

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 29 年度博士課程入学

内田あや

指導教員 金井克晃

論文題目

Paracrine interactions in mouse testis

(マウス精巣におけるパラクライン制御機構)

哺乳類における精子形成は、精巣中の曲精細管 (Seminiferous tubule: ST) とよばれる管の中で精原幹細胞という少数の幹細胞集団により支えられる。精原幹細胞を含む未分化型精原細胞 (A_{undiff}) は ST 上皮の基底区画に維持されるが、分化型精原細胞 (A_{diff})、精母細胞、精子細胞へと分化するに伴い精細管内腔へと移動していく。作られた精子は最終的に精細管内腔へと放出 (Spermiation) され、管腔内液の流れ (Luminal flow) に乗って精巣網 (RT: Rete testis) へ運ばれる。RT は精巣のいわば出口部分に位置する網目状の管構造であり、RT 領域と ST 領域を繋ぐ境界部には弁様構造であるセルトリバルブ (SV: Sertoli valve) が存在する。先行研究から SV 領域における弁様構造は AKT シグナルの恒常活性を示す特殊なセルトリ細胞で構築されており、SV 領域には A_{undiff} ニッチが存在することがわかっている。しかし、RT 領域と ST 領域の境界部における SV 弁の形成機構および、そのニッチ誘導機序は十分にわかっていない。

哺乳類精巣における A_{undiff} の自己複製と分化のバランスは近傍の体細胞が分泌する成長因子やシグナル因子がパラクライン的に作用することで制御される。TGF β スーパーファミリーに属するグリア細胞株由来神経栄養因子 (Glial cell-line derived neurotrophic factor: GDNF) や線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factor: FGF) ファミリーが A_{undiff} の自己複製/増殖を支持する。一方で、 A_{undiff} から A_{diff} への分化および減数分裂の開始はレチノイン酸 (Retinoic acid: RA) シグナルにより誘導されることが知られている。しかし、精巣の恒常性維持におけるパラクライン制御機構の多くは未だ謎に包まれたままである。また、RT 領域および SV 領域はヒト

を含む哺乳類精巣で広く共通して保存されている解剖学的特徴であるにも拘らず、その機能的役割の殆どは明らかとなっていない。

本研究では、第1章でビーズ移植を用いたニッチ関連因子の *in vivo* 解析系を樹立し、これを用いて第2章でSV領域におけるFGFs・RAを介したニッチ制御機構を解明した。第3章ではSOX17⁺ RT上皮からのパラクライン作用によりSV領域が決定され、さらにSV領域における弁構造の形成が「上流」にあたるST領域での精子形成に重要な機能を担っていることを示す。

第1章 ニッチ因子の *in vivo* 機能解析法の樹立：

本章ではパラクライン因子がA_{undiff}に及ぼす影響を *in vivo* で時空間的に解析できる新規アッセイ系として生体精巣間質内への分泌因子吸着マイクロビーズ移植法を開発した。本実験ではリコンビナントタンパク質を吸着させた Affi-gel blue（直径 50~100μm）ビーズを赤色蛍光色素 DiI で標識した後、精巣間質内へと移植し、移植後1日以降、DiIにより標識されたビーズ近傍の精細管内においてA_{undiff}の動態解析を行った。まず検証実験としてGDNF吸着ビーズをマウス精巣間質内へ移植したところ、ビーズに近接した精細管で一過性かつ局所的にA_{undiff}が増殖し、移植後1~3日でA_{undiff}の細胞集塊が形成された。これにより当アッセイ系を用いてGDNFによるA_{undiff}の自己複製誘導能を立証することができた。さらに、GDNFに暴露されたA_{undiff}が *in vivo* において1~3日という短期間で増殖を繰り返し細胞集塊の形成を行うことが初めて明らかとなった。本章ではさらにWNT4、WNT5aに本アッセイを適用させることで、preliminaryながらもWNT4がA_{undiff}の移動能、WNT5aがA_{undiff}の細胞増殖能にそれぞれ影響を与えることを示した。

