

氏名(本籍)	佐々木 基 樹 (神奈川県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	甲第79号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	ラット胎子精巣セルトリ細胞の分化に関する研究
論文審査委員	(主査) 江口 保 暢 (副査) 政岡 俊 夫 有 嶋 和 義 山 本 雅 子

論文内容の要旨

生殖腺の原基は中腎の腹内側に、中皮(中間中胚葉由来)およびその下の間葉組織が増殖した隆起として出現する。原基は次第に、縦に長くなるとともに体腔に突出し生殖腺堤となる。その後、生殖腺堤を覆う表面上皮(中皮)は、その直下に遊走してきた原始生殖細胞(卵黄嚢の内胚葉由来)が到着すると、それを取り込んでさらに増殖肥厚し始める。ラット(Torrey, '45)やマウス(Eguchi and Hashimoto, '61)などの小型哺乳類では、増殖肥厚した生殖腺原基(皮質)の中に取り込まれた間葉由来の細胞が原基の細胞と原始生殖細胞とをいくつかの管状の集塊に仕切ることによって精細管が形成される。そしてこの表面上皮由来の細胞がセルトリ細胞に分化する(Jost, '72; Magre and Jost, '80)とされている。このようにして分化し、そして発達するセルトリ細胞は、卵巣刺激ホルモン(FSH)によって機能的または形態的に影響を受けることが知られており、セルトリ細胞は、その細胞膜表面にFSHレセプターを保有している(Means and Vaitukaitis, '72; Means et al., '76; Orth and Christensen, '77)。セルトリ細胞は、FSHやcAMPの刺激を受けると、一時的に形態を変化させることが報告されている(Spruill et al., '81)。また、Orth('84)は、in vitroで胎齢19日のセルトリ細胞の細胞分裂に対して、FSHが促進的な効果を持つと報告している。しかし、ラット胎子セルトリ細胞に対するFSHの影響に関しては、詳細は示されていない。

そこで、本研究は、ラット胎生期のセルトリ細胞に対するFSHの作用について、①FSHによる細胞骨格と細胞接着の変化、②FSHによる細胞分裂の促進、③cAMP依存性プロテインキナーゼ(PKA)の関与、この三点について明らかにすることと主目的とした。そのためにラット胎子精巣を器官培養法を用いることによって以下のような実験を行った。

第一章においては、セルトリ細胞の分化発達に伴う形態的な変化を細胞の形、細胞内の2種の間径フィラメント(サイトケラチン、ビメンチン)の分布、細胞接着分子の分布に注目して観察するとともに、FSHがどのような作用を及ぼすかについて検討した。

ラット胎子精巣を器官培養とすると、胎齢15日では、中間径フィラメントであるサイトケラチンはセルトリ細胞の基底側に多く存在しているが、胎齢16日になると、サイトケラチンの存在部位が核の周囲に広がり、胎齢17日では、精細管内腔へ向かって伸長する細胞質内に円錐状に存在していた。また、同じ中間径フィラメントのビメンチンは、セルトリ細胞の基底側に存在していたものが核の周囲へと次第にその局在性を変え

ていた。FSHを添加して培養した場合、胎齢16日のラット胎子精巣においてのみ、セルトリ細胞の細胞質の精細管腔方向への伸長と細胞内のサイトケラチンとビメンチンの2種の間径フィラメントの分布の変化が促進されることが明らかになった。また、カドヘリン関連タンパク質の一つである α カテニンの分布を調べたところ、最初はセルトリ細胞の細胞膜の直下に存在していたが、胎齢17日から18日にかけて細胞質全域に顆粒状に存在するようになり、その後、セルトリ細胞の基底部の細胞質に多く認められるようになった。FSHは胎齢17日と18日の間に大きく変化する α カテニンの分布に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、FSHは培養条件下の胎齢16日の精巣セルトリ細胞に対して、セルトリ細胞内の中間径フィラメントの分布の変化に促進的な効果を持ち、その結果セルトリ細胞の形態的な分化を促進することが示唆された。

第二章においては、FSHが、胎生期のラット胎子精巣の細胞分裂に影響を及ぼすかどうか、さらに、影響を与えるならば、いつ頃から影響を与えるようになるかを検討した。

胎齢15、16、17日のラット胎子精巣をFSHを添加して器官培養し、セルトリ細胞の細胞分裂に対するFSHの影響を観察したところ、胎齢15日の精巣を培養した時のセルトリ細胞は、FSHに対して感受性を持たなかったが、胎齢16日になると、FSHによってセルトリ細胞の細胞分裂が促進された。次いで、あらかじめ胎齢16日に抗ラットFSH血清を胎子に投与して胎子体内のFSHの作用を阻害してから、胎齢17日の精巣を培養するとセルトリ細胞の細胞分裂の割合は無処置の胎子精巣のセルトリ細胞の分裂の割合に比べて減少したが、FSHを添加して培養すると分裂の割合は回復した。以上の結果から、胎齢16日と17日の間に胎子下垂体から分泌される内因性のFSHがセルトリ細胞に作用している可能性があることが示唆された。

