

氏名 (本 (国) 籍)	Almunia Fuertes Julio Alfonso (スペイン王国)			
主指導教員氏名	岐阜大学 准教授 高 須 正 規			
学位の種類	博士 (獣医学)			
学位記番号	獣医博甲第516号			
学位授与年月日	平成30年9月21日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻			
研究指導を受けた大学	岐阜大学			
学位論文題目	Studies on the Autologous Transplantation of Testicular Cells in Microminipigs (マイクロミニピッグにおける精巣細胞の自家移植に 関する研究)			
審 査 委 員	主査	岐 阜 大 学	教 授	村 瀬 哲 磨
	副査	帯広畜産大学	教 授	松 井 基 純
	副査	岩 手 大 学	教 授	高 橋 透
	副査	東 京 農 工 大 学	教 授	田 中 知 己
	副査	岐 阜 大 学	准教授	高 須 正 規

学位論文の内容の要旨

精巣幹細胞 (SSCs: Spermatogonial Stem cells) は、自己複製能を有する幹細胞であり、生涯にわたる精子形成を支えている。SSCs には、gonocyte と undifferentiated spermatogonia のふたつのタイプが存在し、精子形成の初期段階ならびに成長期における精巣の発達に重要な役割を果たしている。

1994年、Brinsterらは、生殖能力をもつドナーマウスから採取されたSSCsを生殖能力のないレシピエントマウスの精細管内へと移植し、ドナーSSCs由来の配偶子を形成させた。このSSCsの移植は、精子形成メカニズムの探索、補助生殖医療、種の保存、遺伝子改変動物作出に貢献できる技術として着目され、様々な分野で研究がすすめられている。中でも、生涯にわたって改変SSCs由来の精子を作出できるSSCsの自家移植による遺伝子改変法は、きわめて効率の良い方法とされ、いわゆる家畜動物において同法の開発が期待されている。

本研究では、SSCsの自家移植による新規遺伝子改変法の開発を視野に入れ、マイクロミニピッグを用いたSSCsの自家移植に関する周辺知見の獲得がすすめられた。同自家移植法では、二つもつ精巣の一方をドナーに、もう一方をレシピエントにする。したがって、同法を確立するためには、①ドナーとなる精巣から効率よくSSCsを採取すること、②レシピエント精巣において生物学的ニッチを形成すること、すなわち、内在性SSCsを除去し移植に適した環境を整えることが重要となる。以上を踏まえ、本研究の第一章では、ドナーとなるSSCsの採取時期を決定した。つづく第二章では、生物学的ニッチを形成するために最適な放射線照射条件を決定した。最後の第三章では、これらの知見を組み合わせ、マイクロミニピッグにおける精巣細胞の自家移植を試みた。

第一章では、日齢にともなうマイクロミニピッグ SSCs の数的変化を明らかにし、ドナーSSCs の採取に適切な時期を決定した。本章第一部にて、家畜豚における経時的な SSCs の数的変化ならびに SSC マーカー発現を明らかにした。続く第二部では、第一部で明らかになった知見を基に、日齢にともなうマイクロミニピッグ SSCs の数的変化を明らかにした。これらの結果から、マイクロミニピッグにおいて自家移植ドナーとなる SSCs の採取時期を明らかにした。

第一章, 第一部では, SSC マーカー (gonocyte 特異的マーカー: DBA, SSC マーカー: UCHL1, ZBTB16, POU5F1) を用いて, neonatal 期, 1 カ月齢, 2 カ月齢, adult 期の家畜ブタの精巣幹細胞の数的変化を明らかにした。ここでは, 精細管横断面 1 個あたりの各マーカー陽性細胞を算出し, その平均値を月齢ごとに比較した。各マーカーの陽性細胞数は, 精細管あたりの Sertoli 細胞数で補正し, 精細管の拡大による影響を除外した。neonatal 期の精細管において, DBA+/Sertoli は UCHL1+/Sertoli よりも有意に低かったことから, 精子形成の初期段階は出生前にすでに開始していることが示唆された。また, 2 ヶ月齢までの精細管において, UCHL1+/Sertoli に有意な変化は認められなかったものの, DBA+/Sertoli は観測限界まで減少していた。加えて転写抑制因子でもある ZBTB16 は, ZBTB16+/Sertoli は neonatal 期には DBA+/Sertoli と同程度であったものの, 1 ヶ月齢では有意に減少していた。これらのことから, 家畜ブタの gonocyte から undifferentiated spermatogonia への分化は 1 ヶ月齢で加速し, 2 ヶ月齢までにはほぼ完了すると考えられた。

