

## 審査の結果の要旨

氏 名 相山 好美

哺乳類の恒常的な精子発生は、精原幹細胞 (SSCs: spermatogonial stem cells) によって支えられている。SSCs は周期的に分化する一方、ニッチの内部では自己複製を行い、一定に維持される。近年、TGF- $\beta$ スーパーファミリーの GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) が濃度依存的に SSCs の自己複製を誘導することが明らかとなった。一方、GDNF 受容体 GFR $\alpha$ 1 (GDNF receptor- $\alpha$ 1) を細胞膜上に発現する精祖細胞集団が SSCs として機能することも報告された。つまり、恒常的な精子発生には、規則的な GDNF 発現による GFR $\alpha$ 1 陽性細胞の維持が重要である。

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、精巣輸出管、精巣上体管へと送り出される。この一方向性の Flow は、下流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 は環境調節因子として作用すると考えられていることから、液性因子により制御される SSCs の維持にも何らかの機能を担う可能性が想定される。そこで本研究では、Flow 形成を担う直精細管などの下流の管状構造が SSCs に与える影響を検証することとした。

第 1 章では、精巣組織の皮下移植法を用いて下流の管状構造の存在、非存在下における SSCs 動態の解明を行った。具体的方法として、胎子期のマウスから精巣と精巣上体を採材し、精巣上体を付けた状態 [ep(+)] あるいは精巣を外した状態 [ep(-)] でヌードマウスの皮下に移植し、SSCs 動態を比較した。

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 6 か月後においても維持され、恒常的な精子発生が行われていることが示唆される。また、SSCs 動態を観察したところ、ep(+)-群では野生型マウスと同様の SSCs 動態が維持される一方で、ep(-)-群では GDNF の過剰発現および GFR $\alpha$ 1 陽性細胞の異常蓄積が認められた。これらの原因を追究したところ、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、Flow の破綻が示唆された。

これらの結果は、直精細管など下流の管状構造が SSCs 動態の維持に重要な役割を果たしていることを示している。下流の管状構造は Flow 形成 を介して SSCs を支えたと考えられるが、この一方向性の Flow の形成には直精細管の SV が特に重要であることが示唆されたことから、本領域を詳細に解析することとした。

第2章では直精細管の SV 領域の SSCs 動態の解明を行った。SV 領域は哺乳類に広く保存された構造だが、機能はほとんどわかっていない。そこで、哺乳類間に保存された機能を解明するため、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て比較解析を行った。

ニッチ因子 GDNF は、曲精細管では精上皮ステージ依存性の周期的発現を示すが、SV 領域では恒常的な発現を示した。また、SV 領域では GFR $\alpha$ 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。SV 領域の GFR $\alpha$ 1 陽性細胞は、曲精細管のもの比べて高い増殖率を示した。以上は両種ともに認められた性質であり、哺乳類の SV 領域には新規の SSCs ニッチが存在することを示唆している。続いて、SV 領域の体細胞環境を解析したところ、SV 領域は厚い基底膜に裏打ちされ、性成熟後も増殖能を示す特殊なセルトリ細胞から構成されることが明らかとなった。SV 領域のセルトリ細胞を BrdU 標識して追跡したところ、標識3か月後には曲精細管領域へ達することが確認されたことから、本領域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が示唆される。

これらの結果は、セルトリバルブ領域に新規の固定的な SSCs ニッチが存在することを示している。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。

以上総括すると、本研究ではこれまで着目されることの無かった直精細管など下流の管状構造が SSCs 維持に重要性な役割を担うことを示した。今後、配偶子研究の新たな研究分野としての発展が期待される。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与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。