

**Localization and function of tumor suppressor Wwox in
postnatal testicular development and spermatogenesis**

(生後精巣発達と精子形成における腫瘍抑制因子 Wwox の局在と機能)

Summary of Doctoral Thesis

Md. Abdullah-Al-Mahmud

Graduate School of Veterinary Medicine and Life Science

Nippon Veterinary and Life Science University

要約

WW domain-containing oxidoreductase (*Wwox*) は推定上の腫瘍抑制遺伝子であり、ホルモンで制御を受ける組織で高度に発現し、生殖腺の正常発達において重要であると考えられている。近交系ラットの Lethal Dwarfism with Epilepsy (LDE) は、*Wwox* 遺伝子における自然発症の突然変異、すなわち第 9 エクソンにおける 13 塩基の欠失を有している。*lde/lde* ラットは、生後早期のてんかん発作、体成長遅延、オリゴデンドロサイトの減少を伴う髄鞘低形成を示し、ほとんどが生後早期に死亡する。*lde/lde* の雄ラットは、生後の精巣の発達期に、FSH、LH およびテストステロンの血漿レベルの低下、生殖細胞のアポトーシスの増加、生殖細胞とセルトリ細胞 (SCs) の減少、精細管径の減少、ライディッヒ細胞 (LCs) の分化遅延を呈する。*Wwox* の機能喪失が *lde/lde* ラットにおけるこれらの異常の原因であると考えられるが、精巣における *Wwox* の正確な局在と機能についてはよく分かっていない。従って、正常ラットにおける *Wwox* の局在と *lde/lde* ラットにおける異常のメカニズムを明らかにすることは、精巣の発生や精子形成における *Wwox* の生理機能を理解するための手がかりを提供する可能性がある。本論文では、生後 (PND) 0 から 70 日齢における精巣の発達と精子形成における正常精巣での *Wwox* の細胞分布と細胞内局在を明らかにした。さらに、*in vivo* と *in vitro* の実験によって、*lde/lde* の初回精子形成 (FRS) 期における生殖細胞のアポトーシスのメカニズムの一端を明らかにした。加えて、*lde/lde* の精巣における SCs と LCs の発達異常を明らかにし、*Wwox* 欠損状態におけるステロイド産生障害の原因を明らかにした。本研究で得られた結果に基づいて、正常な精巣の発達と精子形成における *Wwox* の可能性のある役割について考察した。

第 1 章では、突然変異ラットを用いた遺伝子の機能解析の重要性を記述し、*Wwox* に関する一般的な情報を要約し、*lde/lde* ラットの表現型を特徴付け、本研究の目的を概説した。突然変異ラットは、遺伝性疾患の研究や、特定の生物学的事象において遺伝子の機能を研究する際に有用である。がんの進行と脳や生殖器の発達における *Wwox* の機能を研究するために、いくつかの *Wwox* ノックアウトマウスが作出されている。ここでは *lde/lde* ラットを用いて、精巣の発達と精子形成における *Wwox* の機能を明らかにすることの意義を考察した。最後に、精巣における *Wwox* の可能性のある役割を明らかにするという本研究の

目的を解説した。

第2章では、正常 (+/+) の精巣の生後発達期と精子形成過程における *Wwox* の分布と細胞内局在を示した。約 46kDa の *Wwox* タンパク質が精巣で発現しており、日齢に従って徐々に発現が増加した。*Wwox* の発現は免疫染色により、胎子型 LCs (F-LCs)、成熟型 LCs (A-LCs)、未熟 SCs (I-SCs)、成熟 SCs (M-SCs)、およびステップ 18-19 の精子細胞 (STs) と精子を除く全ての生殖細胞で検出された。さらに、*Wwox* は生殖細胞と体細胞において、濃縮した強いシグナル (FISWs) とともに細胞質に拡散して分布していた。FISWs は、細糸期精母細胞 (L-SPs) から複糸期精母細胞 (D-SPs) までの間に徐々に濃縮し、形状が変化し、サイズが増した。すなわち、接合期精母細胞 (Z-SPs) では三日月型に形状が変化し、太糸期精母細胞 (P-SCs) と D-SPs では濃縮した球状を呈し、円形精子細胞 (R-STs) では馬蹄形を呈していた。細胞質の拡散した発現は精子形成の間に SPs と比べて STs で減少した。*Wwox* の同様な発現パターンは単一細胞懸濁 (SCS) 試料でも確認された。精巣細胞の細胞質中の FISWs は cis-Golgi マーカーの *giantin* と共局在し、*Wwox* タンパク質は細胞質分画および Golgi 装置 (GA) 濃縮分画で検出された。これらの発見は、*Wwox* がほとんどの精巣細胞において、GA 関連タンパク質と相互作用することによって GA に局在することを介して機能し、精巣の発生と精子形成において重要な役割を果たす可能性があることを示している。

第3章では、*lde/lde* の精巣において FRS 期に生殖細胞がアポトーシスを生じるメカニズムを明らかにするために、生殖細胞の病理学的変化と GA 関連タンパク質の発現を調査した。さらに +/+ の精巣と *lde/lde* の胎子線維芽細胞 (REFs) にストレスを誘導した際に同様な変化が起こるか否かを調査した。PND13 における精母細胞特異的な *Hspa2* の発現の低下を伴う精細管当たりの L-SPs の有意な減少は、*lde/lde* の精巣で精子形成の開始が遅延していることを示した。加えて、*lde/lde* の精巣では、核濃縮と腔胞形成、SPs の細胞質の消失、TUNEL 陽性 P-SPs の増加、P-SPs と D-SPs の減少、減数分裂後の STs の欠損が FRS において認められた。さらに、減数分裂後期精母細胞に特異的な *Hlt* と *Ccnal* の発現が有意に減少し、精子細胞特異的な *Hspall* の発現が検出されなかったことから、*lde/lde* ラットの FRS が減数分裂後期の SPs から STs への分化段階で中断していることが示唆された。これに加えて、*lde/lde* の精巣では GA 関

