

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293067

研究課題名(和文) 活性酸素シグナルによる精子幹細胞自己複製制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of ROS in spermatogonial stem cell self-renewal

## 研究代表者

篠原 隆司 (SHINOHARA, Takashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30322770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では精子幹細胞の自己複製分裂における活性酸素の役割を解析した。これまでに活性酸素は生殖細胞に悪影響を与えると考えられており、男性不妊の治療においても活性酸素の抑制が一般的に行われている。しかしながら、我々は活性酸素を産生する酵素であるNox1のノックアウトマウスを解析することにより、Nox1の欠損により精子幹細胞の自己複製分裂が顕著に低下していることを明らかにした。さらにNox family分子に属する別分子であるNox3が一過性に活性酸素を産生することが自己複製分裂の開始に重要であることも見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the role of reactive oxygen species (ROS) in spermatogonial stem cell self-renewal. Because it has been considered that ROS is detrimental to germ cells, reduction of ROS is often used as a therapy for male infertility treatment. However, we found that spermatogonial stem cells in Nox1 deficient mice show significantly reduced self-renewal division. Moreover, we also showed that Nox3, another member of the Nox gene family, also plays an important role in the initiation of self-renewal division. These results suggested that ROS are required for spermatogonial stem cell renewal.

研究分野：生殖生物学

キーワード：精子幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに我々のグループでは精子幹細胞の培養系を確立し、精子幹細胞を長期にわたり幹細胞活性を持ったまま増殖させることに成功し、この細胞を Germline Stem (GS) 細胞と名付けた。GS 細胞は glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) と fibroblast growth factor 2 (FGF2) を添加することにより樹立されたもので試験管内では精原細胞として増殖するが、精巣内に移植すると精子形成を再開し子孫を作成することができる。GS 細胞は2年間以上の長期にわたり培養可能であり、遺伝子ノックアウト動物を作成することもできる。精子幹細胞の自己複製分裂は GDNF と FGF2 の両分子が関与することが知られているが、このメカニズムについては未だ明らかとなっていない。

Reactive oxygen species (ROS) は生殖細胞に対して悪影響を与えることが知られており、不妊治療においては ROS の抑制が一般的に行われている。実際にこれまで ROS が過剰になる状態のノックアウトマウス (Atm, Sod1 などの欠損マウス) では精子形成が抑制されており過剰な ROS 産生が精子形成に悪影響を与えていることが報告されている。しかし、一方で ROS はサイトカインに反応して発生することも知られており、幹細胞の自己複製分裂において ROS の発生が起こることが神経幹細胞においては報告されていた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では精子幹細胞の自己複製分裂における ROS の役割を明らかにすることを目標とする。

## 3. 研究の方法

精子幹細胞の研究が難しい理由の一つには、精巣内における精原細胞の割合が少ないことに起因する。しかしながら、申請者の GS 細胞の樹立により、スタート材料となる精原細胞を十分量準備できるという、これまではない利点がある。また精巣の培養は体細胞の過度の増殖が問題になることが多いが、GS 細胞を利用することで、純粋な生殖細胞を準備することが可能になったため、以前より格段に条件が改善されたと申請者は考えている。そこで本研究では GS 細胞を用いて試験管内で実験を行い、その結果を生体を用いて確認するという流れで実験を行った。以下に研究で使われた主な手法について記載する。

### (1) GS 細胞の培養

これまでに報告された Stempro34 培地 (Invitrogen 社製)、rat GDNF, human FGF2 (いずれも Peptotech 社製) を添加し、1% の血清存在下で mouse embryonic fibroblast 上で細胞培養を行った。GFP 遺伝子を発現する GS 細胞は以前に報告を行っているものを使用した (Kanatsu-Shinohara et al., Biol. Reprod. 2003; 69:612)。

