

# 精子幹細胞の自己複製分裂における活性酸素の役割

京都大学大学院 医学研究科 遺伝医学講座 分子遺伝学研究分野

田中 敬

## 1. 背景・目的

精子形成において、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っている。申請者らのグループは精子幹細胞を長期間培養する技術を開発し、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これまでにAktが精子幹細胞の自己複製分裂に重要なことを明らかにし、さらにRasあるいは CyclinD2/E1発現誘導によりサイトカインの自己複製シグナルを再構築することに成功した。しかし細胞には他にも様々なシグナル経路があるため精子幹細胞の自己複製分裂を制御する機構の全貌は明らかでない。

精子幹細胞の自己複製に関与する新規シグナルの候補として、本研究では活性酸素種ROS (Reactive Oxygen Species) に着目した。ROSは造血幹細胞など組織幹細胞の自己複製に関与することが知られるが、その作用は細胞により異なり、精子幹細胞における効果は検討されていない。申請者のこれまでの実験で精子幹細胞の自己複製を促すサイトカインによりROS濃度が上昇することが分かっており、また過酸化水素によりROS濃度を上昇させると培養精子幹細胞の増殖が促進されることも確認している。これらの結果より精子幹細胞のROSは自己複製シグナルとして機能すると考えられる。

そこで本研究は精子幹細胞へのサイトカイン刺激がROS産生を上昇させる機構を明らかにするとともに、生じたROSがどのように精子幹細胞の自己複製分裂に関与するかを解明することを目的として研究を行った。

## 2. 方法

### 1) 培養精子幹細胞内でROSが産生される分子機構の解明

ROSは細胞内の代謝反応の副産物として受動的に産生される場合とNAPDHオキシダーゼNOXにより積極的に産生される場合があることが知られる。どちらの経路が精子幹細胞におけるROS産生を制御しているか、それぞれの経路の選択的阻害剤を用いて調べる。

### 2) ROSによる精子幹細胞自己複製の制御機構の解明

#### a) 高濃度ROS/ROS阻害が培養精子幹細胞の自己複製分裂に与える影響の検討

これまでの予備実験で過酸化水素によりROS濃度を上昇させると培養精子幹細胞の増殖が亢進することが分かってきた。しかしROSが精子幹細胞の自己複製分裂を促すか、あるいは分化した細胞を生み出す分裂を促すかは分かっていない。これを明らかにするため他個体精巣への細胞移植アッセイを行い、コロニー形成と精子形成能を解析して精子幹細胞機能を評価する。過酸化水素およびROS阻害剤 {alpha-lipoic acid (LPA), DPI} を添加して培養した精子幹細胞の幹細胞頻度を比較し、ROSがどのように自己複製分裂に影響するか明らかにする。

#### b) 培養精子幹細胞内のROSシグナル経路の解析

培養精子幹細胞の自己複製分裂に必要なGDNF, FGF2の2つのサイトカインを培地に添加するとROS濃度が上昇することが予備実験で確認されている。GDNF, FGF2それぞれを培地液液に加えた際のROS濃度変化を測定し、どちらがROS産生を促すか調べる。ROS濃度はROSを検出する蛍光プローブを利用してフローサイトメトリーを用いて測定する。ROSシグナルの下流で働く経路としてp38, PTEN, ASK, PTPなどが知られる。ROS濃度上昇によりどの分子が活性化するか調べ、選択的阻害剤やノックダウンによりROSシグナルに機能するか調べる。機能分子が同定されたら活性化コンストラクトの導入によるシグナルの再構成を試みる。

### 3) 生体内でのROSによる精子幹細胞自己複製分裂制御

#### a) 生体内精子幹細胞が存在する酸素環境の解析

生体内の精子幹細胞がどのような酸素環境に存在するかはこれまで検討されていない。低酸素検出プローブを生体マウスに投与し、精巣切片でプローブを免疫染色して生体内の精子幹細胞

