



# Critical function of RA-GEF-2/Rapgef6, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, in mouse spermatogenesis

Okada, Keisuke

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6187号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006187>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

### Critical function of RA-GEF-2/Rapgef6, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, in mouse spermatogenesis

Rap1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子である

RA-GEF-2/Rapgef6 のマウス精子形成における重要な役割

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

腎泌尿器科学

(指導教員：藤澤 正人 教授)

岡田 桂輔

緒言)

RA-GEF-2 (Rapgef6) は、低分子 GTP 結合タンパク質の 1 つである Rap1 の活性化因子 (グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)) である。Rap1 は生体内で様々な機能を有するが、Cadherin および Integrin 依存性の細胞接着に関与していることが知られている。また Rap1 の上流シグナルである RA-GEF-2 も細胞接着に関与するという報告がなされている。例えば、RA-GEF-2 は E-カドヘリンの発現調節を介して、アドヘレンスジャンクションの成熟に重要な役割を果たすと報告されている。またわれわれもマウスの B リンパ球において、RA-GEF-2 が Rap1 の活性化を調節し、腫瘍壊死因子- $\alpha$  が引き金となるインテグリン活性化を調節すると報告した。

現代社会において不妊症は、全カップルの約 10-15% の頻度で認められると言われている。不妊症の原因の約半数を男性側の因子が占めており、その病因の多くは、精子形成障害である。精子形成障害の根本的なメカニズムは依然解明されていないことが多く、治療薬の開発などに向けても、メカニズムの解明が必要と考えられている。

本研究では、RA-GEF-2 と男性不妊症との関連を解明するために、RA-GEF-2 ノックアウトマウスを用いて、マウス精子形成における RA-GEF-2 の機能解析を行った。

方法)

以前われわれが報告した通り Cre/loxP システムを使用し、RA-GEF-2 のエクソン 21 をノックアウトし、RA-GEF-2<sup>+/+</sup> および RA-GEF-2<sup>-/-</sup> マウスを作製した。これらのマウスを用いて、精巣における RA-GEF-2 の発現と局在、精巣の病理学的評価、精液検査および精子の形態評価、妊孕性の評価、RA-GEF-2 と細胞接着分子との関係について検討し、RA-GEF-2 とマウス精子形成の関連について解析した。

結果)

#### #1 精巣における RA-GEF-2 の発現と局在

リアルタイム PCR にて、RA-GEF-2<sup>+/+</sup> マウスの精巣における RA-GEF-2 の発現を確認した。さらに RA-GEF-2<sup>+/+</sup> マウスの精巣の免疫染色検査にて、精細管の内腔側に RA-GEF-2 の発現を認めた。

#### #2 RA-GEF-2<sup>-/-</sup> マウスの精巣における変化

RA-GEF-2<sup>-/-</sup> マウスは、脾腫を認める以外ほとんど正常に発育し、体重や FSH、LH、テストステロンは、RA-GEF-2<sup>+/+</sup> マウスと比較して、有意な差はな

かった。今回の研究で、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスの精巣が、有意に小さいことが判明した。

精巣のステージ分類に従い、ステージ毎に HE 染色標本を 2 群間で比較したが、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスの精巣は、生殖細胞の減数に伴う精上皮の菲薄化および精細管内腔の増大を認め、hypospermatogenesis の像を呈していた。

### #3 RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスにおける精子および妊孕性の検討

RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスの精巣上体から採取した精液は、RA-GEF-2<sup>+/+</sup>マウスと比較して、有意に精子濃度、運動率および正常形態率は、低かった。また走査型顕微鏡で精子を観察したところ、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスの精子に頭部奇形を有意に多く認めた。

また、雄マウスと野生型のメスを交配したところ、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスは、RA-GEF-2<sup>+/+</sup>マウスと比べ妊孕率は低く、産仔数も少なかった。

### #4 RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスにおける N カドヘリンの発現および局在の変化の

RA-GEF-2 の局在から、セルトリ細胞-生殖細胞間の接着(Adherens junction) における RA-GEF-2 が関与する何らかの異常により、精子形成障害を引き起こしているのではないかと推測された。精巣におけるセルトリ細胞-生殖細胞間の adherens junction を構成する分子として、E カドヘリン、N カドヘリン、ネクチン、インテグリンなどを検討した。RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスにおいて、有意に N カドヘリンの発現の低下を認めた。また N カドヘリンは、RA-GEF-2<sup>+/+</sup>マウスにおいて生殖細胞-セルトリ細胞間と推測される部分に発現を強く認めたが、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスにおいては N カドヘリンの発現が弱くなり、局在が diffuse で不規則になっていた。

### 考察)

哺乳類の精子形成における Rap1 の関与に関する報告はいくつか散見される。Rap1 の mutant マウスにおいて、精子形成における生殖細胞とセルトリ細胞間の接着異常により妊孕性の低下が引き起こされるという報告などがある。ところが今までのところ、Rap1 の上流分子である GEF の精子形成における役割を解明した報告は認めていない。そこで、われわれは、Rap1 に対する GEF の 1 つである RA-GEF-2 のノックマウスを用いて、精子形成における RA-GEF-2 の機能的役割を調べた。

RA-GEF-2 の精巣における発現を確認し、また局在を精細管の内腔側に認めた。さらに体重やホルモンに有意差を認めないにもかかわらず、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスの精巣は有意に小さく、病理学的にも hypospermatogenesis の像を呈して

