

恒温脊椎動物の精子形成における温度の影響の解析

平野 高大

総合研究大学院大学

生命科学研究科 基礎生物学専攻

基礎生物学研究所 生殖細胞研究部門

444-8787 岡崎市明大寺町東山 5-1

目次

I. マウス（哺乳類）精子形成における温度の影響の解析	3
① 序論	
② 材料と方法	
③ 結果	
④ 考察	
⑤ 図表	
II. 謝辞	93
III. 参考文献	95

I. マウス（哺乳類）精子形成における温度の影響の解析

① 序論

多くの哺乳類の精巣は陰嚢と呼ばれる袋状の器官の中に存在する。他の主要臓器は内骨格の内側に収容されているのに対し、精巣は骨格の外に位置している。次世代に遺伝情報を繋ぐ生殖細胞をこのように危険に晒している理由はなぜだろうか？“哺乳類の精巣の温度は冷却器官である陰嚢により深部体温よりも2～6℃低く保たれている。精子形成には深部体温よりも低い温度が必要であり、深部体温では精子形成は障害を受ける。”という説が広く知られている(Moore, 1924)。しかし、なぜ哺乳類が低温環境で精子形成を行うのか、その生物学的意義はほとんど解明されていない。

陰嚢内に精巣を持つ動物は哺乳類のほとんどを占めるが、一部の動物種において陰嚢を持たない動物種が知られている(Werdelin and Nilsson, 1999)。例えば海洋性哺乳類のイルカやクジラは精巣を腹腔に持っている。しかしその精巣は、ヒレ、尾そして体表などにより冷やされた血液を精巣に送り込むことで冷却している(Rommel et al., 1994)。加えて、アザラシは陰嚢こそないが、体表近くに精巣を晒すことで冷却していることが報告されている(Einer-Jensen and Hunter, 2005)。陸上哺乳類では、ナマケモノが腹腔に精巣を持つことが知られている。しかし、ナマケモノの深部体温は約30～34℃と、他の哺乳類の深部体温が37℃程度であることに比べて3℃ほど低く、精巣は冷やされていると言える(Pauli et al., 2016)。最後に、ゾウもまた精巣を腹腔に持つ。ゾウの精巣は肺と横隔膜を隔てた位置にあり、これにより冷却されているという説や深部体温がナマケモノ同様に他種と比べて低いという説が唱えられている(Buss and Wallner, 1965)。その真偽は現在のところでは明らかになっていないが、精巣の冷却を示唆する証拠はいくつか存在している。つまり、哺乳類は冷却方法こそ異なるが、その精巣は深部体温(37℃)よりも低く保たれていると考えることができる。私は、多くの哺乳類と同様に

陰嚢を持つ哺乳類のモデル動物であるマウスを研究動物とし、精子形成における温度の影響に着目した。

マウスの精子形成は陰嚢内で進行し、精巣内には精細管と呼ばれる管が収納されている。精細管の基底膜上には一部集団が精子形成幹細胞として機能する未分化型精原細胞が存在し、自己複製と分化を繰り返している(Yoshida, 2016)。分化した細胞は分化型精原細胞となり、減数分裂を行う精母細胞、半数体である円形精子細胞、伸長精子細胞、そして成熟した精子へと分化する(Russell et al., 1990)。マウスでは未分化型精原細胞から成熟精子に至るまでに約35日を要する(Russell et al., 1990)。この間、生殖細胞は支持細胞であるセルトリ細胞と密接に関係している。この分化過程は8.6日の時間差で進行するために、異なる細胞種が精細管断面に整列することになり、この周期は精細管周期と呼ばれる。マウスでは、形態学的にこれら細胞種の組み合わせはXIIのステージに分類され、成熟精子の放出はステージXIIで起こる(Russell et al., 1990)。

マウスの精巣は腹腔内で発生し、出生後に陰嚢へと下降する(Makela et al., 2019)。この下降過程は胎生13～17日に起こる transabdominal phase と出生後3～4週で起こる inguinoscrotal phase に分類される。この間、gubernaculum、すなわち導帯によって精巣は陰嚢へと下降される。transabdominal phase では精巣は尾部が gubernaculum によって固定され、性分化と副腎の退行に伴い gubernaculum との接着を発達させる。精巣の発生と gubernaculum の肥大化により、相対的に鼠径部との距離は縮まるがこの間の精巣の頭部は cranial suspensory ligament に固定されたままとなる。その後、gubernaculum の肥大化と cranial suspensory ligament の退行によって精巣は鼠径部へと移行する。inguinoscrotal phase では gubernaculum は発達した陰嚢へと伸長し、gubernaculum が収縮することで精巣は陰嚢への下降を完了させる。

この精巣の下降は哺乳類のオスのみで発達したものであり、同様に減数分裂を行う哺乳類の卵形成は腹腔内で起こる。また爬虫類や鳥類などの精巣は体幹深部に位置するた

め、この陰嚢への下降は哺乳類オスに特有な現象である。この精巣が陰嚢へと下降する過程が正常に進行しない場合、精巣が腹腔に留まる“停留精巣(cryptorchidism)”となる。マウスを含む多くの哺乳類においてこの現象は観察されており、ヒトでは1～9%の新生児に停留精巣の症状がみられることが知られている (Rodprasert et al., 2019)。多くの場合では生後6ヶ月までにヒト精巣は自然に下降が生じるために積極的な処置は行われないが、その後も自然下降が起こらない場合は不妊や腫瘍化につながることを知られているため治療の対象となる。一般的に治療には、状況に応じて外科的な処置や下降を促すホルモン治療によって陰嚢へと精巣を下降させる (Cobellis et al., 2014)。このように腹腔内に精巣が留まることは多くの哺乳類で不妊に大きく関わることを知られている。

この停留精巣は人工的に再現することが可能である。マウスやラットでは、精巣を人工的に陰嚢から精巣へと挙上して固定した“人工停留精巣(artificial cryptorchid)”が古くから実験系として確立している (Absalan et al., 2008; Bianchi et al., 2017; Kazusa et al., 2004; Nishimune et al., 1978; Sugimoto et al., 2012)。最も体幹深部に固定された精巣では、未分化型精原細胞のみを残して生殖細胞は脱落する (Nishimune and Aizawa, 1978; Sugimoto et al., 2012)。このことは、未分化型精原細胞から分化型精原細胞への分化が阻害されることを示唆し、これが停留精巣の不妊の原因の一端を担うことを示している。また、精母細胞や円形精子細胞も人工停留精巣処置後1週間以内にアポトーシスやそれに類似する機構によって速やかに取り除かれることが知られている (Ito et al., 1997)。この人工停留精巣における精子形成障害の原因については腹腔内の温度環境とされている。また、未分化型精原細胞のみとなった人工停留精巣を再び低温環境である陰嚢内へと戻すと精子形成は再開する (Nishimune et al., 1981)。さらに、ブタの実験においては停留精巣を人工的に水冷パイプで冷却することで精子形成は回復することが報告されている (Frankenhuis and Wensing, 1979)。これらのことから、腹腔の高温環境が精子

形成障害を引き起こすという説は一般的に広まっている (Mieusset and Bujan, 1995)。

また停留精巣以外でも、様々な原因で引き起こされた“高温環境”によって引き起こされたと考えられる精子形成障害がヒトを中心に報告されている (Durairajanayagam et al., 2015)。精巣静脈にできる瘤による血行障害により精巣の温度が上昇し、不妊となる精索静脈瘤は特によく知られている (Mieusset and Bujan, 1995)。陰嚢内にある正常な精巣においても外部からの温度刺激で妊性が低下することも数多く報告されている (Comish et al., 2015; Houston et al., 2018)。一例として、通気性の低く密閉性の高い衣類を着用することや、長時間の自動車の運転による鼠径部の温度上昇、さらにサウナのような高温環境に暴露されることによる温度上昇などが挙げられる (Durairajanayagam et al., 2015)。マウスやラットにおいても 40℃以上の温度で鼠径部を温浴した場合に停留精巣と同様にアポトーシスによって生殖細胞が急速に失われることや、室温を陰嚢温よりも高く設定することによっても障害を受ける (Lue et al., 1999; Miura et al., 2002)。このように、精子形成障害と温度上昇の関係は非常に多くの状況証拠がある。

しかし、本当に温度のみの影響で精子形成障害が生じるのであろうか？あるいは、温度以外の要因、または温度と温度以外のどちらも影響することによって精子形成障害が生じるのであろうか？前述までの実験は全て *in vivo* で行われている。これら全ての実験系に当てはまる問題点に次の2つがある。1) 温度の完全な制御ができない。2) 温度以外の要因の排除ができない。1) について、停留精巣の実験では体温という日内変動がある状況である上に、そもそも体温以外の温度に設定することはできない。温浴実験や室温上昇実験においても同様に、精巣温を任意の温度や期間に設定することはできない。また、温浴実験では40℃以上という体温をはるかに超える温度に設定されているため、停留精巣の温度域である深部体温とは大きく異なる状況と言える。これらのことから、精子形成は一体何℃から障害が生じるのか、そもそも精子形成は一体何℃の温度域が最適かについても不明なままである。2) については、*in vivo* の実験では全身

性の影響を排除することができないことが挙げられる。停留精巣では男性ホルモンなどの内分泌系の攪乱や(Karpe et al., 1981)、精索静脈瘤ではコルチゾールの変動も報告されており(Comhaire and Vermeulen, 1974)、温度のみが直接作用した結果とは断定できない。その他の実験でも同様に、温度を上昇させる際には精巣以外の臓器も全て同時に高温にさらされているため、精巣と温度のみの現象として表現するには十分とは言えない。これらのことから、広く知られた“精子形成の高温障害”は必ずしも温度のみの影響で起こるかは明らかになっていない。

このように、哺乳類の精子形成に与える温度のみの影響を評価できる実験系は存在しなかった。この解決策として、温度のみを変化させることが可能な実験系(例えば、*in vitro*系での精子形成)が必要であった。これまで *in vitro* の実験系で未分化型精原細胞から精子を得ることはできなかった。しかし、2011 年に精巣の器官培養系が開発された(Sato et al., 2011)。気相液相培養を発展させた培養系を用いることで、生後4日齢の最も未分化な生殖細胞のみを含む幼若精巣を約1ヶ月間培養することで顕微受精が可能な伸長精子細胞まで分化させることに成功した。この実験系は非血清培地を用いるため、限りなく実験条件を均質に設定することが可能となった。この実験系により、精子形成の重要な分化現象である減数分裂(meiosis)や精子完成(spermiogenesis)を *ex vivo* で観察することができる。

そこで本研究では、この培養系を用いることで、温度のみの条件を変化させ、精子形成に与える影響を評価した。その結果、温度のみの影響でマウス精子形成は障害を受けることを明らかにし、特に減数分裂期における高温障害のメカニズムの解明に迫った。その結果、高温環境とDNA修復機構の関係から、減数分裂期の染色体の対合不全に至る機構の存在を明らかとした。

② 材料と方法

本研究には、組換え DNA 実験、動物実験が含まれる。いずれにおいても、当該法律・指針等規則およびその精神を遵守し、基礎生物学研究所組換え DNA 実験安全委員会および自然科学研究機構岡崎 3 機関動物実験委員会の承認を受けて遂行した。

動物実験

野生型マウス、および、B6; B6C3-Tg(Acro3-EGFP)01Osb マウス(以降、*Acr-GFP* マウスと表記する)を使用した(Nakanishi et al., 1999)。これらマウスの繁殖、飼育は基礎生物学研究所モデル生物研究センターで行った。全てのマウスは C57BL/6J (Japan SLC, Japan CLEA) 系統の遺伝的背景で利用した。

臓器温度測定

マウスの陰嚢温と腹腔温の測定は、ワイヤレス温度測定センサ IPTT-300 (BMDS) および温度測定装置 DAS-7006S (BioMedic Data Systems) を用いた。温度センサの挿入位置は 8 週齢オスマウスの陰嚢皮下および肝臓直下の腹腔(胸部腔壁)とした。麻酔下で、陰嚢皮下および肝臓直下の腹腔を 1cm 程度切開し、温度センサを挿入した。温度センサは切開部の上側に縫合糸を用いて位置が変化しないように固定した。処置後 1 週間後に 2 時間おきに 24 時間、1 回の計測につき 1 回温度を測定した。マウス飼育条件は、18 時間明期 (8 時から 20 時)、6 時間暗期 (20 時から 8 時) の件下、室温環境 (25°C) で飼育した。また、この臓器温度測定実験は野波裕太さんと共同で行ったものである。

人工停留精巣マウスの作出

人工停留精巣処置は Sugimoto らの報告に従い行った(Sugimoto et al., 2012)。肝臓直

下の皮膚および腹壁を正中線上で約 1cm 切開した。ピンセットを用いて精巣上部に付随する脂肪塊を保護的に掴み、切開創を通して体外まで精巣を引き出した。次に gubernaculum を切除し、精巣が再び陰嚢へと戻ることを防いだ。さらに脂肪塊を用いて精巣を包み縫合した。最後に、精巣と精巣上部頭部の間に縫合糸を通し固定のための輪を作出した。出来上がった輪に縫合糸を通し、切開部の上部に位置する腹壁に固定した。術後は 18 時間明期（8 時から 20 時）、6 時間暗期（20 時から 8 時）の条件下、室温環境（25 度）で飼育した。

マウス精巣器官培養

精巣器官培養は Kojima et al., 2018、Sato et al., 2011 および Sato et al., 2013 に基本的に従った(Kojima et al., 2018; Sato et al., 2011; Sato et al., 2013)。1.5% (wt/vol in H₂O) アガロースゲル (Dojindo Laboratory) をオートクレーブを用いて融解した後に、10cm シャーレに 33ml 流し込んで固め、メスを用いて 1cm 角に成形した。このゲルを 16 個程度新たなシャーレに移し、培養液(α MEM/10% KnockOut Serum Replacement/1% Pen-strep (Penicillin-Streptomycin)) 25ml を加え、5% CO₂、34°C環境で一晩静置した。この工程を少なくとも 2 回繰り返すことで培養用のゲルを作成した。12 well dish (IWAKI)に 2 つのゲルと 500 μ l の培養液を加えた後、10 分程度室温で馴染ませることで気相と液相環境を構築した。生後 4 日齢 (P4) の *Acr-GFP* マウス精巣を採材し、4 °C に冷却した PBS 内で白膜を除去した。その後、少なくとも 2 度にわたって PBS を置換することで精巣を洗浄し、最終的に 4 °C に冷却した培養液に置換した。準備しておいた気相液相環境の 2 つのゲルにそれぞれ精巣を静置し、任意の温度(30 から 40°C)に設定したインキュベータ(APC-30D; Astec)で培養を行った。これらの培養精巣は 1 週間に 1 度、パスツールピペットを用いて古い培養液を除去し、新たな培養液を 500 μ l 加えた。*Acr-GFP* マウスの精巣の蛍光も 1 週間に 1 度、培養液交換時に IX73 倒立顕微鏡

(Olympus)を用いて観察を行うことで培養状態の観察および GFP 蛍光の記録を行なった。

染色体 spread 法

in vivo 精巣と培養精巣の精母細胞の核展開は dry-down 法を用いて行った(Ishiguro et al., 2014; Peters et al., 1997)。 *in vivo* 精巣については、頸椎脱臼により安楽死させた 5 週齢マウスから採集、白膜を除去し、以下は培養精巣と同様の方法によって染色体 spread 標本を準備した。すなわち、4 °C に冷却した PBS 内で眼科バサミを用いて 90 秒間ミンスを行い、その後 30 秒間ピペッティングした。70 μ m メッシュストレーナ (Becton Dickinson)を用いてデブリの除去を行い、300g で 5 分間、4 °C環境で遠心した。PBS で再懸濁後に PBS と同量の Hypo buffer (30mM Tris, 50mM Sucrose, 17mM trisodium citrate dihydrate, 5mM EDTA, 0.5mM dithiothreitol)を加えることで低浸透圧処理を行った。4 倍量の PBS を加え、300g、5 分間、4 °C環境で遠心分離を行うことで細胞を洗浄した。その後、PBS で再懸濁を行い、2 倍量の 100mM Sucrose solution (pH8.2)、3 倍量の 1% PFA/0.1% (v/v) Triton X-100 in 10mM sodium borate を加えて懸濁した。スライドガラス(MAS-GP typeA-coated slides (Matsunami))に直径 2cm 程度の円をパップペンで書き、その内側に 30 μ l の懸濁液を加えた。湿度 100%環境で 1 時間静置し、その後室内湿度環境に 30 分間触れさせた。Photo-Flo (kodak) 溶液で 30 秒間洗浄し、完全に乾燥させ、-80°Cで保存した。

染色体 spread サンプルに対する蛍光免疫染色は以下の通りに行った。0.05% Triton X-100 /PBS で 10 分間洗浄し、0.05% Triton X-100 (PBS-TX)、10% もしくは 2%ウシ胎児血清、4% ロバ血清/PBS(ブロッキング組成)を用いて 1 時間室温でブロッキングをした。その後、一次抗体(anti-DMC1 rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz, #sc-22768, 1:1000); anti-SYCP1 polyclonal antibody (NOVUS Biologicals, #NB300-229, 1:500);

anti-SYCP3 rabbit polyclonal antibody (Abcam, #ab15093, 1:500); anti-SCP3 mouse monoclonal antibody (Abcam, #ab97672, 1:1000); anti-phospho-H2A.X (Ser139; Millipore, #07-164, 1:500); anti-RPA2 (Cell Signaling Technologies, #2208, 1:80); anti-RAD51 (Bio Academia, #70-002, 1:100); anti-MLH1 (BD Biosciences, #551092, 1:100); anti-HORMAD1 (proteintech, #13917-1-AP, 1:1000) をブロッキング組成で希釈し、4℃環境で一晩反応させた。翌日、PBS-TX で 15 分間洗浄し、二次抗体(Thermo Fisher Scientific および Jackson ImmunoResearch)および Hoechst 33342 をブロッキング組成で希釈し、室温で 2 時間反応させた。PBS-TX で 15 分間洗浄し、パーマフルオール (Thermo Fisher Scientific)で封入した。

HE 染色および PAS 染色

in vivo マウス精巣および培養精巣を 4%PFA (wt/vol)/PBS を用いて 4℃環境もしくはブアン固定液を用いて室温で、それぞれ一晩反応させた。その後にパラフィンに包埋し、7 μ m 厚のパラフィン切片を作成した。サンプルはキシレンを用いて脱パラフィン処理を行い、エンタノール系列により脱水した。純水で洗浄後、hematoxylin (MUTO PURE CHEMICALS) and eosin (Wako) (HE) 染色もしくは hematoxylin (MUTO PURE CHEMICALS) and periodic acid-Schiff (Wako) (H-PAS)染色を行い、グリセロールで封入した。

組織切片の免疫染色

in vivo マウス精巣および培養精巣は 4% PFA (wt/vol)/PBS を用いて 4℃環境で一晩反応させた(Nakagawa et al., 2010)。その後にパラフィンもしくは Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura Finetek)に包埋し、7 μ m 厚のパラフィン切片もしくは凍結切片を作成した。パラフィン切片は HE 染色と同様の手順で立つパラフィン処理と脱水処理を行

った。パラフィン切片および凍結切片はこれより同様の手順で染色した。0.04% tween 20 (vol/vol)/PBS (PBS-T)で 15 分間洗浄し、Blocking One Histo solution (Nacalai Tesque)を用いて 1 時間室温でブロッキングした。その後、4% ロバ血清/Can Get Signal Solution 1 (Toyobo)に一次抗体 (anti-GFR α 1 goat polyclonal antibody (R&D Systems, #AF560, 1:1000); anti-KIT goat monoclonal antibody (R&D Systems, #AF1356, 1:1000); anti-Mouse Vasa homolog (MVH) rabbit polyclonal antibody (Abcam, #ab13840, 1:500); anti-SCP3 mouse monoclonal antibody (Abcam, #ab97672, 1:1000); anti-GATA4 rabbit polyclonal antibody (Thermo, #PA1-102, 1:500); anti-cleaved Caspase3 rabbit polyclonal antibody (Cell Signaling, #9661, 1: 500; anti-L1 orf1 rabbit polyclonal antibody (Edinburgh, Edinburgh 大学 O'Carroll D 博士より譲渡された; [\(Di Giacomo et al., 2014\)](#), 1:5000)を希釈し、4°Cで一晩反応させた。翌日、PBS-T で 15 分間洗浄し、二次抗体 (Thermo Fisher Scientific および Jackson ImmunoResearch)および Hoechst 33342 を 4% ロバ血清/Can Get Signal Solution 2 (Toyobo)で希釈し、室温で 2 時間反応させた。PBS-X で 15 分間洗浄し、パーマフルオール(Thermo Fisher Scientific)で封入した。

画像取得および編集方法

HE、PAS、免疫染色サンプルは BX51 正立型落射蛍光顕微鏡(Olympus)と DP72 CCD カメラ(Olympus)を撮影機材として、CellSens imaging software (Olympus)を画像取得のソフトウェアとして用いて撮影した。 γ H2AX の免疫染色の画像データ取得は、Leica SP8 confocal system を用いた。培養精巢の撮影には IX73 倒立型落射蛍光顕微鏡 (Olympus)を使用し、その他は前述と同様の機材およびソフトウェアで撮影を行った。取得した画像は Photoshop (Adobe)を用いて元の情報を損なうことのない範囲で画像の編集を行い、Illustrator (Adobe)を用いて画像を配置した。

統計計算およびグラフ作成

全ての統計解析のデータは Microsoft Excel 2019、KaleidaGraph (4.5.0) (HULINKS)および R studio (1.1.1335) (R studio, Inc)、Fiji (2.1.0/1.53) (NIH)、BellCurve for Excel (2.00) (Social Survey Research Information Co., Ltd.), LAS X (3.5.5.19976) (Leica microsystems)を用いて解析を行った。それぞれの解析データは図表の説明に記載する。

③ 結果

1. マウス精子形成は深部体温によって障害を受ける

1.1 マウスの陰嚢温は深部体温よりも 4°C程度低い

マウスの陰嚢内の温度は 2~6°C程度、深部体温よりも低いことが知られている (Mieusset and Bujan, 1995)。しかしこれまでの実験は麻酔下で、針状の熱電対温度計を挿入して測定するものや、サーモグラフィによって外部から表面温度を測定したものがほとんどであった。これにより、通常活動時の陰嚢内の温度を測定した報告はなかった。そこで、私は、正確な陰嚢温と深部体温を測定するために、体内に埋め込むことができるワイヤレス温度センサを用いて陰嚢内温と深部体温を測定することを想起した (図 1)。マイクロチップの大きさが 14mm と精巣と同等の長さである IPTT-300 (BMDS)温度センサ(Comish et al., 2015)を選択し、陰嚢内と腹腔内にそれぞれを固定することで温度を測定した。深部体温を測定する位置として、肝臓直下に温度センサを配置した (図 1)。これは、未分化型精原細胞のみを残して生殖細胞が脱落することが報告されている、人工停留精巣の中でも最も重度の精子形成障害を引き起こす処置で精巣を固定する位置である (Nishimune and Aizawa, 1978; Sugimoto et al., 2012)。陰嚢内と深部体温をそれぞれ、2 時間間隔で 24 時間計測した結果、日内変動があるものの、陰嚢温は平均 34.0°C、深部体温は平均 37.8°Cであった (図 2)。これまでの報告と同様、マウスの陰嚢内の温度は深部体温に比べて約 4°C低いことがわかった(Mieusset and Bujan, 1995)。

1.2 器官培養した精巣の精子形成は 38°C条件で障害を受ける

人工停留精巣やその他、精巣の温度変化をもたらす過去の実験系では、温度のみの影響を正確に評価することは原理的に不可能であった。Sato et al., 2011 によって、生後 4

日齢の幼若精巣を 34°C 条件で 5 週間培養することにより、最も分化した生殖細胞である伸長精子細胞までの分化過程を支持することが可能な器官培養が開発された。

そこで私は、この器官培養系を用いて温度のみを変化させることで精子形成に与える温度の影響を評価した (図 3 および 4)。最初に、ワイヤレス温度センサによって得られた陰嚢内の精巣温および深部体温と同じ温度条件での培養を行った。陰嚢内温としては、実測した陰嚢内の平均温度が 34.0°C であったことから 34°C を用いた。深部体温には、実測した腹腔内の平均温度が 37.8°C であったことから 38°C を用いた (図 2)。培養を行ったインキュベーター(アステック:APC-30D)の温度制御精度は $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ であった。本研究では、第一減数分裂期の後半の精母細胞から発現する Acrosin (Acr) の プロモーターの下流で Acrosin-GFP 融合タンパク質を発現する *Acr-GFP* トランスジェニックマウス(Nakanishi et al., 1999)の精巣を培養した。この Acrosin-GFP 融合タンパク質は精母細胞では細胞質に、減数分裂期以降の脱細胞質を起こした円形精子細胞および伸長精子細胞では、その先体に局在する(Nakanishi et al., 1999)。これを利用して、Acrosin-GFP 融合タンパク質の蛍光により培養中の組織の状態確認および細胞の分化状態を評価した。さらに、培養精巣に見られる Acrosin-GFP 融合タンパク質の蛍光シグナル(以下、Acr-GFP シグナル) を grade 0 から 4 までに分類することにより半定量的な解析を行った (図 5)。培養後の精巣組織の精子形成は、HE 染色に加えて、蛍光免疫染色によって検討した。具体的には、生殖細胞全体で発現する MVH (Tanaka et al., 2000)、減数分裂期の精母細胞の染色体上に局在する SCP3 (Yuan et al., 2000)、分化型精原細胞に発現する KIT (Schrans-Stassen et al., 1999; Yoshinaga et al., 1991)、未分化型精原細胞の一部の集団に発現する GFR α 1 (Hara et al., 2014; Meng et al., 2000)、そして、セルトリ細胞に発現する GATA4 (Kyronlahti et al., 2011)の発現に基づいて細胞種を判定した (図 7 および 8)。

34°C 条件で培養した場合、培養開始 2 週目から培養終了の 5 週目にわたってほとん

どの培養精巣で grade 4 の Acr-GFP シグナルが観察された (図 6)。組織学的解析では、培養精巣の辺縁部の精細管において精原細胞、精母細胞、円形精子細胞そして伸長精子細胞の全ての分化段階の生殖細胞が多くの培養精巣で観察された (図 9)。これらは Sato et al., 2011 で報告された結果と一致しており、この報告の実験系を再現できたと判断した。さらに切片の免疫染色によって、培養精巣の精細管には多くの MVH 陽性の生殖細胞、SCP3 陽性の精母細胞、KIT 陽性の分化型精原細胞、GFR α 1 陽性の未分化型精原細胞、GATA4 陽性のセルトリ細胞が観察された (図 9)。

一方、38°C条件で培養した場合、培養終了5週目まで全ての培養精巣で Acr-GFP シグナルは観察されなかった (図 10)。これは、生殖細胞が第一減数分裂期の後半の精母細胞まで分化していないことを示唆する。組織学的解析からは、円形精子細胞および伸長精子細胞が失われていることがわかった (図 11)。基底膜上には精原細胞と精母細胞が存在し、2層目にも少数ながら精母細胞が存在した。MVH 陽性細胞数は、34°C条件と比べて大きく減少していた (図 11)。しかし、KIT 陽性の分化型精原細胞、GFR α 1 陽性の未分化型精原細胞、GATA4 陽性のセルトリ細胞は 34°C条件と同様に存在していた。SCP3 陽性細胞 (精母細胞) は 34°C条件に比べて数は少ないものの存在はしたが、その核形態から第一減数分裂の前半の段階にとどまっていると判断した (図 11)。これは、精母細胞後半から発現を開始する Acr-GFP シグナルが観察されなかったことと一致する (図 10)。

以上の結果から、34°C条件で器官培養を行うことで、定性的には陰嚢内の精子形成を模倣することができると結論した。さらに、温度パラメータのみを変化させることで精子形成が障害を受けることが証明された。さらに私は器官培養を用いて 30°Cから 40°Cまでの温度を 1°C刻みで設定し、精子形成と温度の関係を調べた。

