

65. 遺伝性疾患の父年齢効果を生み出す精子幹細胞の競合

吉田 松生

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 生殖細胞研究部門

Key words : 精子幹細胞, 父年齢効果, Apert 症候群, 数理モデル, 競合

緒言

ヒトの遺伝性疾患の中には、ほぼ 100 % が父由来の孤発例で、父親の加齢に伴い子の発症率が指数関数的に上昇する、「父年齢効果」を示す一群の常染色体優性の疾患群がある。その一例が、*FGFR2* (線維芽細胞増殖因子受容体タイプ 2) 遺伝子の点突然変異により軟骨形成不全を来す Apert 症候群である (図 1)。父年齢効果の原因には諸説あるが、①精子幹細胞で変異が起こり、②変異を生じた精子形成幹細胞が、変異を持たない幹細胞に比して優位に増え、③年齢とともに変異を持つ精子の割合が増加するという説が有力である¹⁾。

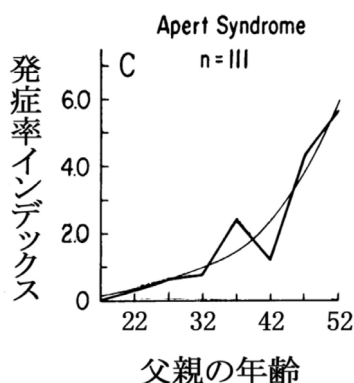


図 1. Apert 症候群の示す父年齢効果

父親の年齢の増加に伴い、子における発症率が指数関数的に増加することがわかる²⁾。

Apert 症候群の他にも、*FGFR2* の異なる部位の点突然変異を原因とする Crouzon 症候群や Pfeiffer 症候群、*FGFR3* の変異に起因する achondroplasia、*Ret* (GDNF 受容体) 遺伝子の変異による RET 症候群などが父年齢効果を示すが、いずれも、上記のメカニズムによるという仮説が提唱されている。しかし、実際に精巣内で起こっていると想定される、精子幹細胞間の競合の細胞学的・分子生物学の実態や、この突然変異が競合に与える影響など、これらの疾患が父年齢効果を示すメカニズムは謎に包まれている。

我々は、マウスを用いて継続する精子形成を支える幹細胞の実態とその動態の解明に取り組んできた。その結果、GDNF の受容体を形成するコンポーネントの一つ、*GFR a1* を発現する細胞が幹細胞として機能することを明らかにした。さらに独自に開発した生体内ライブイメージングやパルス標識法による *GFR a1* 陽性細胞の挙動の詳細な観測結果を、数理モデリングを用いて解析した。その結果、正常 (野生型) のマウス精巣において、幹細胞がお互いに競合関係にあり、細胞集団のレベルで自己複製と分化のバランスを保って長期にわたる精子形成を維持していることが明らかとなった³⁻⁸⁾。これらの結果は、「正常の状態において、精子形成幹細胞集団はすでにダイナミックな競合状態にある」ことを明確に示す。さらに、「通常の状態では優劣のない中立 (neutral) な競合関係にある幹細胞の一部に、競合にわ

ずかでも優位な変異が生じると、この幹細胞が優位にテリトリーを増やす」というシナリオが容易に想定できる。これは、まさに父年齢効果から想定される仮説と一致し、この分子細胞学的メカニズムに最も近いところに、我々は位置していると考えている。

本研究では我々の研究を発展させ、以下の目的を掲げた。すなわち、1) 精子幹細胞が、何を、どのように競合しあっているのか？という分子メカニズムを解明すること、および、2) Apert 症候群など父年齢効果を示す疾患の変異が、この競合に対してどのような効果を与えるのかを解明すること、である。

方 法

本研究では、上記2つの目的に対して以下のような研究方法でアプローチした。

1. 精子幹細胞が、何を、どのように競合しあっているのか？という分子メカニズムを解明する

この目的に対しては、まず第一に、精子幹細胞が競合し合っている対象の実態を、遺伝学的な解析により解析した。我々の精子幹細胞の動態解析より、競合の対象となる分子（あるいはそれに密接に関連する分子）の発現量が変化すると、幹細胞（GFR α 1 陽性細胞）の数が変化すること、その変化した幹細胞数で定常状態が生まれることが予測される。そこで、そのような表現型を示す変異体を検索した。

