

(続紙 1)

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	Mahesh Gajanan Sahare
論文題目	Establishment of Long-Term Culture and Elucidation of Self-Renewal Mechanisms of Primitive Male Germ Cells in Cattle (ウシ雄性生殖幹細胞の長期培養系の確立と細胞増殖メカニズムの解明に関する研究)		
(論文内容の要旨) 雄性生殖幹細胞は、精巣内において、精子を生産するように決定付けられた幹細胞であるが、マウスでは、雄性生殖幹細胞を体外に取り出して培養すると多能性幹細胞にリプログラムされることが知られている。しかし、家畜では雄性生殖幹細胞の体外培養系は未だに確立されていない。家畜における多能性幹細胞は、効率的な遺伝的改良などへの応用価値が高いことから、本研究ではウシ精巣由来の雄性生殖幹細胞の体外での培養とその自己増殖メカニズムの解明を試みた。 雄性生殖幹細胞が体外で増殖するための細胞接着基質について検討したところ、精巣内での細胞外基質として知られているコラーゲンTypeIV、ゼラチンおよびラミニンといった一般的な基質ではなく、Poly-L-lysineでコートした培養皿が幹細胞の増殖と多能性幹細胞のコロニー形成を支持した。またこの培養系では、体細胞の増殖は抑制され、結果として幹細胞の純化にも有効な培養系であることが明らかとなった。通常の細胞培養において、培養液中に添加するウシ胎仔血清は、精巣由来の体細胞の増殖を促すが、生殖幹細胞の増殖を抑制した。そこで幹細胞の培養に用いられる数種類の血清代替物質を検討したところ、Knockout Serum Replacement (KSR)が2ヶ月以上(13継代)にわたって体外でウシ生殖幹細胞の自己増殖とコロニー形成を可能にした。得られた雄性生殖幹細胞は、生殖幹細胞としての特異的マーカーであるPGP9.5、DDX4、DBA、GFR $\alpha$ -1を発現するとともに、OCT3/4、NANOG、E-CADといった多能性幹細胞マーカーを発現し、正常な染色体数を維持しながら安定して増殖する細胞株であった。さらに、培養液中のKSRを15%ウシ胎仔血清に置き換え、生殖幹細胞株を非接着性の培養皿で培養して細胞分化を誘導すると、三胚葉性の細胞群に分化させることができた。 次いで、樹立した雄性生殖幹細胞株の自己増殖を支持する細胞増殖シグナル伝達系について検討した。マウスでは、雄性生殖幹細胞の自己増殖は、精巣内のセルトリ細胞が分泌する成長因子 GDNFとそのレセプターGFR $\alpha$ -1が関与するPI3K/AKTシグナル伝達系が自己増殖に必須と考えられている。そこで、樹立した細胞株でPI3K/AKTおよびMAPK/CDKのシグナル伝達系の阻害剤を培養液中に添加して、細胞の自己増殖能について検討したところ、PI3K/AKT阻害剤では細胞増殖に全く影響は認められないのに対して、MAPK/CDK阻害剤では幹細胞の増殖は著しく低下した。MAPK/AKTシグナル伝達系はMAPKのリン酸化によって誘導されているが、MAPK阻害剤下ではMAPK44/42サイトにおけるリン酸化が誘起されていなかった。細胞周期G1チェックポイントに重要なCyclin D1、D2およびD3とCDK2との関係について検討したところ、MAPK/CDK阻害剤ではCyclin D1とCDK2の発現が強く抑制されているのに対して、PI3K/AKT阻害剤ではCyclin D1、D2、D3とCDK2の発現に全く影響はなかった。このことから、雄性生殖幹細胞株の体外での自己増殖において、マウスとウシではそれぞれ異なったシグナル伝達系を利用していることが示唆された。 以上のことから、ウシ精巣から生殖幹細胞を分離し体外で長期培養が可能な培養系を開発するとともに、生殖幹細胞としての性質とともに、多能性幹細胞としての性質も併せ持つ多能性幹細胞株を樹立した。この細胞株は、安定的に体外で自己増殖するとともに、MAPK/CDK2シグナル伝達系によって細胞の増殖と多能性が維持されていることを明らかにした。			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

マウス精巣内に存在する生殖幹細胞は、体外に取り出すとリプログラムされ、多能性幹細胞としての性質を獲得する。本研究では、多能性幹細胞株が未だに樹立されていない家畜において細胞株を樹立することを目的として、雄性生殖幹細胞の長期体外培養系の開発と体外で生殖幹細胞が増殖するメカニズムの解明を試みた。得られた成果は以下のようにまとめられる。

1. 生殖幹細胞の培養において、細胞による細胞外基質の選択性は体細胞と幹細胞では非常に異なり、生殖幹細胞はPoly-L-lysineでコートした培養皿において増殖が支持され、体細胞の増殖は抑制された。

2. 生殖幹細胞の体外培養において、培養液に添加する成長因子およびタンパク質源について検討した結果、成長因子GDNFは生殖幹細胞の増殖の維持に不可欠であった。また、ウシ胎仔血清の存在は体細胞の増殖を刺激する一方、生殖幹細胞の増殖には抑制的であり、血清代替物質であるKSRの利用によって、生殖幹細胞の増殖と多能性細胞のコロニーの形成が維持された。

3. 生殖幹細胞の体外での自己増殖メカニズムについて検討を行った。培養液中に添加したGDNFは、MAPKのリン酸化を促し、MAPK/CDKシグナル伝達系に関連する遺伝子群を活性化した。このシグナル伝達系の阻害剤は、生殖幹細胞の増殖と幹細胞コロニーの形成を抑制し、細胞周期に関与するCyclin D1やCDK2の発現を抑制したことから、ウシの生殖幹細胞の自己増殖にはCyclin D1とCDK2を介したMAPKシグナル伝達系が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上のように、本論文はウシ精巣内に存在する生殖幹細胞を体外で長期的に培養することを可能にし、その自己増殖メカニズムを解明したもので、家畜増殖学、家畜育種学、家畜生産学、発生生物学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年6月4日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）