2. マウス精子形成は異なる温度で異なる精子形成障害を示す

2.1 深部体温よりも高温の環境では重度の精子形成障害を示す

深部体温は平均 37.8°Cであったことから、前述のように、深部体温を 38°Cに設定した (図 2)。しかし体温は±1°C程度の日内変動が存在する (図 2)。そこで、深部体温として設定した 38°Cよりも高温の 39°Cおよび 40°C条件で培養を行った。39°Cでは、38°C条件と同様、5 週間にわたって Acr-GFP シグナルは観察されなかった (図 14)。組織学的な解析においても、円形精子細胞および伸長精子細胞が失われていた。さらに、MVH 陽性細胞数は 38°C条件よりも減少していた。未分化型精原細胞、分化型精原細胞、および第一減数分裂前半の精母細胞までの細胞が見られ、38°Cと比べて細胞種の構成は変わらなかったが、それぞれの細胞数は減少していた。一方で、GATA4 陽性のセルトリ細胞は 34°Cおよび 38°C条件と同様に精細管内に相当数存在した (図 11 および 14)。

40°Cで培養を行った場合も、39°C条件と同様に Acr-GFP シグナルは 5 週間にわたって観察されなかった。しかし 38°Cや 39°Cとは異なり、全ての精巣片で MVH 陽性細胞は完全に失われていた。これと対照的に、GATA4 陽性のセルトリ細胞は 34°C環境と同様に精細管内に相当数存在した。以上から、40°C環境では生殖細胞のみが失われることが明らかとなった (図 15)。

2.2 陰嚢温と深部体温の間の温度によって障害を受ける複数の分化ステップが存在する

次に、陰嚢内温 (34°C) と深部体温 (38°C) の間の 35°C、36°C、37°Cで培養し、精子形成に与える影響を検討した。

37°Cで培養した場合、Acr-GFP シグナルは培養開始 2 週目から培養終了の 5 週目にわたって観察された一方、34°Cに比べてその強度は弱くなった (図 16)。組織学的解析では、38°C条件と同様に円形精子細胞および伸長精子細胞が失われていた (図 16)。基底膜上には精原細胞と精母細胞が存在し、2 層目にも少数の精母細胞を認めた。MVH 陽

性細胞数は、34°C条件よりも少ないが、38°C条件よりは多数存在した。未分化型精原細胞、分化型精原細胞、セルトリ細胞は34°C条件と同程度の数が認められた。SCP3陽性の精母細胞数は34°C条件よりも減少していた(図16)。Acr-GFPシグナルが観察されたことと一致して、第一減数分裂期の後半の精母細胞(SCP3陽性)が見られた(図16)。以上から、37°C条件において最も分化した細胞種は第一減数分裂期の後期の精母細胞であると結論した。

次いで、36°C条件で培養を行った。Acr-GFPシグナルは、34°Cと同程度の強度で、2週目から5週目にわたって観察された(図17)。HE染色した組織切片では、精原細胞、精母細胞、円形精子細胞が存在する一方、伸長精子細胞は失われていた(図17)。次いで円形精子細胞の分化状態を、PAS染色による先体の形態を指標にしてstep1からstep16に分類した手法(Russell et al., 1990)に従い評価した結果、step3-4の初期の円形精子細胞までしか存在しなかった(図18)。このことから、36°C条件では生殖細胞は円形精子細胞までしか分化できないことが示唆された。

最後に、35°C条件で培養を行った。この温度では、34°C条件と同程度の強度のAcr-GFPシグナルが2週目から5週目にわたって観察された。組織切片上では、伸長精子細胞までの全ての分化段階の生殖細胞が観察された。しかし、伸長精子細胞を含む精細管は34°C条件に比べ少なかった(図19)。これにより、35°Cは精子形成に最適な温度条件ではないものの、精子形成を完了できると結論した。

以上の結果をまとめると、37°Cから38°Cでは第一減数分裂の前半から後半への移行、36°Cから37°Cでは減数分裂の完了、35°Cと36°Cでは円形精子細胞から伸長精子細胞への分化が、それぞれ温度依存的に障害されることが明らかとなった(図20)。精子形成がわずか1°Cの違いによって異なった障害を受けることは、重要な発見と考えている。

2.3 陰嚢温よりも低い温度でも精子形成は障害を受ける

次いで、精子形成にとって最適な温度域を調べるために、陰嚢温よりも低い 30°C および 32°C を検討した。最初に 32°C で培養したところ、34°C で培養した時と同程度の Acr-GFP シグナルが 2 週目から 5 週目にわたって観察された (図 18)。全ての段階の生殖細胞種が観察されたが、伸長精子細胞まで分化の進んだ精細管は 34°C 条件に比べなかった (図 18)。これにより、32°C は精子形成に最適な温度条件ではないものの、伸長精子細胞まで分化が進行すると結論した。

一方、30°C では、5 週間の培養期間を通して Acr-GFP シグナルは観察されなかった。組織学的には、円形精子細胞および伸長精子細胞が失われていた。基底膜上には精原細胞と精母細胞が存在し、2 層目にもわずかに精母細胞が存在した (図 19)。MVH 陽性細胞数、KIT 陽性分化型精原細胞数、GFR α 1 陽性未分化型精原細胞数は 34°C 条件と比較すると大きく減少していた (図 19)。SCP3 陽性の精母細胞は 34°C 条件に比べて減少した。またその核形態から第一減数分裂の前半の段階にとどまっていると判断したこれは精母細胞後半から発現する Acr-GFP シグナルが観察されなかったことと一致する (図 19)。一方で、GATA4 陽性のセルトリ細胞は 34°C 条件と同様、相当数存在した (図 19)。以上から、30°C 条件では生殖細胞は第一減数分裂の前半の細胞までしか分化できないと結論した (図 19)。

2.1 から 2.3 で記したように、私は、マウス精子形成が異なる温度で異なる精子形成障害を示すこと、わずか 1°C の違いによってその障害が変化することを明らかにした (図 20)。この知見は、これまで漠然と考えられてきた“精子形成の高温障害”という現象が、実際には温度感受性の異なる複数の分化ステップを含む、複合的な現象であることを示す。しかし、予想に反して、実測に基づく深部体温(38°C)に設定した今回の実験では人工停留精巣の精子形成障害を再現することはできなかった。すなわち、*in vivo* の人工停留精巣では、未分化型精原細胞のみを残して、分化型精原細胞以降の生殖細胞が脱落するが (Nishimune and Aizawa, 1978; Sugimoto et al., 2012)、38°C および 39°C の温度条件

における器官培養では第一減数分裂期の前半の精母細胞まで分化が進行したのである。このことは人工停留精巣で観察される精子形成障害は、高温だけによる結果ではない可能性を示唆する

3. 37°Cから 38°Cでは、第一減数分裂前期のザイゴテン期からパキテン期への進行が阻害される

前述のように、37°Cでは第一減数分裂の後半の精母細胞以降、38°Cでは第一減数分裂の前半の精母細胞以降の生殖細胞が観察されなかった(図 20)。そこで私は、生殖細胞を特長づける現象である減数分裂が障害を受けるこれらの温度に注目し、さらに詳細な解析を行った。第一減数分裂前期は、相同染色体の凝集が始まるレプトテン期、対合が開始するザイゴテン期、対合が完了し乗換えが進行するパキテン期、乗換えが完了して再び相同染色体が離れるディプロテン期に分けられる (Baudat and de Massy, 2007)。

これらの分化段階は、相同染色体の対合状態を可視化することによって判断できる。切片を用いた解析ではこれらの判別は難しいため、低浸透圧処理によって核を破裂させ、染色体を展開して観察できる”染色体 spread 法”を行った (Ishiguro et al., 2014; Peters et al., 1997) (図 21)。次いで、SCP3 (第一減数分裂期の染色体 lateral element) および SCP1 (第一減数分裂期の染色体 central element) に対する免疫染色を行った。これにより、第一減数分裂期の染色体を SCP3 によって、染色体の対合部分を SCP1 によって、それぞれ可視化することができる (図 21) (Meuwissen et al., 1992; Page and Hawley, 2004)。加えて、Hormad1 を用いた染色を行った。Hormad1 は lateral element であり、染色体間の対合していない部分には局在するが、対合部分には局在しない (Wojtasz et al., 2009) (図 23)。この実験系を用いて、5 週齢の *in vivo* 精巣、34°C、37°C、38°C 条件で 5 週間培養した精巣片から得られた精母細胞の解析を行った。

34°Cで培養した組織片からは、*in vivo* 精巣と同様にレプトテン期からディプロテン

期までの全ての分化段階の精母細胞が観察された。各分化段階の精母細胞の割合は、*in vivo* 精巣と 34°C で培養した精巣で、類似していた(図 22)。これにより、34°C で培養した精巣では第一減数分裂期が正常に進行することが示された。

一方 37°C で培養した場合にも、レプトテン期からディプロテン期までの全ての分化段階の精母細胞が観察されたが、パキテン期およびディプロテン期の細胞の割合は 34°C に比べて大きく減少していた (図 21 から 23)。この結果は、Acr-GFP シグナルと一致する (図 14)。すなわち、37°C の温度条件は精母細胞のザイゴテン期からパキテン期への進行を障害することが示唆された。

ついで、38°C の精母細胞について解析した。レプトテン期とザイゴテン期の細胞は観察される一方、パキテン期とディプロテン期の細胞はごく稀にしか観察されなかった (図21から23)。これは、38°C ではAcr-GFPシグナルが全く観察されなかった観察結果とも一致した (図10)。これにより、38°C 条件では37°C 条件よりも強固にザイゴテン期からパキテン期への進行が阻害されることを明らかにした。

次に、高温環境で精母細胞が取り除かれるメカニズムを検討した。精巣を高温環境に晒した *in vivo* の実験系から、生殖細胞の喪失にアポトーシスが関わることが知られている (Lue et al., 1999; Miura et al., 2002)。そこで、高温条件下の器官培養でもアポトーシスによって生殖細胞が失われるかを検討した。34°C で2週間培養し、Acr-GFPシグナルが認められる精巣片を38°C へ移して、精子形成を解析した (図24)。移行後3日目以降にAcr-GFPシグナルは急速に減弱した (図24)。これと一致して、38°C へと移行後3日目以降から精母細胞は急速に失われることが、組織学的解析より明らかとなった (図25)。さらに、SCP3とCaspase3 (アポトーシスの指標タンパク質) の免疫染色を用いて (Elmore, 2007)、アポトーシスの関与を検討した。34°C 条件で2週間培養した精巣片に見られるSCP3陽性精母細胞のほとんどがCaspase3陰性であった (図26)。しかし、38°C へと移した1日後にはSCP3陽性精母細胞の多くがCaspase3陽性となることが観察され

た (図27)。以上の結果より、*in vivo*の場合と同様、器官培養においても、精母細胞が高温条件に晒されると、アポトーシスによって細胞死をおこすと結論した。

これらから、高温条件によって精母細胞はザイゴテン期からパキテン期への進行が阻害され、アポトーシスの経路により取り除かれることが示唆された。次に、私はザイゴテン期からパキテン期への進行が阻害されるメカニズムに注目した。

4. 高温によりDNA double-strand breaksは増加する

第一減数分裂期前期のレプトテン期とザイゴテン期では相同染色体の対合(synapsis)が進行する。第一減数分裂期前期の最初のイベントはDNA 二重鎖切断、double-strand breaks (DSBs)である。DSBsは、SPO11-TOPO6BL複合体によってレプトテン期に生じる (Baudat and de Massy, 2007; Robert et al., 2016)。さらにRPAs、DMC1やRAD51などのDSBs修復タンパク質群によってDSBsが修復されるのと並行して相同染色体の対合が進行する (Cloud et al., 2012; Kurzbauer et al., 2012; Shinohara and Shinohara, 2004)。一部のDSBs修復部位では、相同染色体のDNA鎖間の相同組換えによる乗換え(crossover)へと発展する (Hunter and Borts, 1997) (図28)。そこで私は、37°Cおよび38°Cで観察されたザイゴテン期からパキテン期への進行の阻害とDSBs形成および修復の関係を検証した。

最初に、減数分裂期特有のDSBsが高温環境で培養した精母細胞でも形成されるかを調べた。5週齢の*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°Cで5週間培養した精巣片より得られた精母細胞から染色体spread標本を作成し、 γ H2AX (DSBsに応答して形成されるリン酸化ヒストン H2AX)の免疫染色を行うことで、DSBs形成を調べた (Mahadevaiah et al., 2001)。

正常な第一減数分裂期前期ではレプトテン期とザイゴテン期において、SPO11-TOPO6BL 複合体によって生じた DSBs に応答して ATM 依存的な γ H2AX(第一波)が

生成される(Bellani et al., 2005)。その後、DSBsの修復に伴い第一波の γ H2AXは減少していく。次いで、より後期のステージから対合していない染色体に応答してATR依存的な γ H2AX(第二波)が生成される。この第二波はmeiotic silencing of unsynapsed chromatin (MSUC)として知られている(Royo et al., 2013)。*in vivo* 精巣から得られた精母細胞では、レプトテン期とサイゴテン期において核全体に γ H2AXシグナルが観察され、パキテン期にはそのシグナルは顕著に減少した(図29)。また、パキテン期にはMSUCによって生じる γ H2AXシグナル(Sex-body)が性染色体の周辺にのみ観察された。これらの観察結果は、これまでの報告とも、 γ H2AXシグナルの定量結果とも一致していた(Mahadevaiah et al., 2001)(図30)。

34°C条件で培養した精巣片から得られた精母細胞の γ H2AXの発現パターンおよび γ H2AXシグナルの定量値は*in vivo*と類似していた(図29および30)。37°Cでは、レプトテン期とサイゴテン期の精母細胞において高いレベルの γ H2AXシグナルが観察された(図29)。また少数ながら観察されるパキテン期やディプロテン期の精母細胞では性染色体の周辺以外の場所においても γ H2AXシグナルが観察された。この観察と一致して、定量解析の結果は37°C条件のレプトテン期とサイゴテン期の細胞のシグナル値は34°Cでみられるシグナル値の幅よりも顕著に大きいシグナル値を示した(図30)。さらに、パキテン期やディプロテン期でも同様の傾向であった。また、37°Cのパキテン期やディプロテン期における34°Cと比べて大きい γ H2AXシグナル値はその大部分が未修復のDSBsによるものだと考えられるが、MSUCにより生成された γ H2AXもいくつか含まれていることも考えられる。38°Cでは、37°Cよりもさらに高い γ H2AXシグナルがレプトテン期とサイゴテン期において観察された(先述のとおり、パキテン期とディプロテン期まで進行した細胞は観察されなかった)(図29および30)。

これらの結果は、高温環境では新たなDSBsの生成もしくは修復機構の障害によりDSBsレベルは上昇することを意味する。

5. 高温によりDSB修復機構が障害を受ける

高温条件下で生じた精母細胞におけるDSB修復について検討した。そのために、5週齢の*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣片から得られた精母細胞の染色体spread標本に対してRPA2、RAD51、DMC1の免疫染色を行った(Cloud et al., 2012; Pittman et al., 1998; Ribeiro et al., 2016; Shinohara and Shinohara, 2004; Wold, 1997; Yoshida et al., 1998)。これらは、DSBに応答して初期レプトテン期からSCP3陽性のシナプトネマ複合体上に顆粒状の”foci”を形成する。RPA2はDSBに応答し、single-strand DNA結合タンパク質として、RAD51とDMC1はrecombinationタンパク質として機能することが知られている。*in vivo*精巣から得られた精母細胞では、後期レプトテン期からザイゴテン期にかけてRPA2 fociの数が増加した。*in vivo*精巣から得られた精母細胞の初期レプトテン期からパキテン期にかけてのRPA2 fociの数の変動は既知の報告と同様であった(Ribeiro et al., 2016; Wold, 1997; Yoon et al., 2018) (図31および32)。34°C、37°Cおよび38°Cで培養した精巣片から得た精母細胞の各ステージにおけるRPA2 fociの数は*in vivo*条件に匹敵するものであった (図31および32)。しかし、37°Cおよび38°Cで培養した精巣片のレプトテン期およびザイゴテン期の精母細胞の γ H2AXシグナルは34°C条件や*in vivo*のものと比べて著しく大きかったことと併せて考えると、高温環境下ではRPA2 fociの形成に障害が生じている可能性が示唆された。

次いで、RAD51およびDMC1を評価した。*in vivo*より得られた精母細胞のRAD51およびDMC1 fociの数は、過去の報告と一致して、後期レプトテン期からザイゴテン期にかけて50-200個程度となり、ザイゴテン期からパキテン期へと進行するにつれて減少した(Ashley et al., 1995; Barlow et al., 1997; Ishiguro et al., 2014; Moens et al., 1997) (図33から36)。34°C条件ではRAD51およびDMC1 fociの数は後期レプトテン期とザイゴテン期において*in vivo*と同等の範囲(50-200程度)にあったが、RAD51 fociの平均は*in*

*vivo*よりも大きかった (図33から36)。しかし、38°C条件では後期レプトテン期とザイゴテン期においてRAD51およびDMC1 fociの数は大きく減少し、50個以下の細胞も多数見られた (図33から36)。また37°C条件では、38°C条件と同様に後期レプトテン期とザイゴテン期においてRAD51およびDMC1 fociの数が減少した細胞も多数見られたが、38°C条件に比べてその減少は穏やかであった (図33から36)。また、少数ながら存在するパキテン期の精母細胞ではRAD51およびDMC1 fociの数は*in vivo*と同等であった (図33から36)。しかし、37°Cで培養した精巣片において円形精子細胞は観察されないことと併せて考えると(図20)、一見すると正常にDSB修復を完了したように見える第一減数分裂期後半の細胞においても何かしらの障害が生じている可能性が示唆された。

これらの結果より、高温によってDSB修復のプロセスが阻害されることが示唆された。

6. 高温により相同染色体の対合が障害を受ける

前述の通り、高温環境ではザイゴテン期からパキテン期への移行が阻害されることが明らかにになった。SPO11-TOPPO6BL複合体によって生じたDSBsが十分に修復されない場合、相同染色体の対合が阻害されることが知られている (Cahoon and Hawley, 2016)。そこで、高温環境下で培養した精母細胞相同染色体の対合の過程を解析した。通常の減数分裂では、一つの細胞に含まれる相同染色体ペア間で同調して対合が進行する。このことに基づいて、対合過程の相同染色体が見られるステップを“ザイゴテン期”と分類されており、本研究でもこの分類法を利用した。5週齢の*in vivo*精巣および34°C、37°C、38°Cで5週間培養した精巣片から得られた精母細胞の染色体spread標本に対しSCP3およびSCP1の免疫染色を行い、ザイゴテン期における相同染色体間の対合状態を調べた。その結果、37°C条件および38°C条件では、完全に対合した染色体、部分的に対合した染色体、対合が起こっていない染色体が1つの核の中に混在する細胞が高い頻度で出現することがわかり、対合の同調性が乱れることが示唆された (図37および38)。更に、部

分的に対合している染色体において、対合していない部分の長さが異なる状態のものが稀に含まれた (図37および38)。これは、通常はほとんど起こらない非相同染色体間での組換えが起きていることを示唆する結果であった。

これらのように、対合の同調性が乱れた精母細胞は”asynapsed pachytene”と分類した報告が知られている (Crichton et al., 2017; Ollinger et al., 2008)。そこで、本研究ではこの報告のasynapsed pachyteneの分類方法に基づいて、少なくとも一对の完全に対合した染色体に加えて、“染色体全長の50%未満の部分のみしか対合していない常染色体”もしくは“全く対合していない常染色体”が一对以上存在する精母細胞をasynapsed pachyteneとした (Crichton et al., 2017; Ollinger et al., 2008)。また本研究では、このようなasynapsed pachyteneは、pachyteneという名称がつくものではあるが、ザイゴテンの一部の集団として扱った。

次いで、5週齢の*in vivo*精巣および34°C、37°C、38°Cで5週間培養した精巣片から得られた精母細胞をレプトテン期、正常ザイゴテン期、asynapsed pachytene、パキテン期に分類した。その結果、*in vivo*精巣にはほとんどasynapsed pachyteneは含まれなかった (図39)。一方、34°Cで培養した精巣片からはいくつかasynapsed pachyteneが観察されたものの、*in vivo*に匹敵する数のパキテン期の細胞が観察された。37°Cで培養した精巣片から得られた精母細胞では44%がasynapsed pachyteneとなり、パキテン期の細胞は*in vivo*や34°Cと比較して減少した (図39)。さらに、38°Cで培養した精巣片から得た精母細胞ではザイゴテン期の細胞の半数程度がasynapsed pachyteneとなり、パキテン期は観察されなかった (図39)。これらの結果は対合の進行が阻害された可能性を示唆する。

減数分裂期におけるDSBsの一部は組換えタンパク質(MLH1等)を介してcrossoverを形成する。そこで、5週齢の*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣片から得られた精母細胞から調整した染色体spread標本に対するSCP3およびMLH1の免疫染色を行い、crossover形成を調べた。MLH1タンパク質は精細管周期stage IV以降の

パキテン期に染色体の対合部分に組換えのためのfociを形成することが知られている (Kolas et al., 2005)。最初に *in vivo* 精巣から得られられた asynapsed pachytene とパキテン期の精母細胞における MLH1 foci をカウントした。 *in vivo* 精巣では、前述の通りほとんどがパキテン期の細胞であり MLH1 foci の数は 22-30 であった (図40から42)。また、foci の数が 0 のものや 20 以下のものは MLH1 foci の形成過程にあるものと考えられる。さらに、顕著な MLH1 foci を持つパキテン期の細胞の MLH1 foci の数をカウントしたところ、これまでの報告と同様に 22-30 であった (Baudat and de Massy, 2007; Hunter and Borts, 1997) (図40から43)。

一方、34°C、37°C および 38°C 条件で培養した精巣片からそれぞれ得られた asynapsed pachytene では、完全に対合した染色体および対合を全く行っていない染色のいずれの場合も MLH1 foci は観察されることはなかった (図40)。34°C および 37°C 条件から得られたパキテン期の細胞からは *in vivo* と同様に MLH1 foci が観察された (図40)。34°C 条件の MLH1 foci の数は *in vivo* よりもわずかに減少し、20-27 の範囲であった (図42および43)。37°C 条件ではさらに減少し、17-25 となった (図42および43)。減数分裂期の乗換えは 19 対の常染色体と 1 対の性染色体において必ず 1 個以上形成される。しかし、37°C 条件では MLH1 foci が存在しないパキテン期の染色体がいくつか観察された (図41)。これは適正な数のキアズマが生じず、染色体の分配不全を引き起こす可能性を示唆する。

以上をまとめると、高温 (37-38°C) 条件では、染色体の対合プロセスが阻害され、その後の乗換えに障害が生じる可能性が示唆された。

7. 高温環境によってトランスポゾンによる異所的な DSBs が形成される可能性は低い

すでに述べてきたように、38°C で精巣片を培養した場合には、第一減数分裂期前期のサイゴテン期からパキテン期への進行が阻害された。これに類似する表現型を示す変異マウスの中には、トランスポゾン制御に関連する遺伝子の変異が原因となるものが多い

見られる (Barau et al., 2016; Chuma and Nakano, 2013; Saxe et al., 2013)。正常な精子形成のプロセスでは、トランスポゾンの発現はpiwi-interacting (pi)RNA 経路によって抑制されている (De Fazio et al., 2011; Di Giacomo et al., 2013)。piRNA経路の構成因子 (Tdrkh等)が機能を失った変異マウスではザイゴテン期からパキテン期への進行が阻害される (Saxe et al., 2013)。最近、線虫 (*Caenorhabditis elegans*)の精子形成において、温度上昇によってトランスポゾンが異所的に高発現すること、これが異所的なDSBsを引き起こすことで精子形成障害に至ることが報告されている (Kurhanewicz et al., 2020)。これらの知見から、私は、マウス精子形成においても高温環境がトランスポゾンの制御不全およびDSBsの亢進を引き起こす可能性を検討した。5週齢の *in vivo* 精巣、34°C、36°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣片切片を用いて、LINE1 ORF1 [マウスにおいて代表的なトランスポゾンであるLINE1(long interspersed nuclear element 1)がコードするタンパク質]に対する免疫染色を行うことによってトランスポゾンの発現状態を評価した。SCP3陽性細胞を多数含む精細管の中で、LINE1 ORF1陽性細胞を含む精細管をカウントしたところ、*in vivo* 精巣ではこの様な精細管は4%程度しか観察されなかった (図44および45)。しかし、34°Cで培養した精巣片では、80%程度の精細管がLINE1ORF1陽性細胞を含んでおり、それらはSCP3陽性の精母細胞であった (図44および45)。36°Cで培養した場合には、34°Cと比べてLINE1 ORF1陽性細胞を含む精細管数は有意に減少し、約50%だった。LINE1 ORF1陽性細胞は、34°Cの場合と同様、SCP3陽性の精母細胞であった (図44および45)。37°C条件で培養した場合、36°C条件と同様に、LINE1 ORF1陽性細胞を含む精細管数は50%程度であった。38°Cで培養した精巣片でも、34°Cと比べてLINE1 ORF1を含む精細管の割合はさらに減少し、20%程度であった (図44および45)。34°Cで培養した精巣片において、LINE ORF1陽性の精母細胞を含む精細管の割合が、*in vivo*の精巣に比較して増加した理由は明らかでない。しかし、器官培養において高温環境になるにつれてLINE ORF1を発現する精母細胞を含む精細管

数は減少した。さらに、高温環境とトランスポゾンに関係を調べるために人工停留精巣を用いた実験を行った。陰嚢内の精巣を腹腔へと外科的に移した人工停留精巣では、生殖細胞は術後3日から急速に失われる。しかし術後2日では、ほとんど全ての生殖細胞は精巣内に生存している。そこで、術後2日の精巣におけるLINE1 ORF1の発現を評価した。術後2日の人工停留精巣では、翌日に細胞死が始まるにも関わらず、*in vivo*精巣と同様にLINE1 ORF1陽性細胞を含む精細管は少数（約8%）であった。これらのことから、高温環境によって異所的なLINE1の発現が起こる可能性は低いと結論した。このことは、高温環境によって生じるマウス精子形成障害にはトランスポゾン以外の要因が関与する可能性を示唆する。

④ 考察

1. 結果の総括

哺乳類の精子形成が高温環境で障害を受けることは広く知られていた。しかし、この問題に関して従来行われてきた *in vivo* の実験系は、温度以外の要因を切り離して温度だけを変化させることが原理的に不可能であった。そのため、温度が変化することだけが原因となって精子形成障害が引き起こされるのか、あるいは他の要因も関わっているのか、については必ずしも明らかになっていなかった。私は、マウス精巣の器官培養系を用いて、温度のみを変化させ、それが精子形成に与える影響を評価した。その結果、温度のみの影響で精子形成障害が生じること、さらに、わずか 1°C の違いによって障害を受ける精子形成のステップが異なることが示唆された。具体的には、37°C から 38°C の間に存在する第一減数分裂の前半から後半へのステップ、36°C から 37°C の間に存在する減数分裂の完了のステップ、35°C と 36°C の間に存在する円形精子細胞から伸長精子細胞への分化ステップは温度に依存した。これらのことから、精子形成の高温障害は複数の温度感受性ステップからなる複合的な現象であることを明らかとした。しかし、停留精巣における精子形成障害には、温度以外の要因も含まれることが示唆された。

次いで、減数分裂期の詳細な観察から、37-38°C の高温環境では第一減数分裂前期のザイゴテン期からパキテン期への進行が阻害されることが明らかとなった (図 46)。高温環境において、DSBs の修復過程が障害を受け、DSBs が増加することが示唆された。さらに、高温環境では相同染色体の対合不全によって対合の同調性が失われることを明らかにした。さらに、高温環境によって障害を受けた精母細胞はアポトーシスの経路によって取り除かれることを明らかとした。一方、精子形成の高温障害にトランスポゾンの異常な活性化が関与する可能性については、否定的な結果を得た。

以上の結果から、マウス精子形成の温度感受性を温度のみを変化可能な器官培養系によって再評価し、マウス精子形成は僅かな温度変化に対して繊細な現象であることを明

らかにした。さらに私は温度と減数分裂の關係に注目し、高温環境下では DSBs の修復と対合に障害が起こり、アポトーシスによって細胞は除去されることを突き止めた。以降、今回明らかにした結果を踏まえ、哺乳類の精子形成の温度の影響についての問題点を絞って、詳しく考察する。

2. 停留精巣と器官培養に見られる精子形成障害の違い

精子形成の高温障害を解析する実験系として、人工停留精巣が最もよく用いられてきた。私が行ったように、肝臓直下の腹腔内に精巣を留置すると重度の精子形成障害が見られ、未分化型精原細胞のみを残して分化型精原細胞以降の生殖細胞は脱落する (Nishimune and Aizawa, 1978; Sugimoto et al., 2012)。私はまた、この手法で精巣を留置する位置の温度（深部体温）が約 38°Cであることを直接測定した。以上の知見から、当初私は、38°Cの温度条件で培養した精巣組織片では、人工停留精巣と同様の精子形成障害、すなわち、未分化型精原細胞から分化型精原細胞への転換の阻害が起こるだろうと予想していた。

