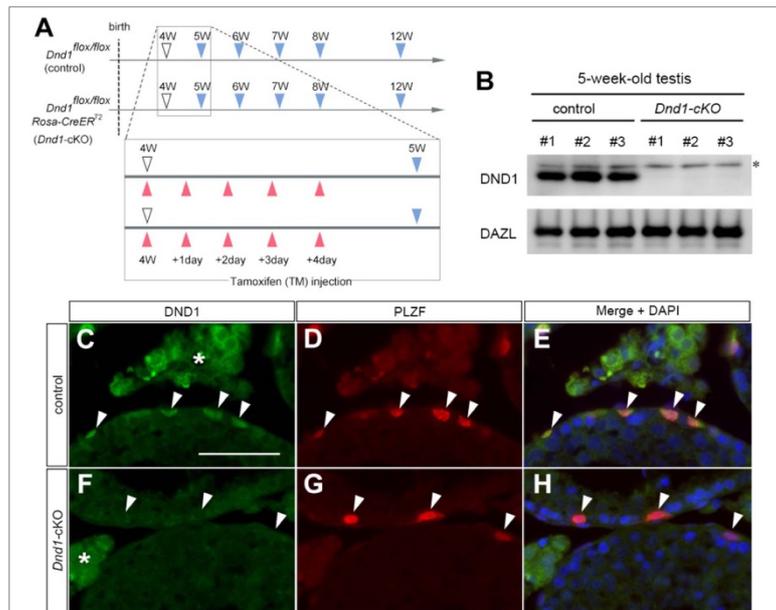


図3. 薬剤誘導型Dead end1条件付き欠損マウス

(5) 生後に Dead end1 を欠損すると精原細胞が消失する

4 週齢でタモキシフェン投与により Dead end1 を除去したのちに、5 週齢、6 週齢、7 週齢、8 週齢、12 週齢で精巣を摘出して抗 PLZF 抗体により切片免疫染色を行うことで精原細胞の数をカウントした。その結果、精原細胞の数が劇的に減少することが明らかとなった (図 4)。

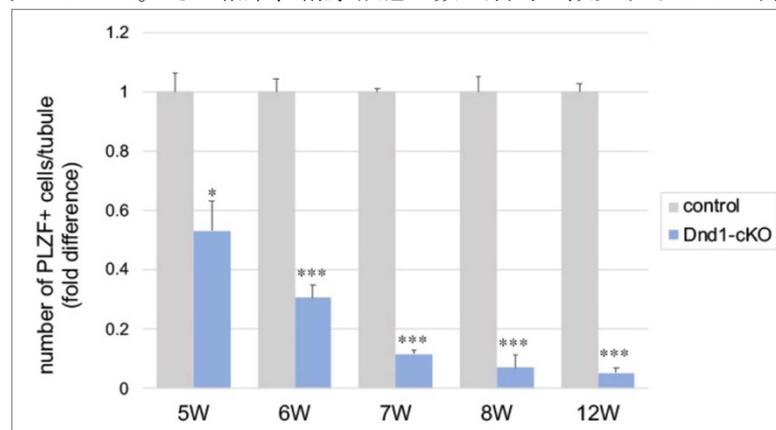


図4. タモキシフェン投与後の精原細胞の割合変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Imai Atsuki, Hagiwara Yoshihiko, Niimi Yuki, Tokumoto Toshinobu, Saga Yumiko, Suzuki Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Mouse dead end1 acts with Nanos2 and Nanos3 to regulate testicular teratoma incidence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0232047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Niimi Yuki, Imai Atsuki, Nishimura Hitomi, Yui Kenya, Kikuchi Ai, Koike Hiroko, Saga Yumiko, Suzuki Atsushi	4. 巻 445
2. 論文標題 Essential role of mouse Dead end1 in the maintenance of spermatogonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.11.003	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kenya Yui , Atsushi Suzuki
2. 発表標題 Functional analysis of mouse IGF2BP1 in spermatogonia
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitomi Nishimura, Atsushi Suzuki
2. 発表標題 精巣テラトーマ抑制機構におけるDND1-NANOS3複合体の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Niimi, Atsushi Suzuki
2. 発表標題 Mouse Dead end1 represses the acquisition of pluripotency in male PGCs
3. 学会等名 The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nishimura H., Imai A., Niimi Y., Suzuki A.
2. 発表標題 Testicular teratoma in organ culture system
3. 学会等名 The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap <a href="https://researchmap.jp/atsushi_ynu/">https://researchmap.jp/atsushi_ynu/</a> 横浜国立大学 研究者総覧 <a href="https://er-web.ynu.ac.jp/html/ATSUSHI_Suzuki/ja.html">https://er-web.ynu.ac.jp/html/ATSUSHI_Suzuki/ja.html</a>
---

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