いた。これらの所見は、RA-GEF-2 が精巣の発育および正常の精子形成の維持に重要な役割を担っていることを強く示唆していた。

また RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスにおいて有意に精子濃度、運動率は低く、奇形精子を多く認めた。また RA-GEF-2<sup>+</sup>雄マウスは妊孕性の低下を認めた。このような RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスにおいて見られる、精液所見の低下や妊孕性の低下は、ヒトの臨床でよく見られる OAT 症候群 (oligoasthenoteratozoospermia 症候群；精子減少症、精子不動症、奇形精子症で特徴づけられる特発性精子形成障害) に類似している。それゆえ、男性不妊症の原因の 1 つとして重要な OAT 症候群の分子メカニズムを解明する動物モデルとして、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスは有用と考えられる。

精細管内の独特な環境を維持するセルトリ細胞は精子形成において非常に重要な役割を果たしている。セルトリ細胞-セルトリ細胞間、あるいは生殖細胞-セルトリ細胞間における adherens junction の障害は、精子形成障害の原因の 1 つと考えられている。そこで adherens junction 関連の各種接着分子と RA-GEF-2 との関連について解析を進めたところ、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスにおいて N カドヘリンの局在が diffuse で不規則になっていた。これらの所見から、RA-GEF-2 が N カドヘリンを介して、セルトリ細胞—生殖細胞間の接着を調節していることが示唆され、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスにおける精子形成不全の原因の一つであると推測された。

### 結論)

RA-GEF-2 は精子形成の維持に重要な役割を果たしており、RA-GEF-2<sup>+</sup>マウスは、OAT 症候群のような精子形成障害を解明するモデルとして有用と考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2435号	氏名	岡田桂輔
論文題目 Title of Dissertation	<p>Critical function of RA-GEF-2/Rapgef6, a guanine nucleotide exchange factor for Rap1, in mouse spermatogenesis</p> <p>Rap1 に対するグアニンヌクレオチド交換因子である RA-GEF-2/Rapgef6 のマウス精子形成における重要な役割</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 眞 庭 謙 昌 Chief Examiner</p> <p>副 査 西 尾 久 英 Vice-examiner</p> <p>副 査 白 川 利 朗 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

RA-GEF-2 (Rapgef6) は、低分子 GTP 結合タンパク質の 1 つである Rap1 の活性化因子 (グアニンヌクレオチド交換因子 (GEF)) である。Rap1 は生体内で様々な機能を有するが、Cadherin および Integrin 依存性の細胞接着に関与していることが知られている。また Rap1 の上流シグナルである RA-GEF-2 も細胞接着に関与するという報告がなされている。例えば、RA-GEF-2 は E-カドヘリンの発現調節を介して、アドヘレンスジャンクションの成熟に重要な役割を果たすと報告されている。またわれわれもマウスの B リンパ球において、RA-GEF-2 が Rap1 の活性化を調節し、腫瘍壊死因子- $\alpha$  が引き金となるインテグリン活性化を調節すると報告した。

現代社会において不妊症は、全カップルの約 10-15% の頻度で認められると言われている。不妊症の原因の約半数を男性側の因子が占めており、その病因の多くは、精子形成障害である。精子形成障害の根本的なメカニズムは依然解明されていないことが多く、治療薬の開発などに向けても、メカニズムの解明が必要と考えられている。本研究では、RA-GEF-2 と男性不妊症との関連を解明するために、RA-GEF-2 ノックアウトマウスを用いて、マウス精子形成における RA-GEF-2 の機能解析を行った。

RA-GEF-2 の精巣における発現を確認し、また局在を精細管の内腔側に認めた。さらに体重やホルモンに有意差を認めないにもかかわらず、RA-GEF-2<sup>-/-</sup>マウスの精巣は有意に小さく、病理学的にも hypospermatogenesis の像を呈していた。これらの所見は、RA-GEF-2 が精巣の発育および正常の精子形成の維持に重要な役割を担っていることを強く示唆していた。また RA-GEF-2<sup>-/-</sup>マウスにおいて有意に精子濃度、運動率は低く、奇形精子を多く認めた。また RA-GEF-2<sup>-/-</sup>雄マウスは妊孕性の低下を認めた。このような RA-GEF-2<sup>-/-</sup>マウスにおいて見られる、精液所見の低下や妊孕性の低下は、ヒトの臨床でよく見られる OAT 症候群 (oligoasthenoteratozoospermia 症候群; 精子減少症、精子不動症、奇形精子症で特徴づけられる特発性精子形成障害) に類似している。それゆえ、男性不妊症の原因の 1 つとして重要な OAT 症候群の分子メカニズムを解明する動物モデルとして、RA-GEF-2<sup>-/-</sup>マウスは有用と考えられる。

精細管内の独特な環境を維持するセルトリ細胞は精子形成において非常に重要な役割を果たしている。セルトリ細胞-セルトリ細胞間、あるいは生殖細胞-セルトリ細胞間における adherens junction の障害は、精子形成障害の原因の 1 つと考えられている。そこで

adherens junction 関連の各種接着分子と RA-GEF-2 との関連について解析を進めたところ、RA-GEF-2<sup>-/-</sup>マウスにおいて N カドヘリンの局在が diffuse で不規則になっていた。これらの所見から、RA-GEF-2 が N カドヘリンを介して、セルトリ細胞—生殖細胞間の接着を調節していることが示唆され、RA-GEF-2<sup>-/-</sup>マウスにおける精子形成不全の原因の一つであると推測された。

本研究は、RA-GEF-2 は精子形成の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした研究であるが、従来行われなかった RA-GEF-2 ノックアウトマウスを用いて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。