第三章においては、ラット胎子精巣のセルトリ細胞における、FSHの作用に対して、細胞内のPKAが関与しているかどうかを調べるために、ウエスタンブロット法を用いて、PKAの α catalytic subunitの定量を行った。また、PKAインヒビター (PKI) を用いて、PKA活性を阻害した場合のセルトリ細胞の細胞分裂の変動を観察した。

胎齢16日のラット胎子精巣を培養すると、精巣内のPKA活性の指標となるPKA catalytic subunitの量がFSHの添加によって増加した。この結果は、添加したFSHが、胎齢16日のラット胎子精巣のcAMPを増加させることによってPKAを活性化し、その結果として α catalytic subunitの量を増加させた可能性を示唆している。また、胎齢16日のラット胎子精巣をFSHとPKIの両者を同時に添加して培養すると、FSHだけを添加した場合よりセルトリ細胞の分裂は抑制された。以上の結果は、培養液に添加されたFSHが、セルトリ細胞の細胞分裂を促進したのは、セルトリ細胞内のPKAが活性化された結果であることを示唆している。

以上本研究の結果から、(1) FSHは、培養条件下において胎齢16日のラット胎子精巣に対して、セルトリ細胞内の中間径フィラメント (サイトケラチン、ビメンチン) の分布の発展的変化つまり管腔側への伸展を促進した。それにより、セルトリ細胞の形態的な分化を促進することが示唆された。(2) 細胞接着にかかわる α カテニンは、最初細胞辺縁にあり、次に細胞質全域に広がり、その後基底部に多く認められ、細胞接着に関与することが示唆された。(3) FSHは培養条件下において胎齢16日のラット胎子精巣のセルトリ細胞の細胞分裂に対して促進的な効果を持つことが示唆された。(4) 胎齢16日と17日の間に胎子下垂体から分泌される内因性のFSHは、生体内においてセルトリ細胞に対して促進的な作用を及ぼしている可能性があることが示唆された。(5) FSHがセルトリ細胞の細胞分裂を促進するのは、セルトリ細胞のPKAが活性化された結果

であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

生殖腺の原基は中腎の腹内側で、中間中胚葉（表面上皮）とその下の間葉組織が増殖した隆起、すなわち生殖腺堤として出現する。表面上皮の直下に卵黄嚢から原始生殖細胞が遊走到着すると、表面上皮はこれらの生殖細胞を取り込んで増殖肥厚し始める。ラットでは、生殖細胞を含むこの肥厚した中間中胚葉由来の皮質組織の中で、そこに取り込まれた間葉由来の細胞が皮質をいくつかの管状に仕切って、性索すなわち雄では精細管を形成する (Torrey, '45)。精細管の支持細胞すなわちセルトリ細胞は表面上皮つまり中間中胚葉由来のものである。

本論文に記述される研究のバックグラウンドは次のようである。

1) 細胞骨格、中間径フィラメントの消長。Fröjdmanら ('92) によれば、セルトリ前駆細胞は表面上皮の時から、細胞骨格としてのデスミンを保有し、増殖肥厚するとともにビメンチンを併せて保有するようになる。性索形成の過程でセルトリ前駆細胞のデスミンが消失し、サイトケラチンが現れる。性索の周りの間葉細胞はデスミンを保有し、その量は次第に増える。性索は精細管となり、セルトリ細胞は生殖細胞すなわち精細胞を支えて、管基底部から中心に向けて伸びる極性を示すようになるが、それはデスミンが消失して、サイトケラチンに変わることによるという。

2) 細胞接着。セルトリ細胞同士の接着は、ラットの生後の観察では、N-カドヘリンによるとされている。胎子では接着の詳細は報告されていないが、胎齢18日では、カドヘリン関連タンパクの一つである α カテニンがセルトリ細胞に存在する (Byersら, '94) ので、胎生期でもカドヘリンによる接着があるものと思われる。

3) FSHによる刺激作用。セルトリ細胞は、卵胞刺激ホルモン (FSH) によって刺激されるもので、それによって、形態変化を起こし、細胞分裂が促進される。しかし、胎生期のセルトリ細胞に対するFSHの作用については、その詳細は報告されていない。FSHがFSHレセプターと結合すると、cAMPが合成され、cAMPがプロテインキナーゼ (PKA) の調節サブユニット (regulatory subunit) と結合すると触媒サブユニット (catalytic subunit) が分離され、このcatalytic subunitがタンパクをリン酸化することによってセルトリ細胞の機能的変化が起こる (Means, '75) とされている。