2. Apert 症候群など父年齢効果を示す疾患の変異が、この競合に対してどのような効果を与えるのかを解明する

この目的のために、Apert 症候群の原因となる変異に相当する変異を人為的に、任意のタイミングで誘導できる遺伝子改変マウスを作製することを目指し、そのための遺伝子座をデザインし、第一段階として培養細胞を用いて開発を進めた。

結果および考察

本研究の結果、以下の結果を得た。

1. 精子幹細胞が、何を、どのように競合しあっているのか？という分子メカニズムを解明する

FGFR2 を活性化するリガンド分子の一つ（X とする）の変異体を解析したところ、X の遺伝子量と GFR α 1 陽性細胞数が正の相関を示した。しかも、これらの変異体マウスでは、長期間（一年弱）を通して GFR α 1 陽性細胞の数（正確には野生型に対する比）が不変であった（図2）。この結果は、X が GFR α 1 陽性細胞同士が競合する対象そのものである、あるいはそれと密接に関わる分子である、ということを示唆する。

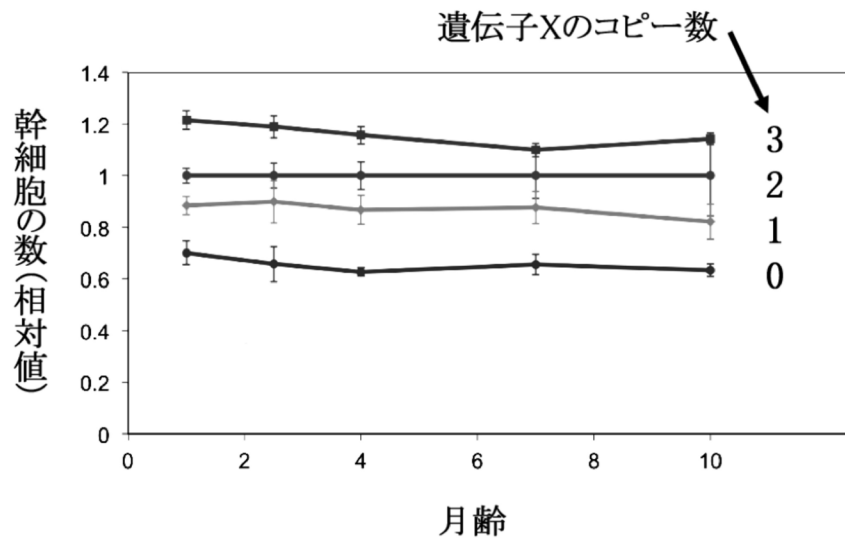


図2. 遺伝子 X 変異体における精子幹細胞数（野生型に対する相対値）の長期間における変化

図に示したコピー数の遺伝子 X を持つ変異マウスにおける精子幹細胞数を、同齢の野生型との相対値で示す。横軸は月齢。エラーバーは標準誤差を示す。(0 コピー：欠失変異ホモ接合体、1 コピー：同ヘテロ接合体、2 コピー：野生型、3 コピー：野生型の 2 コピーに加えて、X 遺伝子座を含む人工染色体を 1 コピーもつトランスジェニックマウス) 幹細胞数が遺伝子 X のコピー数に相関することが観察された。一方、長期間にわたってホメオスタシスが維持され、幹細胞が枯渇したり異常に蓄積したりすることは観察されなかった。

GFR $\alpha 1$ 陽性細胞が X を競合し合う、という考え方を反映した単純な数理モデルを構築し、*in silico*での挙動を解析した。その結果、上記その他の X 変異体の表現型が、このモデルによって説明することができた（一例を図3に示す）。このことは、「X を対象とした競合が幹細胞のダイナミクスを規定している」という仮説を支持するものである。

