

〔別紙2〕

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐藤 剛

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、それを可能にする精巣幹細胞 (SSC (Spermatogonial Stem Cell)) を維持する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。しかし研究に使用される動物の多くがマウスやラットといった常に精子発生を行っている周年繁殖動物であった。そこで本研究では、精子発生の停止・再開を実験室で行うことができる季節繁殖動物ゴールデンハムスター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及び精巣幹細胞維持関連因子を評価し既知のマウスのそれと比較する事で、精巣幹細胞維持メカニズムの解明及びその種差の評価を試みた。

まず第一章では、ハムスターを短日条件/低温条件/制限給餌等に曝露する事で非繁殖期へ誘導し、精子発生停止・再開時の継時的形態変化及びその関連蛋白の発現を探る事で、非繁殖期の精子発生を確認・評価した。その結果、精子発生が停止した状況で高頻度に精母細胞のアポトーシスが観察され、またライディッヒ細胞における LH-R 発現及び 3 β -HSD 発現の低下が認められた。この結果から、短日条件/低温条件/制限給餌等による精子発生の低下・回復遅延は、ホルモン関連因子 (LH-R, 3 β -HSD) の低下とそれに続く精母細胞のアポトーシスの増加が原因と推測され、非繁殖期の精子発生プロファイルが明らかとなった。

次に第二章では、第一章で構築したハムスターの非繁殖期誘導系を用いて、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考えられている SSC の維持の仕組みについて評価を行った。すなわち幹細胞の自己複製に必要と考えられる微細空間 (ニッチ) の主要な外的因子の1つと考えられている GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor) の精巣切片内の発現・分布を調べた。その結果、繁殖期ハムスターにおいて、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、非繁殖期ハムスター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。これらの結果から、マウスやショウジョウバエで恒常的に存在すると考えられてきたニッチが、ハムスターでは決して恒常的ではなく流動的で、GDNF の発現とともに出現・消失を繰り返すものである可能性が示唆された。

GDNF はセルトリ細胞から分泌され SSC へ作用する事で自己複製が可能となると考えられる事から、ニッチの評価には細胞外へ分泌された GDNF の局在を評価する必要がある。しかし、第二章では切片での免疫染色で評価していたため細胞質内の GDNF シグナルも検

出してしまっていると考えられる。従って第三章では、細胞外に分泌された GDNF のみを主として検出するため、膜透過処置を施さない全載精細管を本実験に使用した。そして、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 (SSC を含む未分化型精祖細胞) の共局在, あるいは GDNF 顆粒と c-kit 陽性細胞 (分化型精祖細胞) との共局在を調べる事で具体的にニッチの領域の特定を試みた。その結果, 繁殖期では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となった。さらに, 精細管基底区画で GDNF 顆粒と GFR α 1 陽性細胞 (未分化型精祖細胞) は共局在を示したが, 一方で多くの GDNF は c-kit 陽性細胞 (分化型精祖細胞) と共局在を示す事も明らかとなった。また, ハムスターの GFR α 1 陽性細胞はその細胞密度はマウスより少なく, その形態はマウスより細胞質を伸展させており, これは GFR α 1 陽性細胞が GDNF 発現領域に入りこもうとしている事を示唆する結果と推測された。さらに, 非繁殖期において低レベルの GDNF 発現が認められたがそれに周期性は認められなかった。

以上より, 本研究では繁殖期及び非繁殖期ハムスターにおける GDNF の局在及び GDNF と SSC との共局在を調べる事で, ニッチは精細管基底区画に存在する事を明らかにした。さらに本研究は, ハムスターのニッチはこれまでショウジョウバエで考えられてきたような特定領域に定着して永久的に配偶子を精算する静的なニッチとも, GDNF 発現が精細管内でほぼ恒常的に認められるマウスのニッチとも異なり, 精上皮周期の変動あるいは非繁殖期への移行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初めて示したものである。これらの研究成果は, 獣医学学術上貢献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。