

# 生殖細胞分化における内分泌環境と線維芽細胞増殖因子のクロストーク

平井耕太郎<sup>1)</sup>, 落谷 孝広<sup>2)</sup>

1) 横浜市立大学医学部泌尿器科学

2) 国立がんセンター研究所・がん転移研究室

## はじめに

生殖細胞分化における細胞増殖因子の発現の意義に関しては主に Stem cell factor (SCF/c-kit ligand/Steel factor) とその受容体に関して十分な解析が進められてきたが, 精巣において多種類の発現が確認されている線維芽細胞増殖因子の役割に関しては, これまでさまざまなトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた検討にも関わらず未だ明らかになっていないといえる [1]. また男性不妊に関する治療は顕微受精などの方法の確立により原因に関らずその治療が可能であるため, 原因の解明やその特異的な治療の開発などは進んでいないのが現状である.

今回は特に雄または男性の生殖腺に発現し, 精子形成を促進する作用をもち不妊治療への応用が期待される線維芽細胞増殖因子ファミリーに属する FGF-4 を中心に概説する. そもそも FGF-4 遺伝子は, NIH3T3 細胞をトランスフォームする作用をもち [2], さまざまな細胞に対して増殖促進能を示す癌遺伝子 HST-1 としてクローニングされた. この遺伝子はヒトにおいて 11q13 領域に存在し CyclinD1 などとともに複数のがん遺伝子増幅が認められ, 精巣腫瘍 [3], カボシ肉腫にて遺伝子の発現の上昇が確認されており精巣腫瘍に関しては当遺伝子が悪性度に関与する, 重要な遺伝子であることが予測され, 動物実験の段階ではあるが, FGF-4 のシグナルを抑制することは精巣腫瘍の治療に有用であることが予測されている [4].

正常個体での FGF-4 遺伝子の発現は主に胚発生初期より認められ, 主に胎児期に発現が強くさまざまな組織・細胞の分化や増殖, 形態形成に働くことが知られて

いる. 特に肢芽 [5] や歯芽 [6] の発達にも関り, 興味深いことに発達段階の鶏の leg bud の形態形成において指となる部位に FGF-4 は発現し, 指間となる部位には発現を認めず, さらに人為的に指間となるべき部位に FGF-4 を強発現させると, 指間細胞の細胞死, 脱落が抑制されることから発生における発達段階の細胞の運命決定に深く関わっていることが示唆されている [7]. 特にわれわれはマウス成体における FGF-4 の発現, 機能解析を進めてきたが, FGF-4 の成体全身組織における発現の局在はマウスとヒトではほぼ一致しており, 発現部位は大脳海馬領域, 小脳内のプルキニエ細胞, 小腸上皮細胞および精巣である. 精巣においては, 少なくとも器官形成初期以降のマウス精巣に比較的強く発現し, 生後の発現レベルは低下するものの持続した発現が確認できる [8]. 精巣内における発現の局在は *In situ* hybridization および免疫染色による所見からセルトリ細胞および一部の生殖細胞に発現していると考えられ, われわれは FGF-4 が生殖細胞の分化になんらかの関与をすることを発見していた (図 1). 事実, これらの発現部位において FGF-4 遺伝子の発現を制御する転写因子である Oct3/4 とそのコファクターである Sox2 が共存することがすでに報告されている. また, これらの組織や発現部位が成体の幹細胞の存在する部位とある程度一致することを考え合わせると, 幹細胞もしくは分化段階の細胞の増殖・分化を FGF-4 遺伝子が制御している可能性も示唆され, 大変興味深いと考えられる. 精巣における機能解析のために作成したコンディショナルトランスジェニックマウスを用い精巣特異的, 持続的に FGF-4 を高発現させたところ, コントロールのマウスに比較し長期間にわたり有意に精子数の上昇, 精巣重量の上昇, 高い妊孕性の維持を認めた [9]. さらに, 精巣障害を引き起こす薬剤の中で現在でも膀胱腫瘍に対する抗癌剤として使用されているアドリアマイシンをこのマウスに投与すると精巣障害が軽減され妊孕性も改善するという結果をわれわれは得た [9]. 精巣機能の維持に精巣を低温に維持することが必要なことは, 陰嚢がラ

