

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	藤原 摩耶子
論文題目	家畜の精巣由来生殖幹細胞の保存と体外培養に関する研究		
(論文内容の要旨)			
幼若期の精巣中に存在する前精原幹細胞は、性成熟にともない精原幹細胞へ分化する。これらの細胞は、自己増殖能を持つ生殖幹細胞と考えられているが、その性質については、ほとんど明らかにされていない。特に、家畜を含む大型動物における生殖幹細胞の体外での培養とその利用方法に関する研究は限られている。大型動物の生殖幹細胞を遺伝資源として利用できれば、家畜改良の効率化や希少動物の遺伝資源保全、さらにはヒト生殖医療・再生医療への応用など幅広い応用の可能性がある。本研究では、ウシおよびブタの精巣内生殖幹細胞を用い、その細胞学的特性を解明し、長期保存法を確立するとともに、長期的な体外培養の可能性を探ることを目的とした。 ブタおよびウシの幼若期から性成熟後までの精巣内の生殖幹細胞について、生殖細胞および幹細胞マーカーを用いてタンパク質の発現動態を調べた。ブタ前精原幹細胞は、生後2週齢までは精細管内中央に位置し、前精原幹細胞特異的マーカーであるレクチンDBAとともに、生殖細胞マーカーであるVASAと幹細胞マーカーであるOCT3/4が発現していた。一方、ウシ前精原幹細胞は、生後3か月齢まで精細管内中央に位置し、生殖細胞マーカーであるDBA、UCHL1およびVASAと幹細胞マーカーのNANOGとOCT3/4に陽性であった。しかし、性成熟後のウシ精巣では、幹細胞マーカーのNANOGおよびOCT3/4と生殖細胞マーカーのVASAは、精原幹細胞から分化した精母細胞や円形精細胞で発現が観察された。これらのマーカーの発現パターンは、基本的にブタ精巣でも同様であった。以上の結果から、ブタとウシの幼若期精巣中の前精原幹細胞は生殖幹細胞としての性質を持ち、この性質は成体精巣中の精原幹細胞とは異なることを明らかにした。 次に、精巣の低温下での保存条件および生殖幹細胞の超低温下での長期保存条件について検討した。その結果、Hepes含有DMEM/F12溶液中で、4℃で24時間保持したブタの幼若期精巣から、高い生存率の前精原幹細胞を回収することができた。また、ウシの幼若期および成体の精巣にもこの保存条件が有効であることを示した。さらに、保存後の精巣から回収したブタ前精原幹細胞を、血清、SucroseおよびDMSOを耐凍剤として含むDMEM/F12で凍結した場合、融解後の細胞の生存率は高く維持され、体外培養後も前精原幹細胞としての性質を維持しうることを示した。 最後に、ウシ前精原幹細胞および精原幹細胞の長期体外培養を試みた。成体精巣由来の精原幹細胞は、培養開始直後からDBAおよびUCHL1陽性のコロニーを形成するが、細胞の増殖は限定的なものであった。一方、幼若期精巣由来の前精原幹細胞では、生殖細胞および幹細胞マーカーに陽性で、持続的な細胞増殖が少なくとも継代6回目（約1.5ヶ月）まで観察された。これらの細胞は、生殖細胞除去マウス精巣の精細管へ定着することから、体外で長期間生殖幹細胞の性質を維持したまま培養可能であることが示された。 本研究により、ブタとウシの前精原幹細胞および精原幹細胞について、その生殖幹細胞としての細胞学的特性を明らかにし、長期保存、長期体外培養によって遺伝資源として利用できる可能性を示した。これらの研究成果は、大型家畜動物の精巣内生殖幹細胞についての理解をもたらすとともに、新たな遺伝資源として保全・利用技術を開発する上で有用な情報を提供するものと考えられる。			

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

哺乳動物の精巣中に存在する生殖幹細胞は、性成熟期をへて生殖細胞（精子）を持続的に生産し続けるが、一部の幹細胞は自己増殖を行い、生殖幹細胞として精子形成の基盤を支えている。また、マウスなどのげっ歯類では、生殖幹細胞が体外培養によって多能性幹細胞としての性質を獲得することも知られている。しかし、家畜などの大動物では、生殖幹細胞に関する研究は限られ、その細胞特性や利用に関してはほとんど検討されていない。

本研究では、家畜由来の生殖幹細胞を将来的に家畜改良や遺伝資源のソースとして利用することを想定し、ウシおよびブタの前精原幹細胞とこれらの細胞から分化した精原幹細胞を用い、その細胞学的特性を解明し、組織・細胞レベルでの保存法を確立するとともに、長期的な体外培養の可能性について検討したものである。評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. ウシおよびブタの精巣を用いて、前精原細胞から精原幹細胞へ分化する過程を生殖細胞および幹細胞マーカーの発現を詳細に検討した。生殖幹細胞は、細胞分化の進行にともない、精細管中央部より基底膜上へと移動するとともに、ダイナミックな幹細胞マーカーの変化が起こった。特に、前精原幹細胞を特異的に識別するマーカーであるレクチンDBAは細胞分化の開始初期に消失し、生殖細胞マーカーのVASAが強い発現を示した。また、細胞分化の過程においても、幹細胞特異的マーカーであるOCT3/4の発現が認められたが、その局在は細胞核から細胞質への移行することから、OCT3/4の本来の機能を消失した可能性を示唆した。

2. 生殖幹細胞を遺伝資源のソースとして利用するために、その由来となる精巣とそこから分離・精製した生殖幹細胞の低温下、超低温下における保存技術の確立を試みた。その結果、精巣は低温下（4℃）で24時間（ブタ）および48時間（ウシ）の保存が可能であり、それらの精巣から分離した幹細胞はヌードマウスの精巣内に注入することによって、定着・増殖可能であることを示した。また、保存後の精巣から生殖幹細胞を分離し、液体窒素下で保存・融解後に体外培養およびマウス精巣内での増殖が可能であり、長期保存後も生殖幹細胞としての性質を保持していることを明らかにした。

3. ウシの前精原幹細胞および精原幹細胞を用いて、長期的な体外培養系の開発を試みた。前精原幹細胞は、培養開始直後から未分化細胞様のコロニー形成が観察され、少なくとも1.5カ月にわたって維持された。これらのコロニーは、幹細胞マーカーに陽性を示すとともに、マウス精巣内での増殖も認められ、生殖幹細胞としての性質を維持していた。しかし、前精原細胞より分化の進んだ精原幹細胞の体外培養期間は1週間に限られ、幹細胞の分化にともない細胞の性質が大きく変化することが示唆された。

以上のように、本論文は精巣中に存在する生殖幹細胞の細胞特性を明らかにするとともに、その長期的保存と体外培養に道を開いたものであり、生殖生物学、家畜繁殖学、畜産資源利用学、希少動物保全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 23 年 2 月 17 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) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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