

学位論文（博士）

Prominin-1 deletion results in spermatogenic impairment,
sperm morphological defects, and infertility in mice

(*Prominin-1* の欠失は精子形成障害、
マウスの精子形態異常と不妊症を引き起こす)

氏名 松隈 悠

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 泌尿器科学講座

令和 5 年 12 月

目 次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 目的	4
4. 方法	4～7
(1) 対象	4
(2) 方法	4～7
(3) 解析	8
5. 結果	8～16
6. 考察	16～18
7. 結語	18
8. 謝辞	18
9. 参考文献	18～21

1. 要旨

精子形成は、いくつかの必須遺伝子によって編成される複雑な過程である。Prominin-1 (Prom1/PROM1) は精巣で発現している遺伝子であるが、精子形成における役割はよくわかっていない。我々はProm1ノックアウト (Prom1 KO) マウスを用いて、精子形成におけるProm1の役割を解明することを目的とした。免疫組織化学、免疫蛍光、ウェスタンブロッティング、 β -ガラクトシダーゼ染色、アポトーシスアッセイを用いて検討を行った。さらに、精子の形態を解析し、妊孕性試験において子の数を評価した。PROM1は、有糸分裂期の精母細胞、精子、精巣上体の円柱上皮に局在していることが観察された。Prom1 KOマウスの精巣では、アポトーシス細胞の異常増加と、精上皮細胞の減少が観察された。Prom1 KOマウスの精巣では、細胞性FLICE様抑制タンパク質 (c-FLIP) および細胞外シグナル調節キナーゼ1/2 (ERK1/2) の発現も有意に低下した。さらに、Prom1 KOマウスでは、異常な形態と運動性の低い精巣上体精子の数が有意に増加していた。PROM1は精巣においてc-FLIPの発現を介して精子形成細胞の増殖と生存を維持しており、また、精子の運動性と受精能にも関与していることが分かった。Prom1が精子の形態と運動性に及ぼす影響の根底にあるメカニズムは、まだ明らかにされていない。

2. 研究の背景

男性の生殖能力は、生殖細胞の継続的な産生によって維持されている。生殖細胞は、ハプロイド細胞に分裂し、世代を超えて遺伝情報を伝える唯一の細胞タイプである。男性の生殖細胞は、一連の有糸分裂、2段階の減数分裂、そして減数分裂後の分化を含む複雑なプロセスである精子形成を介して精子に分化する¹。

Prominin-1 (Prom1 ; RP31, CD133, AX133, STGD4としても知られる ; NCBI遺伝子ID 8842) は、分子量約120kDaのペントスパン膜貫通糖タンパク質をコードする²。Prom1は当初、原始的な造血細胞や神経上皮細胞で同定され^{3, 4}、細胞の形態や移動の制御に関与している^{5, 6}。上皮細胞では、PROM1は微絨毛に集中し、細胞膜の突出に関与している⁴。他の報告では、PROM1は細胞移動に関する細胞膜の伸展を誘導することが示唆されている⁵。最近、脳⁸、骨⁹、皮膚¹⁰、肺¹¹、肝臓¹²、結腸¹³、膵臓¹⁴、腎臓¹⁵、膀胱¹⁶、前立腺¹⁷、卵巣¹⁸に出現するCSCのほとんどにProm1が発現していることが判明した。腫瘍では、PROM1は細胞性FLICE様抑制タンパク質 (c-FLIP) の発現を上昇させ¹⁹、細胞外シグナル調節キナーゼ1/2 (ERK1/2) 、 c-Jun N末端キナーゼ、WntおよびプロテインキナーゼB

(Akt) 経路を活性化し、細胞増殖と生存を増加させる²⁰⁻²³。さらに、c-FLIPはプロカスペアーゼ8の活性化を抑制し²⁴、その結果、細胞のアポトーシスが阻害される。

いくつかの研究で、PROM1は精巣にも局在していることが報告されている^{25, 26}。したがって、がん細胞におけるPROM1の機能は、細胞の増殖と分化の制御に関して、精子形成においても保存されている可能性がある。一貫して、非閉塞性無精子症 (NOA) 患者におけるProm1の発現レベルは、健常男性および閉塞性無精子症患者における発現レベルよりも低いことが示されており²⁷、これらの病理学的観察から、Prom1が精子形成と生殖能力において重要な役割を果たしていることが示唆される。しかしながら、精子形成におけるPROM1の役割を調べるメカニズム解析は行われていない。

3. 目的

本研究の目的は、Prom1ノックアウト (KO) マウスを用いて精巣におけるPROM1の細胞内局在を調べ、精子の形態学、精上皮細胞分裂の組織学、および関連シグナル分子の発現を解析して、精子形成におけるProm1の機能を解明することである。

4. 方法

(1) 対象

Prom1 KOマウスを実験に用いた。Prom1 KOマウス系統は以前に確立されているものを用いた^{28, 29} (CDB0623K:

<http://www2.clst.riken.jp/arg/methods.html>). 山口大学医学部動物実験倫理委員会 (J16021) および奈良先端科学技術大学院大学動物実験倫理委員会の承認を得ており、国際および国内のガイドラインに従って実施した。

Prom1遺伝子座にLacZ遺伝子を導入した変異C57BL/6マウスを飼育し、昼夜12時間サイクル、餌と水は自由摂取とした。産仔数は、Prom1 KO雄マウスと異種雌マウスを6ヶ月間交配させることにより評価し、産仔数の合計を記録した。

(2) 方法

1 | 遺伝子型決定

4週齢のマウスの尾を切断し、50mM NaOHに90°Cで10分間浸漬した。各サンプルに10マイクロリットルの1M Tris-HCL (pH7.6) を加え、24°Cで4時間インキュベートした。10,000 g, 10分間、4°Cで遠心し、DNAをペレット化した。ポリメ

ラーゼ連鎖反応 (PCR) は市販のキット (DTM-101, TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。使用したプライマーを supplementary Figure S1に示す。

2 | *Prom1*変異雌マウスの繁殖能

様々な遺伝子型の雌雄マウスの繁殖ペアを設定し、交配開始から仔マウス誕生までの日数を記録した。

3 | 交配と繁殖能の評価

雄マウスの繁殖能力を評価するため、遺伝子型が*Prom1*+/, +/-, -/-の雄マウスを雌*Prom1* (+/-) マウス2匹と8-30週同居させた。各ケージでの産仔数は1ヶ月ごとに記録した；受胎能試験終了時に、組織学的解析のために精巣を採取した (Figure 3A, B)。各ケージで見つかった同腹子をその後の解析に用いた。雌マウスの遺伝子型による繁殖力を調べるため、さまざまな遺伝子型を持つマウスを、すべて8週齢の異なる遺伝子型の雄マウスと交配させ (Figure 3), 出産に要した日数を調べた (Figure 3C)。