本論文は、ラット胎生期のセルトリ細胞の分化に対するFSHの作用を中心として、1) FSHによる細胞骨格と細胞接着因子の変化、2) FSHによる細胞分裂の促進、3) FSHの作用に対するcAMP依存性プロテインキナーゼの関与、の三点について調べることを主目的として述べられており、多くの新知見を得ていることは特筆するに値する。本論文は三つの章からなっている。実験の多くは器官培養法によって行われている。

第一章では前記1) について述べている。まず、in vivoにおける胎齢14~19日のセルトリ細胞の発達状態を光顕的に調べたのち、胎齢15、16、17日の精巣を48時間培養し、これにFSH (0.5および5 μ g/ml) を加えた場合と比較した。凍結切片について抗ビメンチン血清および抗サイトケラチン血清を用い、蛍光抗体法によって染色して観察した。胎齢15日の精巣を48時間培養すると、ビメンチンはセルトリ細胞の核と基底側の間の細胞質中にごくわずかにあり、サイトケラチンは同じく基底側に楕円形の塊として見られ、FSHの添加によっても変化はなかった。このことは、胎齢15日のセルトリ細胞はFSHに対する感受性をまだ持っていないことを示すのではないかと、としている。胎齢16日の精巣を48時間培養すると、ビメンチンは細胞の基底側に

わずかにあったのがFSHによって核周囲および細胞周辺部に見られるようになる。サイトケラチンは細胞の核周囲に見られたのが、FSHの添加によって、精細管腔に向かって円錐状に伸びる細胞質の周辺部に沿って見られるようになる。この変化は胎齢17日の精巣では進行していなかった。 α カテニンはin vivoでは最初セルトリ細胞の細胞膜直下に分布していたが、胎齢18日には細胞質全域に顆粒状に存在し、胎齢20日ではとくに基底部に多く認められた。in vitroでは、FSHの影響はみられなかった。したがって、FSHはセルトリ細胞の中間径フィラメントの分布の経時的変化を促進させる働きがあること、細胞接着には影響を及ぼさないことが示された。

第二章では前記2) について述べている。胎齢15、16、17日の精巣を24時間培養したのち、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を添加して2時間培養、次いでBrdUを含まない培養液に戻してさらに22時間培養した。分裂細胞はBrdU反応陽性となることが指標とされた。その結果、胎齢15日の培養精巣ではFSH添加の影響は見られなかったが、胎齢16、17日の培養精巣では、FSH添加はセルトリ細胞の細胞分裂を促進させた。さらに、胎子自身の下垂体が精巣に対してFSH作用を発揮しているかどうかを調べるため、胎齢16日の子宮内雄胎子に直接抗ラットFSH血清を注射して翌日、その精巣を培養すると、セルトリ細胞の細胞分裂は減少した。一方、この精巣をFSHを添加して培養すると、セルトリ細胞の分裂の割合は、無処置のものと同様に回復していた。このことは、in vivoにおいて胎子下垂体は精巣に対してFSH作用を有していることを示す。

第三章では前述の3) について述べている。第一章および第二章で示されたように、FSHはセルトリ細胞の分化発達に促進的に作用するが、その作用機序にPKAの活性化が関与しているかどうかを検討している。まず、胎齢16日の精巣を培養し、FSH添加の実験を行い、精巣をホモジネイトしてタンパクを抽出し、抗PKA α catalytic subunit血清を用いてウェスタンブロット法で調べた。その結果、FSH添加群では無添加の対照に比べてPKA α catalytic subunitの量が増加していた。一方、胎齢16日の培養精巣では、FSHの添加によってセルトリ細胞の細胞分裂が増加するが、FSHとともにPKA活性の阻害剤であるPKAインヒビターを同時添加して培養すると、細胞分裂は抑制された。したがってこれらの結果は、FSHがセルトリ細胞の細胞分裂を促進させたのは、セルトリ細胞内のPKAが活性化されたことによることを示している。

これらの結果を要するに、本論文は、本研究のバックグラウンドを基にした所期の研究目的を十分に満たしたものである。その目的の1) に関して、胎生期のセルトリ細胞の発達においては、細胞骨格としての中間径フィラメント (ビメンチンおよびサイトケラチン) の量と分布の変化によって、セルトリ細胞が変形し、精細管の管腔に伸びて精細管の形態を形づくることを示すとともに、その機構にFSHが促進的に働くことを初めて明らかにした。また、胎生早期から細胞接着に関わるカドヘリンの関連タンパクの一つ、 α カテニンが存在し、胎齢とともにその分布が変わることも明らかにした。その目的の2) に関して、FSHはセルトリ細胞の細胞分裂を胎生期においても促進させる作用を持つことを初めて明らかにした。その目的の3) に関して、セルトリ細胞の細胞分裂促進は、胎生期においてもセルトリ細胞内のPKAの活性化によるものであることを明らかにした。

以上、本論文は、胎生期のセルトリ細胞の分化発達に新知見を加えることによって、発生学上大いなる貢献をなしたものと思われ、ひいては獣医学上意義ある業績として、博士 (獣医学) の学位を授与するにふさわしいものと判定した。