

Title	Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of Atm-null testis
Sub Title	Atm遺伝子欠損精巣における精原細胞の異常
Author	田久保, 主誉
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.2 (2007. 6) ,p.17-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20070602-0017

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Premeiotic germ cell defect in seminiferous tubules of *Atm*-null testis

(*Atm*遺伝子欠損精巣における精原細胞の異常)

田久保 圭 菅

内容の要旨

哺乳類の精子形成は精巣の中にある精細管で行われる。精子は精原細胞から分化して造られる。精原細胞分画の中に、自己複製によって自己を維持する精子幹細胞が存在し、この幹細胞分画によって個体の精子形成が生涯に亘り維持されていく。このように精子形成において重要な役割を担う精子幹細胞であるが、その完全な純化と、性状解析はいまだ行われていない。

我々の研究グループはこれまでに成体骨髄の造血幹細胞の未分化性維持と自己複製機構でヒトの毛細血管拡張性小脳失調症 (Ataxia Telangiectasia: A-T) の原因遺伝子である Ataxia Telangiectasia-Mutated (*Atm*) に注目してきた。このノックアウトマウスの骨髄造血幹細胞は活性酸素種 (ROS) の上昇により、p38MAPK および p16^{INK4a} が活性化し、最終的に枯渇することが明らかとなった。このマウスの精子形成不全は、減数分裂期の DNA 修復の異常が寄与しているとされているが、幹細胞を含む精原細胞分画についての解析はほとんどなされていない。近年になって幹細胞システム間で共通の分子基盤がその未分化性維持に寄与していることが明らかとなっているため、今回われわれは精巣の幹細胞システムの未分化細胞分画を維持する分子基盤について、*Atm* ノックアウトマウスを用いて検討を行った。

まず、ATM は精原細胞では核内にドット状の染色パターンで活性化していることが明らかとなった。これまで *Atm* 遺伝子を欠損した精巣では減数分裂期の異常しか言及されてこなかったため、改めて *Atm* 遺伝子欠損マウスの精細管の形態学的変化を経時的に観察したところ進行性の精原細胞の喪失を認めた。これらの観察を併せると、精原細胞の維持に *Atm* 遺伝子が寄与している可能性が示唆された。

次いで精巣においても *Atm* 欠損マウスに NAC を経口投与して、この精原細胞の喪失も回復できるかを検討したが、ほとんど回復できないことが明らかになった。また、*Atm* 欠損造血幹細胞の枯渇に寄与する p16^{INK4a} の上昇も認められなかった。すなわち、造血幹細胞の異常とは異なるメカニズムの寄与が強く疑われた。

その一方、8 週齢のマウスでは *Atm* ノックアウトで BrdU 陽性の精細管が 25.0 ± 5.8% と、野生型 (61.1 ± 4.4%) に比して著大な減少を認め、また TUNEL 法および FACS によって精原細胞は野生型に比べて有意にアポトーシスが亢進していることが確認された。これらの異常の分子基盤を検討するために、EpCAM 陽性の精原細胞での cyclin D ファミリーと Bax の遺伝子発現をリアルタイム PCR によって検討したところ、精原細胞では cyclin D1 と D2 の発現が低下と Bax の発現の上昇を認めた。これらの遺伝子発現の変化は *Atm* 欠損精原細胞の細胞周期停止とアポトーシスの分子基盤の一端に寄与していると考えられる。

本研究から、*Atm* 遺伝子を欠損した精巣では、これまで他のグループによって記載されてきた減数分裂期の異常に加えて、それ以前の分化段階の精原細胞にも細胞周期停止とアポトーシスの亢進という異常があることが明らかになった。精原細胞分画は精子幹細胞を含む分画であり、*Atm* 遺伝子欠損によって造血幹細胞以外の幹細胞システムにも異常がある可能性が示唆された。

論文審査の要旨

哺乳類精巣の精細管内にある精子幹細胞システムは、幹細胞を含む未分化細胞から終末分化した精子にいたるまでを核の染色性をもとに容易に峻別できるという点で特異な幹細胞システムである。その一方、幹細胞分画の維持に関与する分子基盤や、表面抗原等の分子マーカーについては未だ明らかとなっていない部分が多い。本研究では、ノックアウトマウスモデルを用いた *Atm* 遺伝子の機能解析を通じて、幹細胞分画を含む精原細胞の維持に ATM が必要であり、*Atm* 欠失条件下では進行性の精原細胞の消失が見られることを明らかにした。また、そのメカニズムとしては細胞周期の停止とアポトーシスの亢進の関与が示唆されることも明らかとなった。本研究はこれまで知られていた減数分裂期における ATM の機能に加えて、より未分化な細胞分画においても ATM が活性化し、その機能が精原細胞分画の維持に寄与していることを明らかにした。

審査では、まず、抗酸化剤 N-acetyl-L-cysteine (NAC) が血液精巣関門を通過して作用しているかについての質問があり、活性酸素の指標となるジハイドロエチディウム染色の染色性の亢進が、NAC 投与群によって低減していることから通過していると考えられるとの回答がなされた。さらに、ジハイドロエチディウム染色の具体的方法についての質問があり、精巣の未固定新鮮凍結切片を作成後、可及的速やかに 37℃ のインキュベーションチャンパーにおいて染色を行うとの回答がなされた。

次に、*Atm* 欠損マウスにおける精子形成不全は、精細胞そのものではない、体細胞成分であるライディッヒ細胞やセルトリ細胞の異常による機序を除外することはできるかについて議論された。これに対し、ノックアウトモデルにおいて進行性の幹細胞減少が見られること、早期の、ライディッヒ細胞の過形成がみられない時期においても、*Atm* 欠損マウス由来の精巣細胞は精細管への移植実験において移植生着能が強度に障害されていること、さらには *in vitro* の精子幹細胞培養系においても ATM 阻害によって幹細胞の喪失がみられることなどから、幹細胞自体の欠陥と結論したとの回答があった。

また、*Atm* 欠損マウスにおける造血幹細胞減少と今回発表された精子幹細胞の減少の機序の違いについての質問があった。これに対し、前者は、p16^{INK4a} の発現上昇を介した老化シグナルによる幹細胞の枯渇であり、後者は、細胞周期停止とアポトーシスシグナルによるもので、おそらくは、組織ごとの DNA 損傷に対する反応の違いではないかと説明された。その他、ATM の標的遺伝子、小脳失調の機序などについても、質問があったが、おおむね的確な回答が得られた。

本論文は精子幹細胞を含む未分化精巣細胞分画の検討により、ATM の新たな精子形成における役割を明らかにした意義は大きく、学位論文としてふさわしいと評価された。

論文審査担当者 主査 発生・分化生物学 須田 年生
生理学 岡野 栄之 泌尿器科学 村井 勝
医化学 末松 誠

学力確認担当者：
審査委員長：岡野 栄之

試問日：平成19年1月18日