しかし、この予想に反して、38°C条件で培養した精巣では、第一減数分裂前期のザイゴテン期精母細胞まで分化が進行することが明らかとなった。深部体温の日内変動を考慮して 30°Cから 40°Cの間の温度を 1°C刻みに設定して精巣の培養を起こったが、いずれの温度条件においても人工停留精巣の精子形成障害を再現することはできなかった (図 20)。この結果から、未分化型精原細胞から分化型精原細胞への転換は高温条件でも進行できることが明瞭に結論づけられた。

同時に、停留精巣で観察される未分化型精原細胞から分化型精原細胞への転換の阻害には、温度以外の要因が関与することが示唆される。また、人工停留精巣に過剰量のレチノイン酸を投与すると、分化型精原細胞が観察されることが報告されている (Sugimoto et al., 2012)。このことから、人工停留精巣の精子形成を引き起こす“温度以

外の要因”としてレチノイン酸が関与する可能性が挙げられる。今後、人工停留精巣とレチノイン酸シグナルの関係を検討することにより、人工停留精巣と器官培養の精子形成障害の違いについてさらに深い理解が得られることが期待される。このように、本研究は精子形成の高温障害として知られてきた人工停留精巣をはじめとする症例を、温度かそれ以外の原因で起こるかを検討した初めての報告である。

3. 減数分裂期チェックポイントと高温による精子形成障害の関係

深部体温(37°Cおよび 38°C)では、減数分裂期の生殖細胞に障害が見られた (図 46)。特に 38°C条件では、減数第一分裂中期の、ザイゴテン期からパキテン期への移行が強く阻害された。これを引き起こすメカニズムとして、1)レプトテン期およびザイゴテン期における DSBs の増加、2) DSBs 修復機構および相同染色体対合の進行の阻害、3)高温障害を受けた細胞のアポトーシス経路による除去、が起こることを示唆する結果を得た。これらの結果、障害を受けた異常な生殖細胞が精子として次世代に受け継がれないように監視していると解釈することができるのではないだろうか。以下、温度環境によって障害を受けた異常な生殖細胞を“監視”するメカニズムについて考察する。

高温条件で培養した時に観察される障害と同じように、減数第一分裂で相同染色体の対合不全がおこり、その後アポトーシスによって除去される表現系を示す変異マウスが多数報告されている。代表的な原因遺伝子として、DSBs の形成に関わるもの (*Spo11* 等)、DSBs 修復に関与するもの (*Rad51*, *Dmc1* 等)、DSBs 修復遺伝子のリクルーターとして機能する遺伝子 (*Meilb2*, *Brme1*, *Brca2* 等) が知られている (Morelli and Cohen, 2005; Takemoto et al., 2020; Zhang et al., 2019)。これらの変異マウスの精母細胞では、ザイゴテン期からパキテン期への進行、もしくは初期のパキテン期から精細管周期 stage IV 移行へのパキテン期 (後期のパキテン期) への進行が阻害される。この進行を妨げる現象は、DSBs 修復および対合不全の精母細胞がアポトーシスの経路によって取

り除かれる監視システム“減数分裂期チェックポイント（パキテンチェックポイント、stage IV チェックポイントとも呼ばれる）”として広く認知されている(Bhalla and Dernburg, 2005; Burgoyne et al., 2009; Daniel et al., 2011; Kogo et al., 2012; Roeder and Bailis, 2000)。この減数分裂期チェックポイントは、酵母、線虫、ショウジョウバエ、哺乳類といった種に幅広く保存されている(Bhalla and Dernburg, 2005; Roeder and Bailis, 2000)。

減数分裂期チェックポイントの存在は、同様の障害を持つ精母細胞が一様に存在する変異マウスの解析によって発見された。しかし、野生型の遺伝背景ではこのような状況が引き起こされる機会はほとんどない。そのため、野生型の遺伝背景を持つ動物の精母細胞での機能を報告した例は少ない。数少ない例の一つが、異種間交配による不妊があげられる。Hybrid sterility（雑種不妊性）と呼ばれるこの現象では、異種間交配によって誕生した F₁ 雑種個体において、異種間の染色体の対合によって生じた対合不全が認知され、対合不全を引き起こした生殖細胞は取り除かれる(Li et al., 2009)。その結果、F₂ 世代の交雑種の誕生は抑制される。

私は本研究で見出した「高温で障害を受けた生殖細胞が除去される現象」にも減数分裂期チェックポイントによる監視機能が関与しているのではないかと考えている。実際、37-38°Cの高温環境で生じた精母細胞は、1)DSBs の修復が障害され、2)対合不全を生じた後、3)アポトーシスによって除去される。減数分裂期チェックポイントは、最上流の原因の如何によらず、未修復の DSBs および相同染色体間の対合不全を検知すると発動され、ザイゴテン期（もしくは初期のパキテン期）から後期のパキテン期への移行を完了させることなくアポトーシス細胞死を引き起こすと考えられている(Rinaldi et al., 2017)。高温障害においては、上記の 1)DSBs 修復の不全（DSBs の増加）および 2）相同染色体間の対合不全を減数分裂期チェックポイント機構が感知するのではないだろうか。その後は、前述した種々の変異体で起こるのと同様のプロセスを辿って細胞死

に至ると考えることができる。

この考えを更に進めて、高温によって障害を受けた細胞を取り除くことが、減数分裂期チェックポイントの今まで知られていなかった新たな役割であると提唱したい (図 46)。この働きによって、減数分裂期に高温に晒された精母細胞が最終的に精子となって次世代に寄与することを防いでいるのではないだろうか。高温条件下で減数分裂を行うと精子に不具合が起こるのか、起こるならばどのような不具合なのか、いずれも今後の課題である。減数分裂チェックポイントが精子の品質管理に機能しているならば、hybrid sterility に続いて、野生型の遺伝背景で減数分裂期チェックポイントが果たす役割を明らかにした意義は大きい。

4. 配偶子形成の性的二型と温度感受性の関係

哺乳類の配偶子形成の高温感受性は性的二型 (sexual dimorphism) を示す (Cahoon and Libuda, 2019; Morelli and Cohen, 2005)。マウスにおいても、オスの精子形成が高温に高い感受性を示すのと対照的に、メスの卵形成は高温条件下で進行する。すなわち、卵母細胞の減数第一分裂中期の大部分は胎児期に、母親の子宮内で進行する。出生後も、卵巣は腹腔深部に位置しており、卵形成過程を通して深部体温の高温条件下で進行すると考えられている (Kim et al., 2013)。更に近年、マウス ES 細胞などの多能性細胞から、始原生殖細胞様細胞の形成、減数分裂を経て、機能的な卵の形成に至る *in vitro* の細胞培養系が開発された (Hikabe et al., 2016; Morohaku et al., 2016)。この培養系では、全ての過程が 37°C で完了することから、マウスの卵形成は 37°C 条件下 (深部体温) で正常に進行することが明瞭に証明された。*in vitro* での卵母細胞の培養系と今回の精巣器官培養系の結果から、マウス配偶子形成における同一温度条件 (37°C) 下で生じる温度感受性の性的二型を明らかになった。

これと呼応して、減数分裂期チェックポイントも性的二型を示すことが知られている

(Bolcun-Filas et al., 2014; Cahoon and Libuda, 2019; Morelli and Cohen, 2005)。 *Spo11*^{-/-}や *Dmc1*^{-/-}などの変異マウスは、雌雄に共通して対合不全を起こす。先述のように、これらの変異を持つオス個体では、減数分裂期チェックポイントの働きによって、ザイゴテン期からパキテン期への進行が起こらずアポトーシス細胞死に至る (Morelli and Cohen, 2005)。これと対照的に、メスの変異マウスでは、対合不全が生じるにも関わらずザイゴテン期からパキテン期へと進行し、減数分裂期チェックポイントが機能していないと解釈されている。もっとも、対合不全を持ったまま減数分裂が進行した卵母細胞も、結局は卵胞閉鎖によって取り除かれ、排卵卵子となって次世代に寄与することはない (Nagaoka et al., 2012; Nagaoka et al., 2011)。hybrid sterilityにおいても同様の性差が見られる。F₁雑種のオス個体は減数分裂期チェックポイントによって精母細胞が取り除かれるのに対して、メスでは対合不全を有した卵母細胞も減数分裂を先へと進行することができる (Morelli and Cohen, 2005)。

オスとメスの *in vitro* 配偶子形成の実験から、マウス配偶子形成における高温感受性はオスにのみ存在するという性的二型を示すことが明らかになった。また、精子形成にのみ機能する減数分裂期チェックポイントによって精子形成の減数分裂期に存在する異常な細胞は卵形成より早期に排除される。これにより、正常な生殖細胞のみが分化を進行することができる。今回の結果から、性的二型が存在する減数分裂期チェックポイントは温度によって障害を受けた精母細胞の監視に機能する可能性を提唱する。これは、大きく変動する外部環境下において生涯に渡り大量の精子を生産しなければならない精子形成特有の品質管理システムと言えるかもしれない。本研究は、マウス配偶子形成における品質管理の性的二型の役割について重要な知見を提供するものである。

6. マウス精子形成の高温障害の原因となる分子メカニズムの考察

本研究で私は、マウスの精子形成において、高温によってDSBs修復、ついで相同染

色体の対合に障害が起こることを示した。しかし、温度を感受するメカニズムの分子レベルでの解明には至らなかった。今後、このメカニズムの解明を目指したい。本研究では特に、高温環境とトランスポゾンの制御不全に注目して解析を行なった。その結果、マウス精子形成においては高温環境がLINE1トランスポゾンの制御不全を異所的に引き起こすことはないことを示すデータを得た。この結果は、最近報告された線虫の精子形成の結果とは一致しない(Kurhanewicz et al., 2020)。このことは、精子形成の高温障害は必ずしも同一のメカニズムによって引き起こされないことを意味する。しかし今回の私の解析では、トランスポゾンの指標としてLINE1タンパク質の発現のみを用いたため、LINE1以外のトランスポゾンの発現の影響は考慮しなければならない。さらに、線虫をはじめとした高温環境とトランスポゾンの制御不全を調べた実験系の多くは、短期間の高温暴露（例えば2時間）によるものである。これに対し本研究は、5週間にわたり高温に暴露したものである。このように暴露時間が短期間もしくは長期間であることによりホルミシス効果が生じ、結果的に異なる精子形成障害が生じる可能性は考慮しなければならない。今後、暴露時間や温度の設定、RNA-seq等の網羅的な遺伝子解析により、高温環境とトランスポゾンの異所的な発現の関係への理解が進むことに期待したい。

トランスポゾンが関与する分子メカニズムの仮説以外に、DSBs修復に関わるオス特異的な温度感受性因子が存在するという仮説を提示したい。現在までに発見された多くの減数分裂因子はオスメス共通して機能する。メスの減数分裂は深部体温環境でも進行することから、オス特異的な高温感受性をオスメス共通して働く減数分裂因子では説明できない。しかし変異マウスの研究から、精子形成にのみ減数分裂期にDSB修復障害および対合不全が生じる遺伝子が知られている（例えば、*Meilb2*, *Brme*, *Brca2*) (Sharan et al., 2004; Takemoto et al., 2020; Zhang et al., 2020)。この時、卵形成の減数分裂は対合不全を起こさず高温環境でも進行することから、減数分裂の分子メカニズムには性的二型が存在する。これらの遺伝子群が精子形成において温度感受性を持つ可能性が考

られる。

今後、これらを検討することにより、哺乳類が低温で精子形成を行うその生物学的意義の理解が進むことに期待したい。

7. 結語

本研究で、私は、マウス精子形成が温度のみの影響で障害を受けることを器官培養によって証明し、わずか1°Cの違いによってその精子形成障害が変化することを示した。特に、減数分裂期において高温によってDSBs修復機構および対合に高温障害が生じることを発見し、“減数分裂期チェックポイント”が、障害を受けた生殖細胞を排除するという生理的な機能を有する可能性を提唱した。これらの結果は、哺乳類が低温で精子形成を行う生物学的意義を理解する上で重要な基盤となると考える。

⑤ 図表



図1 マウスの深部体温および陰囊内の温度計測位置

温度測定時にワイヤレス温度センサを埋め込んだ位置の模式図。深部体温を測定するために人工停留精巣で精巣が置かれる位置である肝臓と腹腔壁の間にワイヤレス温度センサを縫合固定した。陰囊内温を測定するために陰囊の皮下を切開し、精巣の隣にワイヤレス温度センサを縫合固定した。

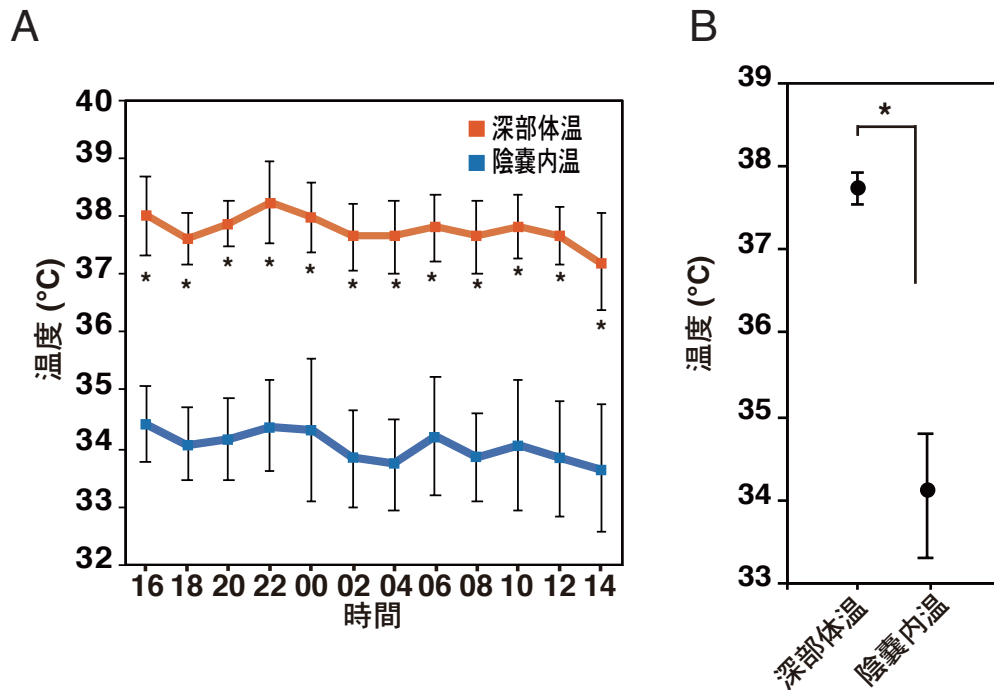


図2 マウス深部体温および陰嚢内温の測定

24 時間にわたって 2 時間ごとにマウス深部体温および陰嚢内温を測定した。A は 24 時間の温度変化を示す。各時間における平均温度と標準偏差を示し、オレンジ線は深部体温を、青線は陰嚢内を示す。B は深部体温および陰嚢内温の 24 時間平均を示す。マウス飼育条件は、18 時間明期（8 時から 20 時）、6 時間暗期（20 時から 8 時）の件下、室温環境（25℃）で飼育した。サンプル数は 14 個体。* は $p < 0.05$ (対応のある Student's t 検定) のものを示す。

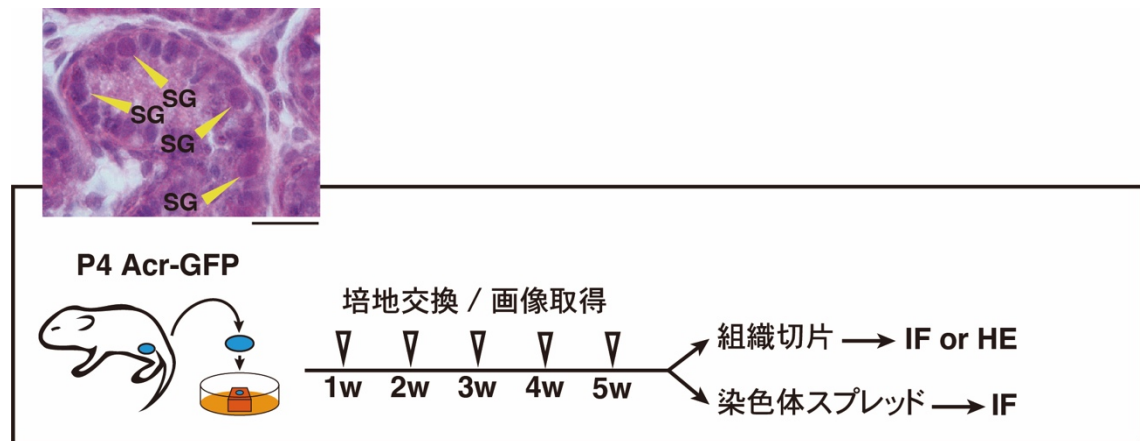


図3 器官培養の実験系の概要

本研究で用いた器官培養の実験系の概要を示す。本研究では生後4日齢の *Acr-GFP* マウスを培養に用いた。生後4日齢の *Acr-GFP* マウスの精巣は精原細胞のみが含まれる（左上パネル）。1週間ごとに培地交換および画像取得を行なった。培養開始後5週目でサンプリングし、組織切片もしくは染色体スプレッドを作成した。ほとんど場合、組織切片に対しては免疫染色もしくはHE染色を、染色体スプレッドのサンプルに対しては免疫染色を行なった。SGは精原細胞、IFは免疫染色、HEはHE染色を示す。スケールバーは20 μm を示す。

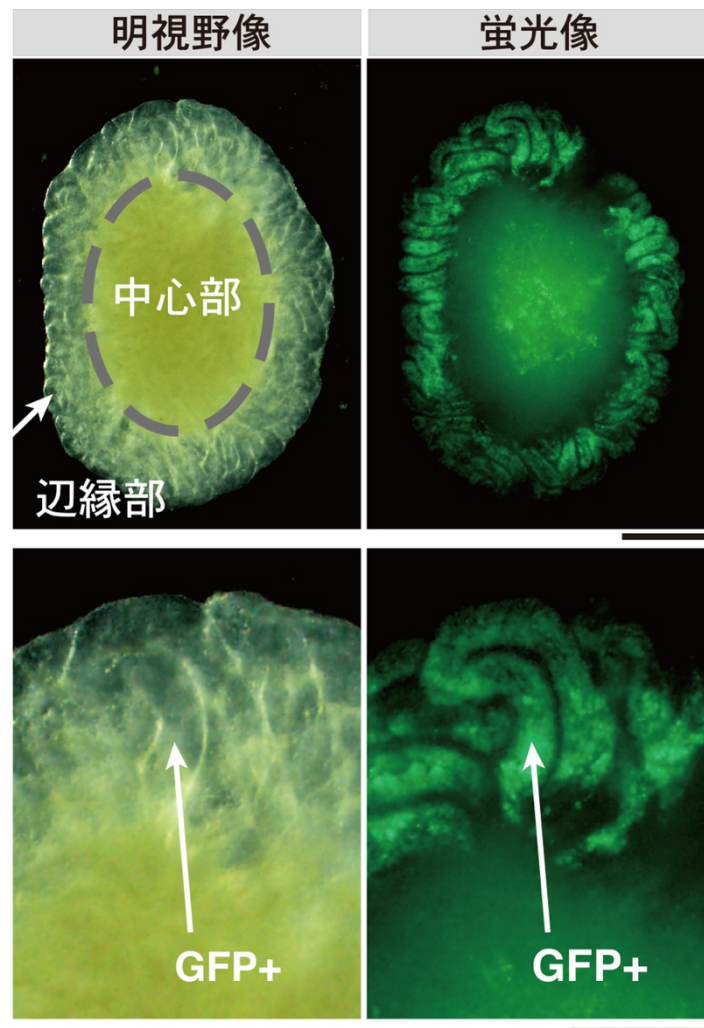


図4 Acr-EGFP マウス精巣の器官培養

本研究で使用した精巣器官培養系の代表例。34℃条件で5週間培養した精巣の明視野像と蛍光像を倒立型落射蛍光顕微鏡で撮影した。第一減数分裂期のパキテン期以降に発現する Acr-GFP シグナルが培養精巣の辺縁部の精細管に見られる。一方、培養組織中心部は Acr-GFP シグナルが見られない。これは培養組織中心部がネクロシスを引き起こしていることによる。スケールバーは 500 μm を示す。

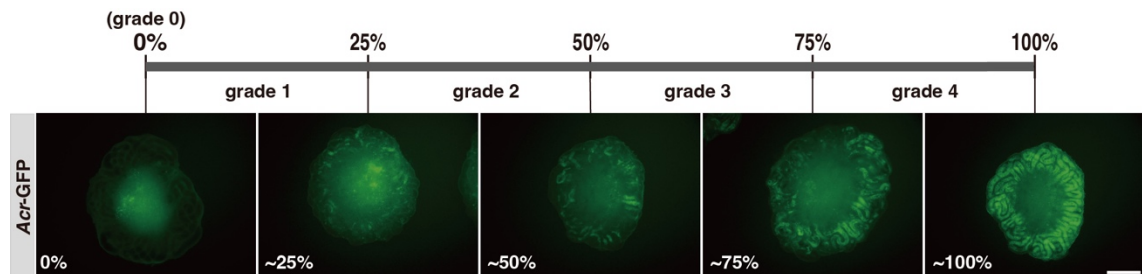


図5 Acr-GFP シグナルの Grade 分類基準

小川らの報告(Sato et al., 2011)を参考に、Acr-GFP シグナルを 0-4 に分類した。0 はシグナルなし、grade 1 は～25%、grade 2 は～50%、grade 3 は～75%、grade 4 は～100%の組織周辺部の精細管でシグナルが観察されるものとした。これらの画像は 34℃ 条件で培養した精巣を倒立型落射蛍光顕微鏡で撮影した。この基準をもとに観察者の目視によって分類した。この基準は野波裕太さんと共同で設定した。スケールバーは 500 μ m を示す。

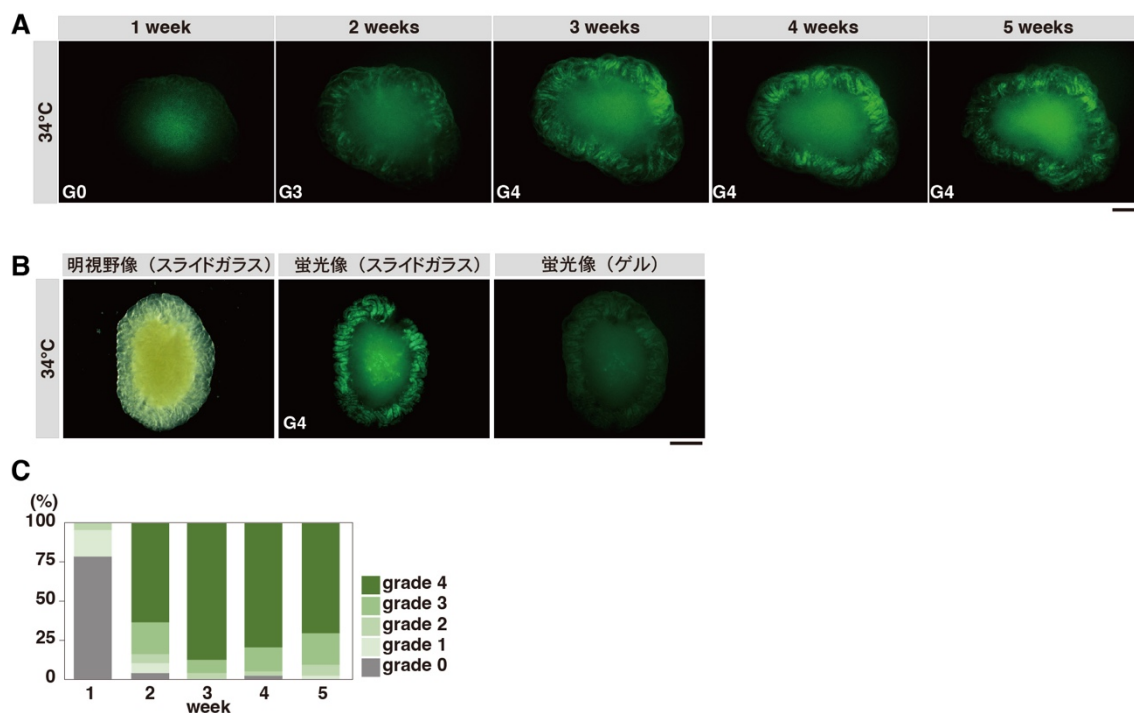


図6 34°C条件における *Acr*-GFP マウス精巣の器官培養

A は同一サンプルの培養1週目から5週目までにおける *Acr*-GFP シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は 34°Cで5週間培養した精巣片を示す。アガロースゲル上およびスライドガラス上において、明視野像と蛍光像を倒立型落射蛍光顕微鏡で撮影した。中央パネルの蛍光像の左下にはサンプルの *Acr*-GFP シグナルの grade を示す。C は 1-5 週の *Acr*-GFP シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は 99 精巣片。多くの培養精巣は 2 週目から *Acr*-GFP シグナルを示し、5 週目まで grade 4 を示す。A と C のスケールバーはそれぞれ 500 μ m を示す。

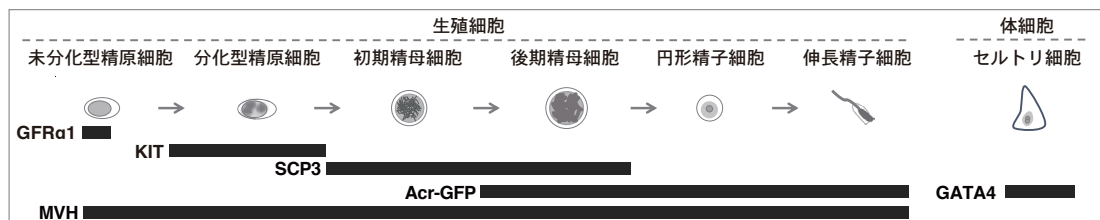


図7 マウス精子形と本研究に用いたマーカータンパク質の発現パターン

本研究で用いた生殖細胞および体細胞のマーカータンパク質の発現パターンを示す。GFR α 1を未分化型精原細胞の一部の集団、KITを分化型精原細胞、SCP3を精母細胞、MVHを全ての生殖細胞のマーカーとして使用した。また支持細胞（体細胞）であるセルトリ細胞のマーカーとしてGATA4を使用した。Acr-GFPは第一減数分裂のパキテン期から発現することからマーカーとしても利用した。

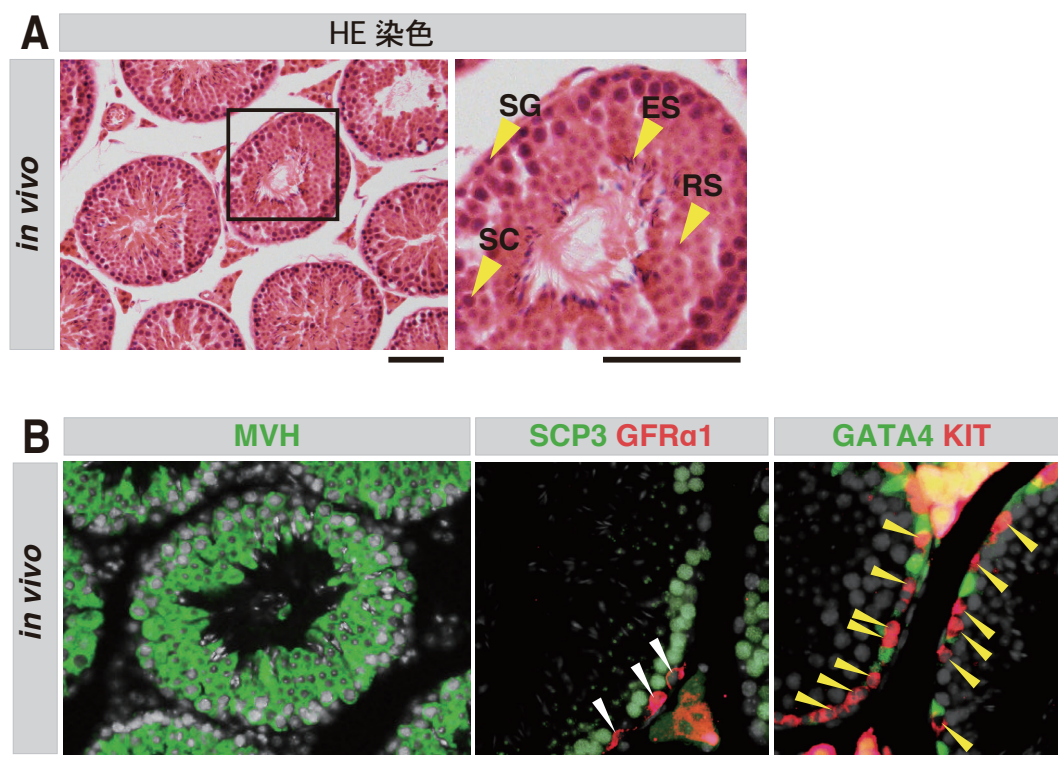


図8 *in vivo* 精巣切片の HE 染色と免疫染色

A は 5 週齢 Acr-EGFP マウスの精巣の HE 染色を示す。A の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞、RS は円形精子細胞、ES は伸長精子細胞を示す。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。B は 5 週齢 Acr-EGFP マウスの精巣の免疫染色を示す。左パネルは MVH、中央パネルは $\text{GFR}\alpha 1$ および SCP3、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。MVH 陽性細胞は精細管内の多くの細胞で、 $\text{GFR}\alpha 1$ 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、SCP3 陽性細胞は基底膜上および 2 層目の細胞で、GATA4 陽性細胞は基底膜上で、KIT 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭は $\text{GFR}\alpha 1$ 陽性細胞を、黄色の矢頭は KIT 陽性細胞を示す。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは $40\mu\text{m}$ を示す。

