

氏 名 徳江 萌

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大乙第250号

学位授与の日付 平成29年3月24日

学位授与の要件 学位規則第6条第2項該当

学位論文題目 SHISA6 confers resistance to differentiation-promoting
Wnt/ β -catenin signaling in mouse spermatogenic stem cells

論文審査委員 主 査 教授 高田 慎治
教授 吉田 松生
教授 藤森 俊彦
教授 大保 和之 横浜市立大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

Stem cells support tissue homeostasis through continual production of differentiating progeny from a pool of undifferentiated cells. This is traditionally thought to be dependent on a couple of paradigmatic mechanisms: asymmetric cell division, which always gives rise to one self-renewing cell and one differentiating cell; and control by an anatomically defined (or closed) niche, inside of which stem cells remain undifferentiated, but outside of which they differentiate. However, mouse testes produce a large number of sperm throughout their reproductive period and show a facultative (or open) niche environment. In addition, mouse spermatogenic stem cells do not rely on asymmetric division; their fates are stochastic. Thus, I explored how mouse spermatogenic stem cells are maintained. In particular, I focused on the machinery that promotes stem cell differentiation.

In mouse spermatogenesis, glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha 1 ($GFR\alpha 1$)⁺ cells act as the “actual stem cells”—the principal self-renewing cells in a steady state—and neurogenin 3 ($NGN3$)⁺ are “potential stem cells,” those that are destined for differentiation and maintain their self-renewing potential. Therefore, I investigated the signal that promotes the $GFR\alpha 1$ ⁺ to $NGN3$ ⁺ transition.

I first compared the gene expression profiles between $GFR\alpha 1$ ⁺ and $NGN3$ ⁺ cell populations *in vivo* by cDNA microarray and obtained a list of candidate signaling molecules that might promote differentiation. I then evaluated the effects of the candidate ligands *in vitro* using cultured spermatogonia, or germline stem (GS) cells, which are usually $GFR\alpha 1$ ⁺. I found that Wnt/ β -catenin signaling induced *Ngn3* expression. Next, I examined the *in vivo* role of Wnt/ β -catenin signaling using mice carrying a β -catenin gain-of-function mutation. Their testes showed defects in spermatogenesis; the number of $GFR\alpha 1$ ⁺ cells was reduced, whereas no significant reduction in retinoic acid receptor-positive gamma ($RAR\gamma$)⁺ cells (largely corresponding to $NGN3$ ⁺ cells) was observed. Consequently, the $RAR\gamma$ ⁺ cell-to- $GFR\alpha 1$ ⁺ cell ratio increased, consistent with the idea that $GFR\alpha 1$ ⁺ to $NGN3$ ⁺ differentiation increased. A conditional β -catenin deletion in mice showed a consistent phenotype—the number of $GFR\alpha 1$ ⁺ cells did not change, whereas the $RAR\gamma$ ⁺ cell number and the $RAR\gamma$ ⁺ cell-to- $GFR\alpha 1$ ⁺ cell ratio decreased, consistent with the idea that $GFR\alpha 1$ ⁺ to $NGN3$ ⁺ differentiation was affected.

In situ hybridization revealed that some Wnt ligands were expressed in conjunction with the seminiferous epithelial cycle. In particular, *Wnt6* was found to be expressed in stages I to VII in Sertoli cells, consistent with an increase in the number of $NGN3$ ⁺ cells, suggesting the role of WNT6 in the induction of spermatogonial

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

differentiation. Mouse spermatogenic stem cells appear not to reside in a definitive niche but are uniformly exposed to external signal(s) like WNT, leading to the next question: How do stem cells persist without exhaustion in the presence of differentiation-promoting Wnt ligands?

I hypothesized that a fraction of GFR α 1⁺ cells are resistant to differentiation-inducing Wnt/ β -catenin signals. I searched for Wnt inhibitors in the microarray data and identified *Shisa6*, which was expressed almost exclusively in the GFR α 1⁺ fraction. Some Shisa family members have been reported as Wnt inhibitors. Using *Xenopus laevis* embryos and a luciferase assay in HEK293T cells, I found that SHISA6 is a novel Wnt inhibitor that acts autonomously. I also discovered that *Shisa6* is expressed in a subset of the GFR α 1⁺ population *in vivo*. Next, I performed a knockdown experiment of *Shisa6* in germline stem (GS) cells by RNAi, which induced *NGN3* expression that was augmented by concurrent stimulation with WNT3a and RSPO2. I also showed that *Shisa6* expression was induced by GDNF and FGF—crucial factors required for spermatogenic stem cell maintenance—in GS cells. I generated *Shisa6* knockout mice using the CRISPR/Cas9 system. Loss of *Shisa6* did not result in an apparent spermatogenesis phenotype, but trans-heterozygotes carrying a *Shisa6* knockout and stabilized β -catenin mutations showed a reduction in GFR α 1⁺ cells and defects in spermatogenesis. This indicates that *Shisa6* was expressed in GFR α 1⁺ cells and played a role in the maintenance of the stem cell pool by suppressing Wnt/ β -catenin signaling in a cell-autonomous manner.

I also discovered that *Shisa6* and *T (Brachyury)* showed compatible expression within the GFR α 1⁺ population. In addition, a pulse-label and chase experiment showed that T⁺ cells have the ability to continue producing progeny for at least 6 months. These results suggest that T⁺ (and probably SHISA6⁺) cells have stem cell-related characteristics.

