OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	雄性生殖細胞の増殖・分化・維持機構の解析 : 精細胞移植法による解析と新規解析系の確立
Author(s)	大田, 浩
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44161
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	大田（おおた） 浩（ひろし）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 17770 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 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	**雄性生殖細胞の増殖・分化・維持機構の解析－精細胞移植法による解析と新規解析系の確立－**
論文審査委員	（主査） 教授 西宗 義武 （副査） 教授 山元 弘　教授 真弓 忠範　教授 岡部 勝

論文内容の要旨

精子形成は精原幹細胞の増殖・分化、精母細胞の減数分裂および精子細胞の著しい形態変化を経て最終的に精子を産生する一連の分化過程である。これら一連の分化過程は精原細胞の内、最も未分化な精原幹細胞の増殖・分化により開始される。精原細胞は、細胞核の形態により、A型、B型精原細胞に分類され、さらにA型精原細胞はその細胞の配列様式により、A_{single}（A_s）、A_{paired}（A_{pr}）、$A_{aligned}$（A_{al}）に細分化することができる。現在のところ、A_s型精原細胞が精原幹細胞であると考えられているが、その増殖・分化機構の解析は、培養系などの有効な解析系が存在せず、実験的な証明は困難であった。

1994年、マウスの精巣において精原細胞を精細管内に移植する技術、精細胞移植法が開発された。この技術により、移植された精原細胞はレシピエントの精細管内で正常な精子形成を行なうことができ、さらに、移植後の交配によりドナー精子由来の子孫を次世代に伝えることが可能であると報告されている。この方法を応用すれば、最も未分化な精原幹細胞から精子までの増殖・分化過程を再構成することが可能であり、これまで解析が困難であった精原幹細胞および精子形成の機能解析に非常に有効な実験系になるものと考えられる。本研究の目的は、精細胞移植法により精原幹細胞の増殖・分化・維持機構を解析し、さらにその方法を応用し雄性不妊マウスのメカニズムの解析を行うことである。また、精細管内injection法と生体電気穿孔法を組み合わせることにより、半数体生殖細胞への遺伝子導入を行い、その実験系を応用した半数体特異的遺伝子の上流解析を試みたのでここに報告する。

1．<u>グリーンマウスを利用した精細胞移植法の確立と移植後の分化過程の解析</u>：精原幹細胞の増殖・分化過程をリアルタイムで観察するため、GFP（green fluorescent protein）トランスジェニックマウスの精細胞を用いた精細胞移植法を行なった。その結果、精原幹細胞の増殖・分化過程は、まず精原幹細胞が精細管の管壁に生着し、それらの細胞が比較的未分化な精細胞として精細管の管壁に沿って増殖した後、分化へ移行することを明らかにした。さらに、移植後の精子形成周期を調べたところ、移植後の精原幹細胞の分化過程は、精細管内において同調して行なわれていることを示した。

2．<u>精原幹細胞の増殖・分化の制御機構の解析</u>：精子形成におけるc-kit/SCFの役割を明らかにするため、SCFに変異を有するマウスである*Sl* mutantへの精細胞移植を行なった。その結果、c-kitを発現していない精原細胞群に精原幹細胞が含まれていることを証明し、c-kit/SCFシステムは分化型精原細胞の維持には必須であるが、精

原幹細胞の増殖には関与しないことを明らかにした。また、精細管内には精原幹細胞を維持するための機能的な場所（stem cell niche）が存在することを示した。

さらに、胎生期生殖細胞がいつ精子形成能を有する精原幹細胞へ分化しているのかを調べたところ、胎生 12.5 日の生殖細胞は精子形成能を有していなかったが、胎生 16.5 日以降の生殖細胞は精子形成能を有する精原幹細胞として機能し得ることを示した。

3．精細胞移植法による不妊マウスの解析：雄性不妊モデルマウスである *jsd/jsd* 変異マウスと nectin2 欠損マウスの解析を精細胞移植法によって行なった。その結果、*jsd/jsd* 変異マウスの精子形成障害の原因は精細管内環境にあるのではなく、生殖細胞自身の障害によることを明らかにした。しかもそれは、精原幹細胞の増殖能ではなくて分化能の異常によることを証明した。また、nectin2 欠損マウスの不妊の表現型は、セルトリ細胞に発現する nectin2 が欠損することにより引き起こされることを示した。

4．半数体生殖細胞への遺伝子導入法の開発と半数体特異的遺伝子 OAZt の上流解析：哺乳類の精子形成細胞への遺伝子導入はこれまで困難なものと考えられており、体細胞では強力な遺伝子導入系であるアデノウイルスやレンチウイルスベクターを用いても精子形成細胞への遺伝子導入は不可能とされている。そのため半数体生殖細胞特異的遺伝子の上流解析などは、多大な労力と時間を要するトランスジェニックマウスの作成による解析が主流であった。本実験では精細管内 injection 法と生体電気穿孔法を用いることにより半数体生殖細胞への遺伝子導入を試み、この実験系を応用して半数体特異的遺伝子、OAZt の上流解析を行った。

トランスジーンを含む溶液には細胞死を抑制する caspase inhibitor を添加し、その溶液を精細管内へ injection した後、生体電気穿孔法により遺伝子導入を試みた。遺伝子導入後の精巣を解析した結果、一部の精細管内に GFP を発現する半数体細胞を検出することができたため、この実験系を用いることにより半数体生殖細胞に遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。次に、半数体特異的遺伝子 OAZt の発現制御領域を調べるため、上流および下流から削ったコンストラクトを作成し、半数体生殖細胞へ遺伝子導入後のレポーター遺伝子（luciferase）の活性測定を行った。解析の結果、転写開始点から－18、－31 に存在する 2 つの CRE 配列および initiator を削った場合にそれぞれ約 60%および 80%の転写活性の低下がみられ、また転写開始点より下流、＋48 から＋68 および＋25 から＋68 を削った場合においても、それぞれ約 50%、70%の転写活性の低下が確認された。これらの結果から、この遺伝子の半数体特異的な発現には、2 つの CRE 配列および initiator と転写開始点の下流＋25 から＋68 の領域が重要であることを示した。

論文審査の結果の要旨

精子形成は精原細胞の増殖・分化、精母細胞の減数分裂および精子形成の著しい形態変化を経て最終的に精子を産生する一連の分化過程である。これらの分化過程の起源細胞である精原幹細胞の増殖・分化機構を解析することは、精子形成および幹細胞システムを理解する上で非常に重要である。しかしながら、今日まで精原幹細胞の培養系は確立されておらず、その解析は非常に困難であった。

本研究では生殖細胞の新たな解析系である精細胞移植法を応用することにより、精原幹細胞の増殖・分化・維持機構を解析し、また、雄性不妊マウスにおける精子形成障害の原因解明を試みている。その結果、精原幹細胞は SCF 非依存的に増殖し、また、4 種類の雄性不妊マウスの原因に関する知見を得ることに成功している。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。