### (2) 実験動物

Kit 遺伝子に突然変異がある WBB6F1-W/Wv マウス、C57BL/6 マウスは日本 SLC より購入した。また Nox1 遺伝子の欠損マウスについては以前に報告されているものを用いた (Ibi et al., J. Neurosci 2008; 28:9486)。

### (3) short hairpin RNA (shRNA)

shRNA を発現するレンチウイルスは Sigma 社から購入し、293T 細胞へ一過性に遺伝子導入することでウイルスの作成を行った。回収されたウイルスは超遠心により濃縮を行い、実験に使用した。

### (4) 移植実験

精子幹細胞の移植については、efferent duct を介して常法に基づき行った (Ogawa et al., Int. J. Dev. Biol. 1997; 41: 111)。個々の精巣に 4ml の容量の細胞をマイクロインジェクションで導入した。移植された精巣は移植実験の2ヶ月後に回収し、UV ランプ下でコロニー数の測定を行った。

継代移植の場合には、一次ホストの精巣を type IV collagenase と trypsin によりバラバラにし、一部の細胞を二次ホストに移植することで行った。

## 4. 研究成果

### (1) 精子幹細胞における Nox1 遺伝子の役割の解析

ROS が精子幹細胞に及ぼす影響を解析するために我々はまず GS 細胞を用いた。GS 細胞に ROS を抑制する化合物 (apocynin、diphenyleneiodonium) を添加すると GS 細胞の増殖は対照群と比較して顕著に抑制された。また、GS 細胞に GDNF, FGF2 などの自己複製因子を外部から添加すると ROS の発生が起こってくることは Flow cytometry により確認された。活性化型の H-Ras (H-RasV12) を発現させた GS 細胞は外部からの自己複製因子の刺激がなくても自己複製を行うという特徴があるが、この細胞においては恒常的に ROS の発生が認められることから、精子幹細胞の自己複製因子の刺激シグナルの下流に ROS が存在することが強く示唆された。

ROS の発生には Nox 遺伝子が関与することが知られている。そこで我々は Nox1-Nox4 遺伝子の発現を GS 細胞を用いて real time polymerase chain reaction (PCR) により調べたところ、Nox1 と Nox4 が強く GS 細胞に発現していることが明らかとなった。Nox1 と Nox4 遺伝子の機能を調べるためにそれぞれの遺伝子に対する shRNA を発現する lentivirus を GS 細胞に感染したところ、Nox4 遺伝子を抑制された GS 細胞の分裂には影響がなかったが、Nox1 遺伝子を抑制された GS 細胞の増殖は顕著に抑制された。また Nox1 遺伝子の機能を低下させた GS 細胞の ROS 発生量は減少することも Flow cytometry により示された。

GS 細胞の中の 1-2% 程度の細胞が精子幹細胞として働くことから、これらの表現型が幹細胞に対するものか分化決定された細胞に

対するものなのかを評価する必要がある。そこで、我々は次に shRNA で Nox1 遺伝子の発現が抑制された GS 細胞を精子幹細胞移植法により精巣に移植したところ、Nox1 遺伝子を抑制された場合にはその移植細胞由来のコロニー形成数が低下することから、精子幹細胞の自己複製に Nox1 遺伝子が関与することが強く示唆された。

次に我々は Nox1 欠損マウスを用いて精子幹細胞の役割の解析を行った。Nox1 欠損マウスは正常の精子形成を示し、子孫を作成することも可能である。しかしながら、精巣のサイズは対照群に比較して有意に小さい。精子幹細胞の状態を調べるために、精巣切片の免疫染色を行ったところ、Nox1 欠損マウスでは未分化精原細胞のマーカー分子の発現が低下していることが分かった。このマウスの精巣細胞を移植実験に用いたところ、Nox1 欠損マウスにおける精子幹細胞の数は野生型と差が認められなかったものの、継代移植実験により幹細胞の自己複製分裂を刺激した場合には自己複製分裂が低下していることが証明された。これらの結果から Nox1 遺伝子が精子幹細胞の自己複製に関与することが強く示唆された。