In conclusion, in this study, I examined the mechanisms controlling the mouse spermatogenic stem cell system. Here, I propose a generic mechanism of stem cell regulation in a facultative (or open) niche environment. Namely, different levels of a cell-autonomous inhibitor (SHISA6, in this case) result in heterogeneous resistance to widely distributed differentiation-promoting extracellular signals such as WNT. Consequently, stem cells follow different differentiation fates.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

幹細胞は、自己を維持すると同時に分化細胞を生み出すことで組織恒常性を維持する。申請者は、今まで不明であった、マウスの精子幹細胞の分化を誘導する細胞外シグナルおよび、自己複製する細胞と分化する細胞を同時に生み出す分子機構の解明に挑戦し、新しい分子メカニズムを発見した。

マウス精巣では GFR α 1 陽性 (GFR α 1⁺) 精原細胞が幹細胞として働き、自己を維持するとともに分化へと方向付けられた NGN3⁺細胞へと移行する。申請者はまず、GFR α 1⁺細胞から NGN3⁺細胞への分化に関わる遺伝子を探すために、これらの細胞集団を FACS により集め、それぞれの遺伝子発現を microarray によって解析した。興味深いことに、いくつかのシグナル経路に関わる遺伝子の発現量に差が見られたため、候補となる複数のシグナルについて、精子幹細胞の培養細胞である GS 細胞を用いて検討を行った結果、Wnt リガンドの 1 つである WNT3a を添加したときに *Ngn3* の発現の上昇が起こることを見出した。さらに、WNT3a が活性化する Wnt/ β -catenin シグナルを生殖細胞で増強する変異マウス (β -catenin^{f1(ex3)/f1(ex3);Nanos3^{Cre/Tg}) では、GFR α 1⁺細胞数の減少と精子形成の異常が起こることを見出した。一方、生殖細胞で β -Catenin を欠損するマウス (β -catenin^{f1/f1;Nanos3^{Cre/Tg}) では、GFR α 1⁺細胞数は変化せずに NGN3 細胞の数が増加することが明らかになった。これらの結果は、Wnt/ β -catenin シグナルは生体内で GFR α 1⁺細胞の分化を誘導するという考えを支持した。}}

次いで、精巣内での Wnt リガンドの発現を *in situ* hybridization により検討し、 β -catenin シグナル経路を活性化すると報告されている *Wnt6* が、体細胞であるセルトリ細胞に高発現していることを見出した。精子形成の周期性 (精細管周期) と合わせて検討したところ、NGN3⁺細胞数の増加するタイミングで *Wnt6* の発現が増加することが明らかとなった。さらに、この発現の増加が見られる時には、*Wnt6* は精細管全体に一樣に発現しており、精細管全体が Wnt シグナルで満たされると考えられた。

しかし、*Wnt6* の発現が増加する時に、すべての GFR α 1⁺細胞が NGN3⁺細胞に転換するわけではなく、分化せずに GFR α 1⁺のままどどまる細胞が多数存在していたことから、「Wnt シグナルで満たされた中でどのように GFR α 1⁺細胞が維持されるのか？」という新たな疑問が生じた。microarray の結果から *Shisa6* の発現が GFR α 1⁺細胞に局限することが分かっていたが、興味深いことに同じファミリーに属する *Shisa2* が細胞自律的に Wnt シグナルを阻害することが報告されていることから、申請者は、「Wnt シグナルが細胞外に存在しても分化せずに残るために一部の GFR α 1⁺細胞が *Shisa6* を発現している。」という仮説を立て、その検証を行った。まず、*Xenopus* 胚における Wnt8 による 2 次軸誘導の阻害および、培養細胞におけるレポーターアッセイを行い、*Shisa6* が実際に細胞自律的に Wnt シグナルを阻害する因子であることを確認した。つぎに、*Shisa6* が GS 細胞で高発現していることから、そのノックダウンを行い、Wnt シグナルによる *Ngn3* の発現誘導が著しく促進されることを示した。さらに、*Shisa6* の KO マウスを作製して精子形成における機能を検討したところ、*Shisa6* 単独の KO では明らかな異常は認めなかったものの、生殖細胞で β -Catenin

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

シグナルを増強する β -catenin^{f1(ex3)} 変異を増強し、GFR α 1⁺細胞の減少と精子形成の異常を引き起こすことを明らかにした。また、*Shisa6* と類似の発現パターンを示すことを申請者が見出した *T (Brachyury)* 遺伝子を発現する細胞の運命を追跡し、SHISA6⁺細胞が長期にわたって幹細胞として機能することを支持する結果を得た。以上の一連の結果は、GFR α 1⁺細胞の一部の細胞が SHISA6 を発現することで、分化を誘導する Wnt/ β -catenin シグナルから守っているという仮説を強く支持するものであった。

マウスの精巣は、明瞭な幹細胞ニッチ構造を持たないことが特徴である。本研究は、このような組織では、一部の幹細胞に分化シグナルに抵抗する分子（阻害因子）を発現することで、幹細胞を維持しながら分化細胞を生み出すというモデルを提唱した。以上、本研究は精子形成のみならず、広く組織幹細胞システムを理解する上で重要な知見となり、学術に十分値する研究であると判断された。