

氏 名 長谷川 和輝

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1349 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Regulation of cyclic gene expression change in
Sertoli cells during mouse spermatogenesis

論文審査委員 主 査 准教授 酒井 則良
准教授 木村 暁
教授 城石 俊彦
助教 浅岡 美穂
教授 吉田 松生

論文内容の要旨

Mammalian spermatogenesis is a highly organized system that can produce large number of spermatozoa continuously. Spermatogenesis takes place within the seminiferous tubules that are composed of germ cells and Sertoli cells that are morphologically and functionally unique somatic cells specialized to support spermatogenesis. Sertoli cells directly contact with germ cells, and regulate their proper localization and release into lumen. They also provide nutrients and growth factors essential for the differentiation of germ cells and the stem cell maintenance. Furthermore, Sertoli cells play a pivotal role for maintaining the integrity of the seminiferous epithelium by forming tight junction. Consequently, dysfunction of Sertoli cells leads to the disruption of spermatogenesis and male infertility. Therefore, understanding of the Sertoli cell's function is crucial to clarify the microenvironment for spermatogenesis.

Spermatogenesis progresses in a spatially and temporally regulated manner, known as spermatogenic wave. During spermatogenesis, germ cells in different developmental stages form groups and synchronously differentiate. In the mouse testis, twelve germ cell groups, known as seminiferous epithelial stages I- XII, can be recognized and they are arranged in order along the tubule length showing the spatial continuity. This cyclical program in spermatogenesis is called "seminiferous epithelial cycle". One cycle takes 8.6 days in the mouse and 12.9 days in the rat. When rat germ cells are transferred to mouse testis, spermatogenesis proceed with the cycle characteristic of rat germ cells. Therefore it is believed that the cycle length is primarily regulated by germ cells.

It has been known that Sertoli cells change their gene expression patterns in accordance with the continuous alteration of the epithelial stages. Because heterogeneous gene expression in Sertoli cells was observed even in testes lacking differentiating germ cells, it is suggested that cyclic gene expression in Sertoli cells can occur independently of synchronous spermatogenic differentiation. Furthermore, in the

early phase of the first round spermatogenesis when intact seminiferous epithelial cycle was not established, the wave-like expression in Sertoli cells was associated with the timing of spermatogonia differentiation. Growing evidence suggests interesting possibility that Sertoli cells support stage-specific events of spermatogenesis by creating stage-specific microenvironments.

It has been suggested that retinoic acid (RA) signaling is involved in the regulation of seminiferous epithelial cycle. In vitamin A-deficient (VAD) mice, spermatogenesis was arrested at spermatogonia stage, and the injection of vitamin A (retinol) or RA into VAD mice triggers initiation of synchronized spermatogenesis in all seminiferous tubules. Moreover, it was reported that Sertoli cell-specific deletion of *RAR α* resulted in disruption of the stage-dependent gene expression in Sertoli cells. These evidences suggest the involvement of RA signaling in the stage-dependent expression of Sertoli cells. However, it remains elusive how RA signaling controls the periodicity of Sertoli cells and whether other signaling pathway(s) is involved in the regulation. Furthermore, importance of periodicity in Sertoli cells for spermatogenesis is also unknown.

In part I, to understand the periodicity of Sertoli cells, I performed comprehensive analysis of stage-dependent gene expression in Sertoli cells by using microarray, and identified 419 stage-dependent genes. In part II, I investigated implication of Notch signaling in Sertoli cells, because the list of stage-dependent genes contained *Notch1* receptor. I found that the Notch ligand, *Jagged2* was expressed in germ cells, and *Notch1* receptor was expressed and activated in Sertoli cells in stage-dependent manner. To examine the involvement of Notch signaling in periodicity of Sertoli cells and spermatogenesis, I inactivated Notch signaling in Sertoli cells by using cre-loxP system. However, my data demonstrated that genetic ablation of Notch signaling in Sertoli cells did not affect spermatogenesis nor stage-dependent gene expression in Sertoli cells as long as I examined, suggesting that Notch signaling in Sertoli cells is dispensable for mouse spermatogenesis and the stage-dependent expression.