4 | β -ガラクトシダーゼ染色

精巣および精巣上体を4%パラホルムアルデヒド (PFA) で2時間固定し、15%スクロース中で一晩インキュベートした。サンプルをOptimal cutting temperature (O.C.T) コンパウンド (サクラファインテック, 東京, 日本) に包埋した。切片はTissuePolar cryostat (Sakura Finetek) を用いて作製した。切片サンプルを1Xリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) で洗浄し, X-Gal溶液 (ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) を添加した β -Gal溶液 (5 mM K₃[FeCN]₆, 5 mM K₂[FeCN]₆, 2 mM MgCl₂) で37°Cで染色した。染色後, サンプルをリンスし, 4% PFA/1X PBSで10分間固定し, マウントメディウム (松波硝子社, 大阪, 日本) とカバースリップでマウントした。画像はAxioplan 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて撮影した。

5 | 精子の数と運動性の測定

精巣上体の新鮮な切片を切り刻み, 豊田・横山・星培地 (LSI Medience Co., Tokyo, Japan) 内で24°Cで精子の遊走を行った。精子懸濁液をMAKLERチャンバー (SEFI medical instruments, Haifa, Israel) にセットした。精子を3回カウントし, 運動精子または不動精子に分類した。精子の形態は, 6,000 gで5分間遠心分離したペレットを塗抹標本にして分析し, 尾の形によって正

常, ヘアピン, ハーフヘアピン, 欠如の4種類に分類した. ヘアピンは尾部が180°以上曲がっている精子, ハーフヘアピンは尾部が90°~180°曲がっている精子とした. 欠如とは尾のない精子分類した. 各遺伝子型について3匹のマウスを分析し, それぞれ無作為に数枚の画像を撮影し, 精子を上記の基準で分類した.

6 | ウェスタンブロッティング

抽出した臓器をサンプリングバッファ (T-per Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) でホモジナイズし, 10,000 gで5分間遠心分離し, 上清を回収した. タンパク質 (10 μ g) をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し, ポリフッ化ビニリデン膜 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) に転写した. 以下の一次抗体を用いた: マウス抗 β -アクチン (RRID: AB_10697039, #M177-3, 1:1000希釈; MBL, 東京, 日本), ウサギ抗CD133 (RRID: AB_2172859, #18470-1-AP, 1:1000希釈; Proteintech, Rosemont, IL, USA), ウサギ抗ホスホ-ヒストンH3 (RRID: AB_310177, #06-570, 1:1000希釈; Millipore, Burlington, MA, USA), ウサギ抗FLIP (RRID: AB_10013746, #8510, 1:1000希釈; CST, Danvers, MA, USA), ウサギ抗ホスホ-p44/42 MAPK (pERK1/2) (RRID: AB_331775, #4377, 1:1000希釈; CST, Danvers, MA, USA), ウサギ抗ERK1 (RRID: AB_631453, #sc-93, 1:200希釈; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). その後, 膜を0.1% Tween 20を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS) で洗浄し, ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体とともにブロッキング液 (NYPBR01, 東洋紡績) 中で24°C, 1時間インキュベートした. 以下の二次抗体を用いた: ヤギ抗マウスIgG (RRID: AB_2755049, no. ab205719, 1:2500希釈; Abcam, Cambridge, UK) およびヤギ抗ウサギIgG (RRID: AB_955447, no. ab6721, 1:2500希釈; Abcam, Cambridge, UK). 強化化学発光 (ECL) キット (Cytiva, Vancouver, Canada) を用いて, メーカーのプロトコールに従って免疫反応性バンドを現像した. 免疫特異的バンドはImageJソフトウェア (ImageJ®, version 1.52a; National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて定量した. デンシトメトリー値は β -アクチンの値で正規化した.

7 | 組織学, アポトーシスアッセイ, 免疫組織化学, 免疫蛍光法

精巣サンプルを解剖し, ヘマトキシリン・エオジン染色, アポトーシスアッセイ, 免疫組織化学のためにBouin固定液で一晩固定し, 免疫蛍光のためにPFA固定液で24時間固定した. その後, サンプルを脱水し, パラフィンに包埋した. 組織はマイクロトームを用いて5 μ mで切り出し, スライドガラスにマウントし

た.

ヘマトキシリン染色は、切片を脱パラフィン後、再水和し、ヘマトキシリン（和光純薬工業）で24°C、1分間インキュベートした後、流水で1分間洗浄した。

アポトーシス細胞を検出するために、deoxynucleotidyl-transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assayを行った。TUNEL染色は、市販のキット（No. 293-71501, 和光純薬工業）を用い、メーカーのプロトコールに従って行った。脱パラフィンおよび再水和後、スライドガラス上の組織サンプルをプロテイナーゼ溶液で37°C、5分間反応させた。サンプルをPBSで洗浄し、37°Cの湿潤チャンバー内で100 μ lのTdT反応液で10分間処理した。その後、サンプルをPBSで洗浄し、内在性ペルオキシダーゼ活性を3% H_2O_2 で24°C、5分間処理することにより阻害した。その後、スライドをPBSで洗浄し、100 μ lのPOD標識抗体溶液を37°Cの湿潤チャンバー内で10分間反応させた。その後、サンプルをPBSで再度洗浄し、スライドをジアミノベンジジンテトラヒドロクロリド（DAB）（#415171; ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan）と24°Cで10分間インキュベートし、流水で洗浄した。最後にスライドをヘマトキシリンで1分間対比染色し、脱水後、顕微鏡（Keyence BZ-X800 ; Osaka, Japan）で観察した。100個の精細管中のTUNEL陽性細胞を数え、精細管あたりのTUNEL陽性細胞の比率を遺伝子型の異なるグループ間で比較した。

免疫組織化学については、脱パラフィンおよび再水和後、3% (v/v) 過酸化水素を含むメタノールで10分間インキュベートすることにより内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。抗原回収のため、スライドをクエン酸緩衝液 (pH 6.0)（LSIメディエンス株式会社）で15分間マイクロウェーブし、24°Cで1時間冷却した。PBS中2%ウシ血清（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）以下の一次抗体を用いた：ウサギ抗 PROM1 (RRID: AB_1846238, HPA004922; Sigma-Aldrich) 1:400 希釈。TBSで洗浄後、ブロッキング液中でHRP標識二次抗体 (No. 414191, ニチレイバイオサイエンス) を37°Cで30分間インキュベートした。その後、DAB (No. 415171, ニチレイバイオサイエンス) を添加し、顕微鏡 (Keyence BZ-X800) で観察した。

蛍光免疫染色については、一次抗体であるウサギ抗-phospho-histone H3 (RRID: AB_310177, #06-570; Millipore) 1:400希釈でインキュベートするまでは、免疫組織化学と同じプロトコールで組織サンプルを処理した。次にスライドを、Alexa Fluor 488二次抗体 (RRID: AB_2630356, #ab150077; Abcam, Cambridge, UK) を1:1000希釈したブロッキング溶液中で37°C、30分間インキュベートした。スライドを4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で核染色し、蛍光染色用封入剤でマウントした。観察は顕微鏡 (Keyence BZ-X800) を

用いて行った.

(3) 解析

2つのサンプル群の比較には、対応のないt検定を用いた. さらに、3群以上の比較には一元配置分散分析を用いた. Dunnettの検定も複数群間の差を決定するために適用し、 $P < 0.05$ を統計的に有意とみなした.

5. 結果

1 | PROM1は精巣の精細管で発現し、生殖細胞の維持に必須である.

まず、PCRによる遺伝子型決定と実際のタンパク質発現との相関を検証した.

