



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Analysis of molecular and cellular mechanisms regulating medaka (<i>Oryzias latipes</i>) spermatogenesis, using a newly established cell culture system [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	佐藤, 竜一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13951号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78048
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryuichi_SATOH_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 佐 藤 竜 一

学 位 論 文 題 名

Analysis of molecular and cellular mechanisms regulating medaka (*Oryzias latipes*) spermatogenesis,
using a newly established cell culture system
(新規に開発した細胞培養系を用いたメダカ (*Oryzias latipes*) 精子形成を制御する
分子細胞機構の解析)

生殖細胞の増殖・分化機構の解明は、基礎生物学的観点のみならず、その応用展開（遺伝子組換え生物の作出、絶滅危惧生物の生殖細胞保存、性判別、不妊治療など）においても重要である。精巣は生殖腺刺激ホルモンや雄性ホルモンに反応して様々な分子を産生し、それら分子はパラクラインやオートクラインを介して精子形成細胞の適切な増殖や分化を制御することは知られているが、ホルモン刺激の下流で機能する分子の実体とそれらの機能はほとんど理解されていない。

生殖細胞の培養技術は複雑な制御機構の理解を進める実験系として、また上記のような技術応用において非常に重要である。近年、器官培養を用いることでマウスにおいて全精子形成過程を再現することが可能となり、ゼブラフィッシュにおいてもフィーダー細胞を利用した細胞培養（分散培養）で全精子形成過程を再現できている。これら以外にも様々な動物種で、精子形成過程の一部が試験管内（*in vitro*）で再現されている。メダカの精子形成細胞培養系の開発は複数の研究グループで進められ、精母細胞から機能的な精子を作製することは可能だが、精原細胞からの成功例はない。精巣はホルモンに反応し、精子形成細胞の適切な増殖や分化を制御する様々な分子を産生する。ゼブラフィッシュ培養系の結果から推測して、セルトリ細胞と各種ホルモンを利用することで、メダカ精原細胞から機能的な精子を作製できる可能性が高いと判断される。メダカで全精子形成過程を再現することができれば、器官培養を用いるマウスよりもより単純で詳細な解析が可能となる。さらに、メダカとゼブラフィッシュの種としての分岐は約2億年前で、種間の類似性と差異を調べるのに有用であり、両種を比較することで精子形成を調節する機構のより良い理解につながる。

上記のような研究の実現可能性と発展性から、本研究ではメダカを用いて新たな細胞培養系を構築し、得られた培養系を用いて精原細胞の増殖・分化機構を調べた。特にサイトカインの1種である白血病抑制因子（leukaemia inhibitory factor: LIF）に注目し、その発現と機能を解析した。

学位論文は2章からなる。第I章ではメダカ精子細胞形成の培養条件を検討した。より詳細に培養条件を評価するため、メダカ精巣細胞からセルソーターで精原細胞を多く含む画分を得て、培養に用いた。これまでの培養液（S medium）にレチノール、コイ血清、human chorionic gonadotropin, pregnant mare serum gonadotropin, porcine follicle stimulating hormoneを加えて、新しい培養液（MS medium）を作製した。さらにフィーダー細胞として p53(癌抑制遺伝子)をノックアウトされたメダカ精巣から由来した体細胞株（Mtp1）を用いた条件（MS medium/Mtp1）も検討した。パルスラベルで BrdU を取り込んだ細胞を数えた結果、S medium よりも MS medium、さらに MS medium/Mtp1 で DNA 複製が亢進することがわかった。また、MS medium と MS medium/Mtp1 では精原細胞から精子が形成されることを確認した。

Mtp1 は複数種の細胞を含む集団と予想されたため、まずセルトリ細胞に特有なファゴサイトーシス活性について調べた。その結果、一部の細胞がファゴサイトーシス活性を持つことがわかった。さらに RT-PCR を用いてセルトリ細胞マーカー（Gsdh と Sox9b）、ライディッヒ細胞マーカー

(p45011 β と 11 β HSD2)、生殖細胞マーカー (olvas) の遺伝子発現を調べた。その結果、Mtp1 は Gsdf、Sox9b、p45011 β 、11 β HSD2 の mRNA を発現しているが、olvas の発現は見られないことがわかった。以上の結果から、Mtp1 にはセルトリ細胞とライディッヒ細胞が混在しており、生殖細胞は含まれないと結論された。より詳細な解析ができるように Mtp1 のクローニングを行った。その結果、形態やサイトカインの発現が違う複数種の細胞株が得られた。得られた複数の細胞株はメダカのシスト構造に由来した遺伝子発現をしている可能性があり有用である。

S medium、MS medium、MS medium/Mtp1 の 3 条件で 15 日間培養して作製した精子を用いて卵を授精させる実験により、得られた精子の機能を評価した。その結果、旧来の S medium では受精率はほぼ 0%で、正常発生胚は得られなかったのに対し、MS medium では受精卵と正常発生胚が得られ、MS medium/Mtp1 では受精率と正常胚発生率がさらに向上した。また、この人工授精で得られたメダカ個体は妊性を有し、次の世代も継代できることを確認した。以上のように、第 I 章では精原細胞から次世代を作ることのできる機能的な精子を *in vitro* で作製する新たな実験系をメダカで初めて確立することに成功した。

第 II 章ではまず、長期にわたって育てた p53 ノックアウトメダカ精巣は精原細胞の割合が増加し、精母細胞の割合が減少することをエリア解析から突き止めた。加えて、サイトカインの発現を qRT-PCR を用いて定量し、Lif、il-11b、Mif の遺伝子が亢進していることがわかった。次に最も顕著な結果だった Lif についてメダカ精巣における機能を明らかにするため、第 I 章で確立した培養系を用い、Lif の精原細胞増殖への影響を調べた。その結果、バキュロウイルス産生組換えメダカ Lif タンパク質の培地への添加が精原細胞の増殖を促すことがわかった。より詳細な効果を調べるため、Lif 過剰発現 Mtp1 細胞を作成し、セルソーターを用いて精原細胞を濃縮した細胞のうちごく少数の細胞を生きたまま蛍光色素トレースすることのできる PKH26 で染めて、染めた細胞がどのように分化していくか調べた。その結果、Lif は減数分裂に移行する直前ではなく、それよりも未分化な精原細胞の増殖を促進することを見出した。また、Lif の mRNA とタンパク質が精原細胞とその周囲のセルトリ細胞で発現していることも確認した。これらの結果は、Lif がメダカ精原細胞の増殖を調節することを示唆する。このように第 II 章では、これまで未知であったホルモン刺激の下流で、サイトカインの Lif が精原細胞の増殖に機能している可能性が初めて示された。

以上のように、新規に確立したメダカ精子形成培養系は精原細胞から次世代を正常に作ることの出来る機能的な精子を作り出すことができる。これを用いることで、これまでほとんど理解されていないホルモン刺激の下流で機能する分子の同定と詳細な機能を明らかにできることが本学位論文で示された。本研究で開発された新規細胞培養系は、メダカの精子形成制御機構を研究するうえで非常に強力な実験系である。加えてクローニングした Mtp1 細胞を用いた培養や、遺伝子組換え技術によるフィーダー細胞と生殖細胞の遺伝子ノックアウトなど、さらなる詳細な実験系の構築も見込まれ、生殖細胞の増殖・分化機構の解明に貢献する重要な実験系となり得る。