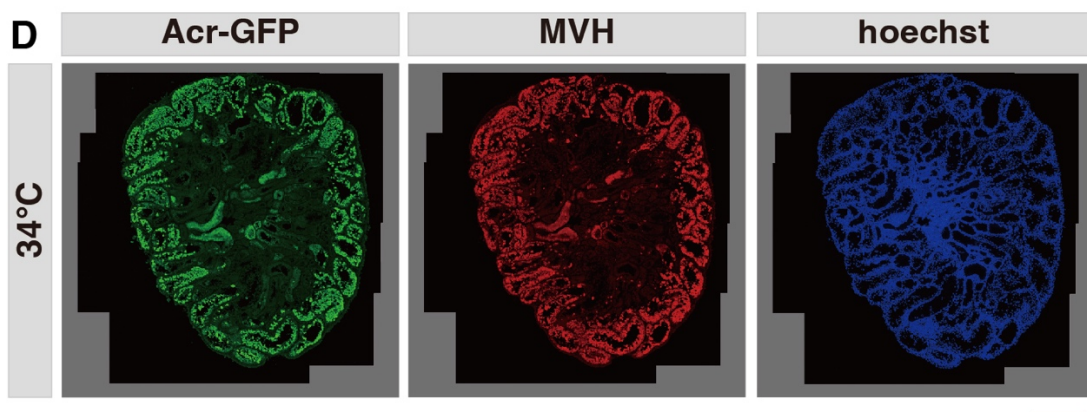
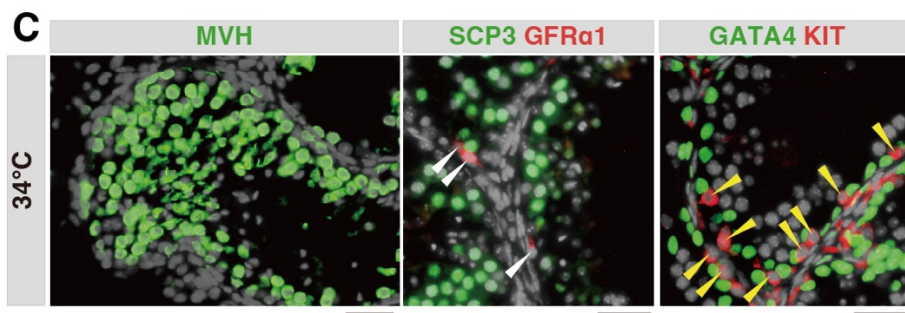
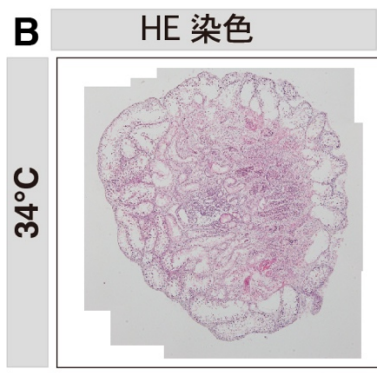
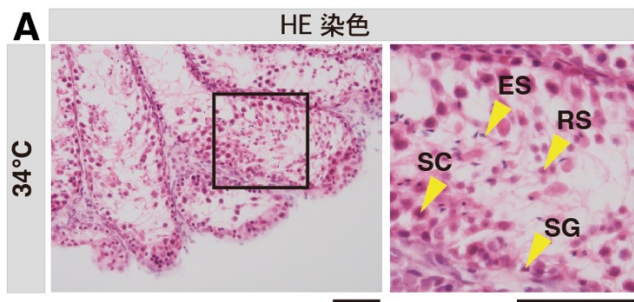


図9 34°C条件で5週間培養した精巢のHE染色と免疫染色

AはHE染色を示す。Aの左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SGは精原細胞、SCは精母細胞、RSは円形精子細胞、ESは伸長精子細胞を示す。スケールバーは100 μ mを示す。BはHE染色をした組織の全体像を示す。スケールバーは500 μ mを示す。Cは免疫染色を示す。左パネルはMVH、中央パネルはGFR α 1およびSCP3、右パネルはGATA4とKITの免疫染色を示す。*in vivo*精巢のようにすべての管で同様の傾向ではないものの、MVH陽性細胞は精細管内の多くの細胞で、GFR α 1陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、SCP3陽性細胞は基底膜上および2層目の細胞で、GATA4陽性細胞は基底膜上で、KIT陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭はGFR α 1陽性細胞を、黄色の矢頭はKIT陽性細胞を示す。グレーはHoechst33342による核染色を示す。スケールバーは40 μ mを示す。Dは免疫染色を行った組織の全体像。GFPおよびMVHの免疫染色、Hoechst33342による核染色を示す。スケールバーは500 μ mを示す。

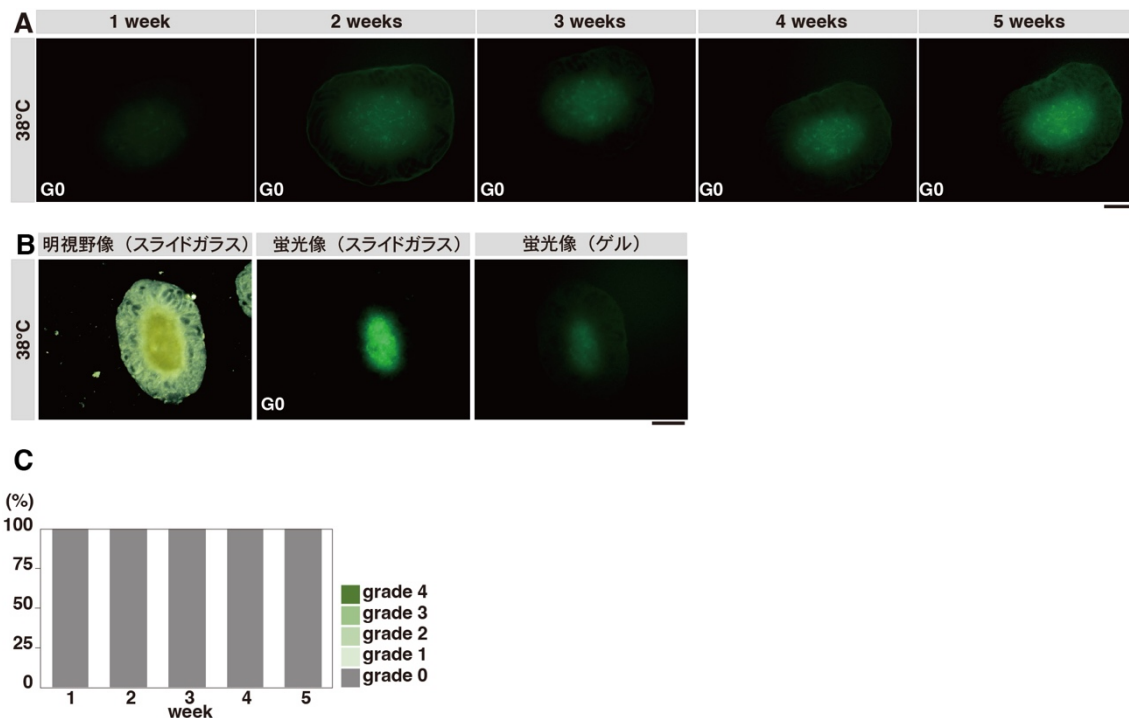


図 10 38°C条件における *Acr-GFP* マウス精巣の器官培養

A は同一サンプルの培養 1 週目から 5 週目までにおける *Acr-GFP* シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は 38°C で 5 週間培養した精巣片を示す。アガロースゲル上およびスライドガラス上において、明視野像と蛍光像を倒立型落射蛍光顕微鏡で撮影した。中央パネルの蛍光像の左下にはそれぞれの精巣片の *Acr-GFP* の grade を示す。C は 1-5 週の *Acr-GFP* シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は 51 精巣片。全ての培養精巣は 5 週目まで grade 0 を示す。スケールバーは 500 μ m を示す。

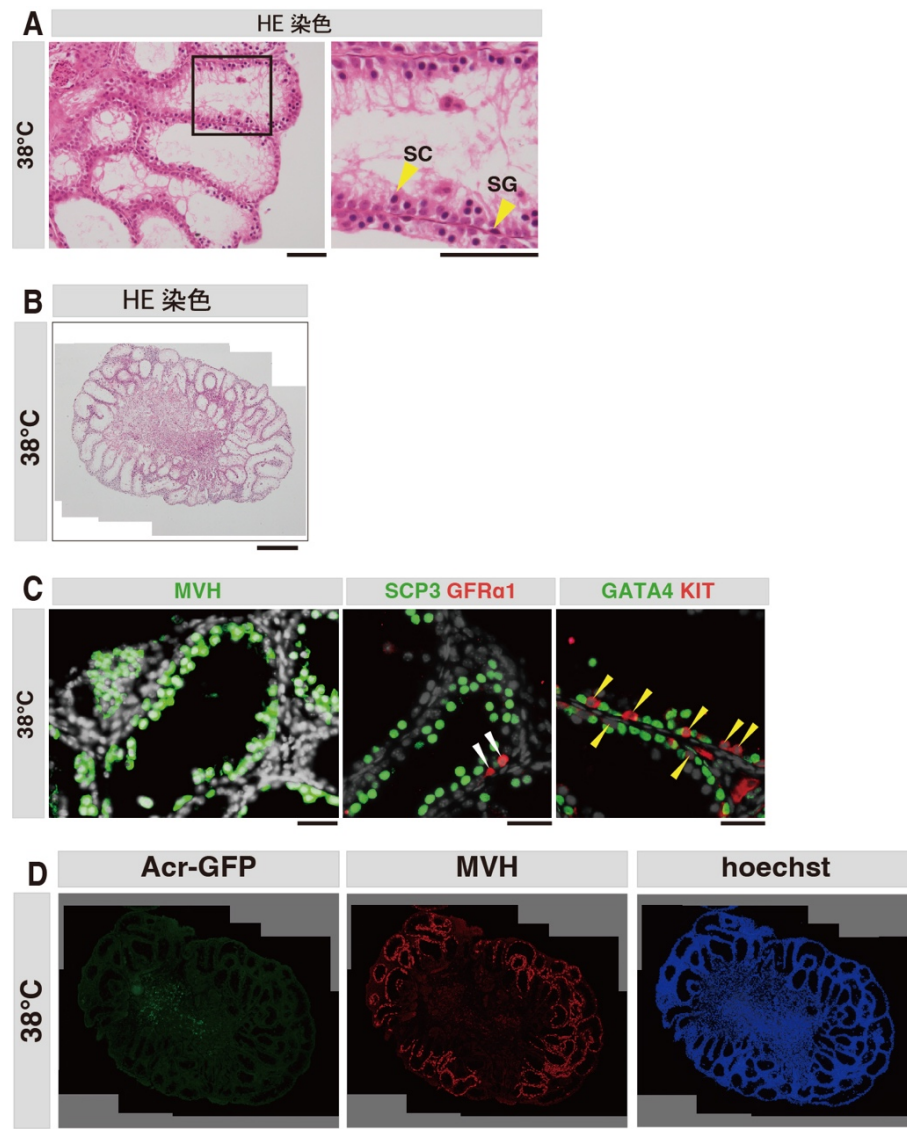


図 11 38°C条件で5週間培養した精巣の HE 染色と免疫染色

A は HE 染色を示す。A の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞を示し、円形精子細胞と伸長精子細胞は失われていた。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。B は HE 染色をした組織の全体像を示す。スケールバーは $500\mu\text{m}$ を示す。C は免疫染色を示す。左パネルは MVH、中央パネルは $\text{GFR}\alpha 1$ および SCP3、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。MVH 陽性細胞数と SCP3 陽性細胞数は 34°C に比べ減少し、 $\text{GFR}\alpha 1$ 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、GATA 4 陽性細胞は基底膜上で、KIT 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭は $\text{GFR}\alpha 1$ 陽性細胞を、黄色の矢頭は KIT 陽性細胞を示す。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは $40\mu\text{m}$ を示す。D は免疫染色を行った組織の全体像。GFP および MVH の免疫染色、Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは $500\mu\text{m}$ を示す。

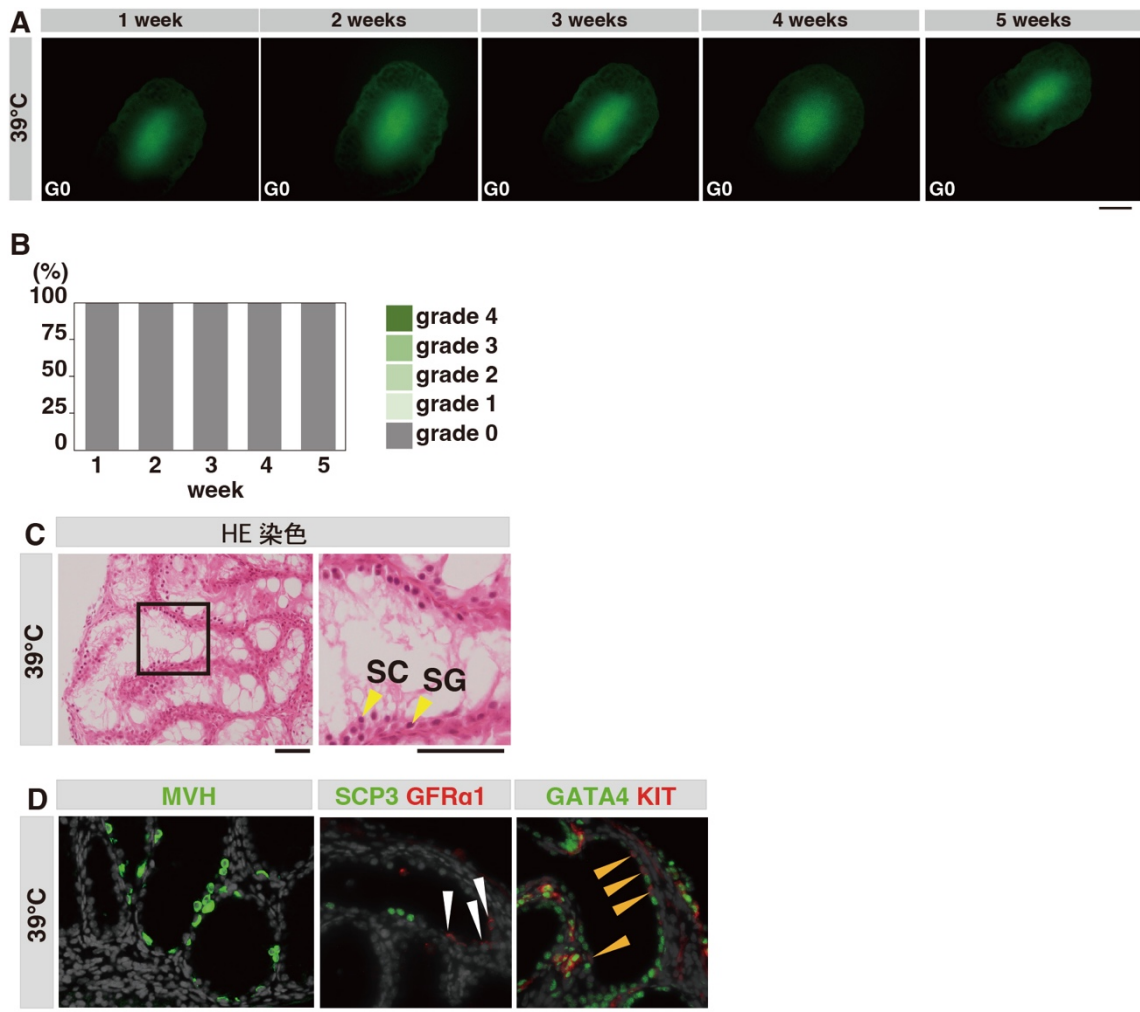


図 12 39°C条件で5週間培養した精巣の精子形成

A は同一サンプルの培養1週目から5週目までにおける Acr-GFP シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は 1-5 週の Acr-GFP シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は 11 精巣片。全ての培養精巣は 5 週目まで grade 0 を示す。スケールバーは $500\mu\text{m}$ を示す。C は HE 染色を示す。C の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞を示し、円形精子細胞と伸長精子細胞は失われていた。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。D は免疫染色を示す。左パネルは MVH、中央パネルは $\text{GFR}\alpha 1$ および SCP3、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。MVH 陽性細胞と SCP3 陽性細胞は 38°C条件に比べ減少し、 $\text{GFR}\alpha 1$ 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、GATA 4 陽性細胞は基底膜上で、KIT 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭は $\text{GFR}\alpha 1$ 陽性細胞を、黄色の矢頭は KIT 陽性細胞を示す。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは $40\mu\text{m}$ を示す。

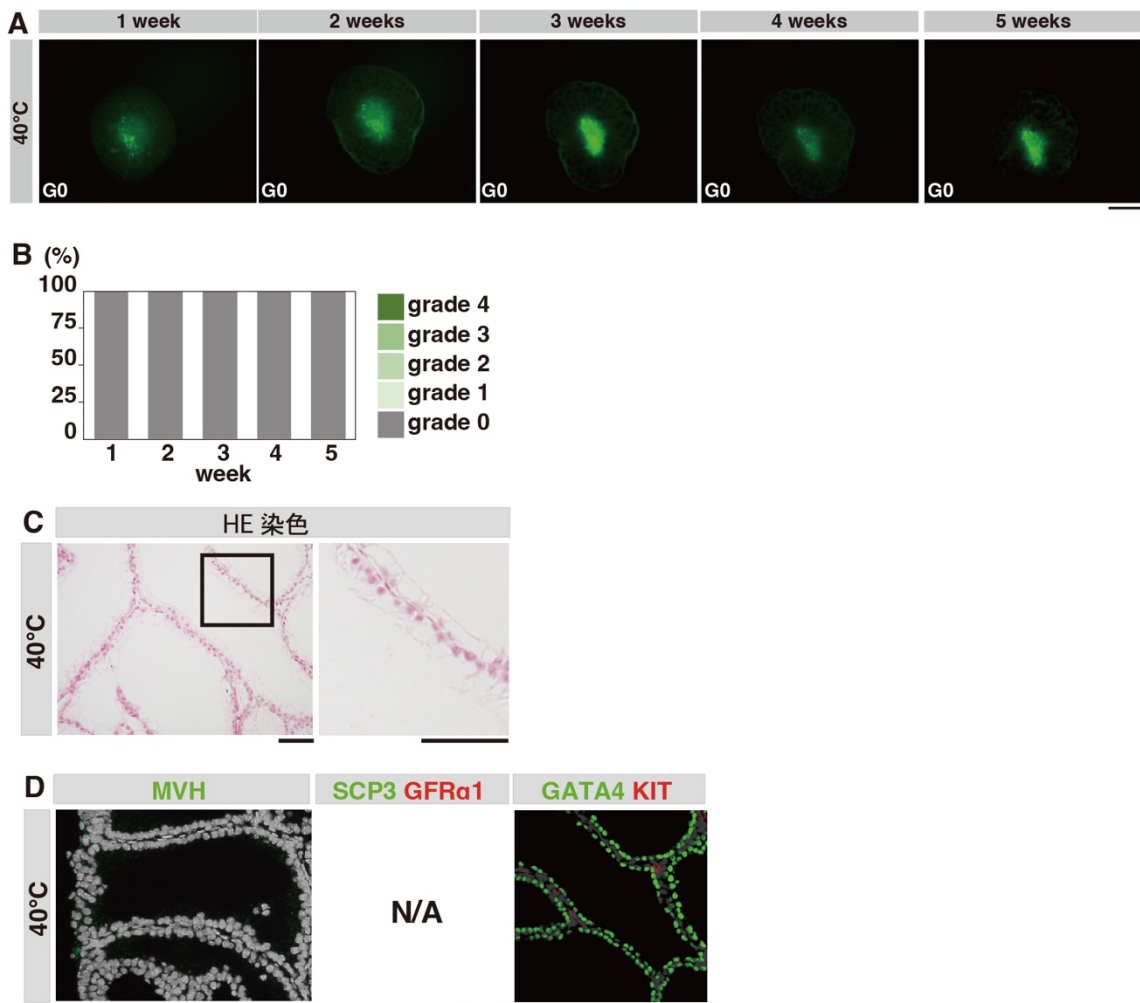


図 13 40°C条件で5週間培養した精巣の精子形成

A は同一サンプルの培養1週目から5週目までにおける Acr-GFP シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は 1-5 週の Acr-GFP シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は 11 精巣片。全ての培養精巣は 5 週目まで grade 0 を示す。スケールバーは 500 μ m を示す。C は HE 染色を示す。C の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。生殖細胞はすべて失われていた。スケールバーは 100 μ m を示す。D は免疫染色を示す。左パネルは MVH、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。MVH 陽性細胞および KIT 陽性細胞はすべての精細管で失われていた。GATA 4 陽性細胞は基底膜上で観察された。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは 40 μ m を示す。

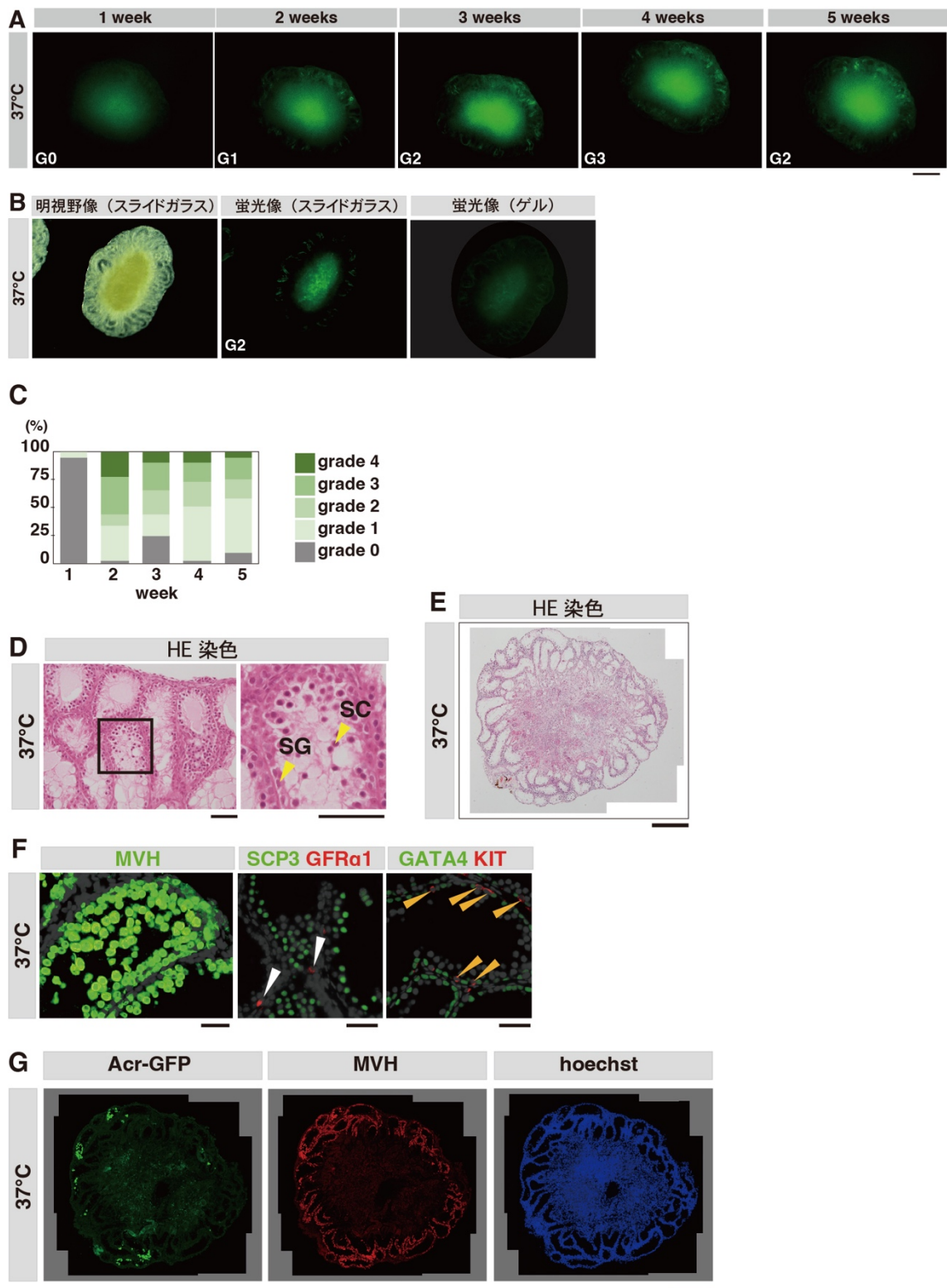


図 14 37°C条件で5週間培養した精巣の精子形成

A は同一サンプルの培養1週目から5週目までにおける Acr-GFP シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は 37°Cで5週間培養した精巣片を示す。アガロースゲル上およびスライドガラス上において、明視野像と蛍光像を倒立型落射蛍光顕微鏡で撮影した。中央パネルの蛍光像の左下にはそれぞれの精巣片の Acr-GFP シグナルの grade を示す。スケールバーは 500 μ m を示す。C は 1-5 週の Acr-GFP シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は 41 精巣片。多くの培養精巣は2週目から Acr-GFP のシグナルが観察され5週目においても Acr-GFP シグナルは観察される。D は HE 染色を示す。D の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞を示し、円形精子細胞と伸長精子細胞は失われていた。スケールバーは 100 μ m を示す。E は HE 染色をした組織の全体像を示す。スケールバーは 500 μ m を示す。F は免疫染色を示す。左パネルは MVH、中央パネルは GFR α 1 および SCP3、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。MVH 陽性細胞と SCP3 陽性細胞は 34°C 条件に比べ減少し、GFR α 1 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、GATA4 陽性細胞は基底膜上で、KIT 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭は GFR α 1 陽性細胞を、黄色の矢頭は KIT 陽性細胞を示す。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは 40 μ m を示す。G は免疫染色を行った組織の全体像。GFP および MVH の免疫染色、Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは 500 μ m を示す。