## (2) Nox3 遺伝子による GS 細胞の自己複製分裂刺激

(1)の実験において我々は Nox1 遺伝子が GS 細胞の自己複製分裂に関与することを証明したが、我々が GS 細胞において自己複製因子を除去して増殖を停止させた後に再度添加する実験を行った場合には Nox1 遺伝子の発現誘導は起こって来なかったことから、Nox1 遺伝子是对数増殖期にある GS 細胞においては発現しているものの、その自己複製分裂に開始時には大きな役割を担っていない可能性が示唆された。

Reverse transcription -PCR を行い、Nox 遺伝子の発現を再度解析したところ、飢餓状態におかれて自己複製因子を再添加された GS 細胞では Nox3 遺伝子の発現が誘導されてくることが明らかとなった。Nox3 遺伝子是对数増殖している GS 細胞ではその発現はほとんど認められないが、自己複製分裂を刺激した場合には一過性に発現上昇が起こることがその後の実験で明らかとなった。

そこで GS 細胞で自己複製因子を除いてその増殖を抑制し、再度自己複製因子を添加して増殖誘導を行った場合に Nox3 遺伝子に対する shRNA をレンチウイルスを用いて遺伝子導入すると Nox3 を抑制された GS 細胞の細胞回収量は対照群に比較して有意に低下した。この結果は Nox3 の一過性発現が精子幹細胞の自己複製に影響を及ぼす可能性を示唆した。この可能性を検証するために、Nox3 を抑制された GS 細胞の幹細胞活性を精子幹細胞移植法により確認したところ、Nox3 遺伝子を抑制された GS 細胞は対照群に比較して有意に低いレベルの幹細胞活性しか持たないこ

とが分かった。これらの結果は Nox3 が GS 細胞の自己複製分裂に関与することを強く示唆する。

GS 細胞は培養された精子幹細胞であるが、これまでの実験で GS 細胞の表現型と生体から回収されたばかりの精子幹細胞の表現型が異なる場合があることが知られている。そこで我々は精子形成が生後始まる段階の新生児マウスの精巣細胞を回収し、生体から回収されたばかりの精子幹細胞における Nox3 遺伝子の機能を解析した。この実験でも GS 細胞を用いた場合と同様に Nox3 遺伝子を抑制された精巣細胞を移植した場合には対照群に比較した場合、コロニー数が有意に低下することが分かった。

これらの実験結果から GS 細胞には複数の Nox 遺伝子が発現されており、それぞれが異なる役割を果たすことで精子幹細胞の自己複製分裂に関与することが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件) 全て査読あり。

1. Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, H., and Shinohara, T. 2016. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by the stem cell dye CDy1. *Biol. Reprod.* 94, 13. 10.1095/biolreprod.115.135707.
2. Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara, M., Hirose, M., Ogura, A., and Shinohara, T. 2015. Pluripotent cell derivation from male germline cells by suppression of Dmrt1 and Trp53. *J. Reprod. Dev.* 61, 473-484. 10.1262/jrd.2015-059.
3. Tanaka, T., Kanatsu-Shinohara, M., and Shinohara, T. 2015. The CDKN1B-RB1-E2F1 pathway protects mouse spermatogonial stem cells from genomic damage. *J. Reprod. Dev.* 61, 305-316. 10.1262/jrd.2015-027.
4. Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., and Shinohara, T. 2015. ROS-generating oxidase Nox3 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 92, 147. 10.1095/biolreprod.114.127647.

5. Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Morimoto, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Jijiwa, M., Takahashi, M., Ogura, A. and Shinohara, T. 2015. Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cell Reports* 4, 489-502. 10.1016/j.stemcr.2015.01.010.
6. Ishii, K., Ishiai, M., Morimoto, H., Kanatsu-Shinohara, M., Niwa, O., Takata, M. and Shinohara, T. 2014. The Trp53-Trp53inp1-Tnfrsf10b pathway regulates the radiation response of mouse spermatogonial stem cells. *Stem Cell Reports* 3, 676-689. 10.1016/j.stemcr.2014.08.006.
7. Kanatsu-Shinohara, M., Ogonuki, N., Matoba, S., Morimoto, H., Ogura, A. and Shinohara, T. 2014. Improved serum- and feeder-free culture of mouse germline stem cells. *Biol. Reprod.* 91, 88. 10.1095/biolreprod.114.122317.
8. Kanatsu-Shinohara, M., Onoyama, I., Nakayama, K. I. and Shinohara, T. 2014. Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, 8826-8831. 10.1073/pnas.1401837111.
9. Kimura, T., Kaga Y., Ohta, H., Odamoto, M., Sekita, Y., Li, K., Yamano, N., Fujikawa, K., Isotani, A., Sasaki, N., Toyoda, M., Hayashi, K., Okabe, M., Shinohara, T., Saitou, M. and Nakano, T. 2014. Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by EKR signal inhibition. *Stem Cells* 32, 2668-2678. 10.1002/stem.1781.
10. Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. 2014. Cell-cycle-dependent colonization of mouse spermatogonial stem cells after transplantation into seminiferous tubules. *J. Reprod. Dev.* 60, 37-46. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/1/60\\_2013-083/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/60/1/60_2013-083/_article)
11. Kanatsu-Shinohara, M., Mori, Y. and Shinohara, T. 2013. Enrichment of mouse spermatogonial stem cells based on aldehyde dehydrogenase activity. *Biol. Reprod.* 89, 140. 10.1095/biolreprod.113.114629.
12. Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. 2013. Spermatogonial stem cell self-renewal and development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 163-187. 10.1146/annurev-cellbio-101512-122353.
13. Behringer, R. R. and Shinohara, T. 2013. Symposium in honor of Ralph L. Brinster celebrating 50 years of scientific breakthroughs. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 333-339. 10.1387/ijdb.120248rb.
14. Takashima, S., Hirose, M., Ogonuki, N., Ebisuya, M., Inoue, K., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Nishida, E., Ogura, A. and Shinohara, T. 2013. Regulation of pluripotency in male germline stem cells by Dmrt1. *Genes Dev.* 27, 1949-1958. 10.1101/gad.220194.113.
15. Morimoto, H., Iwata, K., Ogonuki, N., Inoue, K., Ogura, A., Kanatsu-Shinohara, M., Morimoto, T., Yabe-Nishimura, C. and Shinohara, T.

2013. ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Cell Stem Cell 12, 774-786. 10.1016/j.stem.2013.04.001.

[学会発表] (計2件)

Non-random gremlin transmission of mouse male gremlin stem cells. Shinohara T. International symposium on epigenome dynamics and regulation in germ cells. 2016 (Kyoto, Japan) 2016.02.17.

Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal. Shinohara T. Society for Reproduction and Fertility annual conference 2014 (Edinburgh, UK) 2014.09.02.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

1. 男性不妊症 治療に光 精子の幹細胞の別タイプ 京大チーム、実験で発見  
日本経済新聞 2015年2月13日 42面
2. 精子新たな幹細胞 マウスで発見 不妊症治療へ道 京大など 読売新聞 2015年2月13日夕刊3面

3. 精子幹細胞 放射線に強く 京大チームマウス実験 不妊症防げる可能性読売新聞 2014年9月21日 30面

4. 低濃度活性酸素 精子増やす力 京大研究、不妊治療に一石?朝日新聞 2013年6月13日 28面

5. 男性不妊 治療法変わる? 活性酸素除去で精子減少 京大グループ発表 毎日新聞 2013年6月7日 25面

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠原 隆司 (SHINOHARA, Takashi)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 30322770

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: