

精子形成促進分子 GDNF の制御機構の解明

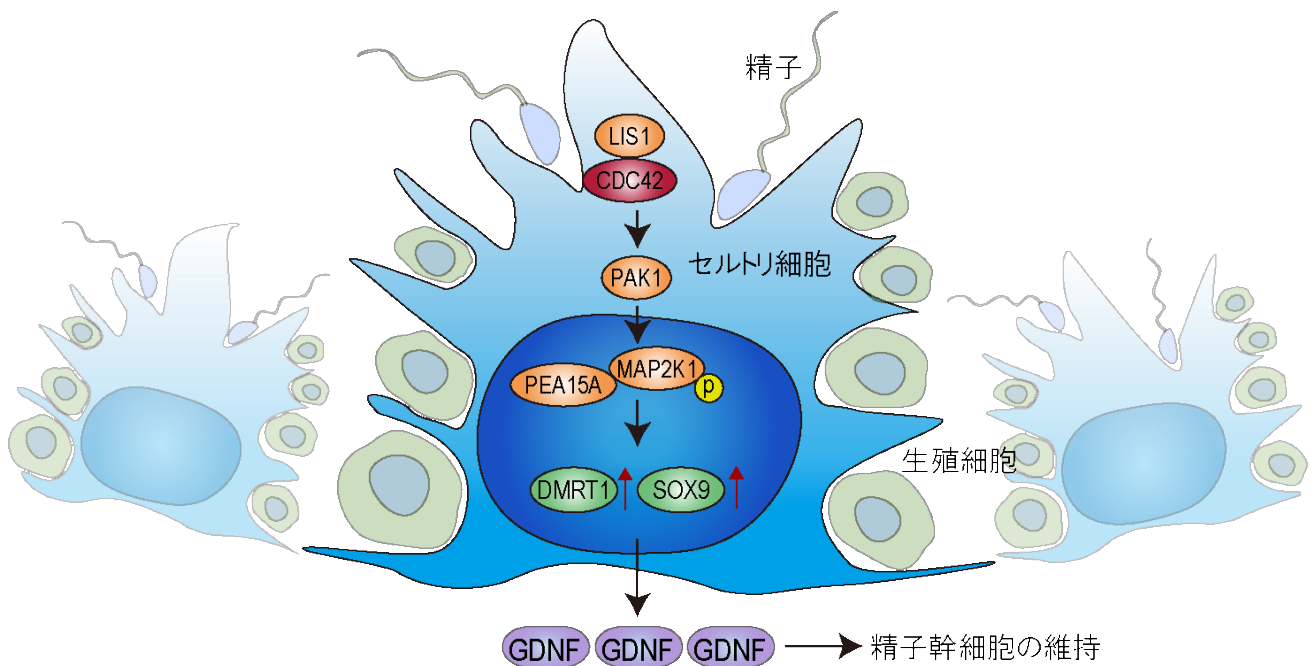
—男性不妊治療への応用に期待—

概要

京都大学大学院医学研究科の森圭史客員研究員と篠原隆司同教授らのグループは、精子形成の促進分子であるサイトカイン（注 1）のグリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）の発現制御メカニズムを明らかにしました。

GDNF は精子幹細胞の自己複製分裂を誘導する分子と知られています。この分子を欠損したマウスでは精子形成が消失し、無精子症になります。GDNF の欠損はヒトにおいても重篤な不妊症の原因として考えられています。GDNF の男性不妊症における重要性は 20 年以上前から報告されていましたが、その発現制御メカニズムについては明らかになっていませんでした。今回の研究で我々は CDC42-PAK1-ERK1,2/PEA15A というシグナル伝達経路が活性化されることで GDNF の発現が誘導されることを明らかにしました。本研究により、上記シグナル伝達経路の活性化が男性不妊症の新たな治療につながる可能性が生まれました。

本研究成果は、2021 年 8 月 18 日午前 0 時（日本時間）に国際学術誌「Cell Reports」誌にオンライン掲載されました。



GDNF はセルトリ細胞より大量に産生され精子幹細胞の維持に必須な分子です。今回の実験でその上流分子として CDC42-PAK1-ERK1,2/PEA15A 経路が同定されました。このシグナル伝達経路を刺激すれば精子形成が減弱している不妊症患者の精巣でも精子形成が促進できる可能性があります。

1. 背景

現在 6 組に 1 組の夫婦が不妊であり、その原因の半分は男性側にあることが知られています。男性の場合、女性とは異なり生殖細胞が分裂を継続し続けます。その源になっているのが精子幹細胞です。精子幹細胞が自己複製分裂という特殊な細胞分裂を行うことで一生に渡り精子形成が行われます。近年の顕微受精技術の開発により少量の精子からでも受精を行うことが可能となり、多くの男性不妊症の治療が可能となりました。しかし、不妊症の 10% 程度とされる「セルトリ細胞遺残症候群 (Sertoli cell only syndrome)」については、ほとんど精子形成細胞が見当たらず依然として治療困難な状態です。

2000 年にマウスの精子幹細胞が自己複製分裂するためには GDNF と呼ばれる液性サイトカインが必須であるということが報告されました。その後の研究で GDNF は精巣内のセルトリ細胞で主に作られることは明らかになりましたが、その産生メカニズムについてはあまり明確になっていませんでした。GDNF の精子形成における重要性はヒトにおいても確認されており、ヒトのセルトリ細胞遺残症候群において GDNF の生産量が低いことがわかっています。私たちはこれまで精子幹細胞の自己複製分裂が行われる環境に興味を持っており、その特殊環境の構築に関係する分子として CDC42 に着目しました。

2. 研究手法・成果

RHO ファミリー低分子量 G タンパク質の 1 つである CDC42 は管腔臓器での細胞構築の形成に重要であることが知られています。精巣でもセルトリ細胞同士が結合しあうことにより管腔構造を作っているため、私たちはセルトリ細胞における CDC42 欠損の役割を調べるために CDC42 欠損マウスを作成しました。ところが私たちの予想に反し、このマウスの精巣の構造には大きな変化が見当たらず、セルトリ細胞による管腔構造は正常に保たれたままでした。ところがマウスが成長するとともに精子形成が減弱し、生殖細胞の数が著しく減少することがわかりました。GDNF は精子幹細胞の自己複製分裂に必須な分子であることから、GDNF の発現を調べると GDNF は CDC42 欠損マウスの精巣ではほとんど生産されていないことがわかりました。

GDNF の生産に直接関わる候補分子は殆ど未知の状態でした。これまでにいくつか GDNF の制御に関わるとされる候補遺伝子が報告されていましたが、実際に遺伝子欠損マウスの解析やタンパク質レベルでの解析では GDNF への関与が確認できていませんでした。GDNF は卵巣では発現されていないため、私たちは性決定に関わるとされる遺伝子欠損マウスの表現型から GDNF の発現制御に関わりうるいくつかの転写因子に注目しました (注 2)。Western Blotting 法 (注 3) と免疫染色法を用いて CDC42 欠損マウスのセルトリ細胞におけるこれらの候補遺伝子の発現を確認したところ、核に移行すべきシグナル伝達タンパク質の ERK1,2 が細胞質にとどまっており、その下流分子とみられる DMRT1 と SOX9 という転写因子の発現量が低下していることがわかりました。CDC42 は ERK1,2 を刺激することが予想されたため、セルトリ細胞にてレンチウイルス (注 4) を用いて CDC42 の活性化を引き起こす分子と ERK1,2 をつなぐ分子のスクリーニングを行ったところ、PAFAH1B という分子が CDC42 を活性化し、PAK1 や PEA15A という分子を介して ERK1,2 が活性化され DMRT1/SOX9 (注 5) という転写因子へとつながり GDNF が生産されることがわかりました。

以上の結果により、私たちはセルトリ細胞内における精子形成促進分子 GDNF の産生経路を明らかにすることに成功しました。これによりセルトリ細胞遺残症候群などの男性不妊症に対する理解も深まると共に、このシグナル伝達経路を刺激することで男性不妊症の新たな治療法の可能性が生じると予想されます。

3. 波及効果、今後の予定

PAFAH1B1-CDC42→PAK1→ERK1,2/PEA15A→DMRT1/SOX9 経路を活性化すれば、セルトリ細胞での GDNF 生産量を高める可能性があるため、本研究結果は男性不妊症の原因遺伝子の同定や新規治療法の開発につながる可能性があります。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本医療研究開発機構（研究課題番号：17933225、jp19gm111008）と、文部科学省（研究課題番号：19k22512、19h05750、19h04906、18h04882、18h05281、18h02935）の支援を受けて実施されました。

<用語解説>

- （注1） 液性因子の1つで、ホルモンなどのように細胞から放出されて別の細胞に作用する化合物のこと。
- （注2） PAK1 は CDC42 と ERK1,2 の橋渡しをするタンパク質であることが知られています。PEA15A は ERK1,2 と結合すること、細胞死に関与することが示唆されているが、未知の点が多いタンパク質です。
- （注3） Western Blotting 法とは、蛋白質をゲルで絵移動することで定量的に比較する方法です。
- （注4） レンチウイルスとは、レトロウイルスの一種で AIDS ウイルスに由来する遺伝子を運搬できる運び屋（ベクター）です。
- （注5） DMRT1、SOX9 は転写因子タンパク質であり、性決定にも関与する分子です。ERK1,2 は細胞分裂を引き起こすシグナル伝達タンパク質です。

<研究者のコメント>

PEA15A や PAFAH1B1 という、新規 GDNF 制御分子を見つけることにはとても苦労し、70以上の遺伝子のノックダウンウイルスを作ってはマウス精巣に顕微注入し、数パターンの時間経過ののちに解析するという作業をひたすら続けました。結果として、一番思い入れのある2光子顕微鏡での FRET 法を用いて PAFAH1B1 が機能的に CDC42 の上流に位置するとわかったときが一番うれしかったです（森）。

<論文タイトルと著者>

タイトル：Cdc42 is required for male germline niche development in mice

（Cdc42 はマウスで男性生殖系列細胞のニッチ形成に必要である）

著者：Yoshifumi Mori, Seiji Takashima, Mito Kanatsu-Shinohara, Zheng Yi, and Takashi Shinohara.

- ・森圭史：京都大学大学院医学研究科 高次脳科学講座 脳統合イメージング分野
- ・篠原美都、篠原隆司：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
- ・高島誠司：信州大学学術研究院 繊維学系
- ・Zheng Yi：Experimental Hematology and Cancer Biology, University of Cincinnati

掲載誌：Cell Reports DOI：https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109550