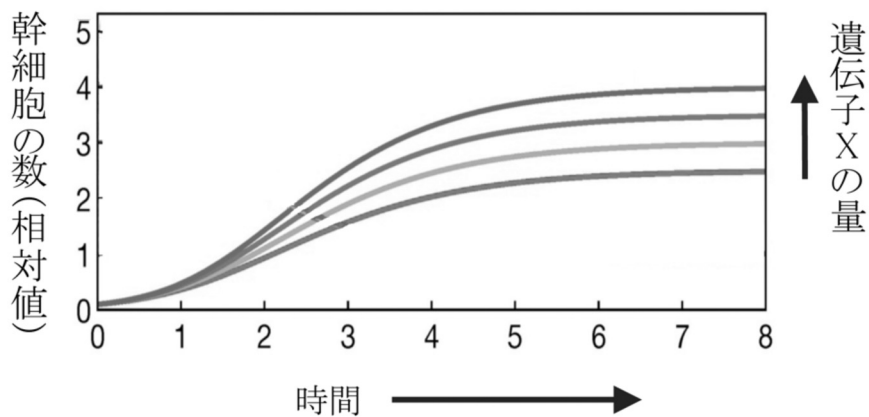


図3. 遺伝子 X の量に変化した変異体における精子幹細胞数のシミュレーション

我々の数理モデルにおいて、一定の幹細胞数の定常状態に収束すること、その時の幹細胞数は、遺伝子 X の量に相関することが予測された。これは、図2に示す実験結果を良く再現した。時間はコンピュータ上の任意の値。本図で用いた初期条件以外の任意の初期条件からでも、同様の定常状態に収束した。

この数理モデルはまた、「X をめぐる競合に優位な変異を起こした幹細胞が存在すると、時間経過とともに優位にテリトリーを拡大する確率が上昇する」ことを予言した。

2. Apert 症候群など父年齢効果を示す疾患の変異が、この競合に対してどのような効果を与えるのかを解明する

CRISPR/Cas9 システムを用いてマウス *Fgf2* 遺伝子に Apert 型の変異を任意に導入できるように改変する手法の開発を進めた。種々の検討を行ったのちに、線維芽細胞株を用いて予備的な遺伝子座改変を試みた。これは、マウス作製の予備実験の意味を持つとともに、変異線維芽細胞株を用いて FGFR2 受容体の機能を詳細に解析することを目的としている。デザイン通りの改変遺伝子座が作出されたことがゲノム PCR によって示されたものの、その作出頻度は大変低いことが明らかとなった。そこで、当初の計画の通り CRISPR/Cas9 法を用いたマウス作出と並行して、ES 細胞を用いたマウスの作出をともに試みることに計画を変更し、現在進行している。

以上本研究では、精子幹細胞が競合している対象の分子の実体の有力候補を同定し、その競合によって幹細胞集団が維持されるダイナミクスを数理モデルによって理解することに成功した。Apert 型変異導入実験系の開発が、効率が予想以上に低いことで計画通りには進んでいないが、着実に進行した。本研究の結果を基盤として、生理的状态における精子幹細胞の制御機構、特にその競合メカニズムの解明が進展するとともに、今まで謎に包まれていた父年齢効果のメカニズムが解明されることが期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は、基礎生物学研究所生殖細胞研究部門の平誠司、北館祐、筑波大学生命科学動物資源センターの高橋智、杉山文博、水野聖哉、滋賀大学動物生命科学研究センターの依馬 正次、英国ケンブリッジ大学 Gurdon 研究所の Benjamin Simons と David Jörg である。

文 献

- 1) Goriely A, McVean GA, Rojmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AO. Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. *Science*. 2003;301(5633):643-6. doi: 10.1126/science.1085710 PubMed PMID: 12893942.
- 2) Risch N, Reich EW, Wishnick MM, McCarthy JG. Spontaneous mutation and parental age in humans. *Am J Hum Genet*. 1987 Aug;41(2):218-48. PMID: 3618593.
- 3) Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell*. 2007;12(2):195-206. doi: 10.1016/j.devcel.2007.01.002 PubMed PMID: 17276338.
- 4) Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science*. 2007;317(5845):1722-6. doi: 10.1126/science.1144885 PubMed PMID: 17823316.
- 5) Klein AM, Nakagawa T, Ichikawa R, Yoshida S, Simons BD. Mouse germ line stem cells undergo rapid and stochastic turnover. *Cell Stem Cell*. 2010;7(2):214-24. doi: 10.1016/j.stem.2010.05.017 PubMed PMID: 20682447.
- 6) Hara K, Nakagawa T, Enomoto H, et al. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell*. 2014;14(5):658-72. doi: 10.1016/j.stem.2014.01.019 PubMed PMID: 24792118.
- 7) Yoshida S. From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis. *Wiley interdisciplinary reviews Developmental biology*. 2016;5(1):119-31. doi: 10.1002/wdev.204. PubMed PMID: 26305780.
- 8) Ikami K, Tokue M, Sugimoto R, Noda C, Kobayashi S, Hara K, et al. Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. *Development (Cambridge, England)*. 2015;142(9):1582-92. doi: 10.1242/dev.118695. PubMed PMID: 25858458; PubMed Central PMCID: PMC4419276.