連絡先: 平井耕太郎, 横浜市立大学医学部泌尿器科学,  
〒236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦3-9  
TEL: 045-787-2679  
FAX: 045-786-5775  
E-mail: kohirai2002@yahoo.co.jp

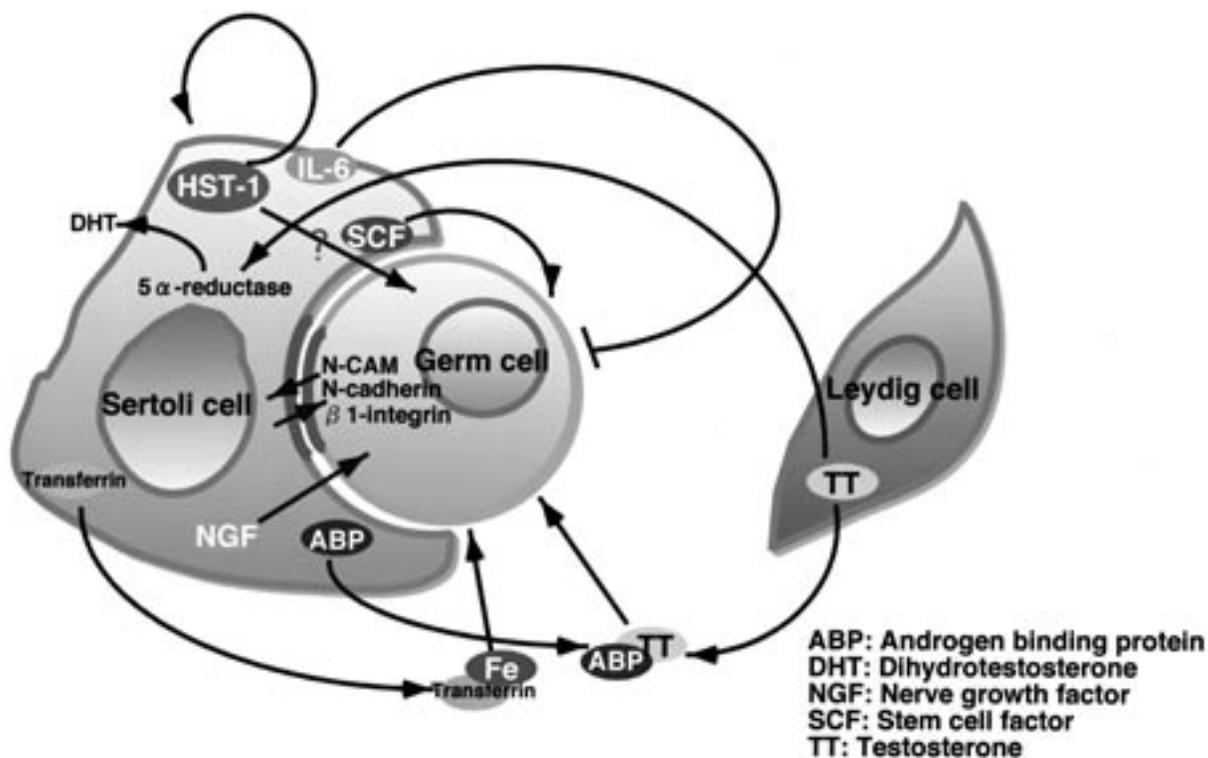


図1 精巣における複雑な細胞間相互作用の中で、HST-1/FGF-4も他の細胞増殖因子、ホルモンと共に生殖細胞分化に密接に関わっていることが想像される。

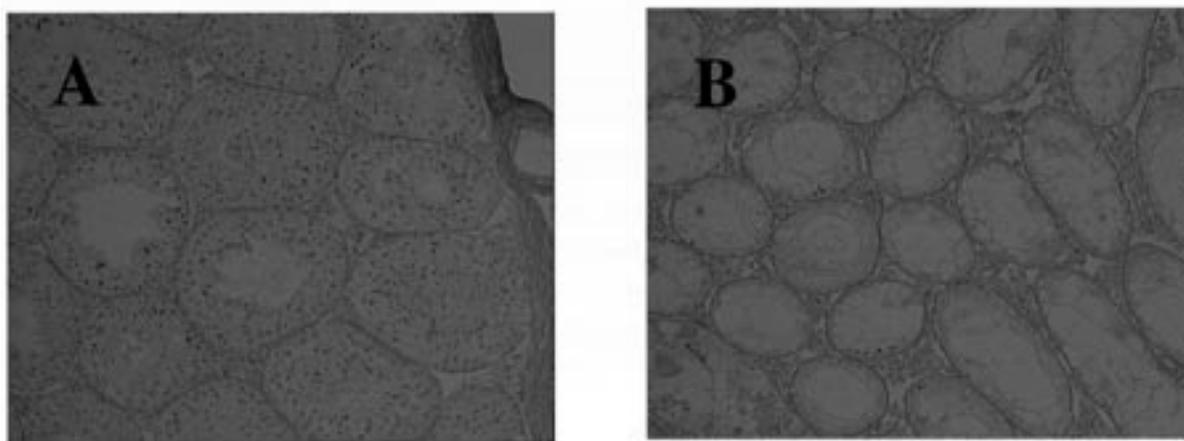


図2 熱による apoptosis 誘導後9日目におけるマウス精巣組織像の比較 (PAS/hematoxylin 染色)。コントロール群において明らかな精細管のダメージがみられるが、FGF-4強発現群においては各分化段階の生殖細胞が認められる。(A.FGF-4を強発現させたマウスの精巣, B.コントロール群)

