

〔別紙1〕

論文の内容の要旨

獣医学 専攻
平成19年度博士課程 入学
氏名 佐藤 剛
指導教員名 九郎丸 正道

論文題目 繁殖期及び非繁殖期のゴールデンハムスターにおける精巣構造と生殖幹細胞維持状態の変化に関する研究

半永久的に配偶子が形成され続ける哺乳類精巣において、その精子発生の仕組みの解明を目的として、これまで数多くの研究がなされてきた。しかし実験に使用される動物の多くがマウスやラットといった周年繁殖動物であった。そのため、例えば不妊治療といったものへの貢献のために、配偶子形成不全のメカニズム解明及び配偶子形成異常の病態・原因探求のためには、精子発生異常モデル動物を作出する必要がある。従って、人為的に遺伝子を改変したり、薬物処理を施したり、外科的処置を行ったりした動物を「モデル動物」として使用してきたが、これらは自然の生理現象を必ずしも反映したものとは言えないものが多かった。そこで本研究では自然生理現象として起こりうる精子発生の停止・再開を観察する事のできる季節繁殖動物の精子発生に着目し、繁殖期及び非繁殖期における精子発生を比較する事で、精子発生機能の維持メカニズムの評価を試みた。

そのためまず、本試験系に用いるゴールデンハムスターを非繁殖期へ導入した際の精子発生停止・再開の継時的形態変化及びその関連蛋白の発現を探る事で、繁殖期及び非繁殖期の差異を評価した。その結果、ACNハムスターでは短日条件に曝露する事で精巣は萎縮し、約13週後(D0)には精子発生が完全に停止する事を確認し、それに加えて、精子発生停止後続く光耐性による

精子発生の回復は、周辺環境に大きく依存した違いを見せる事を明らかにした (Sato et al., 2005)。すなわち、短日曝露及び低温曝露・冬眠誘導により精子発生の回復が大きく遅延する (D0 から約 20 週を要する) 一方で、短日及び室温曝露では精子発生は短期間で回復する事 (D0 から約 10 週を要する) を確認した。さらに、作出された非繁殖期導入個体において、低下した生殖細胞数の維持のメカニズムを確認するため生殖細胞数維持に関与する因子を確認したところ、精細管内の生殖細胞において高頻度のアポトーシス数が維持されている事、ライディッチ細胞における LH-R 発現及び 3β -HSD 発現の低下が維持されている事が確認された。in vitro において低温曝露によりライディッチ細胞におけるテストステロン合成の低下が報告されており (Panesar & Chan, 2004)、また FSH やテストステロンは生殖細胞がアポトーシスを起こすのを防ぐ事も確認されている (Erkkila et al., 1997; Tesarik et al., 2001; Sofikitis et al., 2008)。これらの報告も踏まえると今回得られた結果から、短日及び低温曝露による精子発生の回復遅延は、低温曝露によるメラトニン増加・ホルモン関連因子 (LH-R, 3β -HSD) の低下とそれに続くテストステロンや FSH といった精子発生維持に必要な性ホルモン低下が継続した事で生殖細胞のアポトーシス数が増加し、結果として精巣萎縮・精子発生停止が室温下と比べて長期間維持された可能性が推測された。また Slc ハムスターにおいても、短日・制限給餌条件へ導入する事で非繁殖期への誘導を試みたところ、完全には精細管は閉鎖しなかったものの、形態的に評価したところ精子発生はほぼ停止した。しかし、生殖細胞数維持に関与する因子である LH-R, 3β -HSD の発現は若干低下傾向が認められるものの、ACN ハムスター程の減弱は認められず、ACN ハムスターと Slc ハムスターの系統差を示唆する結果となった。

