

氏 名	こ ばやし とし ひろ 小 林 利 寛
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1305 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Production of Erythropoietin in the Reproductive Organs (生殖器官におけるエリスロポエチン生成)

(主 査)
論文調査委員 教 授 永 尾 雅 哉 教 授 伏 木 亨 教 授 吉 川 正 明

論 文 内 容 の 要 旨

エリスロポエチン (Epo) は赤血球前駆細胞に作用し、その分化・増殖を促進することで赤血球量の調節を行う糖タンパク質である。この赤血球造血に関わる Epo は成体においては腎臓で生産されるが、その生成の調節は酸素によって行われる。しかし、Epo は脳でも生成され、神経栄養因子として作用すること、子宮内でも合成され、血管新生促進因子として機能することが明らかになった。本研究では、子宮での Epo 産生制御が主としてエストロゲン (E2) によってなされることを発見したことを契機として、さらに別の雌性生殖器官、および雄性生殖器官での Epo 産生とその制御について解析している。主な研究成果は次の通りである。

1. 雌性生殖器官における Epo 産生とその制御の解析

成熟マウスの卵巣からは性周期に応じて高濃度の E2 が放出されるので、生体内 E2 の影響をなるべく除くため、3 週齢の幼若マウスを用い、卵巣、及び卵管を摘出して、E2 存在、非存在下で器官培養を行い、その培養上清中の Epo 量を高感度酵素抗体法で検出した。その結果、卵管において E2 濃度依存的、かつ経時的に Epo 産生の増加が観察された。なお、卵巣からの Epo タンパク質分泌量は卵管に比べて低水準であり、E2 による分泌量の有意な変化は見られなかった。また、E2 受容体の拮抗阻害剤を用いた実験結果から、卵管での E2 による Epo 産生誘導は E2 受容体を介すること、またタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドを用いた実験結果から、E2 による Epo mRNA の誘導には新たなタンパク質合成は必要ないことが明らかになった。卵管をさらに細分化した結果、膨大部、峡部で E2 依存性の Epo 産生が確認された。一方、幼若マウスを E2 投与、非投与の後、21%通常酸素条件、もしくは、7%酸素条件 (低酸素) に曝露して、経時的に卵管での Epo mRNA 量を real-time PCR 法で測定した結果、E2 投与後 2 時間をピークとした一過的な Epo mRNA の誘導が観察され、低酸素刺激によってその誘導は増幅された。また、子宮においては低酸素刺激のみでは Epo mRNA の誘導が見られないのに対し、卵管では低酸素刺激のみでも一過的な Epo mRNA の発現誘導が見られることを明らかにした。

2. 雄性生殖器官における Epo 産生とその制御の解析

成熟 8 週齢のマウスの精巣ならびに精巣上体を摘出し、器官培養を行った結果、経時的に培養上清中の Epo 量が増加した。タンパク質合成阻害剤のシクロヘキシミドで、この Epo 産生は抑制されることから、精巣および精巣上体で新規に Epo が合成されていると考えられた。また、成熟雄マウスを 21%通常酸素条件、もしくは、7%酸素条件 (低酸素) に曝露して精巣および精巣上体を摘出して Epo mRNA 量を測定したところ、低酸素曝露後 4 時間でどちらの組織においても 5 ~ 6 倍程度の誘導が見られたが、8 時間後には元の水準まで低下することが明らかになった。また、通常酸素条件下での腎臓一個あたりの Epo mRNA 量を 100% とすると、精巣上体の Epo mRNA 量は約 40% であった。

3. 性成熟に伴うマウス精巣上体での Epo 産生量の増加

性成熟に伴うマウス精巣上体の mRNA 量の変動について検討した結果、未成熟 3 週齢から成熟期にあたる 7 週齢にかけて、全 RNA 量は 3 倍しか増加しないのに、全 RNA 1 μ g あたりの Epo mRNA 量は約 120 倍も増加した。このことから Epo

が雄性生殖器官の成熟や構造維持に寄与している可能性が考えられた。なお、それぞれの週齢において、低酸素刺激に対する応答性は変化しなかった。

4. マウス精巣上体での Epo 産生部位の解析

in situ hybridization 法によって、マウス精巣上体における Epo mRNA 発現細胞の同定を行ったところ、精巣上体管腔内の上皮細胞ではなく、管腔外の間質細胞が Epo mRNA を発現していることが明らかになった。また精巣上体の頭部、胴部、尾部全体で同様の発現が見られるため、Epo は管腔内の精子成熟に直接作用するとも考えるよりも、傍分泌様式で精巣上体の構造や機能維持に働くのではないかと推察した。

論文審査の結果の要旨

赤血球造血因子である Epo は成体では腎臓で産生され、赤血球造血の調節が唯一の機能であると考えられてきたが、脳内でも産生され、虚血による神経細胞死を防御しうること、子宮においても E2 依存的に産生され、血管新生促進因子として作用することが示された。このことから、Epo にはさらに別の機能がある可能性が考えられた。そこで、本研究では子宮以外の生殖器官における Epo 産生とその制御について研究を行っている。成果として評価すべき点は次の通りである。

1. 3 週齢の幼若マウスから卵巣、および卵管を摘出して、E2 存在、非存在下で器官培養を行った結果、卵管において E2 濃度依存的に、かつ経時的に Epo 産生の増加が見られることを示した。また、卵管での E2 による Epo 産生誘導は、E2 受容体を介すること、また E2 による Epo mRNA の誘導には新たなタンパク質合成は必要ないことを確認している。卵管をさらに細分化した結果、特に峡部で E2 依存性の Epo 産生が見られることを示している。また *in vivo* で、幼若マウスに E2 を投与、非投与後、7%酸素条件（低酸素）に曝露して、卵管の Epo mRNA 量を測定した結果、E2 投与後 2 時間をピークとした一過的な Epo mRNA の誘導が観察され、低酸素刺激によってその誘導は増幅されることを示している。

2. 成熟 8 週齢のマウスの精巣ならびに精巣上体を摘出して、器官培養を行い、精巣および精巣上体で新規に Epo が合成されていることを明らかにしている。また、成熟雄マウス個体を用いて、精巣および精巣上体において Epo mRNA が、低酸素（7%酸素）曝露後 4 時間で一過的に 5～6 倍程度誘導されるが、8 時間後には元の水準まで低下することを示している。また、通常酸素条件下での腎臓一個あたりの Epo mRNA 量を 100% とすると、精巣上体一個あたりの Epo mRNA 量は約 40% という比較的高い水準であることを明らかにしている。

3. 精巣上体で性成熟に伴う Epo の発現量の変動について検討し、未成熟 3 週齢から成熟を迎える 7 週齢にかけて、精巣上体の全 RNA 1 μ g あたりの Epo mRNA 量は約 120 倍も増加することを明らかにし、Epo が雄性生殖器官の成熟や構造維持に寄与している可能性を示している。

4. 精巣上体における Epo mRNA 発現細胞の同定を *in situ* hybridization 法によって行い、精巣上体管腔内の上皮細胞ではなく、精巣上体管腔外の間質細胞が Epo mRNA を発現していることを明らかにしている。

以上のように、本論文は新たに卵管、精巣上体といった雌雄生殖器官で Epo が産生されることを発見し、生殖系における Epo の産生とその制御に関する新しい知見を得ており、細胞生化学、生体情報応答学、分子細胞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 15 年 1 月 23 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。