ジェーターのごとく機能しており、成人における熱性疾患や精巣静脈瘤が造成機能障害を与えることなどからよく知られているが、われわれはマウス精巣に負荷した熱ストレスにより生殖細胞特異的に起こるアポトーシスが FGF-4の強制発現により著明に押さえられることも明らかにしている (図2, 3) [10]。

また熱ストレスを負荷した精巣およびセルトリ細胞における FGF-4の発現レベルは負荷前に比べ上昇するこ

とも確認されたが (図4)、作用も比較的類似している同種の遺伝子である FGF-2 (b-FGF) では脳梗塞 [11] や光刺激 [12] により局所における FGF-2の発現は誘導され、一方当遺伝子を強制発現させてやると脳梗塞の範囲 [13] および網膜色素細胞のダメージ [14] が軽減されるという報告がなされている。これらのことから少なくとも一部の線維芽細胞増殖因子の中には生理的に抗ストレス作用をもっており、このような生体防御機構が

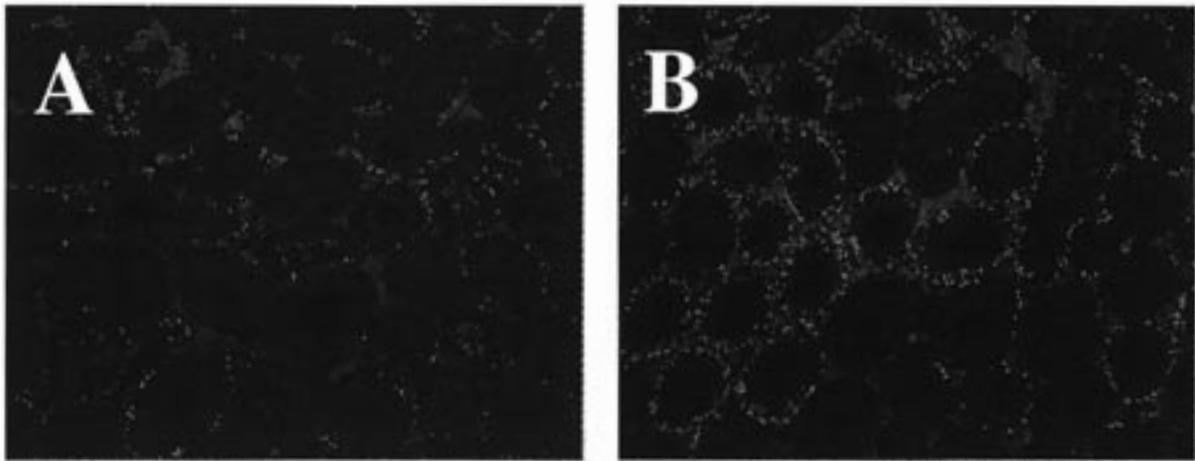


図3 熱による apoptosis 誘導後2日目の精巣切片に TUNEL 法を用いて両群のアポトーシスを比較した。蛍光が陽性である細胞がアポトーシス陽性細胞であり、コントロールに比較して FGF-4強発現群では著明にアポトーシスが抑制されている。(A.FGF-4を強発現させたマウスの精巣, B. コントロール群)