連タンパク質である *golgin-160* の免疫染色性が全体的に低下し、GA の外側に位置する異常に明るい濃縮したシグナル (ABCSs) を形成していた。株化培養細胞では、*golgin-160* は GA に局在するが、アポトーシスの早期にカスパーゼにより断片化する。*golgin-160* の点突然変異により、アポトーシスが増加し、減数分裂後期の生殖細胞の有意な減少が起こることが知られているが、生殖細胞のアポトーシスにおける *golgin-160* の役割は不明である。さらに、*lde/lde* の精巣においては、P-SPs における *golging-160* の局在の変化がその細胞における *Wwox* の欠損によって起こるのか、あるいはゴナドトロピンとテストステロンの低下によって起こるのかが明らかでない。GnRH 拮抗薬 (Cetrorelix) 処置の+/+ラットはテストステロンの有意な低下を示し、*golgin-160* と *Wwox* の変化を伴う生殖細胞のアポトーシスの増加を示した。これに加えて、*lde/lde* と Cetrorelix 処置の精巣におけるウェスタンブロット分析での *golgin-160* の異常なシグナルの出現と *caspase-3* 陽性生殖細胞の増加は、*golgin-160* がアポトーシス経路により断片化されたことを示した。一方、+/+ラットにおける片側性潜在精巣においても、生殖細胞のアポトーシスが増加し、*golgin-160* の発現の異常が認められた。これら一連の実験結果から、*golgin-160* の発現の変化は生殖細胞のアポトーシスにおいて共通に起こる事象であり、*lde/lde* では *Wwox* の欠損とゴナドトロピンおよびテストステロンの低下の両方が *golgin-160* の変化を引き起こし、P-SP 特異的なアポトーシスを増加させている可能性が考えられた。この結果をさらに一般化するために、+/+と *lde/lde* ラットから胎子線維芽細胞 (REFs) が調製され、*in vitro* の実験によって特性解析された。24 時間の血清飢餓によって、*lde/lde* の REFs ではアポトーシスが誘導され、*lde/lde* の P-SPs で見られたものと同様な *golgin-160* の異常な局在を示す細胞が増加し、*Wwox* の欠損する状態で *golgin-160* がストレスに対してより感受性を示すことが示された。まとめると、これらの結果は、*lde/lde* における *Wwox* の欠損は、ストレス (内分泌環境の変化など) による *golgin-160* の変化を起こしやすくさせ、アポトーシスを増加させている可能性がある。

第4章では、*Wwox* の欠損状態における SCs と LCs の分化と成熟過程を調査した。PNDs 23 および 30 における SCs と精細管径の減少、PND23 における増殖中の SCs の存在、PNDs 23 および 30 における *nestin* 陽性の SCs とそれを含む精細管の増加は、*lde/lde* の精巣の SCs が未熟であることを示した。未熟な SCs

の産物である抗ミュラー管ホルモン（AMH）が高いレベルで存在することによって、LCs 系図細胞の増殖が抑制され、テストステロン産生が阻害されることが知られている。*lde/lde* の精巣ではこの状態が持続している可能性がある。LCs の総数、ライディッヒ幹細胞（S-LCs）、前駆ライディッヒ細胞（P-LCs）、未熟ライディッヒ細胞（I-LCs）、クラスター当たりの平均 LCs、精細管当たりの平均クラスター数、精細管当たりのクラスターにおける平均 LCs 数はいずれも *lde/lde* の精巣で減少していた。アンドロゲン受容体、nestin、および 3 β -HSD の発現低下も LCs の発達が異常であることを示唆した。さらに、PND13 および 23 において黄体形成ホルモン/絨毛性ゴナドトロピン受容体（*Lhcg*）の mRNA 発現が減少していたとは、*lde/lde* の精巣において LH 刺激の低下が、LH 受容体を発現する P-LCs 段階後の LCs の発達遅延と関連している可能性を示した。一方、卵胞刺激ホルモン受容体が持続的に正常な mRNA レベルを示したことは、PNDs 13 から 23 のセルトリ細胞の成熟遅延が、ゴナドトロピン非依存性に、その細胞における *Wwox* の欠損により直接引き起こされている可能性があることを示した。

Wwox は生後の精巣の発生と精子形成の過程において、ほぼ全ての細胞の細胞質と GA に局在する。生殖細胞の発達においては、*Wwox* の欠損は FRS 期の P-SPs において caspase-3 発現の増加を伴う golgin-160 仲介性のアポトーシスを引き起こす。この過程は *lde/lde* における低ゴナドトロピン低テストステロン状態によって促進されている可能性がある。その理由としては、この過程は+/+の P-SPs においてホルモンの欠乏や高温なようなストレス条件下で *Wwox* の変化を伴って誘導され、*lde/lde* の REFs では血清飢餓によって誘導されたからである。精巣の体細胞に関しては、*Wwox* の欠損は、生後発育段階のゴナドトロピンのシグナル経路と精巣内クロストークに関連した複雑なメカニズムを介して、SCs の成熟遅延と LCs の重篤な発達障害を引き起こすが、最初期の病理発生はゴナドトロピン非依存性にセルトリ細胞の未熟性によって開始していると考えられた。これらの異常が総じて生後初期の *lde/lde* の精巣の表現型を形成している。

まとめると、*Wwox* は生後の精巣の発生段階において、SCs の成熟、LCs の増殖、ステロイド産生、および精子形成において生理学的に重要である。