次に、この ACN ハムスター及び Slc ハムスターにおける非繁殖期導入系を用いて、生殖細胞数の維持及び精子発生の停止・再開に大きく関わっていると思われる幹細胞維持 (SSC (Spermatogonial Stem Cell) の自己複製) の仕組みの評価を試みた。そのため、まず幹細胞ニッチ外的因子の主要因子の 1 つと考えられている GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) の精巣内発現を調べる事で、繁殖期及び非繁殖期の差異を調べた。その結果、ACN ハムスター及び Slc ハムスター成体において、セルトリ細胞特異的、かつ精子発生ステージ特異的に GDNF が発現している事を見出した。さらに、ACN ハムスターにおいて非繁殖期では精子発生停止期には GDNF 発現はほぼ消失する一方で、精子発生回復過程において精子発生回復に先行して GDNF 発現が回復・増加する事を確認した。ただ、Slc ハムスターにおいては非繁殖期誘導を試みた個体でも、GDNF の顕著な発現低下は認められなかった。成体ハムスターで認められた GDNF のステージ特異性は、FSH から誘導された cAMP の発現のステージ特異性 (Toppari et al., 1991; Simoni et al., 1997) とほぼ一致している事や、非繁殖期で FSH が低下する一方で、回復期には精子発生の回復に先行して FSH レベルが上昇・回復する事 (Berndtson & Desjardins, 1974; Tsutsui et al., 1988; Kirby et al., 1993)、またこれまでも in vitro において、セルトリ細胞における Gdnf の発現は FSH 作用により亢進する事が報告されている (Tadokoro et al., 2002; Simon et al., 2007; Ding et al., 2011) 点などを踏まえると、今回の結果は、GDNF が精細管においてステージ特異的・領域特異的に発現する事でニッチ環境を構築して SSC の自己複製に関与している可能

性を示唆するだけでなく、繁殖期及び非繁殖期における GDNF の発現変動 (=ニッチ環境の変動) には FSH による制御が深く関わっている可能性を自然の生理的状態の *in vivo* 個体で初めて示唆するものとする事ができるだろう。これらの事実は、繁殖期及び非繁殖期における SSC の維持のメカニズムには差異がある可能性を示唆するものと考えられた。

そのため、次に膜透過処置を施さない全載精細管を用いる事で、細胞質外へ分泌された GDNF 顆粒及びその受容体である GFR α 1 (GDNF family receptor alpha 1) 陽性細胞の共発現を調べた。その結果、ステージ特異的かつパッチ状の限局したパターンで精細管基底区画セルトリ細胞表層に GDNF 顆粒が局在する事が明らかになり、また精細管基底区画で GDNF 顆粒と GFR α 1 陽性細胞は共局在を示し、かつ橋で連結された A_{pr} (A_{paired}) 型及び A_{al} (A_{aligned}) 型精祖細胞といった GFR α 1 陽性細胞は連結された細胞のうち一部の細胞のみ非対称的に GDNF と共局在する場合がある事を確認した。これは、Nakagawa ら (2010) による SSC が非対称的に選択され自己複製が行われる可能性を示した報告と合致したものである。さらに、SSC を含むと考えられる GFR α 1 陽性細胞の局在及び形態を定量的に評価したところ、GDNF 発現が比較的高い領域にある GFR α 1 陽性細胞の方が、GDNF 発現が比較的低い領域にあるものよりも細胞の伸展の程度が有意に大きく、また GDNF 発現が比較的高い領域で統計学的有意差は無いものの GFR α 1 陽性細胞数が多い傾向がある事を明らかにした。また、非繁殖期 Slc ハムスター全載精細管においては、切片での評価と同様に GDNF 発現の減少は認められず、また GFR α 1 陽性細胞は精細管内に均一に広く分布していた。以上をまとめると、GDNF 及び GFR α 1 発現の共局在結果は、まずハムスターにおいて SSC 維持のために基底区画に存在すると考えられるニッチ環境は、これまで考えられてきたような無脊椎動物や下等脊椎動物で認められている特定領域においてのみ永久的に存在する静的なニッチ (Davies & Fuller, 2008; Palasz & Kaminski, 2009; Nakamura et al., 2010) とは異なるものであり、精上皮周期の変動に伴い絶えず変化する動的なものであり、そこに偶然入り込んだ未分化精祖細胞が SSC として自己複製する可能性を示した。そして何より興味深いのが、哺乳動物で恐らく初めて繁殖期と非繁殖期における生殖幹細胞ニッチシステムの違いを示唆する結果を得た事であった。すなわち、繁殖期から非繁殖期への移行にかけて GDNF の発現が大幅に低下し、SSC の維持が、来たる精子発生回復に必要な最低限のレベルまで絞られたと考えられる事象を確認した事である。さらに Slc ハムスターでは、非繁殖期でも GDNF の発現の大幅な低下が認められないという系統差を示し、またマウスではハムスターと同様に GDNF はセルトリ細胞特異的に発現するものの明らかなステージ特異性は認められず、また GFR α 1 陽性細胞の密度が高く、細胞をあまり伸展させた形態を取らないなどの種差が認められ (Sato et al., 2011)、以上より、ニッチシステムには繁殖期と非繁殖期の違いだけではなく、系統差・種差も存在する可能性が考えられた。

