

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 内田 あや

哺乳類の精子形成は、精細管 (ST: seminiferous tubules) の中で精原幹細胞 (SSC: spermatogenic stem cell) という少数の幹細胞集団により支えられる。SSC は、ST の基底区画で維持され、分化型精原細胞、精母細胞、精子細胞へと分化するに伴い内腔側へと移動する。完成した精子は精細管腔へと放出され、管腔液の流れ (Luminal flow) に乗って精巣網 (RT: rete testis) へ運ばれる。RT は精巣の出口部分に位置する網目状の管構造であり、RT と ST 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。SV 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、細胞非自律的に誘導され、SSC ニッチを形成することが判明している。しかし、RT と ST の境界部における SV ニッチ誘導のパラクラインの分子機序は不明のままである。申請者は、第1、2章として、新規のビーズ移植によるパラクライン因子の *in vivo* 解析系を樹立し、この手法を用いて、FGF9、RA (レチノイン酸) のパラクライン制御を介したSVニッチの形成機序にアプローチしている。第3章では、SOX17⁺ RT 上皮からのパラクライン作用による SV 形成への影響と SV の上流側の ST での精子形成の役割について、*Sox17* 変異マウス系統を用いて遺伝学的に解析をしている。

第1章では、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。つまり、タンパク質を吸着させた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する。移植後継時的に DiI⁺精細管断片を回収し、その周囲の SSC の動態を解析し定量化するという技術である。特に、ニッチ因子である GDNF の吸着ビーズを用いて、DiI⁺ ST 領域で SSC が数日以内に短期間で増殖を繰り返し、一過性かつ局所的に細胞集塊を形成することを示し、本実験系の有効性を証明している。第2章では、FGF9、RA 吸着ビーズを用いて、ST、SV 領域のセルトリ細胞、SSC への影響を評価している。ST では、FGF9 ビーズに暴露された周辺のセルトリ細胞は、移植後1日でSV領域に特徴的な AKT シグナルの活

性化が上昇し、逆に、RA ビーズ付近の SV 領域では、異所性に分化型精原細胞が誘導され、移植後 3 日までに SV 領域の弁構造が破綻した。これにより SV 領域では、高 FGF9、低 RA シグナル状態が維持されており、その破綻が SV の弁構造の崩壊を誘くと結論付けている。第 3 章では、申請者は、RT 上皮特異的な転写因子 SOX17 に着目し、*Sfl-cre* による RT 上皮特異的 *Sox17* 欠損 (cKO) マウスを作出し、SOX17⁺ RT 上皮の SV、ST 領域での機能解析を行なっている。cKO マウスでは、RT 自体の構造、機能には異常は認められないが、SV 領域全てで精母細胞が異所的に出現し、AKT 活性の消失と SV 領域の弁の形成不全になることを見出している。さらに、cKO マウスでは、SV の形成不全が ST 内で Luminal flow の逆流を誘導し、これにより上流の ST 領域において精子形成の異常 (幼若な円形精子細胞での脱落) を誘発し、マウスが不妊となることを示した。一方、ヒト AMH-promoter によりセルトリ細胞で *Sox17* を過剰発現させた Transgenic (Tg) マウス 系統 (精子発生は正常、妊性あり) を樹立し、その Tg 精巣の SV 領域において弁構造の過形成が誘導されることを見出している。さらに、申請者は、single cell RNA-seq 解析により、*Sox17* 欠損 RT 上皮細胞では、*Fgf9* や *Tgfb2* などの複数のパラクライン関連遺伝子の発現が減少することを確認し、SOX17⁺ RT 上皮は、FGF9、TGFβ2 を含むパラクライン機能により、SV の領域化を正に誘導していると結論づけている。本論文では SV における弁構造の破綻が、上流の ST における精子形成の脱落を誘導することから、SV の弁構造が精巣内の Luminal flow の流れを制御することで、精巣内の ST での高品質な精子形成に必要な微細環境の維持に機能していると締め括っている。

本研究は、パラクライン因子のビーズ移植法により、SV ニッチでの高 FGF・低 RA 状態の重要性を示した。さらに、SOX17⁺ RT 領域から ST の境界部への FGF9 を含むパラクライン機能により、SV 領域の弁構造が形成され、この弁構造が ST 全体の管腔内のホメオスタシスの維持に必須の機能を担っていることを明らかにした。これらの成果は、獣医学分野において貢献するところが少なくない。よって、本論文は博士 (獣医学) の学位請求論文として合格と認められる。