

氏 名	サンディーブ ゴエル Sandeep Goel
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1672 号
学位授与の日付	平 成 20 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 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Identification, Stem Cell Potential and In Vitro Cultivation of Primitive Germ Cells from Neonatal Porcine Testis (幼若ブタ精巣から単離した始原精原細胞の同定、幹細胞としての特性および体外培養に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 今 井 裕 教 授 久 米 新 一 教 授 松 井 徹

論 文 内 容 の 要 旨

哺乳動物の成熟雄個体においては、精巣内に精子幹細胞が存在し、これらの幹細胞が持続的な精子形成に関与していると考えられている。しかし、精子幹細胞が始原生殖細胞からどのような過程をへて生産されるのかは、明らかになっていない。一方、マウスでは、精巣由来の幹細胞から多能性幹細胞株が樹立されており、精巣内に存在するある種の幹細胞は、精子のみならず、他の細胞にも分化する多能性を有していることが示唆される。一方、出生直後の動物の精巣にも、精子幹細胞に類似の幹細胞（始原精原細胞）の存在が知られていたが、それを特異的に認識するマーカーがなく、それがどのような性質を持つ細胞であるのか不明である。そこで本研究は、家畜ブタを用いて、出生直後のブタ精巣中の幹細胞に対する特異的なマーカーを見出すとともに、それを利用して、始原精原細胞を分離・精製して、その細胞の特性を明らかにするとともに、体外培養により始原精原細胞の増殖と細胞分化について検討した。

まず、始原精原細胞を特異的に認識するマーカーについて検討した。始原精原細胞の起源となる始原生殖細胞のマーカーとして知られる、レクチンの一種 Dolichos biflorus agglutinin (DBA) が始原精原細胞を形態的に幹細胞として識別しうる細胞を特異的に認識することが明らかとなった。DBA 陽性細胞は、生後 1 週間以内の精巣中には存在するが、精巣の発育とともに減少し、生後20週の成熟した雄ブタの精巣中には、まったく確認されなかった。このことから、出生直後に観察される幹細胞は、精子幹細胞とは性質の異なる幹細胞であることが明らかとなった。そこで、このマーカーを用いて、出生直後の精巣から始原精原細胞の分離と精製を試みた。パーコールによる密度濃度勾配法によって分離したところ、50-60%濃度のパーコールを含む分画に DBA 陽性細胞が分離された。これらの細胞が、幹細胞に特徴的な形態をもつことから始原精原細胞と同定された。

ついで、始原精原細胞の幹細胞としての性質を詳細に検討するために、マウスで知られている精子幹細胞に対する特異的なマーカー、さらに ES 細胞や EG 細胞などの多能性幹細胞の特異的なマーカーを用いて、出生後から成熟期までの精巣切片における幹細胞の動態について検討した。始原精原細胞は、始原生殖細胞や ES 細胞などの多能性幹細胞の特異的なマーカーであるアルカリフォスファターゼや NANOG の活性を有していた。一方、これらのマーカーは精巣の発育にともなって消失し、代わってマウスの精子幹細胞のマーカーである VASA や KIT に陽性の幹細胞が出現した。このことから、精子幹細胞は始原精原細胞を起源として、細胞分化にともなって様々な生殖細胞マーカーや多能性幹細胞マーカーを精巣に特異的なパターンをもって発現しながら、異なった幹細胞としての性質を維持していると考えられた。特に、多能性幹細胞のマーカーである NANOG は、出生直後の幹細胞で発現するが、その後いったん消失し、再度始原精原細胞から派生した精子幹細胞で発現する特徴的な発現パターンを示した。また、精子幹細胞では、多能性幹細胞のマーカーである OCT4 の発現も認められた。