本研究では、繁殖期及び非繁殖期におけるハムスターの精子発生の構造的変化や関連因子発現変化の確認とマウスとの比較を通して、精子発生における種差・系統差を明らかにした。本実験でハムスターを用いたが、精子発生の仕組みをハムスターで評価したメリットはハムスターが生

理的に精子発生を停止・再開できる点だけではない。ヒトは周年繁殖動物と思われているが、ヒトの生殖機能もハムスターを始め多くの季節繁殖動物の生殖機能を制御している日照時間と、それに関連したメラトニンの影響を大きく受けている。複数の地域における疫学調査によると、赤道近辺の住民に比べ北方の地域の住民は視床下部—性腺機能により明らかな周期性が認められ、夏ごろに機能のピークを迎えるため夏ごろの出産率が高くなる傾向が確認されている (Rojansky et al., 1992)。またメラトニンの分泌異常が少年の性成熟の時期異常や女性の視床下部性無月経症を引き起こす事も知られている (Silman et al., 1979; Arendt 1995)。さらに、メラトニンはフリーラディカルのスカベンジャーとして、あるいは受容体を介した抗酸化物質生成促進を通して抗酸化作用を有する (Hardeland, 2005) が、この抗酸化作用はヒトの生殖能力の維持にも重要な役割を担っている。すなわち、炎症性反応等により生じた酸化ストレスは精子に障害を引き起こすが、精液中に存在するメラトニン (Bornman et al., 1989) により、この障害を軽減させる事ができる (du Plessis et al., 2010)。さらに、精子にはメラトニン受容体が存在し、メラトニンの作用が鞭毛運動の制御に関わっている可能性が示唆されている (van Vuuren et al., 1992; du Plessis et al., 2010)。このように季節繁殖動物で精子発生を制御する主要因子である日照時間・メラトニンがヒトの生殖機能においても重要な役割を担っており、ヒト精子発生への外挿性の面で、ハムスターは周年繁殖動物とは異なる新たな切り口となりうる動物と考えられる。また、SSC維持に関しても、ハムスターを含むげっ歯類のヒトを含む霊長類への外挿性の是非について近年議論されているが、それら報告によると、A型精祖細胞のステージ分類の仕方こそげっ歯類と霊長類で異なるものの、GFR α 1 など、その発現するマーカー遺伝子や自己複製・分化の制御については高い外挿性を示す事が示唆されている (Dym et al., 2009; Hermann et al., 2010)。

以上より、本研究で採用・構築した ACN ハムスター及び Slc ハムスターの非繁殖期導入系は、精子発生の仕組みを理解・評価し、ヒトで不妊治療の対象となるような配偶子形成不全の原因を探る際に、あるいは薬剤性副作用として見られる精巣障害のメカニズム解明の際に有用な動物モデルとなりうると思われた。