

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Md. Abdullah-Al-Mahmud

WW domain-containing oxidoreductase (*Wwox*) は推定上の腫瘍抑制遺伝子であり、ホルモン制御下の組織で高度に発現し、生殖腺の正常発達においても重要であると考えられている。申請者の所属する研究室では、自然発症の突然変異系統である Lethal Dwarfism with Epilepsy (*lde*) ラットを維持している。*lde/lde* ラットでは、*Wwox* 遺伝子の第9エクソンにおける13塩基の欠失により、*Wwox* の機能が失われている。*lde/lde* ラットは、生後早期のてんかん発作、体成長遅延、オリゴデンドロサイトの減少を伴う髄鞘低形成を示し、ほとんどが生後早期に死亡する。雄の *lde/lde* ラットは、生後の精巣の発達期に、FSH、LH およびテストステロンレベルの低下、生殖細胞のアポトーシスの増加、生殖細胞とセルトリ細胞 (SCs) の減少、精細管径の減少、ライディッヒ細胞 (LCs) の分化遅延を示す。*Wwox* の機能喪失が *lde/lde* ラットにおける精巣の異常の原因であると考えられるが、精巣の発達や精子形成における *Wwox* の局在と機能についてはよく分かっていない。従って、正常ラットの精巣における *Wwox* の局在と *lde/lde* における精巣異常のメカニズムを明らかにすることができれば、精巣の発達や精子形成における *Wwox* の生理機能を理解するうえでの手がかりとなるであろう。本論文において、申請者はまず、生後 (PND) 0 から 70 日齢において、発達期の精巣と精子形成における *Wwox* の組織分布と細胞内局在を明らかにした。次いで、*lde/lde* の初回精子形成 (FRS) 期において生殖細胞のアポトーシスが増加するメカニズムの一端を明らかにした。加えて、*lde/lde* の精巣における SCs と LCs の発達異常を明らかにし、*Wwox* 欠損状態においてステロイド産生障害が起こるメカニズムの一端を明らかにした。最後に、これらの結果に基づいて、申請者は正常な精巣の発達と精子形成における *Wwox* の可能性のある役割について考察している。

第1章で申請者は、突然変異ラットを用いた遺伝子の機能解析の重要性を記述し、*Wwox* に関する一般情報を要約し、*lde/lde* ラットの表現型を特徴付け、本研究の目的を概説している。突然変異ラットは、遺伝性疾患の研究や生物学的事象における遺伝子の機能解析において有用であり、がん

の進行と脳や生殖器の発達における *Wwox* の機能を研究するために、いくつかの *Wwox* ノックアウトマウスが作出されている。申請者は、*lde/lde* ラットを用いて精巣の発達と精子形成における *Wwox* の機能を明らかにすることの意義を述べ、精巣における *Wwox* の可能性のある役割を明らかにすると言う本研究の目的を解説している。

第2章では、正常 (+/+) の生後発達期の精巣と精子形成過程における *Wwox* の組織分布と細胞内局在が示されている。ウエスタンブロット分析により約 46kDa の *Wwox* タンパク質が精巣で検出され、その発現は日齢に従って徐々に増加した。免疫染色により、胎子型 LCs (F-LC)、成熟型 LCs (A-LC)、未熟 SCs (I-SC)、成熟 SCs (M-SC)、およびステップ 18-19 の精子細胞 (ST) と精子を除く全ての生殖細胞で *Wwox* が検出された。さらに、*Wwox* は生殖細胞と体細胞において、濃縮した強いシグナル (FISWs) とともに細胞質に拡散して分布し、FISWs は細糸期精母細胞 (L-SP) から複糸期精母細胞 (D-SP) までの間に徐々に濃縮し、サイズが増した。その形状は、接合期精母細胞 (Z-SP) では三日月型、太糸期精母細胞 (P-SC) と D-SP では濃縮した球状、円形精子細胞 (R-ST) では馬蹄形に変化した。細胞質に拡散した発現は精子形成の間に SP と比べて ST で減少した。*Wwox* の同様な発現パターンは単一細胞懸濁 (SCS) 試料でも確認された。精巣細胞の細胞質中の FISWs は cis-Golgi マーカーの *giantin* と共局在し、*Wwox* タンパク質は細胞質分画および Golgi 装置 (GA) 濃縮分画で検出された。これらのことから、申請者は、精巣細胞において、*Wwox* は GA 関連タンパク質を介して GA に局在し、精巣の発達と精子形成において重要な役割を果たす可能性がある」と結論している。

第3章では、*lde/lde* の精巣において FRS 期に生殖細胞のアポトーシスが増加するメカニズムを明らかにするために、生殖細胞の病理学的変化と GA 関連タンパク質の発現が調査されている。さらに申請者は、+/+の精巣と *lde/lde* の胎子線維芽細胞 (REF) に対してストレスを誘導した際に同様な変化が起こるか否かも調べている。PND13 の *lde/lde* における精母細胞-特異的 *Hspa2* の発現低下と精細管当たりの L-SP の有意な減少は、*lde/lde* の精巣で精子形成の開始が遅延していることを示した。加えて、FRS 期の *lde/lde* の精巣では、核濃縮と腔胞形成、SP の細胞質の消失、TUNEL 陽性 P-SP の増加、P-SP と D-SP の減少、減数分裂後の ST の欠損が認められた。さらに、減数分裂後期精母細胞-特異的 *Hlt* と *Ccnal* の発現が有意に減少し、精子細胞-特異的な *Hspa11* の発現が検出され

