

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成23年度博士課程入学

氏名 : 相山 好美
指導教員名 : 九郎丸 正道

論文題目：哺乳類の恒常的な精子発生における直精細管の重要性

哺乳類の精子発生は、曲精細管の基底区画に存在する精原幹細胞 (SSCs: spermatogonial stem cells) による自己複製と分化から始まる。近年、TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達因子 GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) が濃度依存的に SSCs の自己複製と分化のバランスを調整することが明らかとなった。一方で、GDNF 受容体 GFR α 1 (GDNF receptor- α 1) を発現する精祖細胞が SSCs として機能することも報告されている。すなわち、哺乳類の恒常的な精子発生は、規則的な GDNF 発現による一定数の GFR α 1 陽性細胞 (\equiv SSCs) の維持によって支えられていると言える。

直精細管とは、曲精細管と精巣網を繋ぐ短い管状構造である。曲精細管で産生された直後の精子は運動能を持たず、管腔内を流れる一方向性の微小水流 (Flow) によって受動的に運ばれ、直精細管、精巣網を通過した後、精巣輸尿管、精巣上体管へと送り出される。この一方向性の Flow は、曲精細管のセルトリ細胞による内腔液の分泌機構、直精細管以降の管状構造による内腔液の再吸収機構、および直精細管の特殊なセルトリ細胞が形成する弁様構造 (Sertoli Valve; SV) による逆流防止機構によって形成される。Flow の詳細な役割は未解明だが、環境調節因子として機能することが想定される。

これまでの精子発生研究では、曲精細管に重点が置かれることが多く、直精細管以降の管状構造に注意が払われることはほとんど無かった。しかし、精子発生は生殖細胞と体細

胞の液性因子を介した相互作用によって進行するため、環境調節に関わる Flow を形成する下流の管状構造は、間接的に精子発生に寄与している可能性が考えられる。そこで本研究では、直精細管と恒常的な精子発生に関連を明らかにすることを目的とし、第1章では精巣の皮下移植系を用いて直精細管が異所性精子発生に与える影響を検討し、第2章では下流の管状構造の機能を解明するため、直精細管の SSCs 維持機構に着目して解析を行った。

精巣組織の皮下移植法は、未熟な精巣組織を異所的に成熟させる手法の一つであり、精巣の基礎研究における新規実験系や畜産業界の配偶子管理技術としての応用が期待されている。これまでに、ランダムに切ったドナー動物の精巣断片を免疫不全マウスの皮下へと移植することで、げっ歯類の他、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、アカゲザルなど様々な動物の異所性精子発生が成功している。しかしながら、これらの精子発生はいずれも一過性のものであり、効率面においても実用化レベルには至っていない。この原因としては、精巣断片のみを移植することにより曲精細管が盲管となり、精子発生環境が持続しないことが想定される。そこで第1章では、皮下移植の際に直精細管など下流の管状構造を同時に移植すれば精子発生効率の向上に繋がるのではないかと考え、その有効性を検証した。具体的方法として、精巣と精巣上体の基本的な管構造が形成される胎齢 14.5 日のマウス胎子から精巣および精巣上体を採材し、精巣+精巣上体 [ep(+)] ないし精巣のみ [ep(-)] をそれぞれヌードマウスの皮下に移植した。

移植 8 週間後、ep(+)-群では ep(-)-群の約 19 倍の効率で精子発生が認められた [ep(-)-群: 2.11% / ep(+)-群: 38.62%]。ep(+)-群における高効率な精子発生は、移植 15 週間後においても維持され [ep(-)-群: 0% / ep(+)-群: 30.42%]、さらに移植 6 か月後においても Hsc70t (伸長型精子細胞マーカー) 陽性細胞が高頻度に観察されたことから、ep(+)-法は恒常的な精子発生を維持することのできる移植法であると考えられる。

両移植群で精子発生効率に差が認められた原因を追究するため、詳細な組織解析を行った。その結果、ep(-)-群では精巣網の異常な拡張および SV の変形が認められた一方、ep(+)-群では野生型マウスと類似した構造が維持されていた。また、成体マウス (♂ 8 週齢) の精巣輸出管の起始部を結紮して Flow を人為的に阻害したところ、ep(-)-群と同様の精巣網の拡張、SV の変形および精上皮の脱落が認められた。これは、直精細管以降の管状構造の水分再吸収機構に関わる分子を欠損させたマウスの表現型と類似していることから、ep(-)-群では Flow の停滞により精子発生環境が破綻した一方、ep(+)-群では Flow が正常に形成され、恒常的な精子発生に繋がったと考えられる。