第2章 FGF9・RAを介したSVにおけるニッチ制御機構の解明：

本研究室ではマイクロアレイによってRT、SV、ST各領域の遺伝子発現パターンを比較することで、領域特異的にRTでFGF9、SVでRA分解酵素をコードする *Cyp26a1* が高発現することを見出している。そこで、本章では第1章で確立した *in vivo* アッセイ系を用いてFGF9およびRAがセルトリ細胞およびA_{undiff}へ及ぼす影響を評価した。まずFGF9吸着ビーズをST領域に作用させたところ、FGF9に暴露されたSTセルトリ細胞では移植後1日でAKTシグナルの活性化が観察された。これにより、隣接するRT領域から分泌されたFGF9がSV領域での特殊なセルトリ細胞の特性にパラクライン的に作用するという可能性が示唆された。さらに、RA濃度をSV領域で局所的に引き上げるため、第1章で確立したアッセイ系を改良しRA

吸着 Bio-mag amine beads（直径約 1 μm ）を SV 周辺の間質領域へ局所的に移植した。その結果、RA に暴露された SV 領域では移植後 1 日で異所性に A_{diff} が出現し、移植後 3 日では弁構造の破綻が引き起こされた。このことから、SV 領域では CYP26a1 により RA 濃度が低く保たれることで、RA による A_{undiff} の分化誘導が抑制され、当領域の A_{undiff} 細胞集団が維持されることが示唆された。以上の結果により、RT 領域からの FGF、RA の液性因子のバランスにより SV 領域での微細環境が維持されていることが示唆された。

第 3 章 SOX17⁺ RT 上皮細胞による SV 領域のパラクライン制御機構：

先行研究から、SV 領域を構成する特殊なセルトリ細胞は、隣接する RT 領域により生後、細胞非自律的 (non-cell-autonomous) に誘導されることがわかっている。しかし、RT 領域による SV 領域の誘導メカニズムの詳細はわかっていない。第 2 章で行ったマイクロアレイにより、SF1⁺ 生殖腺体細胞の中で、RT 上皮特異的に転写因子 *Sox17* が発現していることが明らかとなっている。そこで、*Sfl-cre* マウスを用いて RT 上皮特異的 *Sox17* 欠損 (*SflCre:Sox17^{fllox/fllox}*、以下 cKO) マウスを作出したところ、cKO の RT 上皮においてその上皮形態とバリアー機能、精細胞の精巣上体へ輸送機能に異常は認められなかった。また、*Cyp26a1* をはじめとする RA 関連遺伝子の発現パターンは cKO マウスでは顕著な変化は認められなかった。一方で、cKO マウスでは RT 領域に隣接する SV 領域での弁構造の形成が阻害され、SV 領域特異的なセルトリ細胞での AKT 活性が減少した。また、cKO マウスの SV 領域では A_{undiff} は維持されていた一方、異所的な精母細胞数の増加が観察された。色素注入による弁機能評価アッセイにより、cKO マウスでは SV 弁の形成不全により RT 領域から ST 領域への Luminal flow の逆流が引き起こされること、また、これにより上流の ST 領域において spermiation 異常（幼若な円形精子細胞の精上皮からの脱落）が誘発されることが示された。さらに、ヒト AMH-promoter を用いてセルトリ細胞に *Sox17* を過剰発現させた遺伝子改変 (Tg) マウスを作成し、その精巣の表現型を解析した。すると、Tg マウスでは精子発生に顕著な異常は見られなかった一方で、SV 領域において弁構造の過形成が誘導されることが明らかとなった。野生型および cKO 精巣のシングルセル (scRNA-seq) 解析により、正常な RT 上皮細胞では *Fgf9* や *Tgfb1* などのパラクライン因子をコードする複数の遺伝子が領域特異的に発現することがわかった。一方で、*Sox17* を欠損した RT 上皮では、これらパラクライン因子をコードする遺伝子発現が減少する傾向が確認された。以上の結果により、RT 領域では *Sox17* がパラクライン因子の発現を誘導すること、そして、RT 領域がこれらのパラクライン因子を介して隣接する ST 領域での SV 弁構造形成を支持することが示された。

本研究は RT 上皮細胞からパラクライン作用により、RT 領域と ST 領域の境界部において SV 領域の弁構造が形成されること、また、この SV 領域における弁構造が、精子発生のある ST 領域でのホメオスタシス維持に必須の機能を担うことを示した最初の研究となった。これらの成果は、精原幹細胞ニッチとして哺乳類に広く保存されている SV 領域の形成機序の深い理解に繋がると同時に、精巣基部に位置する RT および SV 領域が精巣全体の組織液の流れを制御するという、新たな解剖学的な知見を提供するものである。