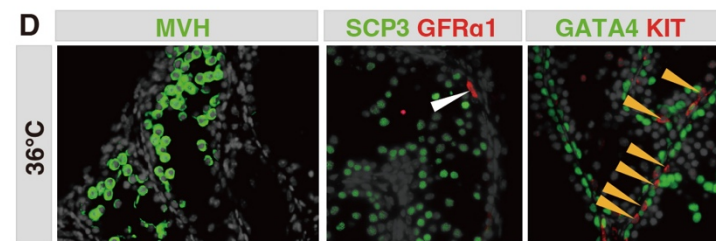
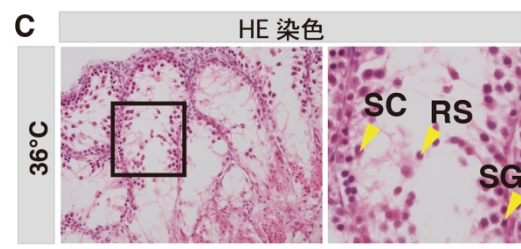
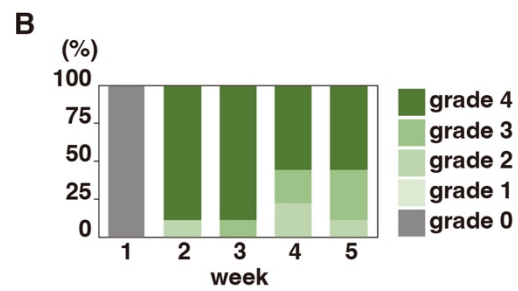
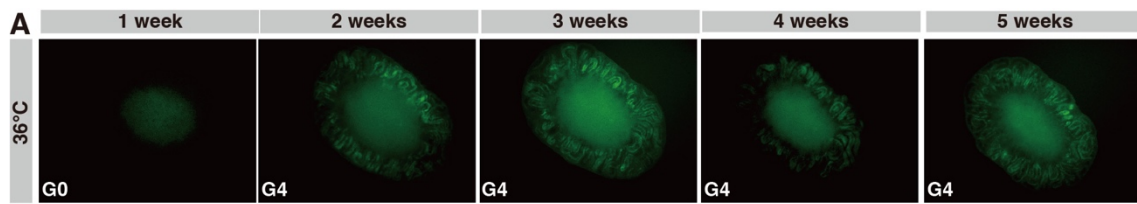


図 15 36°C条件で5週間培養した精巣の精子形成

A は同一サンプルの培養1週目から5週目までにおける Acr-GFP シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は 1-5 週の Acr-GFP シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は 9 精巣片。多くの培養精巣は 2 週目から Acr-GFP シグナルが観察され 5 週目においても Acr-EGFP シグナルは観察される。スケールバーは $500\mu\text{m}$ を示す。C は HE 染色を示す。C の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞、RS は円形精子細胞を示し。伸長精子細胞は失われていた。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。D は免疫染色を示す。左パネルは MVH、中央パネルは $\text{GFR}\alpha 1$ および SCP3、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。34°C条件と同様に、MVH 陽性細胞は精細管内の多くの細胞で、 $\text{GFR}\alpha 1$ 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、SCP3 陽性細胞は基底膜上および2層目の細胞で、GATA 4 陽性細胞は基底膜上で、KIT 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭は $\text{GFR}\alpha 1$ 陽性細胞を、黄色の矢頭は KIT 陽性細胞を示す。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは $40\mu\text{m}$ を示す。

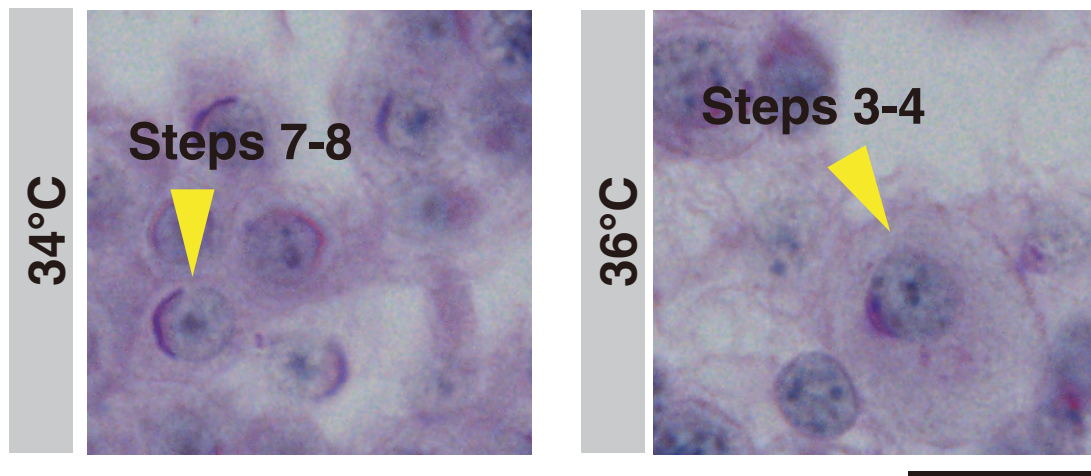


図 16 34°C条件および 36°C条件で 5 週間培養した精巣切片の PAS 染色

PAS 染色によって先体の形状を評価した。34°C条件では step3-4 より分化した円形精子細胞 (step7-8) が観察された。36°Cでは step3-4 の円形精子細胞が最も分化した生殖細胞であった。スケールバーは 20 μ m を示す。

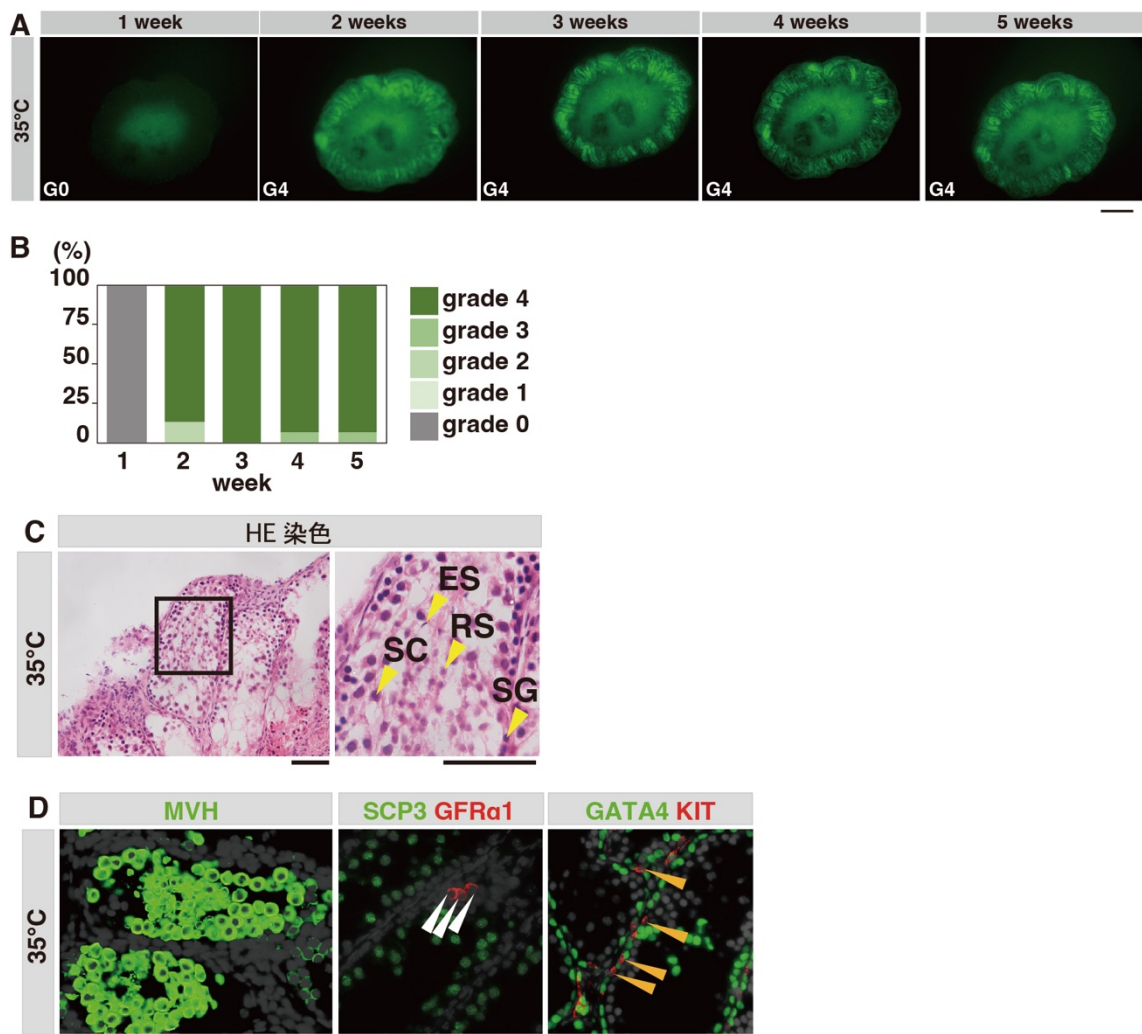


図 17 35°C条件で5週間培養した精巣の HE 染色と免疫染色

A は同一サンプルにおける培養1週目から5週目までにおける Acr-GFP シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は 1-5 週の Acr-GFP シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は 15 精巣片。多くの培養精巣は 2 週目から Acr-GFP のシグナルが観察され 5 週目においても Acr-GFP シグナルは観察される。スケールバーは 500 μ m を示す。C は HE 染色を示す。C の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞、RS は円形精子細胞、ES は伸長精子細胞を示す。スケールバーは 100 μ m を示す。D は免疫染色を示す。左パネルは MVH、中央パネルは GFR α 1 および SCP3、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。34°C 条件と同様に MVH 陽性細胞は精細管内の多くの細胞で、GFR α 1 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、SCP3 陽性細胞は基底膜上および 2 層目の細胞で、GATA4 陽性細胞は基底膜上で、KIT 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭は GFR α 1 陽性細胞を、黄色の矢頭は KIT 陽性細胞を示す。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは 40 μ m を示す。

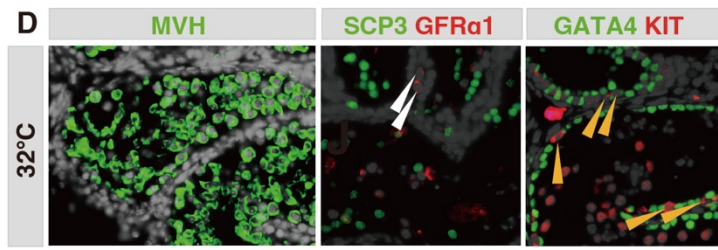
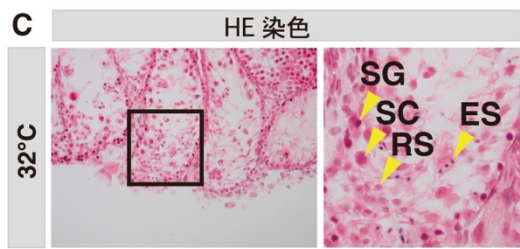
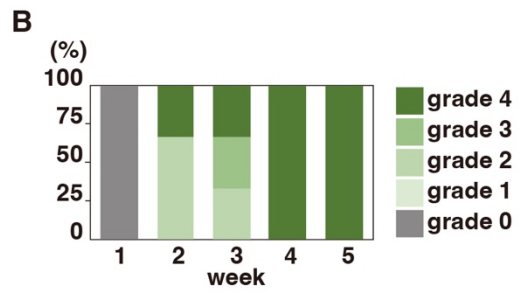
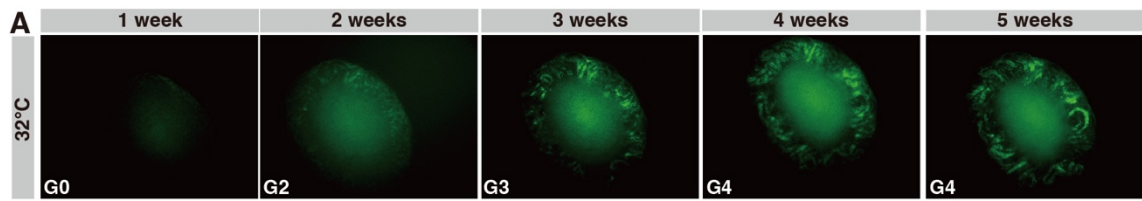


図 18 32°C条件で5週間培養した精巣の精子形成

A は同一サンプルの培養1週目から55週目までにおける Acr-GFP シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は1-5週の Acr-GFP シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は4精巣片。多くの培養精巣は2週目から Acr-GFP シグナルが観察され5週目においても Acr-GFP シグナルは観察される。スケールバーは $500\mu\text{m}$ を示す。C は HE 染色を示す。C の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞、RS は円形精子細胞、ES は伸長精子細胞を示す。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。D は免疫染色を示す。左パネルは MVH、中央パネルは GFR α 1 および SCP3、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。34°C条件と同様に MVH 陽性細胞は精細管内の多くの細胞で、GFR α 1 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、SCP3 陽性細胞は基底膜上および2層目の細胞で、GATA4 陽性細胞は基底膜上で、KIT 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭は GFR α 1 陽性細胞を、黄色の矢頭は KIT 陽性細胞を示す。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは $40\mu\text{m}$ を示す。

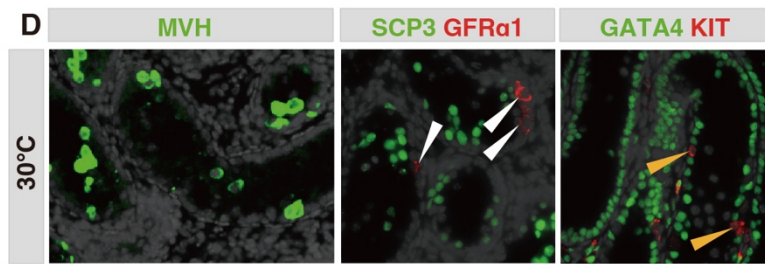
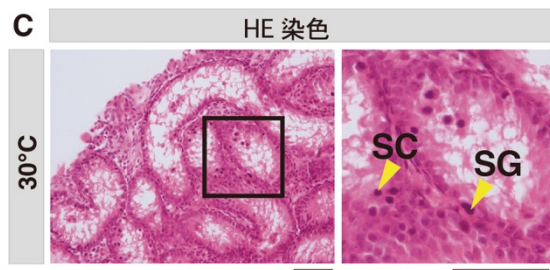
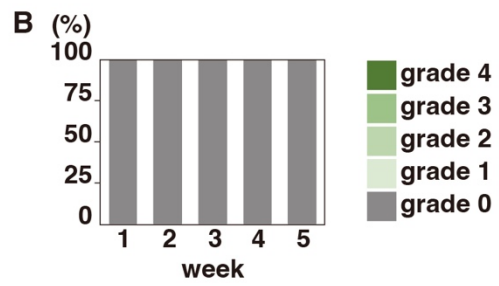
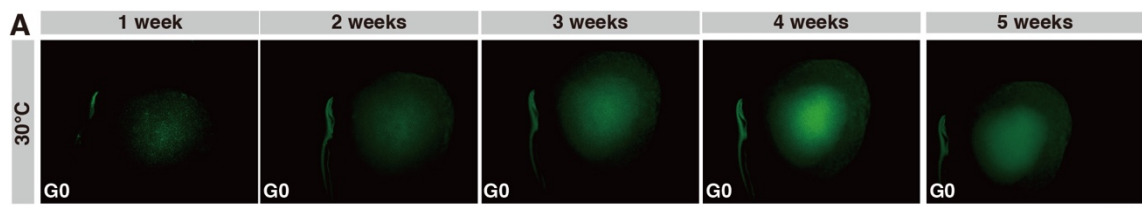


図 19 30°C条件で5週間培養した精巣の精子形成

A は同一サンプルの培養1週目から5週目までにおける Acr-GFP シグナルの代表サンプル。写真左下は各サンプルの grade を示す。B は 1-5 週の Acr-GFP シグナルの grade の割合を示す。サンプル数は 6 精巣片。全ての培養精巣は 5 週目まで grade 0 を示す。スケールバーは 500 μ m を示す。C は HE 染色を示す。C の左のパネルは右のパネルの強拡大を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞を示し、円形精子細胞と伸長精子細胞は失われていた。スケールバーは 100 μ m を示す。D は免疫染色を示す。左パネルは MVH、中央パネルは GFR α 1 および SCP3、右パネルは GATA4 と KIT の免疫染色を示す。MVH 陽性細胞と SCP3 陽性細胞は 38°C条件に比べ減少し、GFR α 1 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で、GATA 4 陽性細胞は基底膜上で、KIT 陽性細胞は基底膜上の一部の細胞で観察された。白の矢頭は GFR α 1 陽性細胞を、黄色の矢頭は KIT 陽性細胞を示す。グレーは Hoechst33342 による核染色を示す。スケールバーは 40 μ m を示す。

	<i>in vivo</i>		<i>ex vivo</i>									
	正常精巢	停留精巢	30°C	32°C	34°C	35°C	36°C	37°C	38°C	39°C	40°C	
未分化型精原細胞	+++++	+++++	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	
分化型形精原細胞	+++++	-	+	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	-	
初期精母細胞	+++++	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	
後期精母細胞	+++++	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	
円形精子細胞	+++++	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	
伸長精子細胞	+++++	-	-	+	++	+	-	-	-	-	-	

図 20 30℃条件から 40℃条件までの器官培養の結果まとめ

30℃条件から 40℃条件までの温度域で 5 週間培養した精巣の精子形成を半定量的に評価した。－は全く観察されなかった場合、＋は頻度は低いが再現よく観察される場合、＋＋は培養組織辺縁部の精細管において容易に観察される場合、＋＋＋は多くの培養組織辺縁部の精細管において観察される場合、＋＋＋＋は培養組織辺縁部の精細管で *in vivo* と同様に観察される場合、＋＋＋＋＋は *in vivo* と完全に同等の傾向で観察される場合を示す。＋＋＋＋＋は器官培養の条件下では観察されなかった。

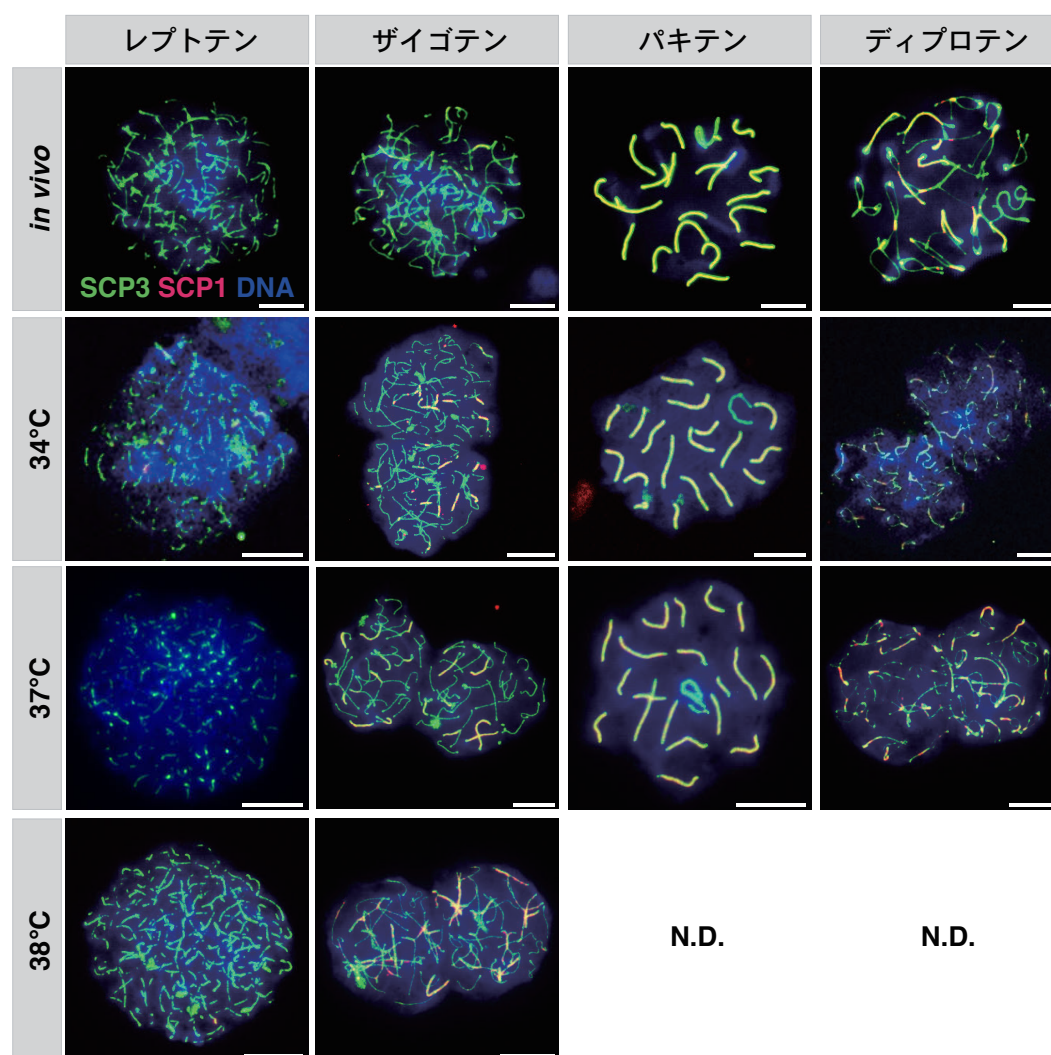


図 21 *in vivo* 精巣および培養精巣の精母細胞の免疫染色

5 週齢の *Acr-GFP* マウス精巣および 34°C、37°C、38°C 条件で 5 週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞を染色体 spread 法と免疫染色を行った。SCP3、SCP1 に対して免疫染色を行った。Hoechst33342 を用いて DNA を対比染色した。38°C 条件ではパキテン期とディプロテン期の細胞は観察されなかった。スケールバーは 10 μ m を、N.D. は検出なしを示す。

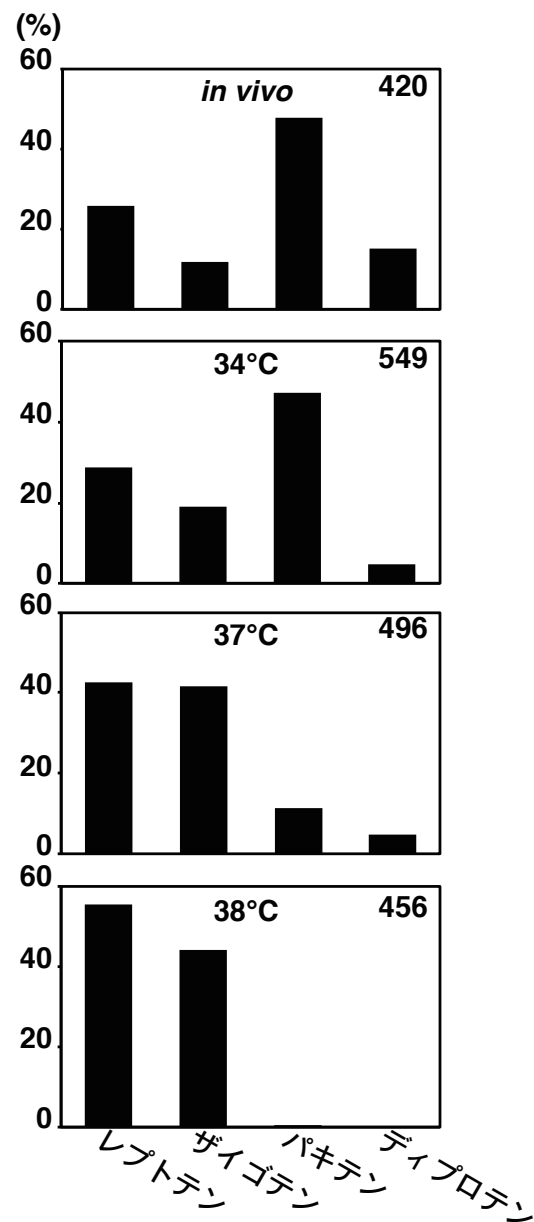


図 22 *in vivo* 精巣および培養精巣の精母細胞の割合

図 21 より得られた結果から、レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期、ディプロテン期に分類した。*in vivo* 精巣、34、37、38°C 条件で 5 週間培養した精巣から合計 420、549、496、456 個の細胞をカウントし、その数をそれぞれのグラフの右上に示す。*in vivo* 精巣、34°C、37°C、38°C 条件で 5 週間培養した精巣はそれぞれ、2 個体、6、7、7 精巣片から得られた。

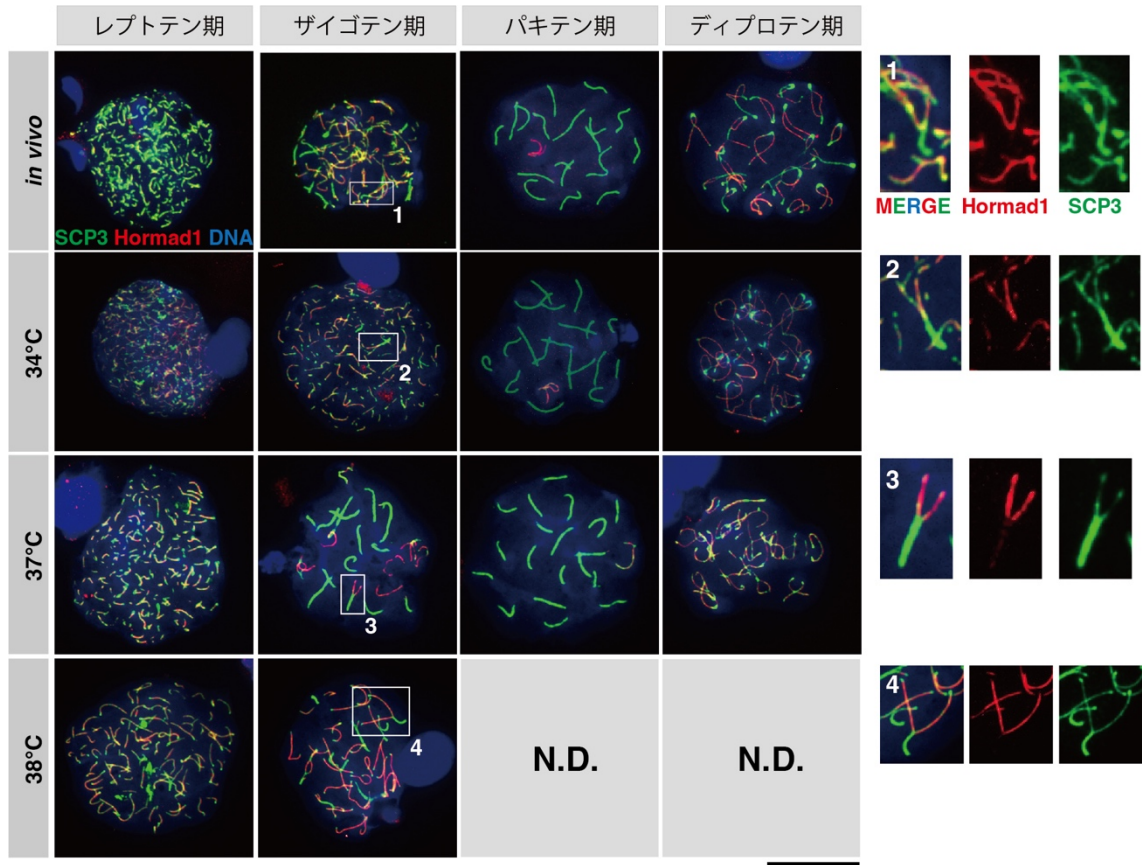


図 23 *in vivo* 精巣および培養精巣の精母細胞の免疫染色

5 週齢の *Acr-GFP* マウス精巣および 34°C、37°C、38°C 条件で 5 週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞を染色体 spread 法と免疫染色を行った。SCP3、Hormad1 に対して免疫染色を行った。Hoechst33342 を用いて DNA を対比染色した。右パネルはザイゴテン期の染色体の強拡大を示す。38°C 条件ではパキテン期とディプロテン期の細胞は観察されなかった。スケールバーは 10 μ m を、N.D. は検出なしを示す。

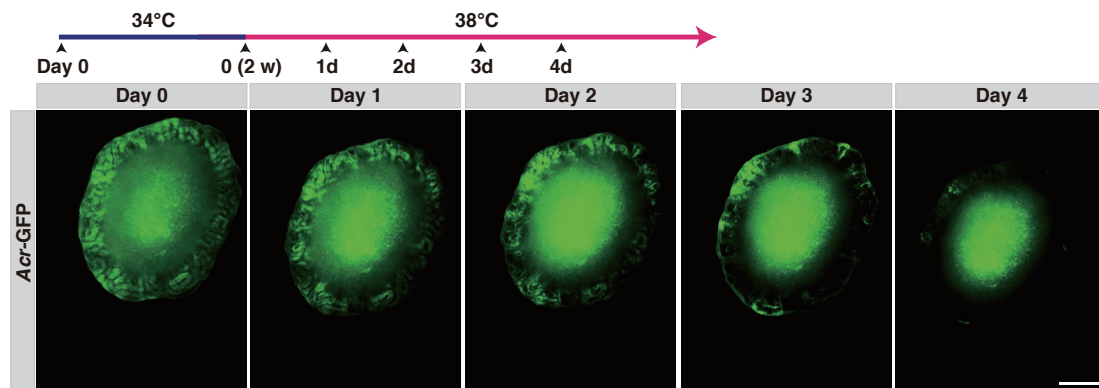


図 24 34°C条件から 38°C条件へと温度を変化させた *Acr-GFP* 精巢の Acr-GFP シグナル変化

34°C条件で 2 週間培養した後に、38°C条件へと温度を変化させた精巢における 4 日間の Acr-GFP シグナルを示す。Acr-GFP シグナルは徐々に減少した。スケールバーは 500 μ m を示す。

