

氏名	かき い しん や 笠 井 慎 也
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2654 号
学位授与の日付	平 成 16 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Haploinsufficiency of <i>Bcl-x</i> leads to male specific defects in fetal germ cells: differential regulation of germ cell apoptosis between the sexes ( <i>Bcl-x</i> のヘテロ遺伝子欠損は胎仔生殖細胞において雄特異的な異常を引き起こす：生殖細胞のアポトーシス制御における雌雄間の相違)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 田 潤 教 授 藤 井 信 吾 教 授 中 辻 憲 夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 背景

生殖細胞は個体の遺伝情報を次世代に伝える細胞系譜であり、その発生過程で起こる細胞死には、致命的なエラーを起こした細胞を除去した後に遺伝情報を正確に次代に伝えるという重要な働きがあると考えられる。マウス生殖細胞は胎齢13日後に雌では減数分裂、雄では細胞分裂休止期に移行し、雌雄で異なった細胞周期の制御が開始する。一方胎仔生殖細胞のアポトーシス制御についてはこれまでに殆ど解析が行われていない。アポトーシス抑制分子である *Bcl-xl* 遺伝子を欠損した *Bcl-x(-/-)* マウスは胎性致死であるが、本研究では *Bcl-x(+/-)* マウスが精巣委縮を示すことを見出し、同マウスの解析を通して胎仔生殖細胞はその生存期間において雌雄で異なった調節を受けることを明らかにした。

#### 方法

*Bcl-x(+/-)* マウスの成体精巣、卵巣及び雌雄胎仔生殖巣を組織染色、免疫組織染色法により解析し、TUNEL法を用いてアポトーシスする細胞数の変化を詳細に調べた。また雌雄胎仔生殖細胞の発生分化過程における *Bcl-x*、*Bax* mRNA、及び両蛋白質の発現量の変化を real-time RT-PCR、定量免疫組織染色法により解析した。更に雌雄胎仔生殖細胞を生殖巣体細胞の存在下及び非存在下で培養後、アポトーシス及びBCL-xの発現量を比較することで、胎仔生殖細胞のアポトーシス制御における生殖巣体細胞の影響の有無を検討した。

#### 結果

*Bcl-x(+/-)* マウスでは精巣の委縮が観察される一方、卵巣及び体細胞組織に明瞭な異常は見られない。*Bcl-x(+/-)* 精巣では野生型と比較して生殖細胞が顕著に減少するが、これは胎齢13日前後に雄胎仔生殖細胞のアポトーシスが亢進するためである事が明らかとなった。一方、本研究の過程で野生型胎仔の生殖細胞においても胎齢13日前後に雌と比べて雄でアポトーシスの頻度が有意に高い事を見出した。同時期の胎仔生殖細胞における *Bcl-xl* の発現は雄より雌で高い一方、BCL-xlと複合体を形成するアポトーシス促進分子であるBAXの発現量に雌雄差は認められない。この事から胎齢13日前後の雄生殖細胞では雌と比べて、BCL-xlのBAXに対する存在比が低く、アポトーシスの頻度が増加するが、BCL-xのヘテロ遺伝子欠損によりその差が顕著に現れたものと考えられた。一方、胎齢13日前後の雌雄生殖細胞を生殖巣体細胞と共に培養するとアポトーシス及びBCL-xの発現量の雌雄差が再現されたが、生殖巣体細胞から分離後に培養を行うと雌雄生殖細胞共に雌生殖細胞と同じパターンを示した事から、雄生殖巣体細胞が胎仔生殖細胞のアポトーシスの雌雄差を制御する事が明らかとなった。

#### 考察と結論

マウス胎仔生殖細胞は生殖巣原基の形成に伴い雌雄で異なった細胞周期の制御を受けるが、本研究では (1) 同時期に胎仔生殖細胞は雌雄で異なったアポトーシスの制御を開始すること、(2) この胎仔生殖細胞の雌雄差にBCL-xが関与すること、(3) 同現象を雄胎仔生殖巣体細胞が制御すること、を示した。これは哺乳類生殖細胞の発生過程で起こる新たな現象と

それに関与する機構、分子を同定したものであり、生殖細胞の特性に関与する新規の知見と今後の解析の手掛かりを与えるものと考えられる。本研究で示された様に生殖細胞がアポトーシス関連分子の存在量の変動に感受性が高い事は、同細胞の質と生存に対する厳密なチェック機構の存在を示唆し、個体発生と世代維持に関与する細胞系譜に特徴的な性質の一つを表すものと考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究により、マウス胎仔生殖細胞は雌雄で異なった生存調節を受けることが明らかになった。

申請者は、*Bcl-x*(+/-)マウスでは卵巣及び体細胞組織に異常が見られない一方、精巣が委縮する事を見いだした。*Bcl-x*(+/-)マウスでは野生型と比べ雄生殖細胞が顕著に減少し、これは胎齢13日前後での雄胎仔生殖細胞におけるアポトーシスの亢進によることが明らかとなった。また胎齢13日前後の野生型胎仔生殖細胞でも雌と比べて雄でアポトーシスの頻度が高い事を見いだした。同時期の胎仔生殖細胞ではBCL-xの発現は雄より雌で高く、BAXの発現量には雌雄差が認められない。一方、胎齢13日前後の雌雄生殖細胞を生殖巣体細胞存在下で培養するとアポトーシス及びBCL-xの発現量の雌雄差が再現され、生殖巣体細胞非存在下で培養を行うと雌雄生殖細胞共に雌生殖細胞と同じパターンを示した。この事から胎齢13日前後の雄生殖細胞では、雄生殖巣体細胞からの作用を受け、BCL-xのBAXに対する存在比が雌と比べて低くなった結果、アポトーシスの頻度が増加し、*Bcl-x*のヘテロ遺伝子欠損によりその差が顕著に現れたものと考えられた。以上の研究は、胎仔生殖細胞のアポトーシス及びその制御機構に雌雄差があることを初めて示したものであり、哺乳類生殖系列細胞の発生、分化機構の解明に寄与するところが多い。

したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成15年11月7日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。