

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11198

研究課題名(和文) 精巣生殖細胞におけるNotchシグナリング制御機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) Study on mechanism of Notch signaling in testicular germ cell and its clinical role in human

研究代表者

宮川 康 (Miyagawa, Yasushi)

大阪大学・医学系研究科・招へい准教授

研究者番号：70362704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ノッチシグナル経路は幹細胞や前駆細胞数を維持することで種を超えて様々な生物の発生過程における根本的な役割をはたしており、そのノッチシグナルはノッチリガンドによって開始される。ノッチシグナルはショウジョウバエや線虫の生殖細胞に重要なことがわかっているが、ほ乳類の精子形成での役割や重要性はわかっていない。本研究ではノッチシグナルの抑制因子であるNkapl (NFkB activating protein-like)とNakap (NFkB activating protein)がマウスにおいて欠くことのできない重要な核蛋白であることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NKAPおよびNKAPLの機能解析は、生殖細胞の特質を理解し、生殖細胞をin vitroで培養するために非常に重要な情報となる。将来的にES細胞を用いNKAPの解析を進めることによって、生殖細胞を能動的に分化させる遺伝子転写のカスケードを明らかにし、さらには、生殖細胞分化を支持する細胞を用いず、体細胞から容易に減数分裂に進める生殖細胞を誘導する系の構築が可能となる。さらに、男性不妊症におけるNKAP、NKAPL、およびNotchファミリー遺伝子の発現の関係と遺伝子多型の解析を進め、NOAの原因を追求し、Notchシグナリングを制御する低分子化合物の開発を通じて新規治療法の開発につなげる。

研究成果の概要(英文)：The Notch signaling pathway plays fundamental roles in diverse developmental processes through maintaining stem/progenitor cell populations and is the highly evolutionary conserved pathway that is initiated in response mainly to Notch ligands. Although Notch signaling also plays a critical role in germ cell development in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*, its function and importance for spermatogenesis in mammals is controversial. Our study is to revealed a novel germ cell-specific gene Nkapl (NFkB activating protein-like) and Nakap (NFkB activating protein) is a functional nuclear protein as a repressor of Notch signaling in mice and an indispensable gene for spermatogenesis.

研究分野：泌尿器科

キーワード：男性不妊症 無精子症 遺伝子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、我が国の政策において少子化対策は重要な課題であり、少子化社会対策基本法(2003年)に不妊症治療支援が盛り込まれ、さらに政府の掲げる「一億総活躍社会」構想の目玉として、2016年から史上初めて男性不妊症助成事業が開始され、これにより男性不妊症なかで最も重篤な非閉塞性無精子症に対する精巣内精子採取術が全国で数多く行われるようになってきている。非閉塞性無精子症はその精巣病理組織所見からセルトリセルオンリー症候群(SCOS: Sertoli cell only syndrome) (生殖細胞欠如) 成熟停止(MA: Maturation arrest) (前期成熟停止および後期成熟停止)そして精子低形成(HS: Hypospermatogenesis)の大きく3病型に分類される。後期成熟停止やHSは加齢や環境因子などによる二次的变化と推測され、多くは精巣内精子採取術で治療可能であるが、SCOSや前期成熟停止では、大部分が精子採取不可能である。また、僅かに精子が採取できたとしても、その精子の妊孕能は低く、大部分は拳児を得ることができず、多くの不妊カップルが身体的、経済的負担のみを負わされている。この非閉塞性無精子症の不十分な治療効果に加えて、さらにTESE-ICSIによって得られた出生児にも高頻度で男性不妊が認められるなどの後世への遺伝的問題もあり、非閉塞性無精子症の発症メカニズムの理解に立った診断・生殖補助医療の開発が強く望まれている。生殖細胞は次世代に遺伝情報を伝承する役目を担っており、種の保存、繁栄に必須で、世代を越えて生存し、個体全体を作りうる全能性を保有しているなど、体細胞系列とは、大きく異なる特徴を有しているが、その詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。その全貌を解明することは非閉塞性無精子症の未だ不明な病因病態を解明する手がかりになり、真に不妊カップルに福音となる新しい診断法および治療法の開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

