



Title	哺乳類雄性生殖幹細胞の維持・増殖・分化機構の解析
Author(s)	田所, 優子
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/44812">https://hdl.handle.net/11094/44812</a>
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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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 田 所 優 子

博士の専攻分野の名称 博士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 18638 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 16 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 哺乳類雄性生殖幹細胞の維持・増殖・分化機構の解析

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 西宗 義武

(副査)

教 授 八木 清仁 教 授 前田 正知 教 授 土井 健史

### 論 文 内 容 の 要 旨

幹細胞とは、自己複製能と機能的分化細胞を産生する能力を兼ね備えた細胞と定義されている。つまり、様々な組織は幹細胞と分化細胞との間の動的平衡状態の中で維持されていると考えることができる。この幹細胞システムによる動的平衡状態と生体のホメオスタシスについて解明するには、まず幹細胞の自己複製機構と分化調節機構を理解する必要がある。本研究では組織再生の視点から幹細胞制御のメカニズムの理解を進めるために、生殖幹細胞の維持・増殖・分化の調節機構の解析を行なった。

一般に組織が傷害を受け分化細胞が欠損すると、幹細胞はその組織を修復するために増殖するものと考えられる。そこで、様々な原因により分化細胞が欠損する 5 種類の精細胞分化障害マウス精巣を用いて、幹細胞を含む未分化精原細胞の増殖状態について解析を行った。この結果、未分化精原細胞の増殖率はその精巣中に含まれる生殖細胞の含有率と逆相関しており、精巣中の生殖細胞の含有率が低くなると、それを補うように生殖幹細胞の増殖は亢進していることが明らかとなった。

このような生殖幹細胞の増殖亢進を直接誘導する因子の検討を行なうために、精巣支持細胞 Sertoli 細胞から分泌され、その強発現マウス精巣において精細胞腫瘍を形成することが明らかにされた glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) に着目した。これら精細胞分化障害マウスの未分化精原細胞において GDNF の受容体 GFR $\alpha$ -1 と Ret が発現していることが確認され、GDNF の発現レベルは精巣内生殖細胞含有率と逆相関の関係にあった。さらに未分化精原細胞の増殖率と相関関係にあることが示された。また未分化精原細胞の増殖が亢進している人工停留精巣に GDNF 中和抗体を注入したところ、未分化精原細胞の増殖が完全に阻害され、GDNF が未分化精原細胞の増殖に必須であることが証明された。この GDNF の発現は内分泌ホルモン FSH により調節されていることを突き止めた。血中 FSH 濃度は、生殖細胞の数によって負に調節されていることから、生殖幹細胞の増殖は FSH/GDNF 経路を介したフィードバック機構により制御されることが明らかとなった。

この生殖幹細胞の増殖調節機構の解析において、未分化精原細胞は Oct-3/4(+)と(-)の 2 つの細胞集団から成っていることを見出したので、それらの存在意義について検討を行った。それぞれの細胞集団を単離して移植実験を行ったところ、どちらも同程度の幹細胞活性を示した。これら幹細胞の特性の違いを調べるために、細胞表面膜貫通型レセプタータイプのチロシンキナーゼである c-kit を指標として解析をすすめた。これら 2 つの生殖幹細胞集団はいずれもその細胞表面に c-kit を発現していない未分化精原細胞であるが、その細胞質内にすでに c-kit 蛋白質を保持して

いることが明らかとなった。Western blotting 法により生殖細胞における c-kit の発現様式を詳細に検討した結果、Oct-3/4(+), (-) どちらの生殖幹細胞も共通して幹細胞に特有の c-kit 蛋白質を保持していた。しかし Oct-3/4(-) 生殖幹細胞は分化細胞型の c-kit 蛋白質もまた保持していた。このことから、Oct-3/4(+) 生殖細胞がより未分化型幹細胞であり、Oct-3/4(-) 生殖細胞は精原細胞分化に直接移行することのできる活性型の幹細胞であると考えられた。続いて、同様の幹細胞活性を示す異なる 2 つの生殖幹細胞群が存在する生理的意義を理解するため、これらの生殖幹細胞の動態を追跡した。その結果、Oct-3/4(+), (-) 2 つの生殖幹細胞群は相互に変換可能であり、これらの動的平衡によって幹細胞システムが維持されていることが明らかとなった。一方 GDNF の過剰刺激は、互いの相互変換による動的平衡を変化させ、Oct-3/4(-) 生殖幹細胞を増やし再生を促進する方向に働いた。つまり精子形成障害時には、FSH/GDNF 経路により 2 つの幹細胞群のバランスを変化させて再生を進めることが示された。