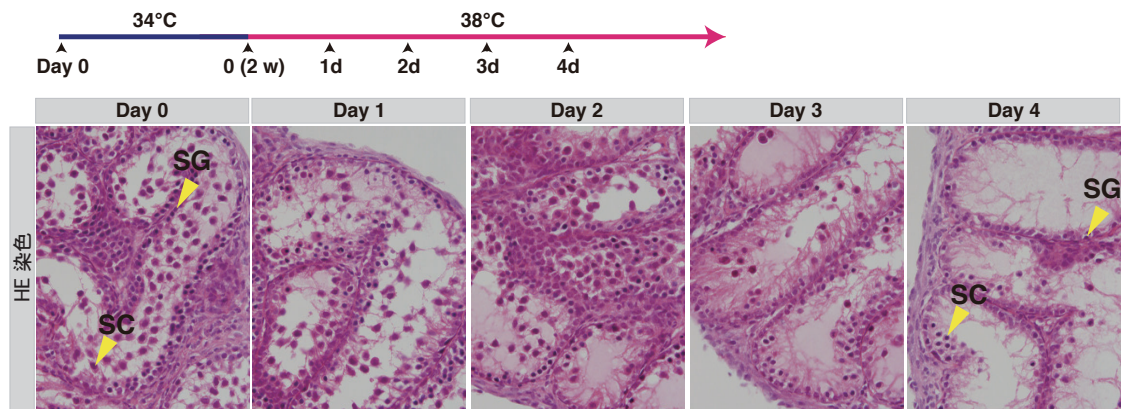


図 25 34°C条件から 38°C条件へと温度を変化させた *Acr-GFP* 精巣の精子形成の変化
 34°C条件で 2 週間培養した後に、38°C条件へと温度を変化させた 4 日間の精巣の HE 染色を示す。SG は精原細胞、SC は精母細胞を示す。温度変化後に精母細胞は著し減少した。スケールバーは 40 μ m を示す。

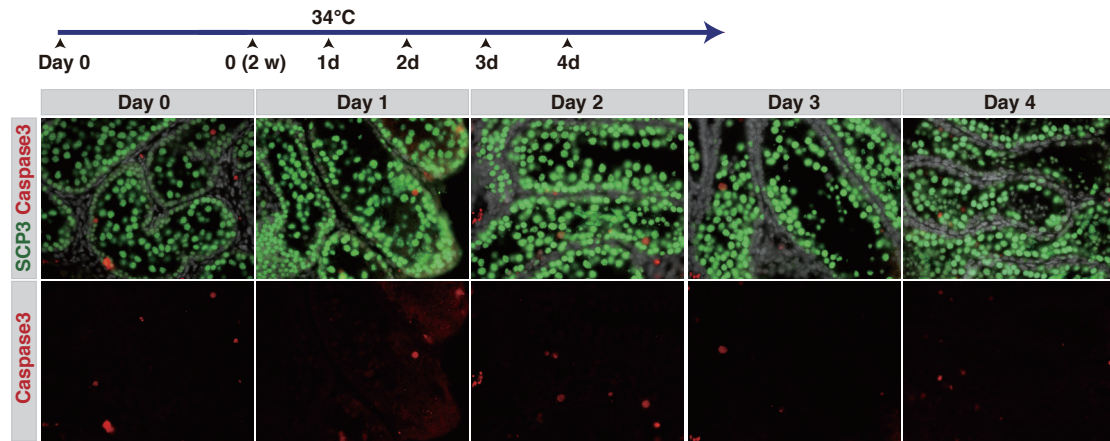


図 26 34°C条件で2週間培養した精巢における Caspase3 の免疫染色

34°C条件で培養2週目から4日間の精巢における Caspase3 の免疫染色を示す。SCP3、Caspase3 に対して免疫染色を行った。Hoechst33342 を用いて DNA を対比染色した。ほとんどの SCP3 陽性細胞は Caspase3 陰性となった。スケールバーは 40 μ m を示す。

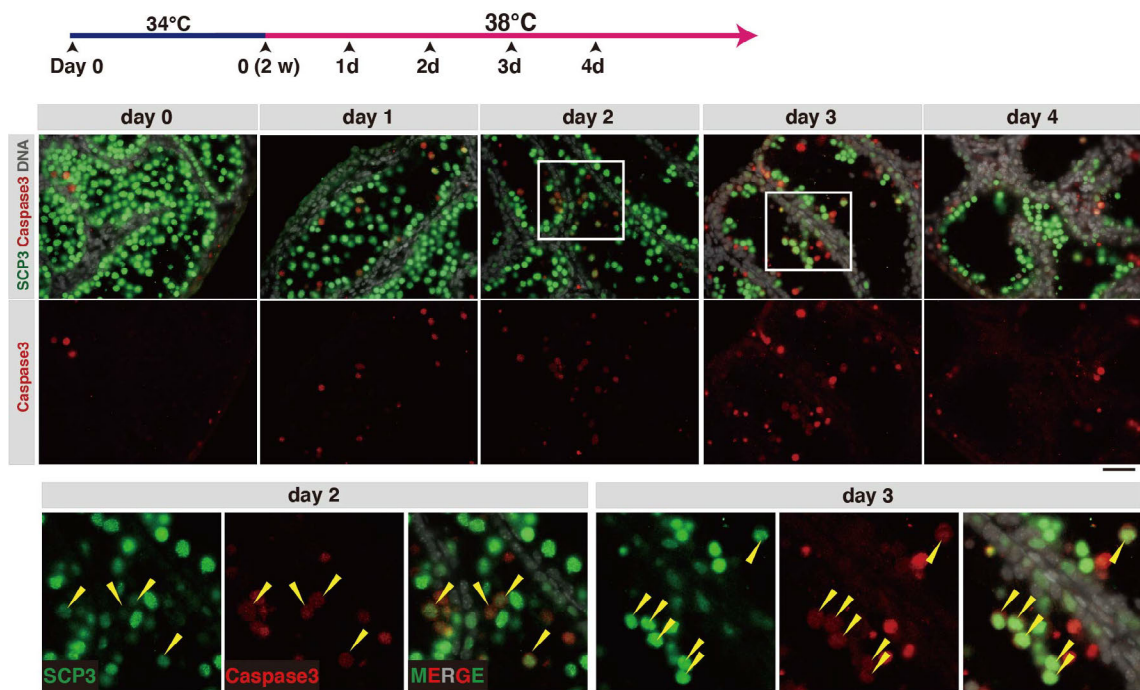


図 27 34°C条件から 38°C条件へと温度を変化させた *Acr-GFP* 精巣における Caspase3 の免疫染色

34°C条件で 2 週間培養後、38°C条件へと温度を変化させた後 4 日間の精巣の Caspase3 の免疫染色を示す。SCP3、Caspase3 に対して免疫染色を行った。Hoechst33342 を用いて DNA を対比染色した。下段のパネルは上段のボックス内の強拡大を示す。黄色の矢頭は SCP3 陽性かつ Caspase3 陽性の細胞を示す。スケールバーは 40 μm を示す。

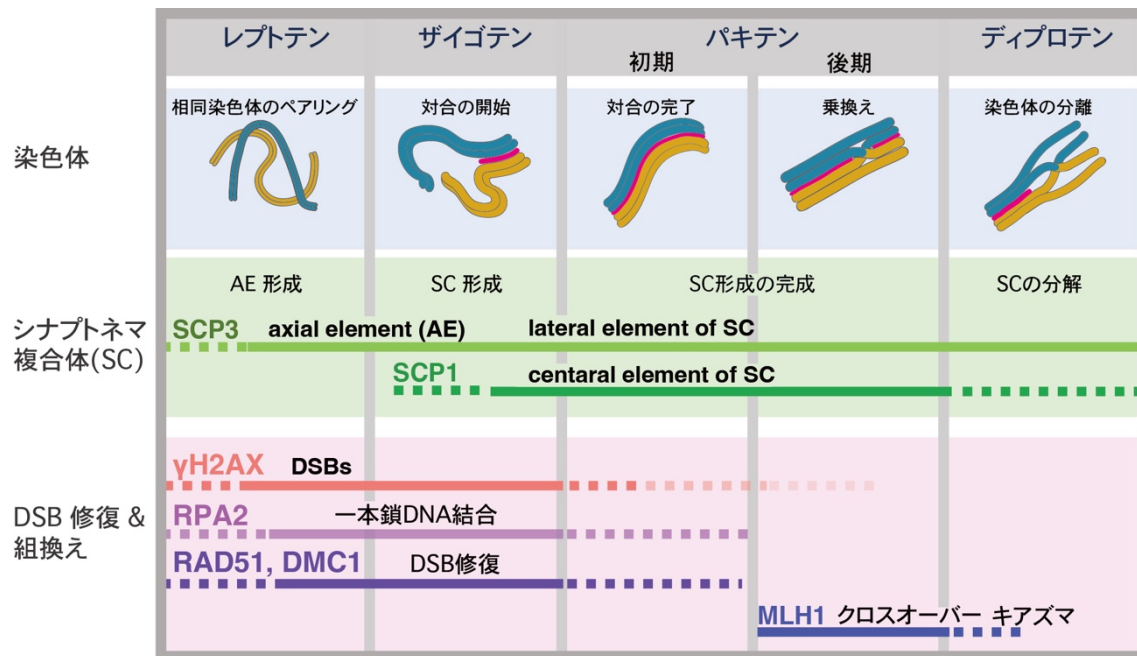


図 28 マウス減数分裂の概要と本研究に用いたマーカータンパク質の発現パターン

本研究で用いた減数分裂期の主要なイベントとマーカータンパク質の発現パターンを示す。SCP3 を axial element、SCP1 を central element、 γ H2AX を DSBs、RPA2 を DSB 認識タンパク質、RAD51 および DMC1 を DSB 修復タンパク質、MLH 1 を乗換え（クロスオーバー）のマーカーとして使用した。

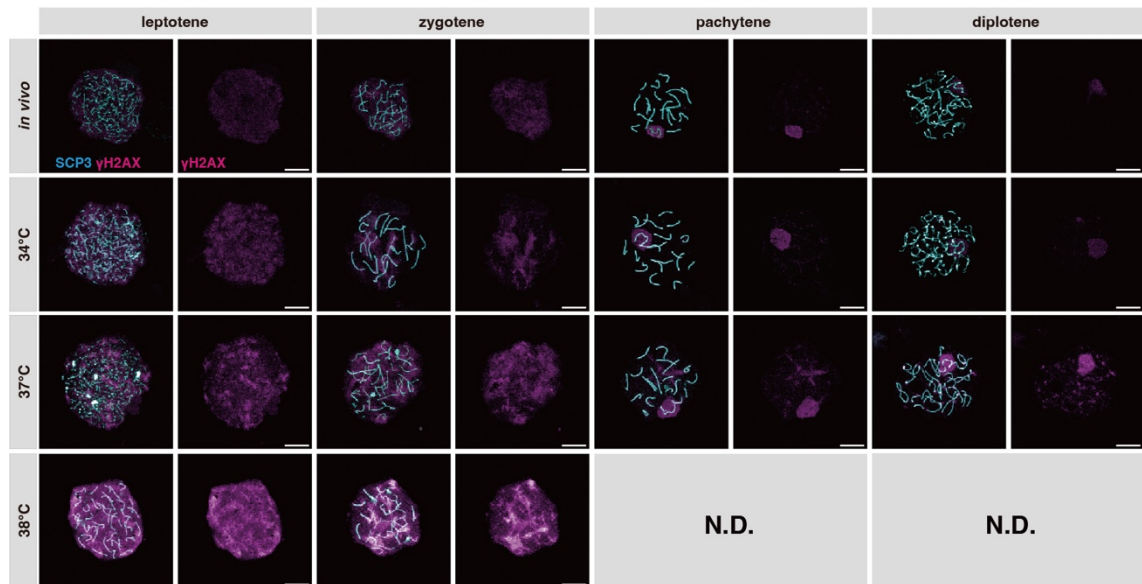


図 29 *in vivo* 精巣および培養精巣の精母細胞の γ H2AX 染色

5 週齢の *Acr-GFP* マウス精巣および 34、37、38°C 条件で 5 週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞を染色体 spread 法と免疫染色を行った。SCP3、 γ H2AX に対して免疫染色を行った。Hoechst33342 を用いて DNA を対比染色した。38°C ではパキテン期とディプロテン期の細胞は観察されなかった。N.D. は検出なしを示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

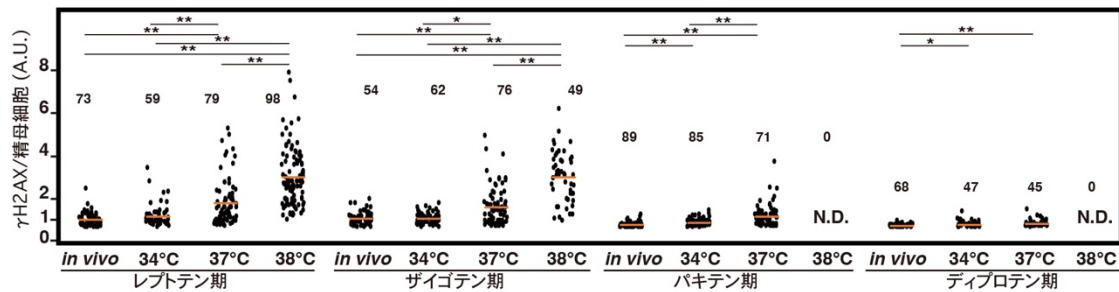


図30 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞の γ H2AXシグナルの定量

図29から得られた結果から、精母細胞の γ H2AXシグナルの定量解析を行った。レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期、ディプロテン期に分類した。38°C条件の培養精巣からはパキテン期およびディプロテン期の精母細胞は観察されなかった。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣から、レプトテン期を73、59、79、98、ザイゴテン期を54、62、76、49、パキテン期を89、85、61、0、ディプロテン期を68、47、45、0個カウントした。その数をそれぞれのプロットの右上に示す。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精母細胞は、4個体、14、15、15精巣片から得られた。Kruskal-Wallis testの結果は、初期レプトテン期、後期レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期でそれぞれ、 $2.31\text{E}-34$ 、 $1.13\text{E}-19$ 、 $2.53\text{E}-19$ 、 $3.76\text{E}-5$ であった。バーは平均を、N.D.は検出なしを示す。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ (Steel-Dwass検定)のものを示す。

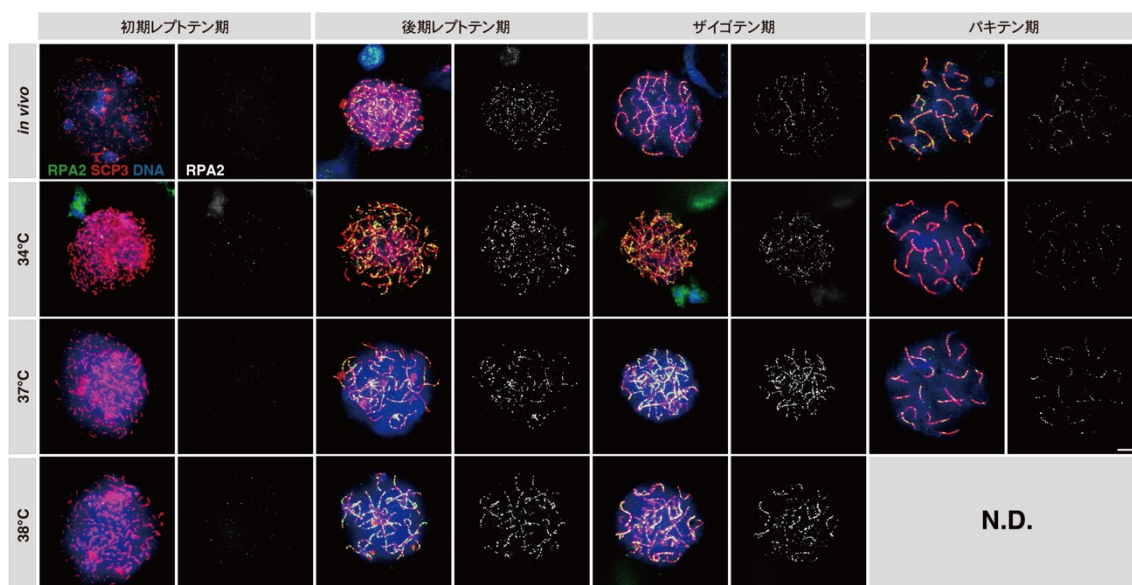


図31 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞のRPA2タンパク質の発現

5週齢の *Acr-GFP* マウス精巣および34、37、38°C条件で5週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞を染色体 spread法と免疫染色を行った。SCP3、RPA2に対して免疫染色を行った。Hoechst33342を用いてDNAを対比染色した。38°C条件ではパキテン期の細胞は観察されなかった。スケールバーは10 μ mを、N.D.は検出なしを示す。

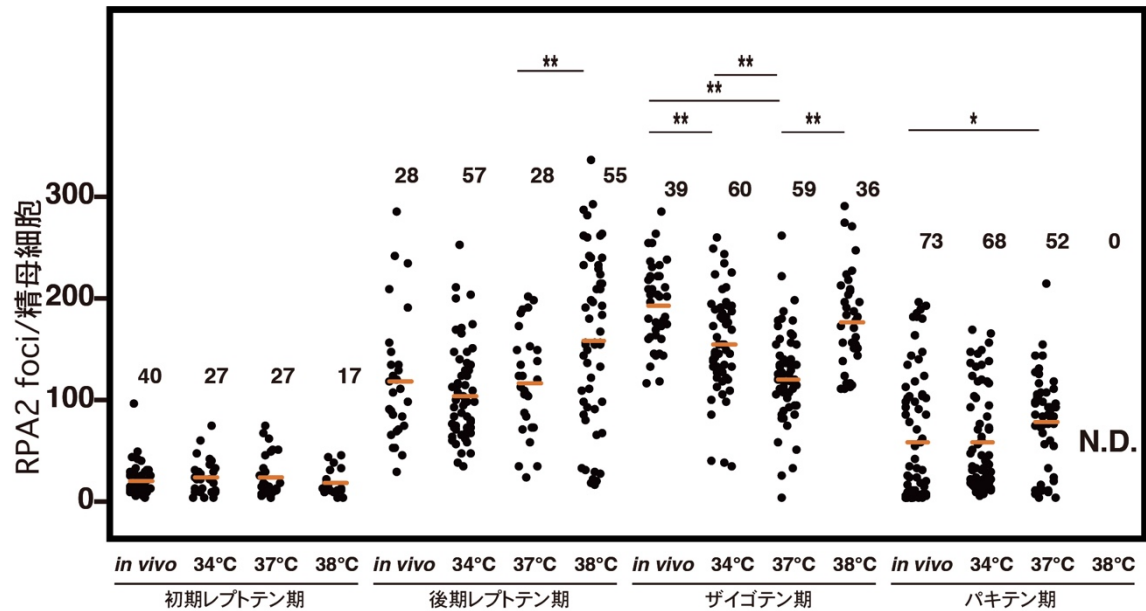


図32 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞のRPA2 fociの定量

図31から得られた結果から、SCP3上に存在するRPA2 foci のカウントを行った。初期レプトテン期、後期レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期に分類した。38°C条件の培養精巣からはパキテン期の精母細胞は観察されなかった。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣から、初期レプトテン期を40、27、27、17、後期レプトテン期を26、57、28、55、ザイゴテン期を39、60、59、36、パキテン期を73、68、52、0個カウントした。その数をそれぞれのプロットの右上に示す。バーは平均を、N.D.は検出なしを示す。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精母細胞は、3個体、8、8、8精巣片から得られた。Kruskal-Wallis testの結果は、初期レプトテン期、後期レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期でそれぞれ、0.88、1.39E-3、1.13E-11、0.02であった。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ (Steel-Dwass検定) のものを示す。

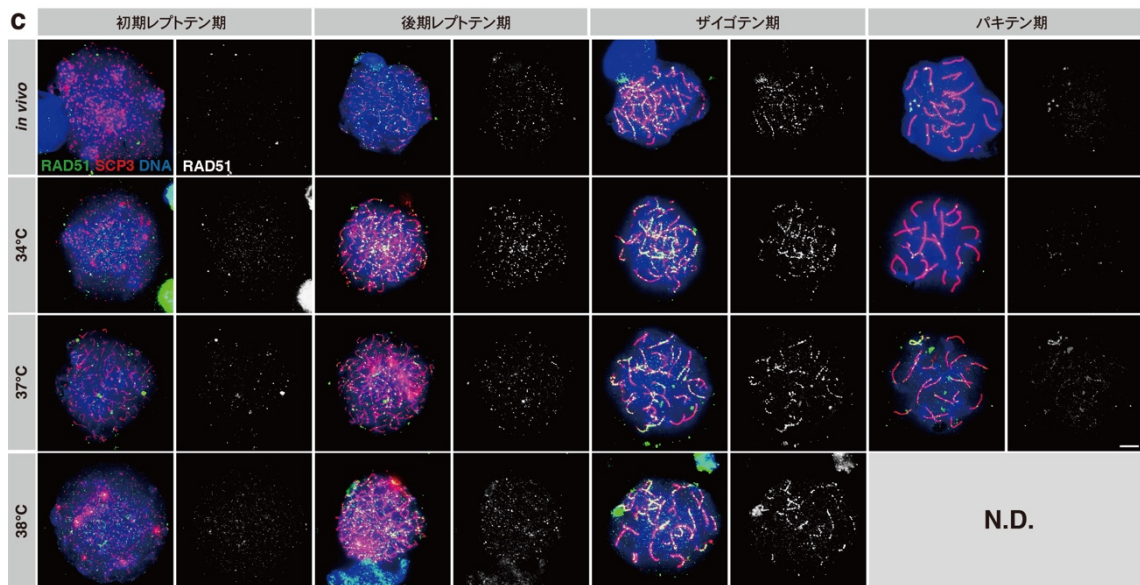


図33 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞のRAD51タンパク質の発現

5週齢の *Acr-GFP* マウス精巣および34、37、38°C条件で5週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞を染色体 spread法と免疫染色を行った。SCP3およびRAD51に対して免疫染色を行った。Hoechst33342を用いてDNAを対比染色した。38°C条件ではパキテン期の細胞は観察されなかった。スケールバーは10 μ mを、N.D.は検出なしを示す。

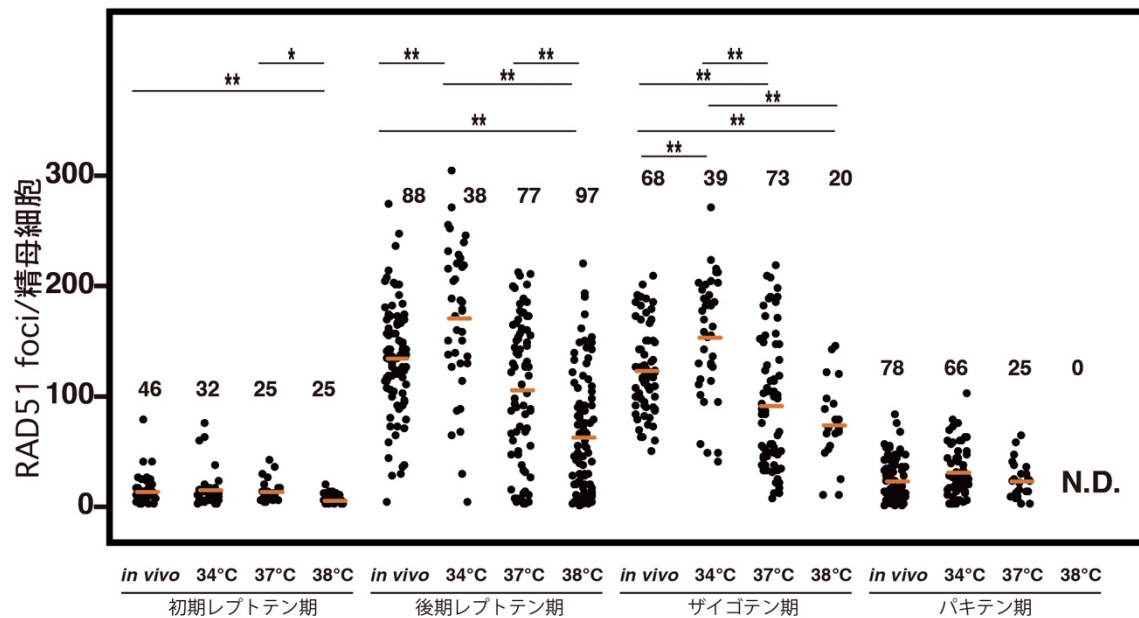


図34 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞のRAD51 fociの定量

図33から得られた結果から、SCP3上に存在するRAD51 foci のカウントを行った。初期レプトテン期、後期レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期に分類した。38°C条件の培養精巣からはパキテン期の精母細胞は観察されなかった。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣から、初期レプトテン期を46、32、25、25、後期レプトテン期を88、38、77、97、ザイゴテン期を68、39、73、20、パキテン期を78、66、25、0個カウントした。その数をそれぞれのプロットの右上に示す。バーは平均を、N.D.は検出なしを示す。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精母細胞は、4個体、14、15、15精巣片から得られた。Kruskal-Wallis testの結果は、初期レプトテン期、後期レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期でそれぞれ、0.01、4.75E-18、1.68E-9、0.11であった。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ (Steel-Dwass検定)のものを示す。

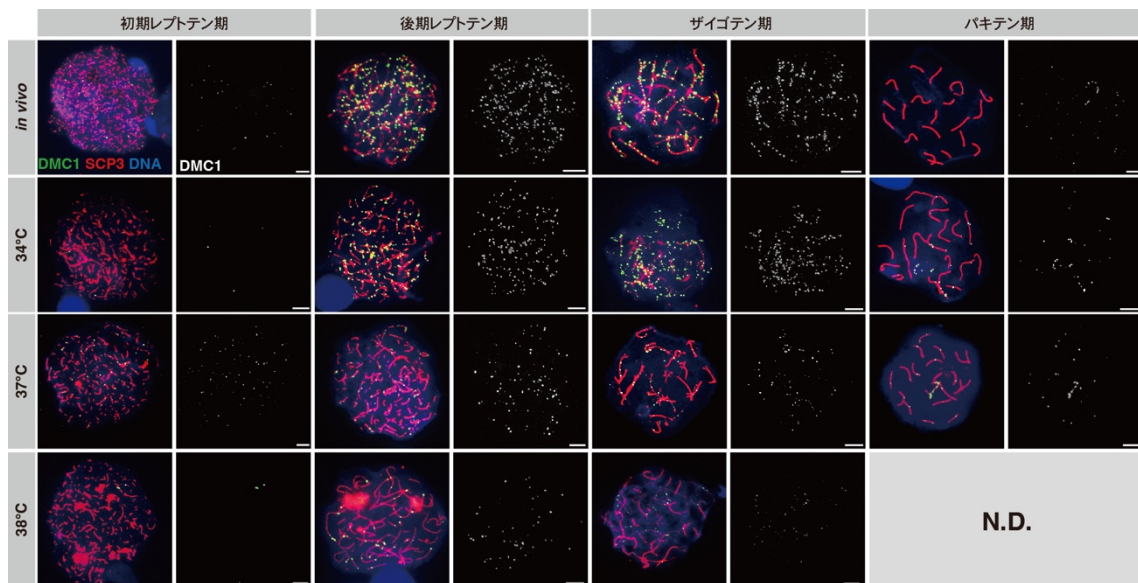


図35 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞のDMC1タンパク質の発現

5週齢の *Acr-GFP* マウス精巣および34、37、38°C条件で5週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞を染色体 spread法と免疫染色を行った。SCP3、DMC1に対して免疫染色を行った。Hoechst33342を用いてDNAを対比染色した。38°C条件ではパキテン期の細胞は観察されなかった。スケールバーは10 μ mを、N.D.は検出なしを示す。

