



Title	精巣支持細胞におけるGATA-1転写因子の発現調節機構の解析
Author(s)	今井, 智章
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43992
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	今井智章
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第17738号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	精巣支持細胞におけるGATA-1転写因子の発現調節機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授由良義明 (副査) 教授米田俊之 助教授大倉正也 助教授池澤一彦

論文内容の要旨

【目的】

近年、歯牙組織を含めた各組織系列における幹細胞研究の進展により、再生医療が現実のものとして検討されている。しかし、幹細胞の自己再生と分化の制御には支持細胞が作り出す局所的環境が重要な役割を果たす報告がなされているものの、幹細胞と支持細胞の関係が明確な組織が少なく、解析系として確立されたものがほとんどない。その点、精巣生殖系は、幹細胞を含めた精細胞と支持細胞との関係が明確で、幹細胞からの分化が単純な組織系であることから、幹細胞-支持細胞解析のモデル系として有用であると考えられる。

精巣生殖系においては、精細管上皮を構成するセルトリ細胞と呼ばれる支持細胞が互いに結合して血液精巣閥門を形成し、精細胞の増殖・分化に関わる局所的環境を提供している。この環境は成長や精子形成周期に従って変動しており、このような厳密な遺伝子発現制御の一翼を担う支持細胞の転写因子としてGATA-1が同定されている。GATA-1は、マウス精巣において、生後1週で発現を開始し、2週でピークを迎える。精子形成周期が認められるようになるとこれと同調した発現変化を示す。このことから、GATA-1の発現調節機構に関する知見は精巣生殖幹細胞系における生殖細胞と支持細胞の機能を理解する上での有力な手がかりになると考えられる。しかし、支持細胞を初代培養系へ移すとGATA-1発現が消失するため、その発現調節機構の解析はこれまでほとんど手付かずであった。そこで本研究では、精巣支持細胞におけるGATA-1を発現する初代培養条件を確立した上で、支持細胞としての機能を評価すること、さらにGATA-1発現誘導の機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

GATA-1を強発現する生後2週マウスの精巣支持細胞を初代培養したところ、その発現は培養系に移されると速やかに消失することがノーザンプロットにより確認された。しかし、スライドグラス上で培養した支持細胞を抗GATA-1抗体にて免疫染色したところ、一部の細胞密集部位にGATA-1陽性細胞が認められた。そこで、その発現と細胞密度との関係をノーザンプロット法で調べたところ、細胞密度が高くなるにつれ細胞外マトリックスの種類と関係なく、GATA-1の発現が強くなった。それに伴い、数種の機能蛋白遺伝子の発現も変化していた。これら遺伝子の発現がGATA-1の発現により誘導されることを、GATA-1消失状態にある細胞へGATA-1を遺伝子導入することにより確認した。さらに、二室槽培養系で培養した支持細胞の上に、精細胞をのせて共培養したところ、GATA-1が高発現して

いる高密度培養時では、その発現がみられない低密度培養時より精細胞維持能が良好であった。

GATA-1 は精巣及び血球系細胞で発現しており、コード領域を共用しているものの、各々に特異的なプロモーター・第 1 エクソンに由来する精巣 (1T) 型・血球系細胞 (1E) 型 mRNA がある。そこで、GATA-1 の発現調節機構を調べるために、その 2 型の使い分けについて TaqMan PCR 法により解析した。その結果、高密度培養における GATA-1 発現の本態は、1E 型によるものであった。また、生体においては生後 2 週以降とは対照的に、生後 1 週では精巣で発現する GATA-1 発現量は 1E 型が 1T 型より優位であった。この時期は、分裂を繰り返している精巣支持細胞が互いに接するようになる血液精巣閥門の形成期にあたることから、生体においても培養系と同様に細胞間相互作用に基づく GATA-1 の発現には 1E プロモーターが関与することが示唆された。そこで、精巣支持細胞における 1E 型の発現調節領域を同定するため、プロモーター解析を行ったところ、1E エクソン上流 136-117bp. に転写活性化領域を認め、同領域内には、血球系細胞での増殖制御機能が示されている MZF 転写因子の結合配列が含まれていた。ゲルシフト解析では、その他の部位にも結合する因子が複数認められ、それらの部位に変異を入れたレポーター活性は野生型と比べ半減したことから、同領域は複数の因子によって制御されていることが示唆された。

近年、血球系細胞でエリスロポイエチン (Epo) による 1T 型の誘導が報告された。そこで、精巣支持細胞に対する Epo の有効性を調べた。その結果、Epo とその受容体 (EpoR) は共に細胞密度依存的に発現し、Epo 刺激により 1T 型の発現が誘導された。このことから、精巣支持細胞においても Epo-EpoR システムが機能しうることが明らかとなった。

【結論】

- ・初代培養精巣支持細胞における GATA-1 発現は、細胞密度に依存し、支持細胞としての機能を変化させることから、精細胞を維持する指標となりうる。
- ・GATA-1 は精巣支持細胞において 2 つのプロモーター (1E 型・1T 型) の使い分けがなされており、前者は細胞密度に依存して誘導され、後者の誘導には Epo が関与しうる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、幹細胞-支持細胞解析のモデル系として有用である精巣生殖系に着目して、精巣支持細胞において特徴的な発現を示す GATA-1 転写因子の発現調節機構について初代培養系を用いて解析を行ったものである。その結果、GATA-1 は、細胞密度に依存して発現し、支持細胞としての機能を変化させること、また、その発現には 2 つのプロモーター (1E 型・1T 型) が機能し、前者には細胞密度が重要であり、後者にはエリスロポイエチンが関与することが明らかとなった。

以上の結果は、組織幹細胞研究を推進する上で重要な知見を与えるものであり、博士 (歯学) の称号を与えるに値するものと認める。