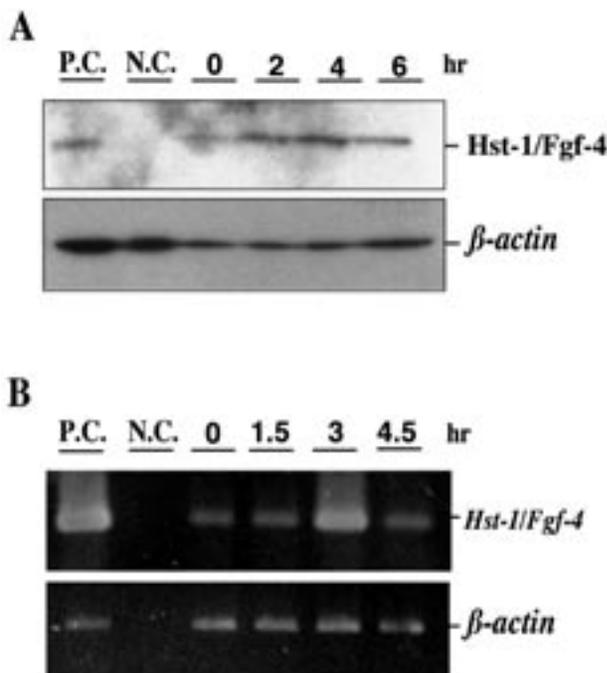


図4 熱ストレス負荷後の FGF-4の経時的な発現誘導の検討。  
In vivo, In vitro いずれにおいても FGF-4の発現誘導が確認された。(A. 精巣組織 (Western blot analysis), B. 初代培養のセルトリ細胞 (RT-PCR))

FGF-4の精巣における意義の1つであることが推測された。

これまでわれわれの施設を含む複数の施設で作成された FGF-4に関するノックアウトマウスはいずれも胎生致死であったが、現在では cre/lox システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスが作成されている。われわれもこのマウスを用いて精巣で特異的に FGF-4 遺伝子をノックアウトする作業を進めており、これらの

解析から精巣における FGF-4のさらなる解明が進むものと期待される。

FSH やテストステロンの作用として生殖細胞に対する、抗アポトーシス作用があげられるが [15,16], SCF [17] や FGF-4にも前述のように生殖細胞に対して抗アポトーシスをもつ。このように作用が共通していることは、互いの経路が協調しあっている可能性を示唆しているといえる。そのことを裏付ける事実として、それぞれが受容体の発現レベルにを影響を及ぼす場合もあり、マウスセルトリ細胞においては FSH の投与により FGFR1 の発現が増強されることや (未発表データ), FSH 受容体の発現が FGF により増強すること [18] 等があげられる。他臓器における例として陰茎の発生に FGF-10が関与し [19], 陰茎の発生・発育にアンドロゲンが重要であることから、やはり生体における内分泌系と細胞増殖因子の協調作用の存在が示唆されると考えられる。これまでのホルモン剤の投与による治療に加えて、今後生殖医療において細胞増殖因子を治療剤として用いるのではないかと期待できるのではないであろうか。

### まとめ

以上、これまで明らかにされてきた FGF 解析ノックアウトマウスなどの phenotype や強発現系におけるわれわれのデータを中心に相互関係を眺めてきたが、内分泌と細胞増殖因子は相互に関わっていることが示唆され、われわれが FGF-4を中心にさまざまな検討を行ってきた結果は、精巣において FGF-4の不妊治療への可能性を示唆しており、さらなる解明を進め精巣における役割を明らかにしてゆくことで、不妊治療の1つの選択肢と