非閉塞性無精子症(NOA)は精巣病理組織所見からセルトリセルオンリー症候群(SCOS) 成熟停止(MA)そして精子低形成(HS)の大きく3病型に分類される。HSは加齢や環境因子などによる二次的变化と推測され、多くは精巣内精子採取術で治療可能であるが、SCOSやMAは、大部分が原因不明であり、精子採取も困難である。我々は、精巣生殖細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体 TRA98 の抗原が Notch シグナリング制御遺伝子 NKAP(NF- κ B activating protein)であることを世界に先駆けて同定し、減数分裂後に機能するホモログ遺伝子 NKAPL(NKAP-like)をも新規に発見した。驚くべきことにNKAPとNKAPLの遺伝子破壊マウスの精巣表現型はそれぞれSCOSとMAであった。生殖細胞で2つの遺伝子が如何にNotchシグナリングを制御するのかを明らかにし、NOAの病態解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) NKAP/NKAPLの生殖細胞での共役因子ならびに標的遺伝子の解析:我々はすでにNKAP/NKAPLの発現ベクターおよび抗体作成済みであり、プロテインアレーチップにてNKAP/NKAPLの共役因子の同定と、マウスGS細胞での機能解析(遺伝子・siRNA導入、マイクロアレー解析) NKAP/NKAPL 遺伝子破壊マウスの表現型の詳細な解析を行う。
2) 成熟停止による非閉塞性無精子症患者のNKAPLのゲノム変異・SNP解析:我々はこれまで精巣内精子採取術を施行する非閉塞性無精子症患者に対する様々な精子形成遺伝子のゲノム解析を大阪大学ヒトゲノム研究倫理審査承認のもと逐次施行している。このうち、成熟停止による非閉塞性無精子症患者50名のエクソンシーケンスを開始し、さらに関連施設からも症例を募り、成熟停止症例100名の解析を目標とする。

4. 研究成果

1) NKAP/NKAPLの生殖細胞での共役因子ならびに標的遺伝子の解析:
我々は独自に開発したヒトタンパク質を網羅するプロテインアレーチップを用いて、生殖細胞マーカーとして広く使用されているモノクローナル抗体 TRA98(図1)の認識する抗原のスクリーニングを行い、その抗原遺伝子のクローニングに世界に先駆けて成功した。TRA98の認識する抗原は、NF- κ Bと複合体を形成する転写調節因子NKAP(NF- κ B activating protein)であった(図2)。
そこでNKAPLのGS細胞への強制発現を行いNKAPLが既知のNotchシグナリング共役因子と協調して、GS細胞にてPlzf, Gfra1, Ret, and Nanos2といった精原性幹細胞マーカーを制御することを明らかに論文化した(Okuda H et al. A novel transcriptional factor Nkapl is a germ cell-specific suppressor of Notch signaling and is indispensable for spermatogenesis. PLoS One. 10: e0124293, 2015)。しかしながら、NKAPとの機能の違いは不明であり、NKAPのGS細胞への遺伝子導入およびsiRNA移行によるノックダウン法によるNotchシグナリング標的遺伝子の同定をこころみだが、NKAP遺伝子導入によるGS細胞の形質変化とNKAPLとの分子機能的違いは確認できなかった。しかしながらNKAP遺伝子破壊マウスの表現形は生殖細胞の欠如であり、その子細を論文投稿中である(in revision)。