第一章, 第二部では, 家畜ブタでの知見を基に, マイクロミニピッグの日齢 (neonatal 期, 30 日齢, 45 日齢, 80 日齢, adult 期) に伴う SSCs の数的変化を明らかにした。マイクロミニピッグにおいては, 30 日齢までには DBA+/Sertoli が有意に減少し, 45 日齢では観測限界となった。また, UCHL1+/Sertoli は 30 日齢までに有意に増加していた。これらのことから, マイクロミニピッグにおける SSCs の分化は家畜豚よりも早く, 30 日齢より以前にすでに加速していると考えられた。これらのことから, マイクロミニピッグにおける SSCs の自家移植のドナー精巣は 30 日齢未満のものである必要があると結論付けられた。

第二章では, レシピエントとなる精巣にニッチ形成するために適切な放射線照射条件を明らかにした。30 日齢のマイクロミニピッグ精巣に 0 Gy, 6 Gy, 9 Gy で放射線を照射し, SSCs の除去と組織へのダメージから適切な放射線量を決定した。放射線による炎症が治まる約 6 週間後に精巣を摘出し, 摘出した精巣の精巣周囲長を計測した。次に, HE 染色で精細管直径を計測し, 放射線によるダメージを評価した。最後に, UCHL1 および Sertoli 細胞のマーカーである Vimentin を用いて染色し, 精細管横断面 1 個あたりの SSC を算出した。6 Gy および 9 Gy の照射で, UCHL1 陽性細胞である SSCs が有意に減少した。しかし, 9 Gy の照射では, Sertoli 細胞の有意な減少, 間質の出血, 線維化および硝子化等が認められた。これらのことから, 9 Gy は過剰線量と判断され, レシピエント精巣におけるニッチ形成には 6 Gy が適していると考えられた。

最終章の第三章では, 第一章ならびに第二章で得られた知見を基に, 精巣細胞の自家移植を試みた。30 日齢未満のマイクロミニピッグの片側の精巣をドナー精巣として摘出し, 凍結保存した。次に, レシピエント精巣となるもう一方の精巣に 6 Gy を照射した。放射線の影響がなくなると考えられる 6 週間後, 凍結しておいたドナー精巣から SSC を含む精巣細胞を分離し, それらの細胞をエコーガイド下でレシピエント精巣の精巣網に移植した。個体の性成熟を待ち, 用手法にて精液を採取した。採取した精液量ならびに精子量は少なかったものの, 質的には問題のない精子が得られた。

本研究では, SSCs の自家移植の基礎となる知見が得られ, それらを統合することでドナーSSC 由来の質的に問題のないと考えられる精子が得られた。これにより, SSCs の自家移植に基づく新規遺伝子改変法の開発が一步前進したと考えられた。

審査結果の要旨

本研究では、精巣幹細胞 (Spermatogonial Stem Cells, SSC; gonocyte 及び undifferentiated spermatogonia) の自家移植による新規遺伝子改変法の開発を最終目標として、マイクロミニピッグを用いて SSC の自家移植方法の確立を目的とした。同自家移植法では、一方のドナーとなる精巣から採取した SSC を、放射線の照射によりその精子形成を止めたもう一方のレシピエントとなる精巣へ移植する。したがって、同法を確立するためには、① ドナー精巣から効率よく SSC を採取すること、② レシピエント精巣において、内在性 SSC を除去し移植に適した環境を整えることが重要となる。以上を踏まえ、本研究の第一章では、ドナーとなる SSC の採取日齢を決定した。つづく第二章では、レシピエント精巣への最適な放射線照射条件を決定した。最後の第三章では、これらの知見を組み合わせ、マイクロミニピッグにおける精巣細胞の自家移植を試みた。

第一章では、マイクロミニピッグの日齢にともなう SSC の数的変化を明らかにし、ドナーSSC の採取に適切な時期を決定した。本章第一部にて、まずは家畜豚をモデルとして用い、経時的な SSC の数的変化ならびに SSC を同定するマーカーの発現を明らかにした。続く第二部では、第一部で明らかになった知見を基に、日齢にともなうマイクロミニピッグ SSC の数的変化を明らかにした。これらの結果から、マイクロミニピッグにおいて自家移植のためのドナーとなる SSC の採取時期日齢を明らかにした。

具体的には、第一章、第一部では、SSC マーカー (gonocyte 特異的マーカー: DBA, SSC マーカー: UCHL1, ZBTB16, POU5F1) を用いて、新生子期、1 カ月齢、2 カ月齢、成熟期の家畜ブタの精巣幹細胞の数的変化を明らかにした。ここでは、精細管横断面 1 個あたりの各マーカー陽性細胞を算出し、その平均値を月齢ごとに比較した。各マーカーの陽性細胞数は、精細管あたりの Sertoli 細胞数で補正し、精細管の拡大による影響を除外した。新生子期の精細管において、DBA 陽性細胞数は UCHL1 陽性細胞数よりも有意に低かったことから、精子形成の初期段階は出生前にすでに開始していることが示唆された。また、2 ヶ月齢までの精細管において、UCHL1 陽性細胞数に有意な変化は認められなかったものの、DBA 陽性細胞数は観測限界まで減少していた。また転写抑制因子でもある ZBTB16 については、ZBTB16 陽性細胞数は新生子期には DBA 陽性細胞数と同程度であったものの、1 ヶ月齢では有意に減少していた。これらのことから、家畜ブタの gonocyte から undifferentiated spermatogonia への分化は1 ヶ月齢で加速し、2 ヶ月齢までにはほぼ完了すると考えられた。

