

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 猪村（貴志） かさね

哺乳類の精巣では、長期間大量の精子が産生されるが、それは精巣内に精原幹細胞が存在し、その幹細胞が分化と自己複製をバランス良く行うことにより支えられている。精原幹細胞は精巣中の精細管という管の中にあり、周囲を支持細胞のセルトリ細胞（SC）に支えられている。SCや精細管の周囲の細胞により分泌される GDNF（グリア細胞由来神経栄養因子）や FGF（線維芽細胞増殖因子）により精原幹細胞を含む未分化な精原細胞では自己複製が促進され、RA（レチノイン酸）により精原細胞は分化が促進される。精原細胞は精母細胞へと分化し、その後円型精子細胞となり形態変化を遂げ伸長型精子細胞となる。この一連の精子発生は周期性をもって進むが、この周期を精上皮周期といいマウスでは 12 ステージに分けられる。精細管の大部分を占める曲精細管では以上のような周期的な精子発生を行うが、精細管基部である直精細管は少数の精原細胞と SC のみから成り、精子発生は抑制されている。この領域の SC は細胞質を精巣網側へと伸ばし、精細管腔を塞ぐような弁様の構造をしており、“セルトリバルブ（SV）”と呼ばれている。SV では GDNF が高発現し、未分化な精原細胞が集積し精原細胞の分化が抑制されている。また、成体の SC は増殖しないと考えられていたが SV の SC は増殖能を維持している。このような特徴を持つ SV の更なる機能解明のため、本研究ではマウスを用いて、第 1 章で SV がいつどのように形成されるのか、その形成過程を明らかとし、第 2 章ではトランスクリプトーム解析によりその分子基盤を明らかとした。

〈第 1 章〉精子発生に重要な役割を持つことが示唆される Akt シグナルに関して、曲精細管及び SV の SC におけるその活性に着目して解析を行った。曲精細管の SC では精上皮周期特異的に Akt シグナルが活性化するのに対し、SV では恒常的に同シグナルが活性化していることが分かった。更にこの活性化パターンは生後すぐは見られず、2 から 4 週齢にかけて弁様の構造が出来るのと同時間に見られることが分かった。次に曲精細管の SC と SV の SC が同一の細胞集団から形成されるのか異なる細胞集団から形成されるのか解析するために SC の置換実験を行った。当研究室で作出した Amh-Treck マウス（ジフテリア毒素投与により SC を特異的に除去）を用い、SC をすべて除去した Amh-Treck マウスの精細管に、1 週齢マウスの曲精細管の SC をドナー細胞として移植した。ドナー細胞は SV 領域を含む精細管に一樣に定

着し、曲精細管領域に定着した SC は精子発生を支えたが、SV 領域に定着した SC は精子発生を支えず、弁様の構造をとり、Akt シグナルの恒常的な活性化パターンを見せた。以上のことから、SV は生後、細胞非自律的及び環境依存的に形成されることが判明した。

〈第 2 章〉マイクロアレイにより精巣網、SV、曲精細管の各領域の遺伝子発現を比較した。SV 特異的高発現遺伝子として第一に RA 分解酵素遺伝子である *Cyp26a1* が挙げられた。また、精巣網では *Fgf9* の発現が高いことも明らかとなった。リアルタイム PCR により SV では *Cyp26a1* の発現が高いこと、曲精細管では RA 合成酵素遺伝子の *Aldh1a2* の発現が高いことが分かった。また、*in situ* hybridization でも *Cyp26a1* の発現を確認した。これらの結果から、SV では RA の分解亢進により精原細胞の分化が抑制されていることが示唆される。*Fgf9* の精巣網における高発現はリアルタイム PCR でも確認し、外因性の FGF9 を曲精細管の SC に作用させることにより Akt シグナルを活性化することが可能であった。以上を第 1 章の結果と合わせて考えると、精巣網より分泌された FGF9 により SV 領域の SC は Akt シグナルが活性化し、生後に細胞非自律的に弁様構造が形成されることが示唆される。また、FGF と RA の拮抗関係という考え方を適応すると、FGF シグナルを受容した SV では CYP26A1 が誘導され、RA の分解が起こり精原細胞の分化が抑制されていることが考えられる。

本研究では SV は生後細胞非自律的に形成されることを明らかとし、その形成には FGF シグナルによる Akt シグナルの活性化と CYP26A1 の高発現が重要であることが示唆された。この成果により、SV の形成阻害実験や *in vitro* 実験が今後可能となり、獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。