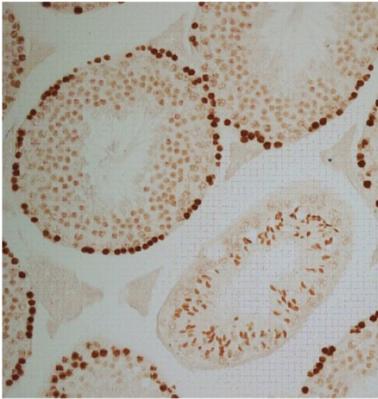


図1 マウス精巣の免疫染色

茶色のシグナルが TRA98 の抗原。生殖細胞特異的に発現が観察される。特に精原細胞に強い

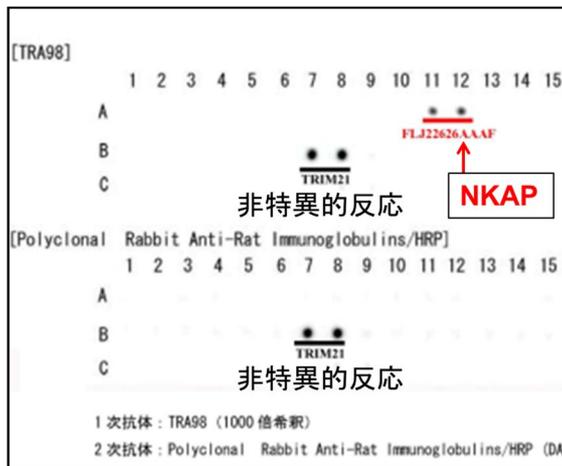


図2

TRA98 抗原として同定された NKAP

Cell free protein synthesis により作成したプロテインアレーを利用

2) 成熟停止による非閉塞性無精子症患者の NKAPL のゲノム変異・SNP 解析:
 成熟停止による非閉塞性無精子症患者 50 名のエクソンシーケンスを行い NKAPL と NKAP とともに有意な変異は認めなかったが、他のあらたな責任遺伝子候補を複数発見でき、引き続き、症例数を増やしつつ解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hayashi R, Okuno Y, Mukai K, Kitamura T, Hayakawa T, Onodera T, Murata M, Fukuhara A, Imamura R, Miyagawa Y, Nonomura N, Otsuki M, Shimomura I.	4. 巻 160
2. 論文標題 Adipocyte GR Inhibits Healthy Adipose Expansion Through Multiple Mechanisms in Cushing Syndrome.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 504-521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2018-01029.	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 該当する
1. 著者名 Ueda N, Kondo M, Takezawa K, Kiuchi H, Sekii Y, Inagaki Y, Soda T, Fukuhara S, Fujita K, Uemura M, Imamura R, Miyagawa Y, Nonomura N, Shimada S.	4. 巻 506
2. 論文標題 Intravesical ATP instillation induces urinary frequency because of activation of bladder afferent nerves without inflammatory changes in mice: A promising model for overactive bladder.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 498-503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.10.106.	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 該当する
1. 著者名 Minase G, Miyamoto T, Miyagawa Y, Iijima M, Ueda H, Saijo Y, Namiki M, Sengoku K.	4. 巻 20
2. 論文標題 Single-nucleotide polymorphisms in the human RAD21L gene may be a genetic risk factor for Japanese patients with azoospermia caused by meiotic arrest and Sertoli cell-only syndrome.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hum Fertil	6. 最初と最後の頁 217-220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14647273.2017.1292004.	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 該当する
1. 著者名 Soda T, Miyagawa Y, Ueda N, Takezawa K, Okuda H, Fukuhara S, Fujita K, Kiuchi H, Uemura M, Okamoto Y, Tsujimura A, Tanaka H, Nonomura N.	4. 巻 32
2. 論文標題 Systematic characterization of human testis-specific actin capping protein 3 as a possible biomarker for male infertility.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Hum Reprod	6. 最初と最後の頁 514-522
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/humrep/dew353	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 該当する

1. 著者名 Terai K, Horie S, Fukuhara S, Miyagawa Y, Kobayashi K, Tsujimura A.	4. 巻 19
2. 論文標題 Combination therapy with antioxidants improves total motile sperm counts: A Preliminary Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol.	6. 最初と最後の頁 89-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12308.	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 該当する

1. 著者名 Tanaka H, Miyagawa Y, Tsujimura A, Wada M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Genetic Polymorphisms within The Intronless ACTL7A and ACTL7B Genes Encoding Spermatogenesis-Specific Actin-Like Proteins in Japanese Males.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Fertil Steril.	6. 最初と最後の頁 245-249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22074/ijfs.2019.5702.	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 該当する

1. 著者名 Soda T, Miyagawa Y, Fukuhara S, Tanaka H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Physiological role of actin regulation in male fertility: Insight into actin capping proteins in spermatogenic cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Reprod Med Biol.	6. 最初と最後の頁 120-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rmb2.12316.	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮川 康
2. 発表標題 シンポジウム 精子研究の臨床応用
3. 学会等名 第63回日本生殖医学会学術講演会・総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔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
研究分担者	田中 宏光 (Tanaka Hiromitsu) (10263310)	長崎国際大学・薬学部・准教授 (37303)	
研究分担者	福原 慎一郎 (Fukuhara Shinichiro) (20609870)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	木内 寛 (Kiuchi Hiroshi) (70403053)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	