Prom1変異マウスでゲノムPCRを行い (Supplementary Figure S1A, B) , PCRのバンドサイズが異なるサンプルのウェスタンブロッティングによってPROM1タンパク質の発現を確認した (Supplementary Figure S1B) . ウェスタンブロッティングは、PROM1の発現が高いことが示されている腎臓と精巣から抽出した組織サンプルを用いて行った. その結果、600bpのPCR断片を得たサンプルではPROM1の発現が完全に消失していることが確認されたが、240bpのPCR断片を得たサンプルでは期待されるサイズの明確なバンドが観察された

(Supplementary Figure S1B-D) . したがって、ジェノタイピングPCRと実際の発現はよく対応していた. 次に、Prom1遺伝子の欠損が生殖器に及ぼす影響を解析するために、精巣と精巣上体の全体的な外観を解析した. 12週齢のオス *Prom1*^{-/-}マウスと野生型 (*Prom1*^{+/+}) マウスから精巣と精巣上体を取り出し、外観を観察した. その結果、Prom1 KOマウスの精巣サイズはWTマウスよりも小さかった (Figure 1A, B) . 同様に、精巣の重量は、*Prom1*^{-/-}マウス (78 ± 6.9 mg, $n = 5$) では、*Prom1*^{+/+}マウス (101 ± 1.6 mg, $n = 5$; $P < 0.05$) と比較して低かった (Figure 1C) . これらの結果から、精巣の成長は、少なくとも部分的にはPROM1の機能減弱によって障害されていることが示唆された.

次に、12週齢と33週齢の*Prom1*^{-/-}マウスの精巣の精細管の構造を調べた。12週齢の*Prom1*^{+/+}マウスと*Prom1*^{-/-}マウスの精巣の精細管には明らかな差は認めら

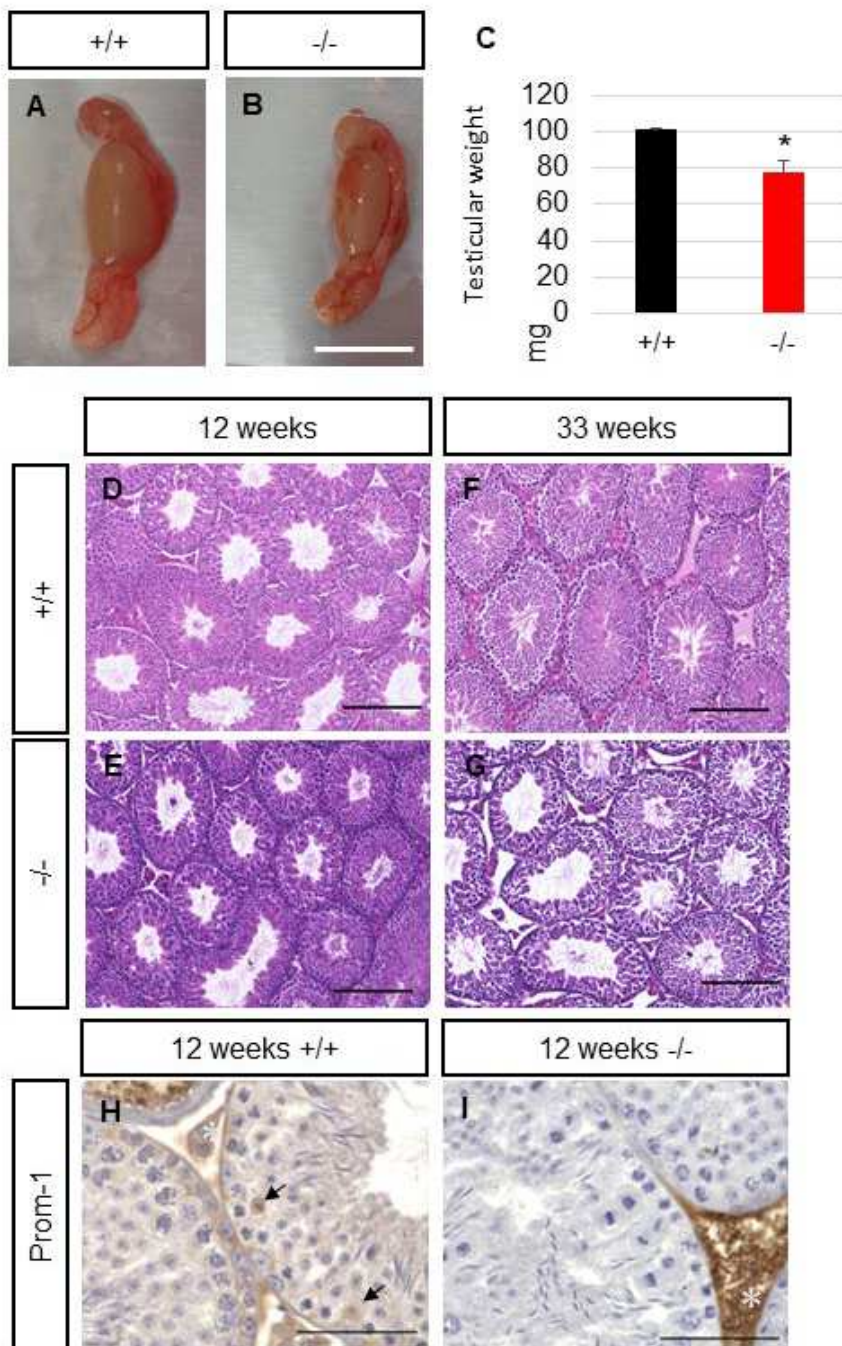


Figure 1 精巣の肉眼的外観と組織像。(A, B) 12 週齢の 歳の *Prom1*^{+/+} (A) と *Prom1*^{-/-} (B) マウス。スケールバー=5mm。(C) WT および *Prom1* KO マウスにおける精巣容積の定量化。エラーバーは標準誤差 (SEM)、Student's *t* 検定、*n* = 5、**p* < 0.05。(D-G) 精巣断面のヘマトキシリン・エオジン染色。ヘマトキシリン・エオジン染色。33 週齢 週齢マウス。スケールバー=200 μ m。(H, I) PROM1 の免疫組織染色。特異的および非特異的 特異的シグナルは矢印で、非特異的シグナルはアスタリスクで示す。スケールバー=50 μ m。

れなかったが (Figure 1D, E) , 33週齢の *Prom1*^{+/+}マウスと比較して, *Prom1*^{-/-}マウスでは精細管内の精上皮細胞の急激な減少が認められた (Figure 1F, G) . さらに, *Prom1*^{+/+}の精巣では12週目に一部の分裂精母細胞の細胞質に PROM1が局在していた (Figure. 1Hの茶色のシグナル) が, *Prom1*^{-/-}の標本では対応する部位にそのようなシグナルは検出されなかった (Figure 1I) . 次に, 精巣と精巣上体で *Prom1* を発現している細胞の同定を試み, *Prom1* 変異マウスの *Prom1* 遺伝子座にノックインされた *LacZ* 遺伝子を利用した. 雄マウスがまだ性的に成熟していない3週齢では, WTおよびヘテロ接合体変異体 (*Prom1*^{+/-}) の精巣ともに β -gal の染色が見られなかったことから, PROM1 タンパク質は発現していないか, あるいは発現していたとしても非常に低いレベルであることが示唆された (Figure 2A, B) . 一方, マウスが性的に成熟する年齢である8週齢のマウスの精巣では, *Prom1* ヘテロ接合体変異体の精細管内部で強い β -gal 染色が認められた (Figure 2C, D) . β -gal 染色陽性細胞は, ヘテロ接合体変異体の精巣上体管で観察された (Supplementary Figure S2A, B) . このように, *Prom1* はマウスでは3週齢ですでに精巣上体に発現している. また, 8週齢の精巣上体の柱状上皮細胞にも明らかなシグナルが見られた (Supplementary Figure S2C, D) .