In part III, I studied relationship between stage-dependent gene expression in Sertoli cells and RA signaling. I found that RA signaling was periodically activated in stage VII-XII seminiferous tubules, and stage-dependent genes showing peak at stage I-VI and VII-XII tended to be suppressed and activated by RA signaling, respectively. To examine the significance of the periodicity in Sertoli cells for spermatogenesis, I disrupted stage-dependent gene expression in Sertoli cells by means of lentivirus mediated suppression of RA signaling, and found it led to stage-specific defects in germ cell differentiation, delayed recovery of tight junction component and abnormal morphology of Sertoli cells. Taken together, the stage-dependent gene expression in Sertoli cells is primarily regulated by periodic activation of RA signaling, and is important for stage-specific events of spermatogenesis.

博士論文の審査結果の要旨

マウス精巣の精細管では 8.6 日周期で同じパターンを繰り返す精子形成の周期性があり、精子形成を支持する体細胞のセルトリ細胞も周期性を持つことが知られている。長谷川君はこのセルトリ細胞の周期性に興味を持ち、そこで周期的に発現パターンを示す遺伝子群をマイクロアレイにより包括的に解析するとともに、レチノイン酸 (RA) 受容体 RAR α をドミナントネガティブ法により機能阻害して、RA の周期性が精子形成に必要であることを示した。博士論文は 3 部からなっており、

第 1 部では、生殖細胞が欠失する *Nanos3*^{-/-} マウスの精巣を用いてセルトリ細胞を単離するとともに、野生型マウスの精細管をその周期に応じて 4 つに分け、それらの発現遺伝子をマイクロアレイ解析してデータを比較することで、セルトリ細胞で周期的に発現パターンが変わる遺伝子を 419 単離した。

第 2 部では、第 1 部で単離した遺伝子のなかに *Notch1* が見つかったため、Notch シグナル伝達系が周期性に関与しているという仮説のもと、*Pofut1* 遺伝子のコンデショナルノックアウトマウスを作製した。*Pofut1* は Notch シグナル受容体に糖鎖を修飾する酵素で、機能維持に必要なことが分かっている。その結果、目的通りセルトリ細胞で Notch シグナルが伝わらないマウスを作成することに成功したが、精子形成に異常は認められず、周期性を示した遺伝子の発現も変化は認められなかった。以上の結果は、セルトリ細胞において Notch シグナルは精子形成に関与しないことを示すものである。

そこで第 3 部では、ビタミン A 欠乏マウスで精子形成が特定の時期に休止すること、ビタミン A 投与により再開するという知見をもとに RA の関与を解析した。まず、RA シグナルを可視化するレポーター (RARE-lacZ) を用いて、精細管の周期が、RA シグナルが強く作用する時期と、その作用の弱い時期に二分されることを見いだした。次に、RA 投与による第 1 部の遺伝子の変化を調べ、RA が低い時期に発現する遺伝子は RA により抑制されるものが多く、高い時期に発現する遺伝子は活性化されるものが多いことを明らかにした。さらに、ドミナントネガティブ型レチノイン酸受容体 dnRAR α をレンチウイルスベクターによって精細管のセルトリ細胞へ導入し、周期的な遺伝子の発現パターンが異常となることを認めた。このとき、精母細胞はアポトーシスをおこし伸長精細胞が精細管内部への移動しなくなることが認められた。これらの結果はセルトリ細胞の RA の周期性が精子形成に重要な働きをもつことを強く示したものである。

セルトリ細胞の詳細なマイクロアレイ解析は今後のセルトリ細胞解析の基盤となる重要なデータセットであり、また dnRAR α による抑制実験は今後さらに詳細な解析を可能にする。これらの知見はセルトリ細胞が精子形成に果たす役割を理解する上で大きく寄与するものである。以上の理由から、長谷川和輝君の博士論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。