胞が高酸素環境あるいは低酸素環境に存在するか調べる。生体内では精原細胞のうち幹細胞として働くのはごく少数である。精子幹細胞を特定できるマーカーは見つかっていないが、E-Cadherin > EpCAM > c-KIT陽性細胞の順で幹細胞が含まれる割合が高いことが分かっているので、これらを低酸素プローブと二重染色する。

#### b) 生体内精子幹細胞のROS濃度と幹細胞活性の関係の検討

生体内の精子幹細胞のROS濃度レベルは明らかでなく、ROS濃度と幹細胞活性の関係も検討されていない。マウス精巣細胞から単離した精原細胞を細胞内ROS検出試薬で染色し、フローサイトメトリーでROS濃度が高い分画と低い分画に分ける。これを他個体精巣へ移植してコロニー形成能を解析し、ROS濃度と精子幹細胞活性の関係を解析する。またROS阻害剤LPAを投与したマウスの精巣細胞の移植アッセイを行い、生体内でのROS阻害が精子幹細胞の自己複製分裂に与える影響を解析する。

### 4) 精子幹細胞においてROSシグナルのエフェクターとして働く分子機構

#### a) 培養精子幹細胞におけるROSシグナルのエフェクター転写因子の網羅的解析

ROSシグナルは様々な分子の活性を制御すると考えられる。ROSシグナルが制御する分子を網羅的に同定するため、過酸化水素を加えた培地、ROS阻害剤を添加した培地と通常の培地で培養した精子幹細胞のmRNA発現をマイクロアレイ解析で比較し、変化を示すmRNAを同定する。

#### b) 同定したエフェクター転写因子の精子幹細胞における機能解析

a) で同定した分子の機能を明らかにするため、ドミナントネガティブ型発現ベクターあるいはノックダウンベクターを培養精子幹細胞に導入して標的遺伝子の機能を阻害する。遺伝子導入した細胞の精子幹細胞機能を移植アッセイにより評価し、標的遺伝子が精子幹細胞の自己複製分裂に機能するかを解明する。

## 3. 結果

### 1) 培養精子幹細胞内でROSが産生される分子機構の解明

培養精子幹細胞の培地にROS阻害剤である $\alpha$ -Lipoic Acidを加えると、培養精子幹細胞の増殖が阻害された。またNAPDHオキシダーゼNOX阻害剤であるDPIを阻害しても増殖が阻害された。

### 2) ROSによる精子幹細胞自己複製の制御機構の解明

#### a) 高濃度ROS/ROS阻害が培養精子幹細胞の自己複製分裂に与える影響の検討

過酸化水素によりROS濃度を上昇させると培養精子幹細胞の増殖が亢進された。この細胞の移植アッセイを行うと通常の培養条件と同程度の幹細胞活性および精子形成能を有することが分かった。またROS阻害剤 { $\alpha$ -lipoic acid (LPA), DPI} を添加すると幹細胞活性を持った精子幹細胞頻度が減少した。

#### b) 培養精子幹細胞内のROSシグナル経路の解析

GDNF, FGF2それぞれを培地液中に加えた際のROS濃度変化を測定すると、GDNF, FGF2のどちらでもROS濃度が上昇することが分かった。またROS濃度を上昇させるとp38, JNKが活性化され、ROS阻害剤を加えると両シグナル分子の活性が下がることが示された。

### 3) 生体内でのROSによる精子幹細胞自己複製分裂制御

#### a) 生体内精子幹細胞が存在する酸素環境の解析

低酸素検出プローブPimonidazolを生体マウスに投与し、精巣切片でプローブとE-Cadherin, EpCAM, c-KITのそれぞれ二重免疫染色を行った。精巣の精細管では基底膜近く低酸素環境になっており、E-Cadherin等のマーカーをもつ細胞が低酸素環境に存在していた。

#### b) 生体内精子幹細胞のROS濃度と幹細胞活性の関係の検討

マウス精巣細胞から単離した細胞をROS検出試薬で染色し、フローサイトメトリーでROS濃度が高い分画と低い分画に分ける条件を設定できた。移植アッセイを行ったが現在の段階でまだ明確な結果は得られていない。

### 4) 精子幹細胞においてROSシグナルのエフェクターとして働く分子機構

#### a) 培養精子幹細胞におけるROSシグナルのエフェクター転写因子の網羅的解析

過酸化水素を加えた培地、ROS阻害剤を添加した培地と通常の培地で培養した精子幹細胞のmRNA発現をRT-PCRで調べ、マイクロアレイ解析用のサンプルを得た。

## 4. 考察 まとめ

### 1) 培養精子幹細胞内でROSが産生される分子機構の解明

培養精子幹細胞の増殖にROS産生が必要であることが分かり、特にNOXによるROSの積極的産生が重要だと考えられる。

## **2) ROSによる精子幹細胞自己複製の制御機構の解明**

移植アッセイによる培養精子幹細胞活性の評価から、ROSの上昇が精子幹細胞の自己複製を亢進させること、またROSを阻害すると精子幹細胞が減少することが明確になった。

さらに細胞内ROS濃度測定および下流シグナルの解析により、精子幹細胞の自己複製増殖を亢進させるサイトカインGDNF, FGF2がそれぞれ精子幹細胞を刺激してROSを産生させること、産生されたROSがp38, JNKを活性化して精子幹細胞が自己複製増殖に向かうことが示された。

## **3) 生体内でのROSによる精子幹細胞自己複製分裂制御**

低酸素検出プローブにより、精子幹細胞は比較的低酸素環境に存在することが分かった。一方これまでの実験により精子幹細胞のROS産生が必要であることが分かっている。一見すると矛盾するこれらの事象の関係はまだ明らかでない。

実際の生体内精子幹細胞とROS濃度の関係を調べるにはマウス精巣細胞からROS濃度の高い細胞と低い細胞で分けて移植アッセイをする必要がある。この実験に関しては条件を設定できたものの移植アッセイに2ヶ月かかるためまだ明確な結果は得られていない。

## **4) 精子幹細胞においてROSシグナルのエフェクターとして働く分子機構**

ROSシグナルのエフェクターシグナル分子としてp38, JNKを同定できた。ROSシグナルは様々な分岐があることが知られるため、その他にもエフェクターとしてはたらく可能性がある。現在、網羅的解析用のサンプルが得られたため、mRNA変化の解析中である。

## **まとめ**

本研究では、これまで研究されてこなかった精子幹細胞におけるROSの重要性を明らかにした。造血幹細胞など他の幹細胞ではROSが幹細胞活性に負にはたらくことが知られるため、精子幹細胞がユニークなROS制御機構をもつと考えられる。このROSシグナル経路について本研究では下流のp38, JNKを同定できた。しかしROSがどのような転写因子に影響するかなど、シグナルカスケードの全貌は明らかでなく今後の課題である。一方生体内では精子幹細胞が低酸素環境に存在することが示唆された。これは精子幹細胞のROS要求性と一見矛盾するため、精子幹細胞における低酸素シグナルなどについても今後さらなる解析が必要である。

精子幹細胞の培養はマウス、ラット、ハムスター等では成功しているがサル、ウサギ、ブタなどでは未だ培養出来体内。本研究で過酸化水素添加により増殖が亢進した精子幹細胞は正常な精子、子孫を作ることが示されたため、他の動物においても過酸化水素添加により精子幹細胞培養法の改善が期待される。また一般にROSは細胞を傷害する悪い影響が知られるが、精子幹細胞では逆にROSが必要であることが分かった。現在の不妊治療ではROSを抑制するメリットばかりに注目されているため、精子幹細胞におけるROSの重要性を示した本研究の成果は不妊治療方針の見直しにつながる可能性がある。

## **5. 参考文献**

Morimoto H, Iwata K, Ogonuki N, Inoue K, Atsuo O, Kanatsu-Shinohara M, Morimoto T, Yabe-Nishimura C, Shinohara T. (2013) ROS are required for mouse spermatogonial stem cell self-renewal. Cell Stem Cell 12(6) 774-786.