次に、Oct-3/4(-)、c-kit(-) 生殖幹細胞の分化機構を c-kit/SCF システムから解析を行った。これまで、生殖幹細胞は細胞表面 c-kit(-) の未分化精原細胞群に含まれていると考えられていたが、Oct-3/4(-)、c-kit(-) 生殖幹細胞から細胞分裂非依存的に生じた細胞表面 c-kit(+) 細胞は分化型 c-kit(+) 細胞と明らかに異なる形態を示し、c-kit(-) 生殖幹細胞と同等以上の幹細胞活性を保持していた。この細胞を c-kit 提示生殖幹細胞と定義し、生体内の c-kit(+) 分化細胞との特質の比較を行った。精原細胞の分化には膜型 stem cell factor (SCF) が必須であることは知られているが、分泌型 SCF の生物活性については明らかになっていないことから、2 つの c-kit(+) 細胞における分泌型 SCF に対する反応性を検討した。その結果、c-kit(+) 分化細胞は分泌型 SCF に対してほとんど反応せずに膜型 SCF に接着可能であるのに対して、c-kit 提示生殖幹細胞は分泌型 SCF の存在によって c-kit(-) 生殖幹細胞に戻り、膜型 SCF への接着が阻害された。このことから、c-kit 提示生殖幹細胞の分化への決定の第一段階として、分泌型 SCF の存在がその調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

この生殖幹細胞から不可逆的な分化が成立するメカニズムを解析するために、精原細胞から減数分裂前精母細胞期の劇的なクロマチン構造の変化からヒストン H2A.X に着目し、H2A.X プロモーター制御下に EGFP をつないだトランスジェニックマウスの作製を行なった。このマウスにおける EGFP 発現細胞を解析した結果、生殖細胞の中間型精原細胞からパキテン期精母細胞でのみ標識化されていることが明らかとなった。従ってこのマウスは、未分化から分化の決定機構と有糸分裂から減数分裂の開始機序の研究を進めるための強力な解析系を提供し得ると期待される。

## 論文審査の結果の要旨

様々な組織は幹細胞と分化細胞との間の動的平衡状態の中で維持されている。この幹細胞システムによる生体のホメオスタシスを理解する上で、幹細胞の自己複製機構と分化調節機構を解明することは重要である。本研究では幹細胞制御のメカニズムの理解を進めるために、生殖幹細胞の維持・増殖・分化の調節機構の解析を行なった。

まず種々の精細胞分化障害マウス精巣における生殖幹細胞の増殖機構を解析することにより、生殖幹細胞の増殖が FSH/GDNF 経路を介したフィードバック機構により制御されていることを明らかにした。またこの解析過程で、生殖幹細胞が Oct-3/4(+) と (-) の 2 つの細胞集団から成っていることを見出し、分化障害時には FSH/GDNF 経路により 2 つの幹細胞群のバランスが変化することを示した。さらに生殖幹細胞の分化機構の解析を c-kit/SCF システムから行ない、生殖幹細胞特異的 c-kit receptor を細胞膜に提示した遷移状態生殖幹細胞の存在を見出した。その結果、精原細胞分化への決定の第一段階として遷移状態生殖幹細胞と分泌型 c-kit ligand (SCF) の存在がその調節に重要な役割を果たしていることを示唆した。一方、生殖幹細胞から分化が成立するメカニズムを解析するために、ヒストン H2A.X プロモーター制御下に EGFP をつないだトランスジェニックマウスを作製し、分化型精原細胞から減数分裂前精母細胞にマーキングすることに成功している。このトランスジェニックマウスは、未分化から分化の決定機構と有糸分裂から減数分裂の開始機序の研究を進める上で有用なものである。

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。