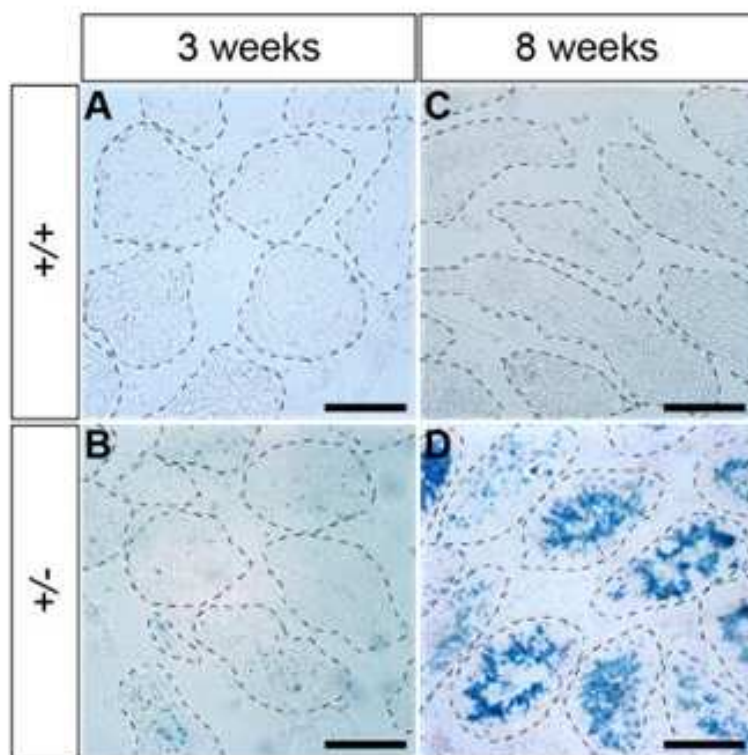


Figure 2 PROM1 は精巣の精細管で発現している。3 週齢 (A, C) および 8 週齢 (B, D) の *Prom1*^{+/+} (A, B) および *Prom1*^{+/-} (C, D) 雄マウスを β -gal 染色アッセイを行った。スケールバー = 50 μ m。

これらのことから, PROM1 は分化中の生殖細胞と精巣上体の上皮細胞で発現し, 精子の増殖と成熟に関与していることが示唆された.

2 | Prom1変異雄マウスは不妊であるが、雌マウスは不妊ではない

次に、繁殖能力に対するProm1欠損の影響を評価することとした。そのために、8週齢の雄マウスと同年齢の異種雌マウスからなる異なる遺伝子型の繁殖ペアを作製し、1カ月ごとに子孫の総数をカウントした。その結果、Prom1+/+の雄マウスは試験終了まで繁殖能力を維持していたが、ヘテロ接合体マウスは時間の経過とともに繁殖能力が低下しており、Prom1ヘテロ接合体は部分的に不妊の表現型を持ち、年齢とともにその程度が重くなることが示唆された (Figure 3A)。マウスが6ヶ月齢に達するまでに生まれた仔マウスの総数は、Prom1+/+雄では平均76.7±13.8匹であった。対照的に、ヘテロ接合体雄マウスの産仔数は17.7±3.2匹と有意に少なかった (P < 0.05) ことから、Prom1遺伝子は繁殖能に関して不完全優性形質を発現していることが示唆された。Prom1-/-雄マウスとの交配では、仔マウスは生まれなかった (P < 0.05) (Figure 3B)。次に、雌の遺伝子型が不妊表現型に影響を及ぼすかどうかを調べた。そこで、8週齢のWTおよびProm1変異体の雌の繁殖能力を評価した。WTマウスでは、交配開始から平均28日後に仔マウスが生まれた。Prom1+/-およびProm1-/-の雌マウスをProm1ヘテロ接合体の雄マウスと交配させると、仔マウスも28~30日以内に生まれた。しかし、Prom1-/-雄マウスとWT雌マウスの交配では仔マウスは生まれなかった (Figure 3C)。

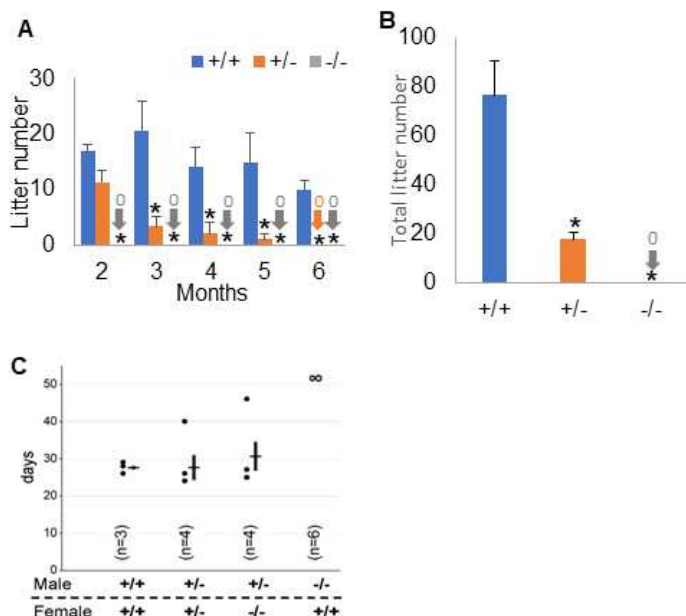


Figure 3 Prom1 雄マウスは不妊の表現型を示す。(A)Prom1-変異マウスの繁殖能と1ヶ月あたりの産仔数。(B) Prom1-/-マウスとProm1+/+マウスの繁殖ペアが6ヶ月間に産んだ産仔数の合計。WTと各遺伝子型間の統計的有意性を解析した。エラーバーはSEM, n = 3, Dunnett 検定, *p < 0.05。(C)様々な繁殖ペアの出産までの日数。

このことから、Prom1変異に起因する不妊の表現型は、雄の生殖機能の喪失にのみ起きることが示された。

3 | PROM1はアポトーシスの抑制に不可欠な役割を果たしている

Prom1 KOマウスの精細管における細胞密度の低下 (Figure 1) を受けて、Prom1変異マウスの精巣におけるアポトーシスの可能性を検討した。アポトーシスは12週齢未満ですでに起こっている可能性があるため、4週齢、8週齢、12週齢のWTマウスとProm1 KOマウスから精巣を取り出し、TUNEL染色を行った。その結果、Prom1^{-/-}マウスおよびProm1^{+/-}マウスの精細管におけるTUNEL陽性細胞数は、WTマウスよりも有意に多かった (Figure 4A)。さらに、TUNEL陽性の生殖細胞のほとんどは有糸分裂中の精母細胞であった (Figure 4B, C)。精母細胞の分裂が起こる12期の精細管でのみアポトーシス細胞数をカウントすると、8週齢と12週齢の両方で、Prom1^{-/-}マウスではWTマウスに比べてアポトーシス指数が有意に増加していることがわかった (Supplementary Figure 3A, B)。これらの結果は、PROM1が細胞分裂の際に機能し、その欠損が分裂細胞における細胞死を引き起こすことを示唆している。

4 | PROM1は精上皮細胞の増殖維持に必須である

アポトーシスを抑制するPROM1の機能をさらに調べるため、12週齢のWTおよびProm1^{-/-}マウスの精巣について、リン酸化ヒストンH3 (pHH3) 陽性分裂期細胞の頻度を免疫蛍光法を用いて解析した。その結果、Prom1^{-/-}マウスの精細管ではpHH3陽性細胞の数が激減していることが観察された (Figure 5A-5D)。さらに、ウェスタンブロッティング解析により、Prom1^{-/-}マウスではpHH3タンパク質の蓄積量がProm1^{+/-}マウスに比べて有意に減少していることが明らかになった (32.4%, P < 0.05) (Figure 5E, 5F)。

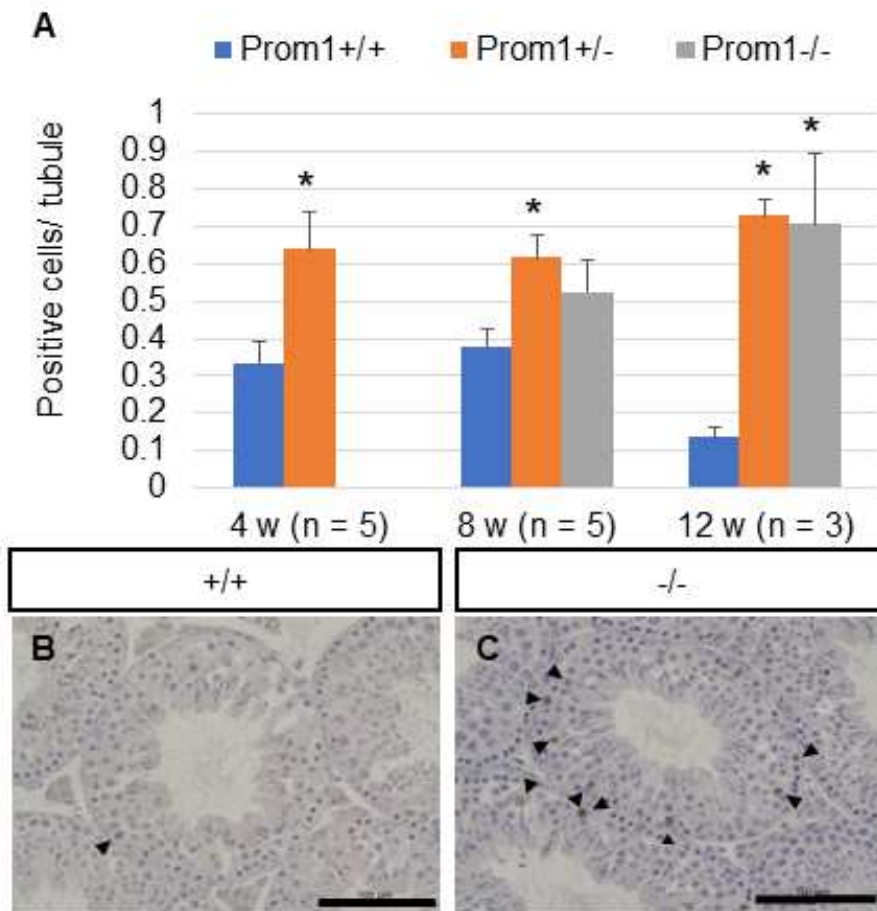


Figure 4 PROM1 の抗アポトーシス作用。(A) アポトーシス細胞の割合 (TUNEL 陽性細胞/精細管)。エラーバーは SEM、Dunnett 検定、* $p < 0.05$ 。(B, C) 12 週齢マウスの精細管の TUNEL 染色。スケールバー = 100 μ m。黒矢印は TUNEL 陽性細胞を示す。

c-FLIP は精上皮細胞における主要なアポトーシス抑制タンパク質であることから、PROM1 が c-FLIP を介してプログラム細胞死から保護するのではないかと推測した。さらに、リン酸化 ERK1/2 (pERK1/2) の発現を調べた。ERK1/2 の活性化は細胞増殖と一致しており、精子形成に重要な役割を果たしているからである。ウェスタンブロット解析の結果、pERK1/2 の発現は *Prom1*^{-/-} マウスの精巣で有意に減少していた (54.8%, $P < 0.05$) (Figure 5E, 5H)。以上のことから、PROM1 は c-FLIP の維持と ERK の活性化を介して、細胞分裂の促進とプログラム細胞死の抑制に必須であることが示唆された。

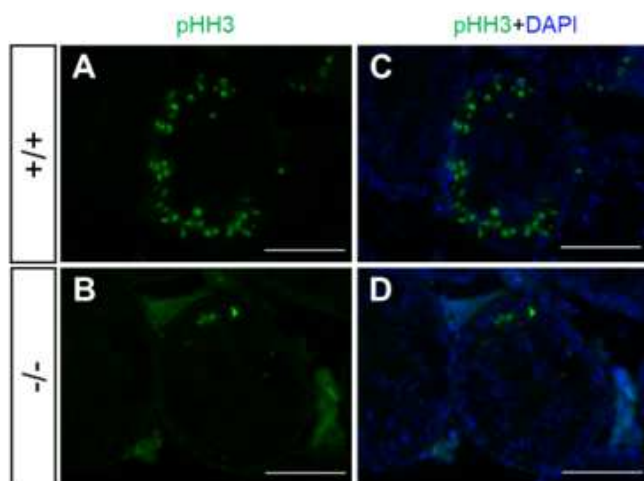
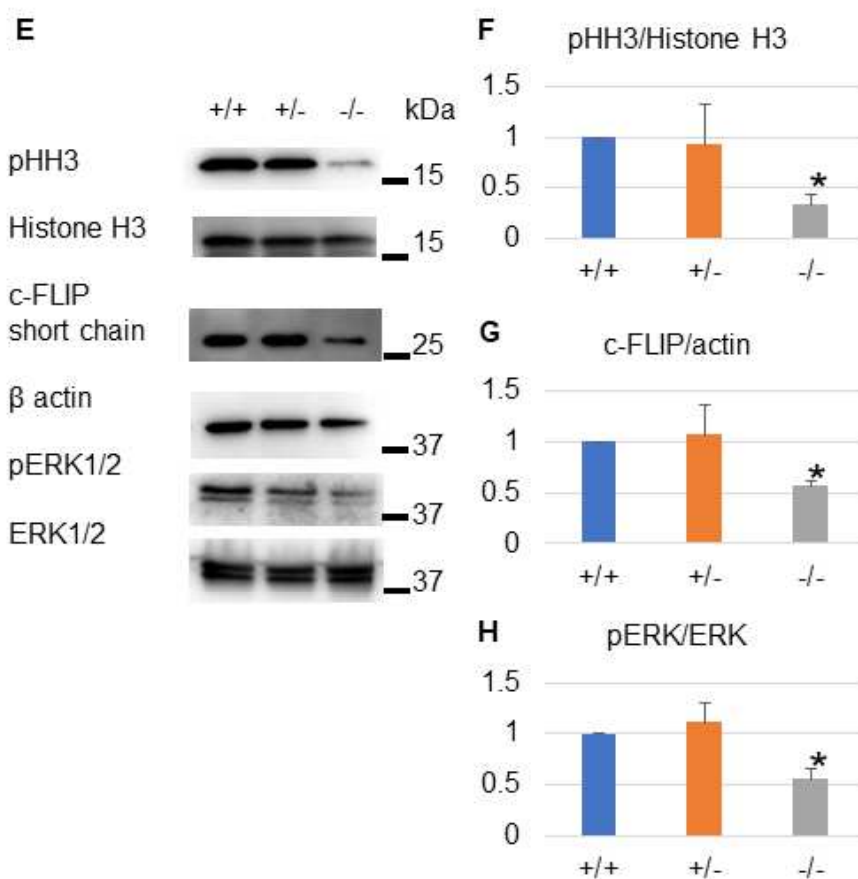


Figure 5 *Prom1*^{-/-}マウスの増殖解析。(A-D) 精細管の免疫蛍光分析。核は DAPI (青) で染色し、pHH3 はモノクローナル抗体 (緑) を用いて標識化した。(E-H) マウス精巣のpHH3、c-FLIP、pERK1/2 のウェスタンブロット解析。(E) 各タンパク質の発現は、マウス精巣から得たタンパク質溶解液のウェスタンブロット分析により測定した。(F-H) 各タンパク質発現の定量。アクチン、ヒストン H3、ERK1/2 をローディングコントロールとした。n=4、エラーバーは SEM を示す。Dunnett の検定、*p < 0.05。



5 | PROM1欠損は精子鞭毛の形態異常を引き起こす

最後に、*Prom1*欠損が精子の形態に及ぼす影響を調べた。まず、8週齢の*Prom1*^{-/-}マウスの精巣上体精子の質を評価したところ、短く、湾曲した鞭毛をもつ異常な形態の精子が有意に多かった (Figure 6A-D, Supplementary Figure

S4) . *Prom1* KOマウスの奇形率は、WTマウスよりも有意に高かった (8週 : $63 \pm 6.5\%$ vs $32.8 \pm 3.5\%$, $P < 0.05$, 12週 : $93.2 \pm 3.6\%$ vs $28 \pm 5.4\%$, $P < 0.05$) (Figure 6C, D) .

さらに、4週齢、8週齢、12週齢のWTマウスと *Prom1*^{-/-}マウスの精子の運動性を評価した。WTマウスでは、成熟するにつれて精巣上体内の運動精子数が増加し、8週齢と12週齢では80%以上の精子が運動精子であった。一方、*Prom1*^{+/-}および *Prom1*^{-/-}マウスでは、運動精子数はWTマウスに比べて有意に少なく (Figure 6E, F) , 12週では運動精子はほとんど検出されなかった。

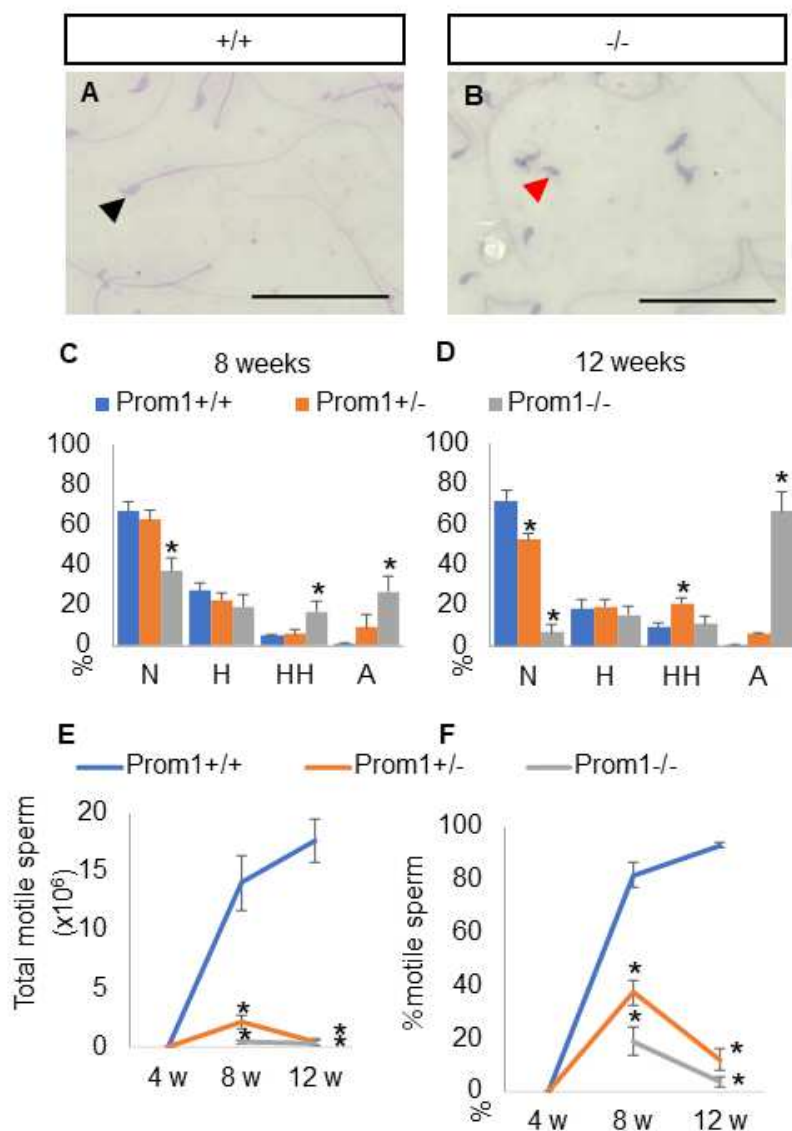


Figure 6 精巣上体精子の形態。(A, B) 各遺伝子型における精子の外観。黒矢印は正常精子、赤矢印は無尾精子を示す。(C, D) 精子の異常の比較。A,不在 ; H,ヘアピン ; HH,ハーフヘアピン ; N,正常精子。(E, F)遊走した精子の総運動精子率。エラーバーはSEMを示し、n = 5、Dunnettの検定、*p < 0.05。

これらの所見を総合すると、*Prom1*欠損は精子の形態異常を引き起こし、運動

性を損なうことが示唆される。

6. 考察

精子形成障害の根底にある発症機序を理解することは、男性不妊症、特にNOAの診断と新規治療法の確立に極めて重要である。最近の研究で、PROM1とNOAの関係が明らかにされ、精子形成障害におけるPROM1の関与が証明された²⁷。本研究は、PROM1がマウスにおいて、精細管における細胞増殖と生存、および精子の形態と運動性に複数の役割を果たしていることを示す直接的な証拠を示している。