始原精原細胞が多能性幹細胞のマーカーを発現していることから、その多能性細胞としての性質をヌードマウス精巣への

移植によって検討した。精巣はあらかじめブスルファン投与により精巣由来のマウス精子幹細胞を死滅させている。この精巣にブタの始原精原細胞を注入し、1ヵ月後に種々の幹細胞マーカーを用いて、細胞増殖と分化について検討した結果、注入細胞は始原精原細胞としてとどまるのみならず、マウス精管内でコロニーを形成することから、幹細胞としての増殖と分化が認められた。

さらに、出生直後の始原精原細胞の体外での増殖と細胞分化について検討した。パーコール密度濃度勾配法によって分離した細胞をDMEM/F12培地で7日間培養した。始原精原細胞は、培養液中で増殖し、コロニーを形成した。多くの細胞が、DBA陽性細胞としての性質を維持しながら増殖した。また、一部の細胞は、KIT, SSEA-1, NANOGを発現する幹細胞へと分化した。

以上のように、本論文は、哺乳動物において初めて、出生直後の幼若期の精巣から幹細胞を同定・分離するとともに、これらの細胞から精子幹細胞への細胞分化の道筋を示すとともに、体外および体内での幹細胞の増殖に関する多くの知見を示しており、将来家畜における精子幹細胞や多能性幹細胞株の樹立に有用な情報を提供している。

論文審査の結果の要旨

哺乳動物の成熟雄個体では、精巣中に精子幹細胞が存在し、持続的な精子形成にかかわっている。しかし、これらの幹細胞の起源については明らかになっていない。一方、出生直後の精巣内には、形態的に精子幹細胞に類似した細胞（始原精原細胞）の存在が知られているが、それがどのような性質をもつ細胞であるのか不明である。そこで、本論文では、ブタの始原精原細胞に対する特異的マーカーを同定するとともに、これらの細胞を精製し、幹細胞としての特性を明らかにした。さらに、体外の培養系およびヌードマウス精巣への移植によって、始原精原細胞の増殖と細胞分化について検討したもので、評価すべき点は以下の通りである。

1. 始原精原細胞を特異的に認識するマーカーについて検討したところ、始原精原細胞の起源となる始原生殖細胞のマーカーであるDBAが、始原精原細胞を特異的に認識することが明らかとなった。DBA陽性細胞を組織レベルで追跡したところ、生後1週間以内の精巣中には存在するが、精巣の発育とともに減少し、生後20週の成熟した雄ブタの精巣中では消失した。精巣内の幹細胞は、組織の成熟にともなって、幹細胞としての性質を大きく変化させることを明らかにした。
2. 精子幹細胞やES細胞やEG細胞などの多能性幹細胞に対する特異的マーカーを用いて、出生後から成熟期までの精巣切片における幹細胞の動態について検討した結果、始原精原細胞は、始原生殖細胞や多能性幹細胞のマーカーであるアルカリフォスファターゼやNANOGの活性を有していた。一方、これらのマーカーは精巣の発育とともに消失し、精子幹細胞のマーカーであるVASAやKITに陽性反応を示す細胞に置き換わった。このことから、精子幹細胞は始原精原細胞を起源として、精子幹細胞へと分化する細胞群であることを示した。
3. 始原精原細胞の幹細胞としての性質をヌードマウス精巣への移植によって検討した結果、移植細胞は始原精原細胞としてとどまるのみならず、マウス精管内でコロニーを形成することから、異種精巣内で幹細胞として性質を維持しながら、増殖と分化が誘導されることを明らかにした。
4. パーコール密度濃度勾配法によって始原精原細胞を精製し、体外での増殖と細胞分化について検討した。始原精原細胞は、DMEM/F12培養液中でDBA陽性細胞としての性質を維持しながら増殖し、幹細胞様のコロニーを形成することを示した。

以上のように、本論文は、哺乳動物において初めて出生直後に出現する始原精原細胞の幹細胞としての性質を明らかにしたものであり、発生学、幹細胞生物学、動物繁殖学などの発展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20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。