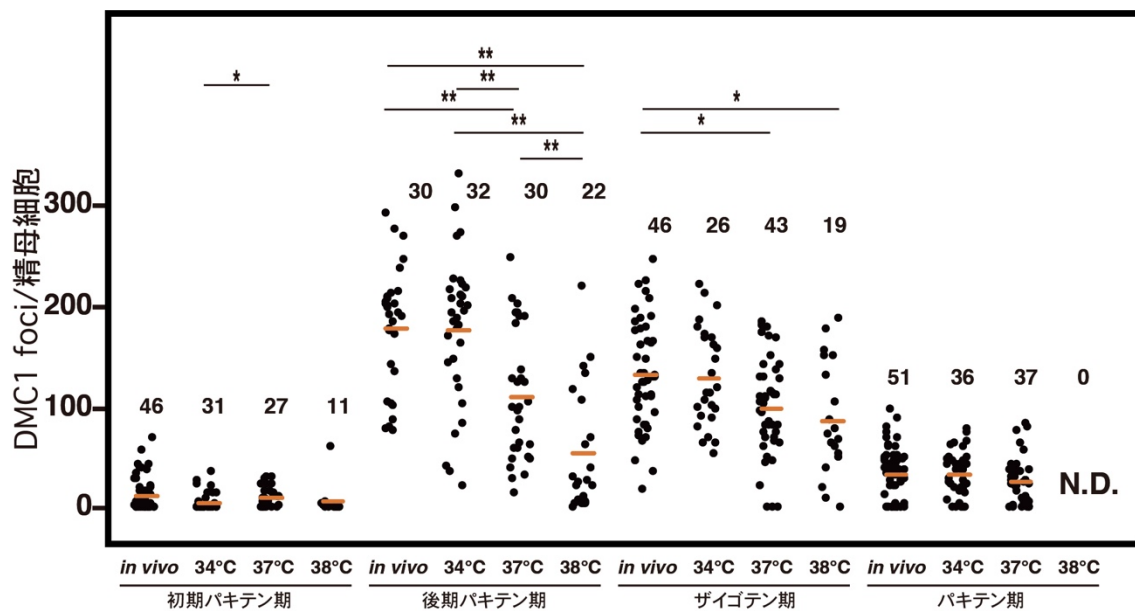


図36 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞のDMC1 fociの定量

図35から得られた結果から、SCP3上に存在するDMC1 foci のカウントを行った。初期レプトテン期、後期レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期に分類した。38°C条件の培養精巣からはパキテン期の精母細胞は観察されなかった。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣から、初期レプトテン期を46、31、27、11、後期レプトテン期を30、32、30、22、ザイゴテン期を46、26、43、19、パキテン期を51、36、37、0個カウントした。その数をそれぞれのプロットの右上に示す。バーは平均を、N.D.は検出なしを示す。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精母細胞は、2個体、4、10、4精巣片から得られた。Kruskal-Wallis testの結果は、初期レプトテン期、後期レプトテン期、ザイゴテン期、パキテン期でそれぞれ、0.02、9.08E-9、2.20E-3、0.25であった。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ (Steel-Dwass検定)のものを示す。

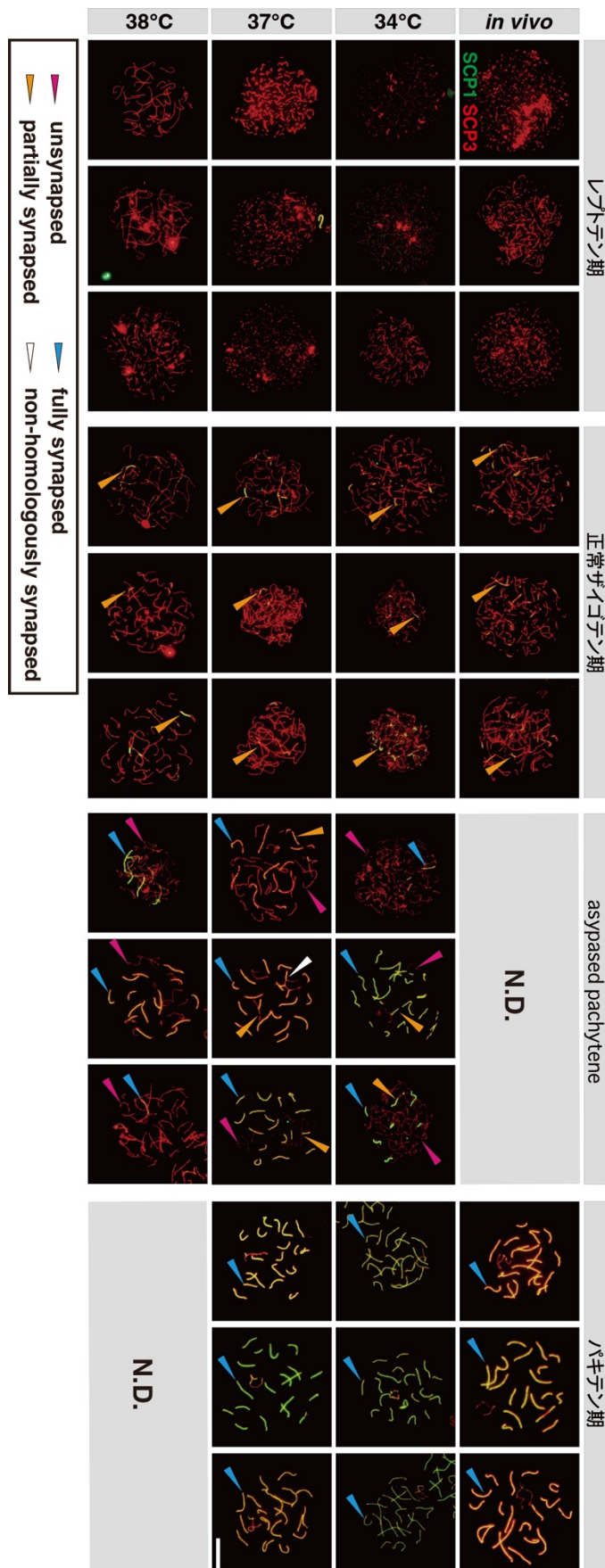


図 37 *in vivo* 精巣および培養精巣におけるザイゴテン期および asynapsed pachytene の精母細胞

5 週齢の *Acr-GFP* マウス精巣および 34、37、38°C 条件で 5 週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞を染色体 spread 法と免疫染色を行った。SCP3、SCP1 に対して免疫染色を行った。レプトテン期、正常ザイゴテン期、asynapsed pachytene、パキテン期を示す。asynapsed pachytene の定義は、少なくとも一对の完全に対合した染色体に加えて、“染色体全長の 50%未満の部分のみしか対合していない常染色体”もしくは“全く対合していない常染色体”が一对以上存在する精母細胞とした。染色体の対合状態は、対合を行っていないもの(マゼンタ)、対合過程のもの(オレンジ)、完全に対合したもの(青)、非相同染色体間の対合(白)に分類した。スケールバーは 10 μ m を、N.D.は検出なしを示す。

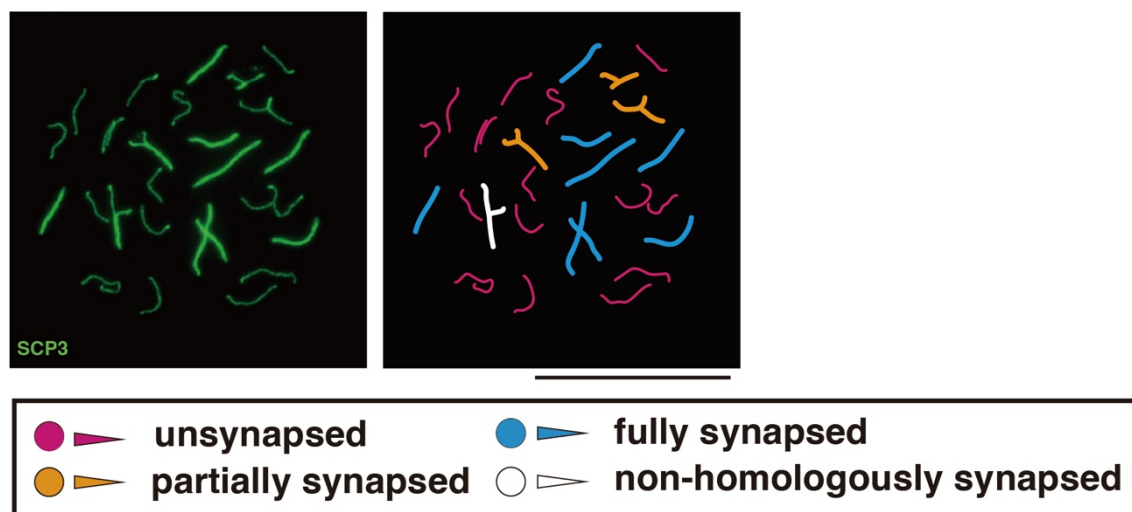


図38 高温培養下での精母細胞の染色体の対合状態

37°C条件で5週間培養時の精母細胞の染色体の対合状態の代表例を示す。左のパネルはSCP3で染色を行ったサイゴテン期様の精母細胞を、右パネルは各染色体の対合状態の模式図を示す。染色体の対合状態は、対合を行っていないもの(マゼンタ)、対合過程のもの(オレンジ)、完全に対合したもの(青)、非相同染色体間の対合(白)に分類した。スケールバーは20 μ mを示す。

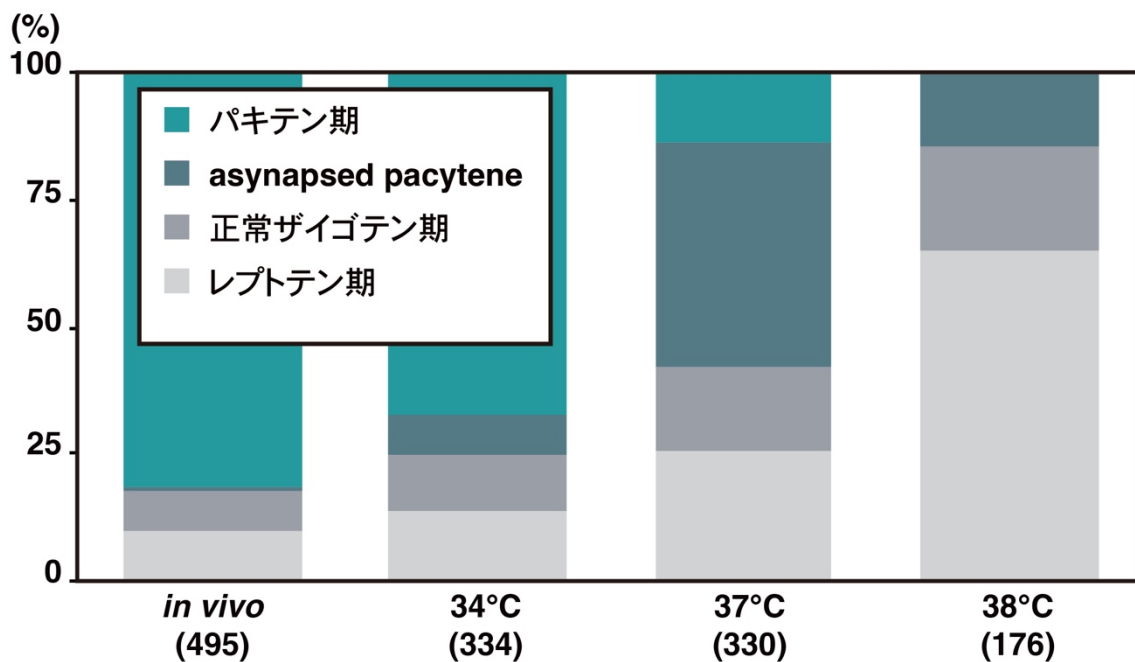


図 39 *in vivo* 精巣および培養精巣の精母細胞の割合

図 38 より得られた結果から、レプトテン期、正常ザイゴテン期、asynapsed pachytene、パキテン期に分類した。*in vivo* 精巣、34、37、38°C条件で5週間培養した精巣から合計495、334、330、176個の細胞をカウントし、その数をそれぞれのグラフの右上に示す。*in vivo* 精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣はそれぞれ、4個体、10、15、10精巣片から得られた。

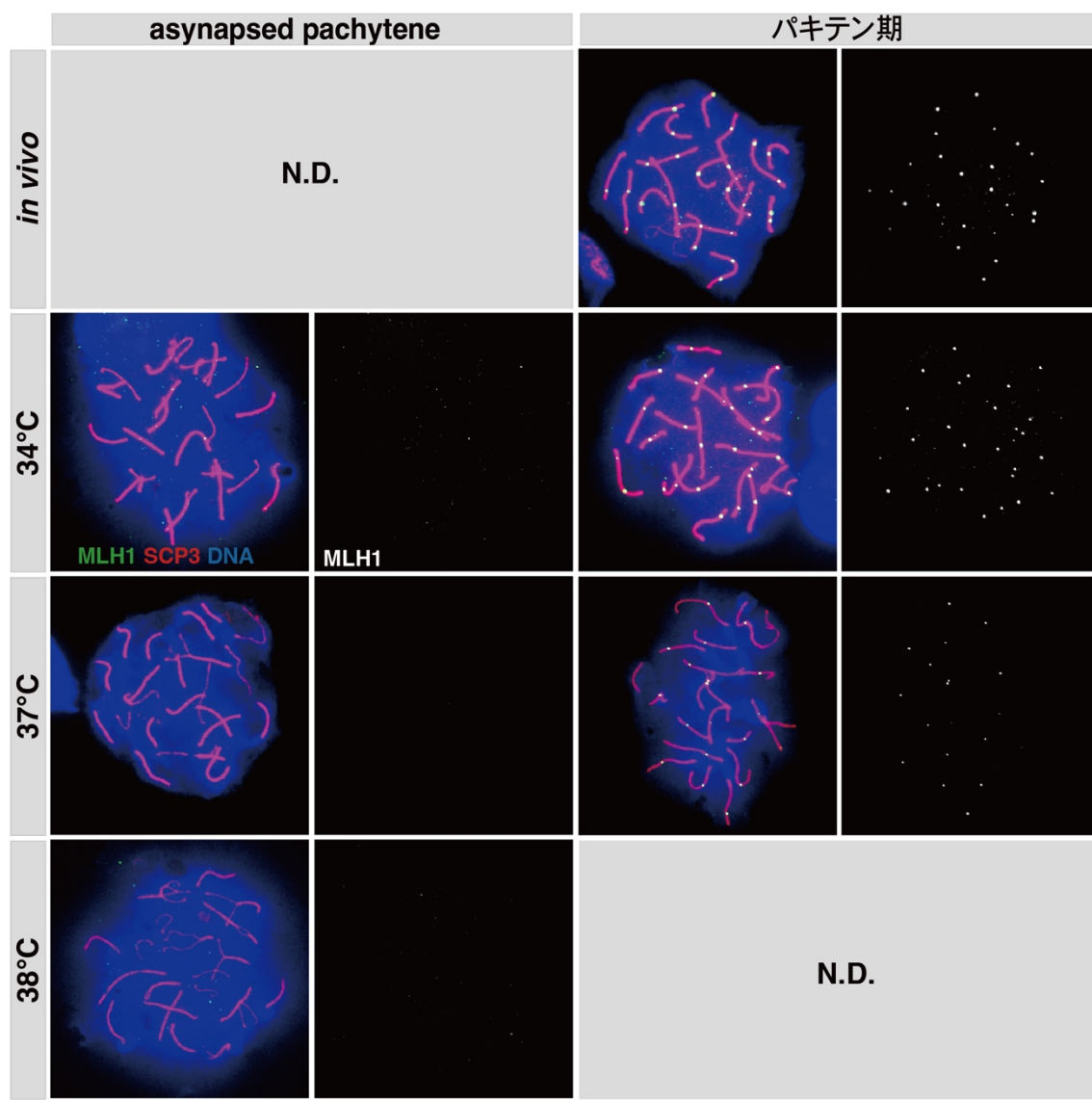


図40 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞のMLH1タンパク質の発現

5週齢の *Acr-GFP* マウス精巣および34、37、38°C条件で5週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞を染色体 spread法と免疫染色を行った。SCP3、MLH1に対して免疫染色を行った。Hoechst33342を用いてDNAを対比染色した。38°C条件ではパキテン期の細胞は観察されなかった。スケールバーは10 μ mを、N.D.は検出なしを示す。

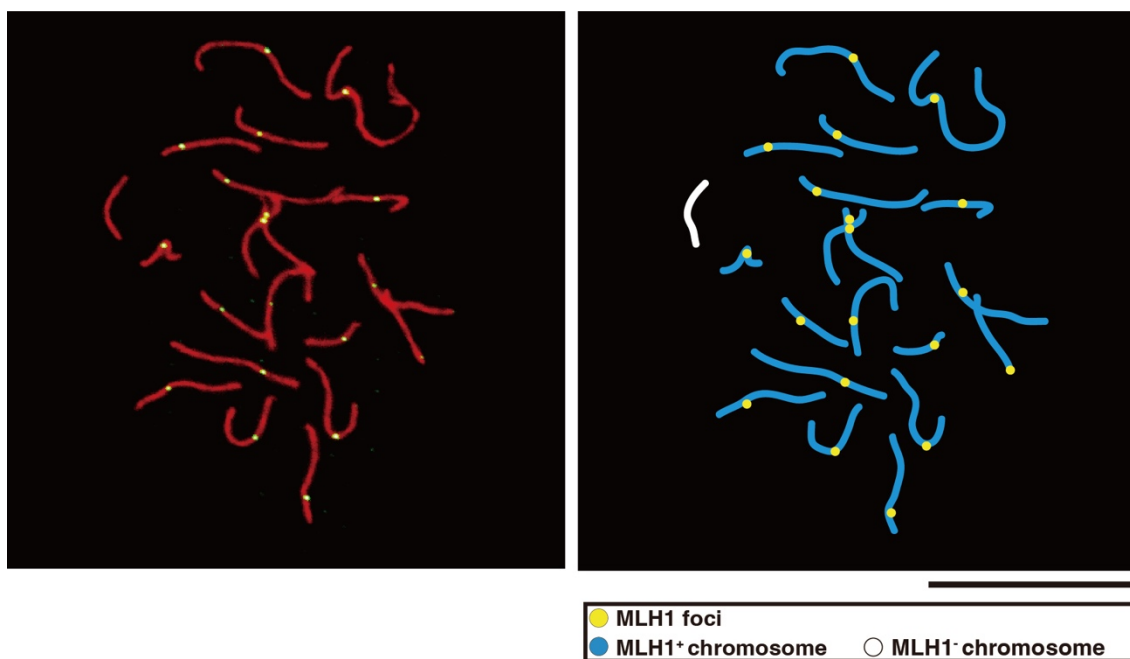


図41 高温培養下でのMLH1 fociの発現パターン

37°C条件で5週間培養時のパキテン期精母細胞のMLH1 fociの発現パターンの代表例を示す。左のパネルはSCP3で染色を行ったパキテン期精母細胞を、右パネルは各染色体のMLH1 fociの発現パターンの模式図を示す。MLH1 foci(黄)、MLH1 fociを持つ染色体(青)、MLH1 fociを持たない染色体(白)に分類した。スケールバーは20 μ mを示す。

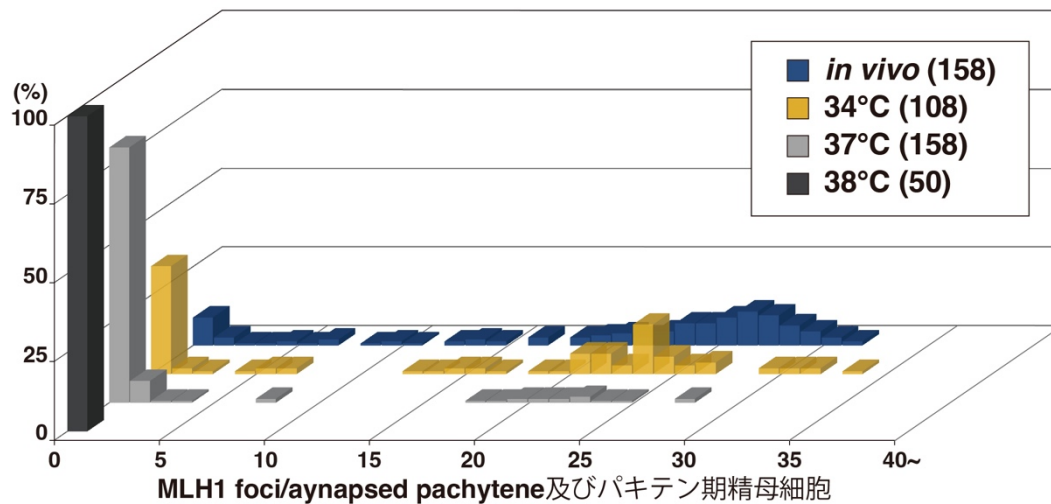


図42 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞におけるMLH1 fociの定量

図41から得られた結果から、asynapsed pachyteneおよびパキテン期の細胞におけるSCP3上に存在するMLH1 fociのカウントを行った。38°C条件の培養精巣からはパキテン期の精母細胞は観察されなかった。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣から、それぞれ158、108、158、58個カウントした。その数をそれぞれ右上のボックスに示す。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精母細胞は、3個体、10、12、12精巣片から得られた。

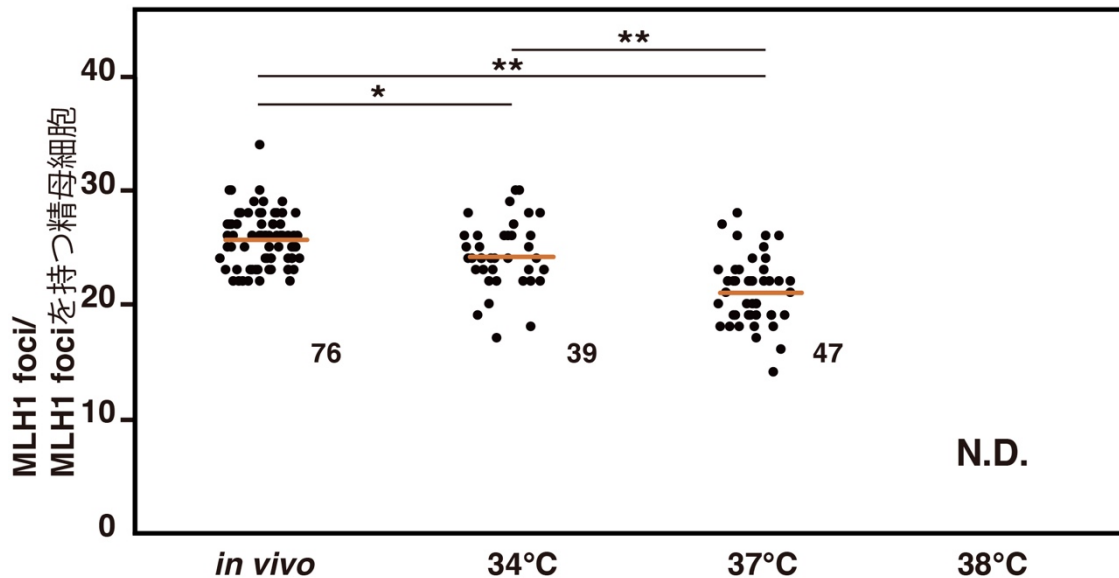


図43 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞MLH1 fociの定量

図42から得られた結果から、顕著なMLH1 fociを持つパキテン期の細胞におけるSCP3上に存在するMLH1 fociのカウントを行った。38°C条件の培養精巣からはパキテン期の精母細胞は観察されなかった。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣から、それぞれ76、39、47、0個カウントした。その数をそれぞれ右上のボックスに示す。バーは平均を、N.D.は検出なしを示す。*in vivo*精巣、34°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精母細胞は、3個体、10、12、12精巣片から得られた。Kruskal-Wallis testの結果は9.53E-13であった。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ (Steel-Dwass検定)のものを示す。

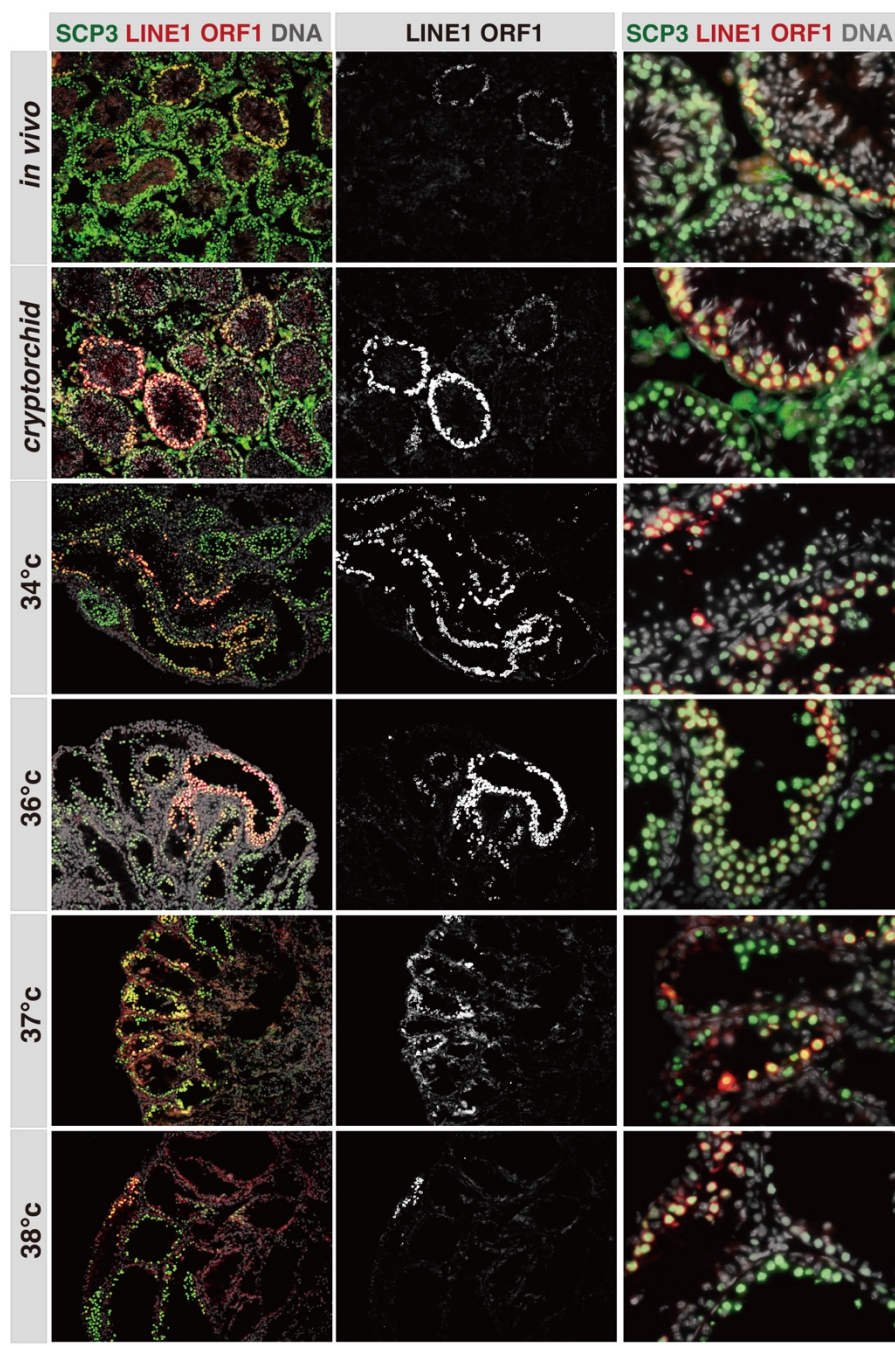


図44 *in vivo*精巣および培養精巣の精母細胞におけるLINE1ORF1タンパク質の発現

5週齢の *Acr-GFP* マウス精巣と処置後2日の人工停留精巣および34、36、37、38°C 条件下で5週間培養した *Acr-GFP* マウス精巣から得られた精母細胞の免疫染色を行った。SCP3、LINE1ORF1に対して免疫染色を行った。Hoechst33342を用いてDNAを対比染色した。いずれの場合においても SCP3陽性細胞で LINE1ORF1陽性細胞が見られた。スケールバーは10 μ mを示す。