第一章、第二部では、家畜ブタでの知見を基に、マイクロミニピッグの日齢 (新生子期、30 日齢、45 日齢、80 日齢、成熟期) に伴う SSC の数的変化を明らかにした。マイクロミニピッグにおいては、30 日齢までには DBA 陽性細胞数が有意に減少し、45 日齢では観測限界まで低下した。また、UCHL1 陽性細胞数は 30 日齢までに有意に増加していた。これらのことから、マイクロミニピッグにおける SSC の分化は家畜豚よりも早く、30 日齢より以前にすでに加速していると考えられたので、マイクロミニピッグにおける SSC の自家移植のドナー精巣は 30 日齢未満のものである必要があると結論付けられた。

第二章では、レシピエントとなる精巣にニッチ形成するために適切な放射線照射条件を明らかにした。30 日齢のマイクロミニピッグ精巣に 0 Gy, 6 Gy, 9 Gy で放射線を照射した後、放射線による炎症が治まる約 6 週間後に精巣を摘出し、摘出した精巣の精巣周囲長を計測した。次に、HE 染色で精細管直径を計測し、放射線によるダメージを評価した。最後に、UCHL1 および Sertoli 細胞のマーカーである Vimentin を用いて染色し、精細管横断面 1 個あたりの SSC を算出した。その結果、6 Gy および 9 Gy の照射で、UCHL1 陽性細胞である SSCs が有意に減少したが、9 Gy の照射では、Sertoli 細胞の有意な減少、間質の出血、線維化および硝子化等が認められた。これらのことから、9 Gy は過剰線量と判断

され、レシピエント精巣におけるニッチ形成には 6 Gy が適していると考えられた。

第三章では、第一章ならびに第二章で得られた知見を基に、精巣細胞の自家移植を試みた。30 日齢未満のマイクロミニピッグの片側の精巣をドナー精巣として摘出し、凍結保存した。次に、レシピエント精巣となるもう一方の精巣に 6 Gy を照射した。放射線の影響がなくなると考えられる 6 週間後、凍結しておいたドナー精巣から SSC を含む精巣細胞を分離し、それらの細胞をエコーガイド下でレシピエント精巣の精巣網に移植した。個体の性成熟を待ち、用手法にて精液を採取した。採取した精液量ならびに精子量は少なかつたものの、質的には問題のない精子が得られた。

本研究では、SSC の自家移植の基礎となる知見が得られ、それらを統合することでドナーSSC 由来の質的に問題のないと考えられる精子が得られた。これにより、SSCs の自家移植に基づく新規遺伝子改変法の開発が一步前進したと考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Characterization of domestic pig spermatogenesis using spermatogonial stem cell markers in the early months of life
著 者 名 : Almunia, J., Nakamura, K., Murakami, M., Takashima, S. and Takasu, M.
学術雑誌名 : Theriogenology
巻・号・頁・発行年 : 107 : 154-161, 2018

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Magnetic resonance imaging of ovarian activity in microminipigs showing normal estrous cycles
著 者 名 : Maeda, M., Takashima, S., Takasu, M., Mori, T., Goto, N., Matsubara, T., Almunia, J., Imaeda, N., Ando, A. and Kitagawa, H.
学術雑誌名 : In Vivo
巻・号・頁・発行年 : 30 (1) : 35-40, 2016
- 2) 題 目 : Cryopreservation of lar gibbon semen collected by manual stimulation
著 者 名 : Takasu, M., Morita, N., Tajima, S., Almunia, J., Maeda, M. and Kamiguchi, T.
学術雑誌名 : Primates
巻・号・頁・発行年 : 57 (3) : 303-307, 2016
- 3) 題 目 : Genetic characterization of the Miyako horse based on polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA
著 者 名 : Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Almunia, J., Maeda, M., Matsuyama, R. and Takasu, M.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 79 (1) : 218-223, 2016
- 4) 題 目 : Genetics diversity of the Yonaguni horse based on polymorphisms in microsatellites and mitochondrial DNA
著 者 名 : Senju, N., Tozaki, T., Kakoi, H., Shinjo, A., Matsuyama, R., Almunia, J. and Takasu, M.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 79 (2) : 425-431, 2017
- 5) 題 目 : Accuracy of follicle count and ovulation confirmation using magnetic

resonance imaging in microminipigs with normal estrus cycles

著 者 名 : Takasu, M., Baba, R., Owada, S., Nakamura, K., Almunia, J., Nishii, N. and Kitagawa, H.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

卷・号・頁・発行年 : 80 (1) : 125-127, 2018