次に、移植精巣における精子発生を SSCs ニッチ動態の観点から評価した。その結果、ep(-) 精巣では、GDNF の高発現が認められ、GFR α 1 陽性細胞密度の異常な上昇が認められた一方、ep(+) 精巣では野生型マウスと同程度の微弱な GDNF 発現が認められ、GFR α 1 陽性細胞の密度が正常に維持されていた。つまり、ep(+) 移植法では SSCs レベルで恒常性が維持されていると言える。

第 1 章では、精巣の皮下移植系を用いて、直精細管など下流の管状構造が恒常的な精子発生に重要な働きを持つことを示した。これらの管状構造は、水分再吸収機構やセルトリバルブ構造による一方向性の Flow の形成を介して間接的に精子発生に影響を与えていると考えられる。今後、これらの管状構造の詳細な機能解明が進むことで、生殖発生工学技術の更なる進展が期待される。

哺乳類の SSCs は曲精細管全域に分布し、基底区画を動き回っている。SSCs は特に血管や間質と隣接した領域に高頻度に分布することから血管ニッチの概念が提唱されているが、その場所や実態の詳細はわかっていない。一方、ショウジョウバエや線虫などの無脊椎動物は、生殖腺の末端部分に固定的な生殖幹細胞 (GSCs: germ line stem cells) ニッチを持つ。GSCs ニッチでは、ニッチ細胞と呼ばれる特殊な体細胞が隣接する GSCs にニッチ因子を分泌して未分化性を維持する。第 2 章では、哺乳類の精細管の末端部である直精細管における SSCs ニッチの動態を解明することを目的として実験を行った。尚、哺乳類に広く保存された性質を見出すため、実験には周年繁殖動物のマウスおよび季節繁殖動物のシリアンハムスターを用い、組織学的手法で解析した。

免疫染色を施した全載標本において GFR α 1 陽性細胞の分布を調べたところ、ハムスターとマウスの両種において、SV 領域では GFR α 1 陽性細胞が高密度に分布し、c-Kit 陽性の分化型精祖細胞が存在しないことが確認された。興味深いことに、GFR α 1 陽性細胞の SV 領域での出現頻度はハムスターでは 100% (94 本/94 本) であり、マウスでは 87% (80 本/92 本) であった。また、SV 領域の GFR α 1 陽性細胞の増殖率を定量解析したところ、ハムスターでは曲精細管と比べて有意に高い増殖率が認められ、マウスにおいても同様の傾向が認められた。以上の結果より、少なくともハムスターの SV 領域には、GFR α 1 陽性細胞が常在し活発に増殖する SSCs ニッチが存在すると考えられる。

続いて、SV 領域の体細胞環境を解析した。曲精細管のセルトリ細胞では、性成熟後は増殖能が認められないことが知られているが、SV 上皮のセルトリ細胞は、性成熟後も使用した全ての増殖細胞マーカー (CyclinD1, Ki67 および BrdU) で陽性を示した。セルトリ細胞を

BrdUで標識し、1日後および3か月後に分布を確認したところ、標識1日後にはBrdU陽性細胞はSV領域に限局していたが、3か月後には精子発生の行われる曲精細管領域へ達していた。これは、SV上皮が曲精細管のセルトリ細胞の供給源となっている可能性を示唆している。

最後に、ハムスターのSV領域におけるニッチ因子GDNFの発現を解析したところ、曲精細管ではステージ依存性の周期的発現が認められたのに対し、SV領域では恒常的な発現が認められた。マウスにおいてもSV領域では恒常的なGDNF発現が確認された。以上より、SV領域では恒常的なGDNF発現により、GFR α 1陽性細胞が選択的かつ安定的に維持されていると考えられる。

第2章では、下流の管状構造の詳細な機能解明のために直精細管に着目し、セルトリバルブ領域に新規の固定的なSSCsニッチが存在する可能性を示した。これは哺乳類において固定的なSSCsニッチの存在を示唆する初めての報告である。今後、同領域の網羅的遺伝子解析により、哺乳類のSSCsニッチ動態の詳細が解明されることが期待される。

本研究では、直精細管に関して以下の2点を明らかにした。

- 1) 直精細管は、皮下移植法における高効率かつ恒常的な精子発生の誘導に重要である。
- 2) 直精細管のセルトリバルブ領域には、新規のSSCsニッチが存在する。

以上の所見は、これまで注意を払われて来なかった直精細管など下流の管状構造が恒常的な精子発生に対して重要な役割を有することを強く示唆するものである。今後、直精細管の更なる解明が進むことで、より高次の視点からの異所性精子発生手法が開発され、畜産業界などに応用されることが期待される。

直精細管など下流の管状構造の概略図