本研究の*Prom1* KOマウスは、33週目に精巣重量および精細管厚の減少を示し (Figure 1A-C, F, G) , PROM1が精子形成に重要な役割を果たしていることが示された。免疫組織化学的検討の結果から、PROM1は精母細胞の有糸分裂期に高発現していることが示唆された (Figure 1H-I) 。さらに、PROM1は精子と精巣上体の円柱上皮に局在していた (Figure 2E-H) 。上記の結果は β -gal染色によるものであり、実際の局在を完全に反映したものではないが、PROM1が精子の鞭毛に発現していることを報告した生理学的研究の結果と一致している^{25, 27}。さらに、我々の妊孕性試験の結果より、*Prom1*の機能欠失は完全な不妊をもたらすことが明らかになった (Figure 3) 。全体として、PROM1は精上皮細胞における細胞分裂中の細胞生存を保護し、精子鞭毛の形態に影響を与えている。PROM1が欠損すると、細胞分裂が阻害され、アポトーシスが亢進し、精子の運動性が損なわれる。

さらに、精原細胞と精母細胞はアポトーシスシグナルに対して脆弱であるため、精子形成におけるアポトーシスの起こりやすい主な細胞である³⁶。TUNELアッセイの結果、*Prom1*^{-/-}マウスでは、アポトーシスシグナルが主に分裂中の精母細胞に出現していることが明らかになった (Figure 4A-C) 。さらに、分裂期マーカーであるpHH3の発現が*Prom1*^{-/-}マウスで有意に低下したことから、PROM1が精子形成にも関与していることが示唆された (Figure 5A-D, 5E, 5F) 。これらの結果は、PROM1がアポトーシスと細胞分裂を通して生殖細胞数の制御に重要な役割を果たしていることを示している。

これまでの研究で、NOA患者におけるPROM1の役割が調べられ²⁷、PROM1が精子形成だけでなく精子鞭毛の形態にも関与していることが報告されている。今回の研究では、PROM1がc-FLIPの発現 (Figure 5E, 5G) とERKの活性化 (Figure 5E, 5H) を促進することが示唆された。さらに、c-FLIPは癌幹細胞において、pro-caspase 8をcaspase 8に変換する経路を遮断し、それによってFASシグナルを介したアポトーシスを抑制することが示されている¹⁸。また、c-FLIPは生

殖細胞で発現し、FAS依存性のアポトーシスから生殖細胞を保護することも報告されている^{31, 33}。さらに、c-FLIPは精母細胞および精子細胞で主に発現するが、精原細胞では発現が低いことも分かっている³³。

c-FLIPの活性と並行して、ERKが精子形成を通して発現し、ERKのリン酸化が精母細胞の分裂に必須であることが以前の研究で明らかにされている³⁷。また、がん細胞ではPROM1がc-FLIPの発現を促進し、その活性化によってERK, Akt, Wnt, c-Junなどの細胞分裂や細胞生存に関与する下流のシグナル因子が発現することがこれまでの研究で示されている²⁰⁻²³。先行研究と本研究の結果を考慮すると、c-FLIPはERKを活性化し、ひいては生殖細胞の分裂に関与する因子であると考えるのが妥当であろう。細胞分裂とアポトーシスのメカニズムを解明するためには、さらなる研究が必要である。

PROM1の発現は様々な上皮細胞で報告されており^{4, 38-41}、臓器によっていくつかの異なるスプライスバリエントが発現しており、いくつかの特異的アイソフォームは精巣と精巣上体で主に発現している²⁵。細胞膜の突出はProm1によって制御されている^{27, 38}。したがって、これらのバリエントは、精巣上体の繊毛や精子の鞭毛の形態維持に関与していると考えられている²⁵。別の報告では、PROM1は精子の鞭毛に局在し、精子形成に重要な役割を果たしていることが示されている²⁷。さらに、*Prom1*^{-/-}マウスでは、精子の鞭毛の異常な割合が増加し、運動性が低下しており (Figure 6C-F) 、以前に報告されたPROM1の役割を裏付けている^{25, 27, 41}。形態異常を引き起こすメカニズムが、細胞の生存を確保するメカニズムと同じものであるかどうかは、まだ不明である。しかし、異常な細胞分裂によって作られた精子が異常な形態を持つことは容易に考えられる。さらに、PROM1はコレステロール結合タンパク質⁴²であり、鞭毛の形成や形態維持に関与している可能性がある。さらに、PROM1は精巣上体で発現していることが判明した (Supplementary Figure S2) 。したがって、*Prom1*^{-/-}マウスでは精巣上体の機能不全によって精子の成熟過程に影響が及んでいる可能性がある。この点に関して、抗エストロゲン療法やエストロゲン受容体KOマウスは精子の成熟を抑制することが報告されており、精巣上体頭部におけるProm1の発現低下を引き起こし、精子の成熟を抑制する可能性が示されている⁴¹。*Prom1*^{-/-}マウスにおける運動精子数の減少や精巣上体の繊毛におけるPROM1の蓄積は、精巣上体の円柱上皮細胞におけるPROM1が精子の運動性に影響を与えていることを示唆している。精子の形態と運動性におけるPROM1の役割を明らかにするためには、さらなる研究が必要である。

我々の研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究はc-FLIPとERK活性化に焦点を当てているが、c-FLIPがERKに影響を及ぼす経路、およびc-FLIPに関連する他のシグナル伝達経路の包括的な解析が必要である。第二に、これはin

vivoでの観察研究であるため、PROM1が精子の鞭毛形成に関与する機序は不明なままである。

まとめると、我々の結果は、PROM1が精子形成において重要な役割を果たしていることを示している。精子形成において、PROM1はおそらくc-FLIPの転写とERKの活性化を促進する。Prom1の発現制御に関するさらなる証拠を積み重ねることで、PROM1に基づく分子アプローチを用いて精子形成と精子の質を改善する道が開けるかもしれない。

7. 結語

Prominin-1は分裂中の精母細胞において高発現し、細胞生存にかかわるc-FLIPの転写を活性化し、精母細胞をアポトーシスから保護していることを示した。また、精子の鞭毛形成に影響している可能性が示唆された。

8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、技術支援をいただいた眼科学講座教授の木村 和博先生、助教の小林 由佳先生、大学院生の東島 史明さん、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科発生医科学研究室准教授の笹井 紀明先生、大学院生の吉原 えりかさん、泌尿器科学講座教授の白石 晃司先生、大学院生の田原 正則さんに感謝いたします。

9. 参考文献

1. Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat.* 1956;99(3):507–16.
2. Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, et al. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood.* 1997;90(12):5013–21.
3. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;90(12):5002–12.

4. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of nonepithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:12425–30.
5. Hori A, Nishide K, Yasukuni Y, Haga K, Kakuta W, Ishikawa Y, et al. Prominin-1 modulates rho/ROCK-mediated membrane morphology and calcium-dependent intracellular chloride flux. *Sci Rep*. 2019;9(1):15911.
6. Jang JW, Song Y, Kim SH, Kim J, Seo HR. Potential mechanisms of CD133 in cancer stem cells. *Life Sci*. 2017;184:25–9.
7. Zhao P, Lu Y, Jiang X, Li X. Clinicopathological significance and prognostic value of CD133 expression in triple-negative breast carcinoma. *Cancer Sci*. 2011;102(5):1107–11.
8. Brescia P, Ortensi B, Fornasari L, Levi D, Broggi G, Pelicci G. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells*. 2013;31(5):857–69.
9. Mardani A, Gheytauchi E, Mousavie SH, Madjd Jabari Z, Shooshtarizadeh T. Clinical significance of cancer stem cell markers CD133 and CXCR4 in osteosarcomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2020;21(1):67–73.
10. Korn P, Kampmann A, Spalthoff S, Jehn P, Tavassol F, Lentge F, et al. Suitability of CD133 as a marker for cancer stem cells in melanoma. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2021;22(5):1591–7.
11. Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, et al. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol*. 2004;57(9):965–9.
12. Ma S. Biology and clinical implications of CD133+ liver cancer stem cells. *Exp Cell Res*. 2013;319(2):126–32.
13. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci*. 2008;99(8):1578–83.
14. Immervoll H, Hoem D, Sakariassen PO, Steffensen OJ, Molven A. Expression of the “stem cell marker” CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer*. 2008;8:48.
15. Kim K, Ro JY, Kim S, Cho YM. Expression of stem-cell markers OCT-4 and CD133: important prognostic factors in papillary renal cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2012;43(12):2109–16.
16. Farid RM, Sammour SA, Shehab Eldin ZA, Salman MI, Omran TI. Expression of CD133 and CD24 and their different phenotypes in urinary bladder carcinoma. *Cancer Manag Res*. 2019;11:4677–90.
17. Yang Y, Liu Z, Wang Q, Chang K, Zhang J, Ye D, et al. Presence of CD133-positive circulating tumor cells predicts worse progression-free survival in patients with metastatic castration-sensitive prostate cancer. *Int J Urol*. 2022;29(5):383–9.
18. Barzegar Behrooz A, Syahir A, Ahmad S. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. *J Drug Target*. 2019;27(3):257–69.
19. Zabalova R, McDermott L, Stantic M, Prokopova K, Dong LF, Neuzil J. CD133-positive cells are resistant to TRAIL due to up-regulation of FLIP. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(4):567–71.
20. Kim MJ, Kim HB, Bae JH, Lee JW, Park SJ, Kim DW, et al. Sensitization of human K562 leukemic cells to TRAIL-induced apoptosis by inhibiting

- the DNA-PKcs/ Akt-mediated cell survival pathway. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(6):573–82.
21. Kataoka T, Tschopp J. N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 2004;24(7):2627–36.
 22. Nakajima A, Komazawa-Sakon S, Takekawa M, Sasazuki T, Yeh WC, Yagita H, et al. An antiapoptotic protein, c-FLIPL, directly binds to MKK7 and inhibits the JNK pathway. *EMBO J.* 2006;25(23):5549–59.
 23. Naito M, Katayama R, Ishioka T, Suga A, Takubo K, Nanjo M, et al. Cellular FLIP inhibits beta-catenin ubiquitylation and enhances Wnt signaling. *Mol Cell Biol.* 2004;24(19):8418–27.
 24. Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):36–41.
 25. Fargeas CA, Joester A, Missol-Kolka E, Hellwig A, Huttner WB, Corbeil D. Identification of novel Prominin-1/CD133 splice variants with alternative C-termini and their expression in epididymis and testis. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 18):4301–11.
 26. Kemper K, Tol MJ, Medema JP. Mouse tissues express multiple splice variants of prominin-1. *PLoS One.* 2010;5(8):e12325.
 27. Yukselten Y, Aydos OSE, Sunguroglu A, Aydos K. Investigation of CD133 and CD24 as candidate azoospermia markers and their relationship with spermatogenesis defects. *Gene.* 2019;706:211–21.
 28. Dellett M, Sasai N, Nishide K, Becker S, Papadaki V, Limb GA, et al. Genetic background and light-dependent progression of photoreceptor cell degeneration in Prominin-1 knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;56(1):164–76.
 29. Nishide K, Nakatani Y, Kiyonari H, Kondo T. Glioblastoma formation from cell population depleted of Prominin1-expressing cells. *PLoS One.* 2009;4(8):e6869.
 30. Song N, Liu J, An S, Nishino T, Hishikawa Y, Koji T. Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis. *Acta Histochem Cytochem.* 2011;44(4):183–90.
 31. Chandrasekaran Y, McKee CM, Ye Y, Richburg JH. Influence of TRP53 status on FAS membrane localization, CFLAR (c-FLIP) ubiquitinylation, and sensitivity of GC-2spd (ts) cells to undergo FAS-mediated apoptosis. *Biol Reprod.* 2006;74(3):560–8.
 32. Giampietri C, Petrunaro S, Coluccia P, D'Alessio A, Starace D, Riccioli A, et al. Germ cell apoptosis control during spermatogenesis. *Contraception.* 2005;72(4):298–302.
 33. Giampietri C, Petrunaro S, Coluccia P, D'Alessio A, Starace D, Riccioli A, et al. FLIP is expressed in mouse testis and protects germ cells from apoptosis. *Cell Death Differ.* 2003;10(2):175–84.
 34. Kimura M, Itoh N, Takagi S, Sasao T, Takahashi A, Masumori N, et al. Balance of apoptosis and proliferation of germ cells related to spermatogenesis in aged men. *J Androl.* 2003;24(2):185–91.
 35. Takagi S, Itoh N, Kimura M, Sasao T, Tsukamoto T. Spermatogonial proliferation and apoptosis in hypospermatogenesis associated with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2001;76(5):901–7.
 36. Dadhich RK, Real FM, Zurita F, Barrionuevo FJ, Burgos M, Jimenez R. Role of apoptosis and cell proliferation in the testicular dynamics of seasonal breeding mammals: a study in the Iberian mole, *Talpa occidentalis*. *Biol*

Reprod. 2010;83(1):83–91.

37. Inselman A, Handel MA. Mitogen-activated protein kinase dynamics during the meiotic G2/MI transition of mouse spermatocytes. *Biol Reprod.* 2004;71(2):570–8.

38. Corbeil D, Roper K, Hellwig A, Tavian M, Miraglia S, Watt SM, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem.* 2000;275(8):5512–20.

39. Karbanova J, Corbeil D, Fargeas CA. Prominin-1/ CD133, saliva and salivary glands—integrating existing data to new clinical approaches. *Exp Cell Res.* 2019;383(2):111566.

40. Bhattacharya S, Yin J, Winborn CS, Zhang Q, Yue J, Chaum E. Prominin-1 is a novel regulator of autophagy in the human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(4):2366–87.

41. Pereira MF, Fernandes SA, Nascimento AR, Siu ER, Hess RA, Oliveira CA, et al. Effects of the oestrogen receptor antagonist Fulvestrant on expression of genes that affect organization of the epididymal epithelium. *Andrology.* 2014;2(4):559–71.

42. Corbeil D, Marzesco AM, Fargeas CA, Huttner WB. Prominin-1: a distinct cholesterol-binding membrane protein and the organization of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Subcell Biochem.* 2010;51:399–423.