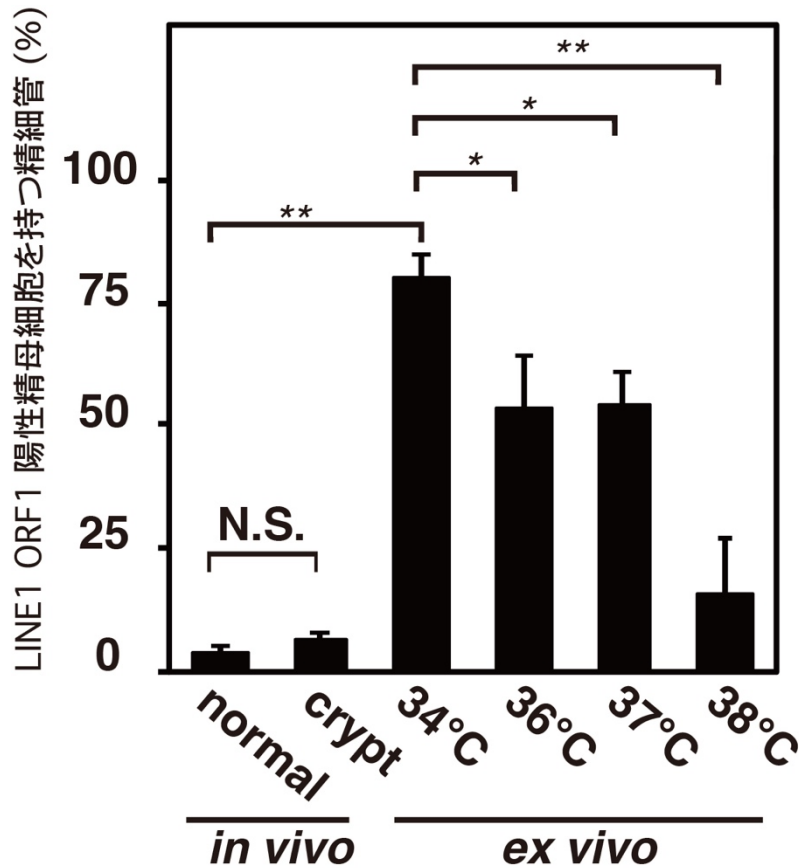


図45 LINE1ORF1陽性細胞を含む精細管の定量

図44から得られた結果から、SCP3細胞を持つ精細管中のLINE1ORF1陽性細胞を含む精細管をカウントした。平均と標準誤差を示す。*in vivo*と比較して、培養精巣ではLINE1ORF1陽性細胞を含む精細管は増加した。しかし、培養精巣において、温度の上昇に伴ってLINE1ORF1陽性細胞を含む精細管は減少した。*in vivo*精巣、処置後2日の人工停留精巣、34°C、36°C、37°C、38°C条件で5週間培養した精巣片のサンプル数は、5個体、5個体、5、5、6、4精巣片であった。*は $p < 0.05$ 、**は $p < 0.01$ (Student's *t*検定)のものを示す。

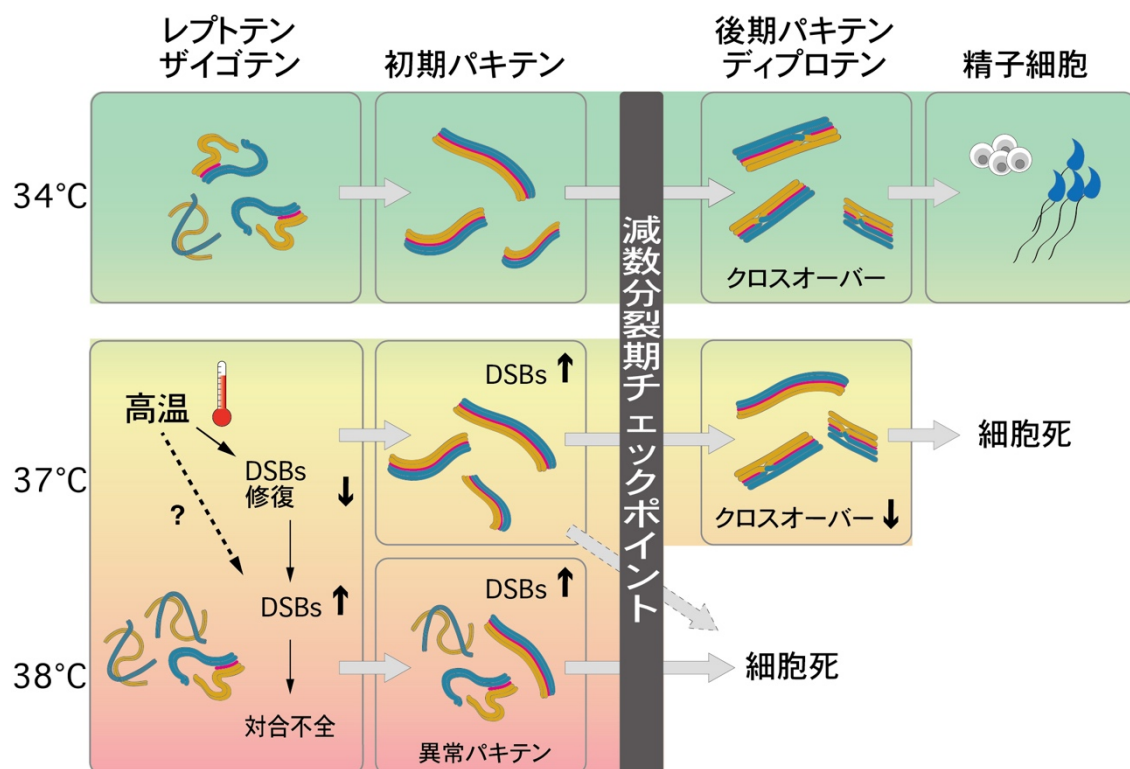


図 46 高温環境がマウス減数分裂に与える影響の総括

34°C環境では、減数分裂を完了し、精子細胞が生成される。高温環境（37°Cもしくは38°C）では、DSB修復機構が障害を受けることでDSBsが増加し、結果的に対合不全を引き起こす。また、高温環境が新規のDSBsを引き起こす可能性も考えられる。高温環境による障害の程度は細胞によって異なり、重度なものは asynapsed pachytene の状態（対合不全）となる。減数分裂期チェックポイントは高温によって障害が生じた細胞の未修復のDSBsおよび対合不全を監視し、アポトーシスによって閾値を超えた細胞を取り除く（37°Cにおける一部の初期パキテン期の細胞も排除される可能性が存在する）。閾値以下の細胞は減数分裂期のチェックポイントを通過し、後期のパキテン期へと進行する。38°Cでは全ての細胞が減数分裂期のチェックポイントによって取り除かれる。37°Cでは一部の細胞が後期のパキテン期に移行するものの、クロスオーバー（乗換え）形成に障害を生じるため、減数分裂を完了することなく細胞は排除される。

II. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方々にお世話になりました。ここに深く感謝の意を評します。

研究活動から日々の生活までを、暖かく熱心なご指導を賜りました吉田松生博士に心からお礼申し上げます。研究を遂行する面白さ、難しさ、葛藤などを常に真っ直ぐ向き合って教えていただきました。

本研究を始めるにあたり、大学院での生活や研究の進め方を親切に教えていただいた野波祐太さんに心から感謝申し上げます。

また、貴重なご教授を賜りました基礎生物学研究所 長谷部光泰博士、同研究所 木下典行博士、同研究所 山下朗博士、東京農工大学 新村毅博士に深く御礼申し上げます。

器官培養にあたっては横浜市立大学 小川毅彦博士ならびに佐藤卓也博士、減数分裂の細胞観察の実験には熊本大学 石黒啓一郎博士、同大学 高田幸博士、九州大学 林克彦博士ご協力のもと行いました。右も左もわからない私を快く受け入れて頂き、貴重な資源やお時間を頂きまして誠にありがとうございました。

Anti-LINE1ORF1 antibody を譲与してくださった Edinburgh 大学 Donal O'carroll 博士、*Acr-GFP* トランスジェニックマウスを譲与してくださった大阪大学 岡部勝博士、同大学 伊川正人博士、理化学研究所バイオリソースセンター実験動物開発室の方々、論文投稿にあたり御校閲頂きました Cambridge 大学 Benjamin D Simons 博士に深く御礼申し上げます。

そして、吉田研究室の方々には、研究に対する御助言やご指摘、充実した実験環境を整えていただき、感謝いたします。

本研究遂行のために犠牲になりました、多くのマウス、ウズラたちに心より感謝と哀

悼の意を表します。

最後に、博士に進学する機会を与えてくださり、その上いつも見守り続けてくれた家族に深く感謝いたします。本当にありがとうございました

III. 参考文献

- Absalan, F., M. Movahedin, and S.J. Mowla. 2008. Assessment of testis histological changes and sperm parameters in experimentally induced unilateral and bilateral cryptorchid mouse model. *Iran. J. Reprod. Med.* 6:143-148.
- Ashley, T., A.W. Plug, J. Xu, A.J. Solari, G. Reddy, E.I. Golub, and D.C. Ward. 1995. Dynamic changes in Rad51 distribution on chromatin during meiosis in male and female vertebrates. *Chromosoma*. 104:19-28.
- Barau, J., A. Teissandier, N. Zamudio, S. Roy, V. Nalesso, Y. Herault, F. Guillou, and D. Bourc'h. 2016. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. *Science*. 354:909-912.
- Barlow, A.L., F. Benson, S. West, and M. Hulten. 1997. Distribution of the RAD51 recombinase in human and mouse spermatocytes. *EMBO J.* 16:5207-5215.
- Baudat, F., and B. de Massy. 2007. Regulating double-stranded DNA break repair towards crossover or non-crossover during mammalian meiosis. *Chromosome Res.* 15:565-577.
- Bellani, M.A., P.J. Romanienko, D.A. Cairatti, and R.D. Camerini-Otero. 2005. SPO11 is required for sex-body formation, and Spo11 heterozygosity rescues the prophase arrest of *Atm*^{-/-} spermatocytes. *J. Cell Sci.* 118:3233-3245.
- Bhalla, N., and A.F. Dernburg. 2005. A conserved checkpoint monitors meiotic chromosome synapsis in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 310:1683-1686.
- Bianchi, E., K. Boekelheide, M. Sigman, S.J. Hall, and K. Hwang. 2017. Ghrelin modulates testicular damage in a cryptorchid mouse model. *PLOS ONE*. 12:e0177995.
- Bolcun-Filas, E., V.D. Rinaldi, M.E. White, and J.C. Schimenti. 2014. Reversal of female infertility by Chk2 ablation reveals the oocyte DNA damage checkpoint pathway. *Science*. 343:533-536.
- Burgoyne, P.S., S.K. Mahadevaiah, and J.M. Turner. 2009. The consequences of asynapsis for

- mammalian meiosis. *Nat. Rev. Genet.* 10:207-216.
- Buss, I.O., and A. Wallner. 1965. Body Temperature of the African Elephant. *J. Mammal.* 46:104-107.
- Cahoon, C.K., and R.S. Hawley. 2016. Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23:369-377.
- Cahoon, C.K., and D.E. Libuda. 2019. Leagues of their own: sexually dimorphic features of meiotic prophase I. *Chromosoma.* 128:199-214.
- Chuma, S., and T. Nakano. 2013. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philos. Trans. R. Soc. B, Biol. Sci.* 368:20110338-20110338.
- Cloud, V., Y.L. Chan, J. Grubb, B. Budke, and D.K. Bishop. 2012. Rad51 is an accessory factor for Dmc1-mediated joint molecule formation during meiosis. *Science.* 337:1222-1225.
- Cobellis, G., C. Noviello, F. Nino, M. Romano, F. Mariscoli, A. Martino, P. Parmeggiani, and A. Papparella. 2014. Spermatogenesis and cryptorchidism. *Front. Endocrinol.* 5:63-63.
- Comhaire, F., and A. Vermeulen. 1974. Varicocele sterility: cortisol and catecholamines. *Fertil. Steril.* 25:88-95.
- Comish, P.B., L.Y. Liang, Y. Yamauchi, C.C. Weng, G. Shetty, K.A. Naff, M.A. Ward, and M.L. Meistrich. 2015. Increasing testicular temperature by exposure to elevated ambient temperatures restores spermatogenesis in adult Utp14b (jsd) mutant (jsd) mice. *Andrology.* 3:376-384.
- Crichton, J.H., C.J. Playfoot, M. MacLennan, D. Read, H.J. Cooke, and I.R. Adams. 2017. Tex19.1 promotes Spo11-dependent meiotic recombination in mouse spermatocytes. *PLoS Genet.* 13:e1006904.
- Daniel, K., J. Lange, K. Hached, J. Fu, K. Anastassiadis, I. Roig, H.J. Cooke, A.F. Stewart, K. Wassmann, M. Jasin, S. Keeney, and A. Tóth. 2011. Meiotic homologue alignment and its quality surveillance are controlled by mouse HORMAD1. *Nat. Cell Biol.* 13:599-610.

- De Fazio, S., N. Bartonicek, M. Di Giacomo, C. Abreu-Goodger, A. Sankar, C. Funaya, C. Antony, P.N. Moreira, A.J. Enright, and D. O'Carroll. 2011. The endonuclease activity of Mili fuels piRNA amplification that silences LINE1 elements. *Nature*. 480:259-263.
- Di Giacomo, M., S. Comazzetto, H. Saini, S. De Fazio, C. Carrieri, M. Morgan, L. Vasiliauskaite, V. Benes, A.J. Enright, and D. O'Carroll. 2013. Multiple epigenetic mechanisms and the piRNA pathway enforce LINE1 silencing during adult spermatogenesis. *Mol. Cell*. 50:601-608.
- Di Giacomo, M., S. Comazzetto, S.C. Sampath, S.C. Sampath, and D. O'Carroll. 2014. G9a co-suppresses LINE1 elements in spermatogonia. *Epigenetics Chromatin*. 7:24.
- Durairajanayagam, D., A. Agarwal, and C. Ong. 2015. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress. *Reprod. Biomed. Online*. 30:14-27.
- Einer-Jensen, N., and R. Hunter. 2005. Counter-current transfer in reproductive biology. *Reproduction*. 129:9-18.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol*. 35:495-516.
- Frankenhuis, M.T., and C.J. Wensing. 1979. Induction of spermatogenesis in the naturally cryptorchid pig. *Fertil. Steril*. 31:428-433.
- Hara, K., T. Nakagawa, H. Enomoto, M. Suzuki, M. Yamamoto, B.D. Simons, and S. Yoshida. 2014. Mouse spermatogenic stem cells continually interconvert between equipotent singly isolated and syncytial states. *Cell Stem Cell*. 14:658-672.
- Hikabe, O., N. Hamazaki, G. Nagamatsu, Y. Obata, Y. Hirao, N. Hamada, S. Shimamoto, T. Imamura, K. Nakashima, M. Saitou, and K. Hayashi. 2016. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*. 539:299-303.
- Houston, B.J., B. Nixon, J.H. Martin, G.N. De Iuliis, N.A. Trigg, E.G. Bromfield, K.E. McEwan, and R.J. Aitken. 2018. Heat exposure induces oxidative stress and DNA damage in the male germ line. *Biol. Reprod*. 98:593-606.
- Hunter, N., and R.H. Borts. 1997. Mlh1 is unique among mismatch repair proteins in its ability to

- promote crossing-over during meiosis. *Genes Dev.* 11:1573-1582.
- Ishiguro, K., J. Kim, H. Shibuya, A. Hernandez-Hernandez, A. Suzuki, T. Fukagawa, G. Shioi, H. Kiyonari, X.C. Li, J. Schimenti, C. Hoog, and Y. Watanabe. 2014. Meiosis-specific cohesin mediates homolog recognition in mouse spermatocytes. *Genes Dev.* 28:594-607.
- Ito, K., K. Tanemura, H. Gotoh, M. Kurohmaru, and Y. Hayashi. 1997. Apoptosis-Like Cell Death in Experimentally-Induced Cryptorchidism in Adult Mice. *Journal of Veterinary Medical Science.* 59:353-359.
- Karpe, B., L. Ploen, L. Hagenas, and E.M. Ritzen. 1981. Recovery of testicular functions after surgical treatment of experimental cryptorchidism in the rat. *Int. J. Androl.* 4:145-160.
- Kazusa, K., Y. Namiki, A. Asano, Y. Kon, D. Endoh, and T. Agui. 2004. Differences in spermatogenesis in cryptorchid testes among various strains of mice. *Comp. Med.* 54:179-184.
- Kim, B., K. Park, and K. Rhee. 2013. Heat stress response of male germ cells. *Cell Mol. Life Sci.* 70:2623-2636.
- Kogo, H., M. Tsutsumi, T. Ohye, H. Inagaki, T. Abe, and H. Kurahashi. 2012. HORMAD1-dependent checkpoint/surveillance mechanism eliminates asynaptic oocytes. *Genes Cells.* 17:439-454.
- Kojima, K., H. Nakamura, M. Komeya, H. Yamanaka, Y. Makino, Y. Okada, H. Akiyama, N. Torikai, T. Sato, T. Fujii, H. Kimura, and T. Ogawa. 2018. Neonatal testis growth recreated in vitro by two-dimensional organ spreading. *Biotechnol. Bioeng.* 115:3030-3041.
- Kolas, N.K., A. Svetlanov, M.L. Lenzi, F.P. Macaluso, S.M. Lipkin, R.M. Liskay, J. Greally, W. Edelmann, and P.E. Cohen. 2005. Localization of MMR proteins on meiotic chromosomes in mice indicates distinct functions during prophase I. *J. Cell Biol.* 171:447-458.
- Kurhanewicz, N., D. Dinwiddie, Z. Bush, and D. Libuda. 2020. Elevated Temperatures Cause Transposon-Associated DNA Damage in *C. elegans* Spermatocytes. *Curr. Biol.* 30.
- Kurzbauer, M.T., C. Uanschou, D. Chen, and P. Schlögelhofer. 2012. The recombinases DMC1

- and RAD51 are functionally and spatially separated during meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell*. 24:2058-2070.
- Kyronlahti, A., R. Euler, M. Bielinska, E.L. Schoeller, K.H. Moley, J. Toppari, M. Heikinheimo, and D.B. Wilson. 2011. GATA4 regulates Sertoli cell function and fertility in adult male mice. *Mol. Cell Endocrinol.* 333:85-95.
- Li, X.C., B.C. Barringer, and D.A. Barbash. 2009. The pachytene checkpoint and its relationship to evolutionary patterns of polyploidization and hybrid sterility. *Heredity (Edinb)*. 102:24-30.
- Lue, Y.H., A.P. Hikim, R.S. Swerdloff, P. Im, K.S. Taing, T. Bui, A. Leung, and C. Wang. 1999. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*. 140:1709-1717.
- Mahadevaiah, S.K., J.M. Turner, F. Baudat, E.P. Rogakou, P. de Boer, J. Blanco-Rodriguez, M. Jasin, S. Keeney, W.M. Bonner, and P.S. Burgoyne. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27:271-276.
- Makela, J.A., J.J. Koskenniemi, H.E. Virtanen, and J. Toppari. 2019. Testis Development. *Endocr. Rev.* 40:857-905.
- Meng, X., M. Lindahl, M.E. Hyvonen, M. Parvinen, D.G. de Rooij, M.W. Hess, A. Raatikainen-Ahokas, K. Sainio, H. Rauvala, M. Lakso, J.G. Pichel, H. Westphal, M. Saarma, and H. Sariola. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*. 287:1489-1493.
- Meuwissen, R.L., H.H. Offenberg, A.J. Dietrich, A. Riesewijk, M. van Iersel, and C. Heyting. 1992. A coiled-coil related protein specific for synapsed regions of meiotic prophase chromosomes. *EMBO J.* 11:5091-5100.
- Mieusset, R., and L. Bujan. 1995. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int. J. Androl.* 18:169-184.
- Miura, M., I. Sasagawa, Y. Suzuki, T. Nakada, and J. Fujii. 2002. Apoptosis and expression of apoptosis-related genes in the mouse testis following heat exposure. *Fertil. Steril.* 77:787-793.

- Moens, P.B., D.J. Chen, Z. Shen, N. Kolas, M. Tarsounas, H.H. Heng, and B. Spyropoulos. 1997. Rad51 immunocytology in rat and mouse spermatocytes and oocytes. *Chromosoma*. 106:207-215.
- Moore, C.R. 1924. The scrotum as a temperature regulator for the testis. *Am. J. Physiol.* 68:70-79.
- Morelli, M.A., and P.E. Cohen. 2005. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction*. 130:761-781.
- Morohaku, K., R. Tanimoto, K. Sasaki, R. Kawahara-Miki, T. Kono, K. Hayashi, Y. Hirao, and Y. Obata. 2016. Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 113:9021-9026.
- Nagaoka, S.I., T.J. Hassold, and P.A. Hunt. 2012. Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.* 13:493-504.
- Nagaoka, S.I., C.A. Hodges, D.F. Albertini, and P.A. Hunt. 2011. Oocyte-specific differences in cell-cycle control create an innate susceptibility to meiotic errors. *Curr. Biol.* 21:651-657.
- Nakagawa, T., M. Sharma, Y. Nabeshima, R.E. Braun, and S. Yoshida. 2010. Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science*. 328:62-67.
- Nakanishi, T., M. Ikawa, S. Yamada, M. Parvinen, T. Baba, Y. Nishimune, and M. Okabe. 1999. Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett.* 449:277-283.
- Nishimune, Y., and S. Aizawa. 1978. Temperature sensitivity of DNA synthesis in mouse testicular germ cells in vitro. *Exp. Cell Res.* 113:403-408.
- Nishimune, Y., S. Aizawa, and T. Komatsu. 1978. Testicular Germ Cell Differentiation in Vivo. *Fertil. Steril.* 29:95-102.
- Nishimune, Y., T. Haneji, and S. Aizawa. 1981. Testicular DNA synthesis in vivo: changes in DNA synthetic activity following artificial cryptorchidism and its surgical reversal. *Fertil. Steril.*

35:359-362.

- Ollinger, R., A.J. Childs, H.M. Burgess, R.M. Speed, P.R. Lundegaard, N. Reynolds, N.K. Gray, H.J. Cooke, and I.R. Adams. 2008. Deletion of the pluripotency-associated *Tex19.1* gene causes activation of endogenous retroviruses and defective spermatogenesis in mice. *PLoS Genet.* 4:e1000199.
- Page, S.L., and R.S. Hawley. 2004. The genetics and molecular biology of the synaptonemal complex. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:525-558.
- Pauli, J.N., M.Z. Peery, E.D. Fountain, and W.H. Karasov. 2016. Arboreal Folivores Limit Their Energetic Output, All the Way to Slothfulness. *Am. Nat.* 188:196-204.
- Peters, A.H., A.W. Plug, M.J. van Vugt, and P. de Boer. 1997. A drying-down technique for the spreading of mammalian meiocytes from the male and female germline. *Chromosome Res.* 5:66-68.
- Pittman, D.L., J. Cobb, K.J. Schimenti, L.A. Wilson, D.M. Cooper, E. Brignull, M.A. Handel, and J.C. Schimenti. 1998. Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for *Dmc1*, a germline-specific RecA homolog. *Mol. Cell.* 1:697-705.
- Ribeiro, J., E. Abby, G. Livera, and E. Martini. 2016. RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma.* 125:265-276.
- Rinaldi, V.D., E. Bolcun-Filas, H. Kogo, H. Kurahashi, and J.C. Schimenti. 2017. The DNA Damage Checkpoint Eliminates Mouse Oocytes with Chromosome Synapsis Failure. *Mol. Cell.* 67:1026-1036.e1022.
- Robert, T., A. Nore, C. Brun, C. Maffre, B. Crimi, H.M. Bourbon, and B. de Massy. 2016. The TopoVIB-Like protein family is required for meiotic DNA double-strand break formation. *Science.* 351:943-949.
- Rodprasert, W., H.E. Virtanen, J.A. Makela, and J. Toppari. 2019. Hypogonadism and Cryptorchidism. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 10:906.
- Roeder, G.S., and J.M. Bailis. 2000. The pachytene checkpoint. *Trends Genet.* 16:395-403.

- Rommel, S.A., D.A. Pabst, W.A. McLellan, T.M. Williams, and W.A. Friedl. 1994. Temperature regulation of the testes of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): evidence from colonic temperatures. *J. Comp. Physiol. B.* 164:130-134.
- Royo, H., H. Prosser, Y. Ruzankina, S.K. Mahadevaiah, J.M. Cloutier, M. Baumann, T. Fukuda, C. Höög, A. Tóth, D.G. de Rooij, A. Bradley, E.J. Brown, and J.M. Turner. 2013. ATR acts stage specifically to regulate multiple aspects of mammalian meiotic silencing. *Genes Dev.* 27:1484-1494.
- Russell, L.D., R.A. Ettlin, A.P.S. Hikim, and E.D. Clegg. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press.
- Sato, T., K. Katagiri, A. Gohbara, K. Inoue, N. Ogonuki, A. Ogura, Y. Kubota, and T. Ogawa. 2011. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature.* 471:504-507.
- Sato, T., K. Katagiri, Y. Kubota, and T. Ogawa. 2013. In vitro sperm production from mouse spermatogonial stem cell lines using an organ culture method. *Nat. Protoc.* 8:2098-2104.
- Saxe, J.P., M. Chen, H. Zhao, and H. Lin. 2013. Tdrkh is essential for spermatogenesis and participates in primary piRNA biogenesis in the germline. *EMBO J.* 32:1869-1885.
- Schrans-Stassen, B.H., H.J. van de Kant, D.G. de Rooij, and A.M. van Pelt. 1999. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology.* 140:5894-5900.
- Sharan, S.K., A. Pyle, V. Coppola, J. Babus, S. Swaminathan, J. Benedict, D. Swing, B.K. Martin, L. Tessarollo, J.P. Evans, J.A. Flaws, and M.A. Handel. 2004. BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development.* 131:131-142.
- Shinohara, A., and M. Shinohara. 2004. Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination. *Cytogenet. Genome Res.* 107:201-207.
- Sugimoto, R., Y. Nabeshima, and S. Yoshida. 2012. Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mech. Dev.* 128:610-624.

- Takemoto, K., N. Tani, Y. Takada-Horisawa, S. Fujimura, N. Tanno, M. Yamane, K. Okamura, M. Sugimoto, K. Araki, and K.I. Ishiguro. 2020. Meiosis-Specific C19orf57/4930432K21Rik/BRME1 Modulates Localization of RAD51 and DMC1 to DSBs in Mouse Meiotic Recombination. *Cell Rep.* 31:107686.
- Tanaka, S.S., Y. Toyooka, R. Akasu, Y. Katoh-Fukui, Y. Nakahara, R. Suzuki, M. Yokoyama, and T. Noce. 2000. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14:841-853.
- Werdelin, L., and A. Nilsson. 1999. The evolution of the scrotum and testicular descent in mammals: a phylogenetic view. *J. Theor. Biol.* 196:61-72.
- Wojtasz, L., K. Daniel, I. Roig, E. Bolcun-Filas, H. Xu, V. Boonsanay, C.R. Eckmann, H.J. Cooke, M. Jasin, S. Keeney, M.J. McKay, and A. Toth. 2009. Mouse HORMAD1 and HORMAD2, two conserved meiotic chromosomal proteins, are depleted from synapsed chromosome axes with the help of TRIP13 AAA-ATPase. *PLoS Genet.* 5:e1000702.
- Wold, M.S. 1997. REPLICATION PROTEIN A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66:61-92.
- Yoshida, K., G. Kondoh, Y. Matsuda, T. Habu, Y. Nishimune, and T. Morita. 1998. The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol. Cell.* 1:707-718.
- Yoshida, S. 2016. From cyst to tubule: innovations in vertebrate spermatogenesis. *Wiley interdisciplinary reviews. Devel. Biol.* 5:119-131.
- Yoshinaga, K., S. Nishikawa, M. Ogawa, S. Hayashi, T. Kunisada, T. Fujimoto, and S. Nishikawa. 1991. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development.* 113:689-699.
- Yuan, L., J.G. Liu, J. Zhao, E. Brundell, B. Daneholt, and C. Hoog. 2000. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol. Cell.* 5:73-83.

- Zhang, J., Y. Fujiwara, S. Yamamoto, and H. Shibuya. 2019. A meiosis-specific BRCA2 binding protein recruits recombinases to DNA double-strand breaks to ensure homologous recombination. *Nat. Commun.* 10:722.
- Zhang, J., M. Gurusaran, Y. Fujiwara, K. Zhang, M. Echbarthi, E. Vorontsov, R. Guo, D.F. Pendlebury, I. Alam, G. Livera, M. Emmanuelle, P.J. Wang, J. Nandakumar, O.R. Davies, and H. Shibuya. 2020. The BRCA2-MEILB2-BRME1 complex governs meiotic recombination and impairs the mitotic BRCA2-RAD51 function in cancer cells. *Nat. Commun.* 11:2055.