しての可能性の検討を追求する方針である。

## 文 献

1. Cancilla B, Davies A, Ford-Perriss M, Risbridger GP (2000) Discrete cell- and stage-specific localisation of fibroblast growth factors and receptor expression during testis development. *J Endocrinol* 164, 149-159.
2. Sakamoto H, Mori M, Taira M, Yoshida T, Matsukawa S, Shimizu K, Sekiguchi M, Terada M, Sugimura T (1986) Transforming gene from human stomach cancers and a non-cancerous portion of stomach mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 3997-4001.
3. Suzuki K, Tokue A, Kamiakito T, Kuriki K, Saito K, Tanaka A (2001) Predominant expression of fibroblast growth factor (FGF) 8, FGF4, and FGF receptor 1 in nonseminomatous and highly proliferative components of testicular germ cell tumors. *Virchows Arch* 439, 616-621.
4. Hirai K, Sasaki H, Sakamoto H, Asano K, Kubota Y, Ochiya T, Terada M (2003) Antisense oligodeoxynucleotides against HST-1/FGF-4 suppresses tumorigenicity of an orthotopic model for human germ cell tumor in nude mice. *J Gene Med.* (submitted)
5. Ochiya T, Sakamoto H, Tsukamoto M, Sugimura T, Terada M (1995) Hst-1 (FGF-4) antisense oligonucleotides block murine limb development. *J Cell Biol* 130, 997-1003.
6. Niswander L, Martin GR (1992) Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development* 114, 755-768.
7. Macias D, Ganan Y, Ros MA, Hurle JM. (1996) In vivo inhibition of programmed cell death by local administration of FGF-2 and FGF-4 in the interdigital areas of the embryonic chick leg bud. *Anat Embryol (Berl)* 193, 533-41.
8. Yamamoto H, Ochiya T, Takahama Y, Ishii Y, Osumi N, Sakamoto H, Terada M (2000) Detection of spatial localization of Hst-1/Fgf-4 gene expression in brain and testis from adult mice. *Oncogene* 19, 3805-3810.
9. Yamamoto H, Ochiya T, Tamamushi S, Toriyama-Baba H, Takahama Y, Hirai K, Sasaki H, Sakamoto H, Saito I, Iwamoto T, Kakizoe T, Terada M. (2002) HST-1/FGF-4 gene activation induces spermatogenesis and prevents adriamycin-induced testicular toxicity. *Oncogene* 21, 899-908.
10. Hirai K, Sasaki H, Yamamoto H, Ochiya T, Sakamoto H, Kakizoe T, Kubota Y, Terada M. HST-1/FGF-4 protects male germ cells from apoptosis under heat-stress condition. (submitted)
11. Iwata A, Masago A, Yamada K (1997) Expression of basic fibroblast growth factor mRNA after transient focal ischemia: comparison with expression of c-fos, c-jun, and hsp 70 mRNA. *J Neurotrauma* 14, 201-210.
12. Walsh N, Valter K, Stone J (2001) Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. *Exp Eye Res* 72, 495-501.
13. Song BW, Vinters HV, Wu D, Pardridge WM (2002) Enhanced neuroprotective effects of basic fibroblast growth factor in regional brain ischemia after conjugation to a blood-brain barrier delivery vector. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 605-610.
14. Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1992) Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci* 12, 3554-3567.
15. Shetty J, Marathe GK, Dighe RR (1996) Specific immunoneutralization of FSH leads to apoptotic cell death of the pachytene spermatocytes and spermatogonial cells in the rat. *Endocrinology* 137, 2179-2182.
16. Tesarik J, Martinez F, Rienzi L, Iacobelli M, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E (2002) In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 17, 1811-9.
17. Yan W, Suominen J, Toppari J (2000) Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro. *J Cell Sci* 113, 161-168.
18. Jaillard C, Chatelain PG, Saez JM (1987) In vitro regulation of pig Sertoli cell growth and function: effects of fibroblast growth factor and somatomedin-C. *Biol Reprod* 37, 665-674.
19. Haraguchi R, Suzuki K, Murakami R, Sakai M, Kamikawa M, Kengaku M, Sekine K, Kawano H, Kato S, Ueno N, Yamada G (2000) Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *Development* 127, 2471-2479.