なかったことから、*lde/lde* ラットの FRS が減数分裂後期の SP から ST への分化段階で中断していることが示された。より重要なこととして、*lde/lde* の精巣では GA 関連タンパク質である golgin-160 の免疫染色性が全体的に低下し、golgin-160 は P-SP において GA の外側に位置する異常に明るい濃縮したシグナル (ABCSS) を形成していた。P-SP における golgin-160 の局在の変化が、その細胞自身における *Wwox* の欠損によって引き起こされるのか、あるいはゴナドトロピンとテストステロンの低下によって起こされるのかを明らかにするために、+/+ラットに GnRH 拮抗薬 (Cetrorelix) を処置し、ゴナドトロピンとテストステロンの有意な低下を引き起こしたところ、golgin-160 と *Wwox* の変化を伴う生殖細胞のアポトーシスが増加した。さらに、*lde/lde* と Cetrorelix 処置の精巣では、caspase-3 陽性生殖細胞が増加し、ウェスタンブロット分析において断片化した golgin-160 が検出され、golgin-160 がアポトーシス経路により切断されたことが示された。一方、+/+ラットにおける片側性潜在精巣においても、生殖細胞のアポトーシスが増加し、golgin-160 の濃縮したシグナルの発現が認められた。申請者は、これらの実験結果から、golgin-160 の変化は生殖細胞のアポトーシスに共通して起こる事象であり、*lde/lde* では *Wwox* の欠損とゴナドトロピンおよびテストステロンの低下の両方が golgin-160 の変化を引き起こし、P-SP 特異的なアポトーシスを引き起こしている可能性があると結論している。さらに、*lde/lde* ラットの胎子線維芽細胞 (REFs) を 24 時間の血清飢餓状態で維持すると、P-SP で見られたものと同様な golgin-160 の異常な局在を示す REFs が増加し、*Wwox* の欠損がストレスに対する golgin-160 の感受性を増強することで、アポトーシスが増加することが示された。これらの結果から申請者は、正常な細胞における *Wwox* の欠損は、ストレス (内分泌環境の変化など) による golgin-160 の変化を起こしやすくさせ、アポトーシスを増加させる可能性があるという結論付けている。

第 4 章で申請者は、*Wwox* の欠損状態における SCs と LCs の分化と成熟過程を調査している。PND23 および 30 における SCs と精細管径の減少、PND23 における増殖中の SCs の存在、PND23 および 30 における nestin 陽性の SCs とそれを含む精細管の増加は、*lde/lde* の精巣の SCs が未熟であることを示した。LCs の総数、ライディッチ幹細胞 (SLCs)、前駆ライディッチ細胞 (PLCs)、未熟ライディッチ細胞 (ILCs)、クラスター当たりの平均 LCs、精細管当たりの平均クラスター数、精細管当たりのクラスターにおける平均 LCs 数はいずれも *lde/lde* の精巣で減少していた。さらに、LCs におけるアンドロゲン受容体、nestin、および 3β -HSD の発現は低下しており、LCs の発達が遅

延していることが示された。申請者は、*lde/lde*において未熟な SCs の産物である抗ミュラー管ホルモン (*Amh*) の mRNA が高レベルで存在することから、*Amh* により LCs 系細胞の増殖が抑制され、黄体形成ホルモン/絨毛性ゴナドトロピン受容体 (*Lhcg*) が減少していることから、LH 刺激の低下により LH 受容体を発現する PLCs 段階後の LCs の発達遅延が引き起こされている可能性がある」と結論付けている。対照的に、卵胞刺激ホルモン受容体 (*Fshr*) が正常な mRNA レベルを示したことから、セルトリ細胞の成熟遅延が、ゴナドトロピン非依存性に、その細胞における *Wwox* の欠損により直接引き起こされている可能性がある」と述べている。

第5章で申請者は、一連の研究を総括している。*Wwox* は生後の精巣の発達と精子形成の過程において、ほぼ全ての細胞の細胞質と GA に局在する。さらに、*Wwox* の欠損が FRS 期の P-SP において *caspase-3* 発現の増加を伴う *golgin-160* 仲介性のアポトーシスを引き起こすことが明らかとなり、この過程は *lde/lde* における低ゴナドトロピン低テストステロン状態によって促進されていることが示唆された。さらに、精巣の体細胞に関しては、*Wwox* の欠損は SCs の成熟遅延と LCs の重篤な発達障害を引き起こすが、これはゴナドトロピンのシグナル経路と精巣内クロストークに関連した複雑なメカニズムを介しており、最初期の病理発生はゴナドトロピン非依存性にセルトリ細胞の未熟性によって開始していると考えられた。これらの異常が総じて生後初期の *lde/lde* の精巣の表現型を形成しており、申請者は最後に、*Wwox* は生後の精巣の発生段階において、SCs の成熟、LCs の増殖、ステロイド産生、および精子形成において生理学的に重要であると結論している。

以上のように、本論文は *Wwox* を欠損するモデル動物の解析を通じて、精巣の発達と精子形成過程における *Wwox* の局在と機能を明らかにしており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。