

論 文 要 旨

Bmi1 expression in long-term germ stem cells

(長期生殖幹細胞における Bmi1 の発現)

関西医科大学腎泌尿器外科学講座

(指導：松田 公志 教授)

駒井 資弘

【はじめに】

生殖細胞は遺伝情報を伝達する重要な細胞である。マウスの精子形成は精巣内の精細管で起こり、ごく少数の細胞が幹細胞（精子形成幹細胞）として機能することは明らかであるが、未だ不明な点が多い。精子形成幹細胞の解明は、再生医療や不妊治療に繋がる可能性があり、マウス精巣における精子形成幹細胞の同定は重要であると考えられた。

【研究方法】

精子形成幹細胞を解析する為に、他臓器で報告されている種々の幹細胞マーカー遺伝子の CreER ノックインマウスにおいて、多色細胞系譜追跡法(レポーターマウスにレインボーマウス : Rosa26^{rbw/+} を使用)を用いて生殖細胞の clonality 解析を試みた。

【結果】

精子形成幹細胞を同定するために、shh, Lgr5, Lgr6 遺伝子に CreERT2 をノックインしたマウスを用いた遺伝子特異的な解析を行ったが生殖細胞の標識は認められなかった。しかし、Bmi1^{creER/+} mice ; Rosa26^{Rbw/+} mice にタモキシフェンを投与したところ生殖細胞の標識が認められたため、Bmi1 由来細胞の命運追跡を行った。タモキシフェン投与 2 日後の initial labeled cell は主に 1 個の細胞 (A_{single cell}) であった。これらの細胞は時間の経過と共に分化し、48 週後にも Bmi1 由来細胞は分化細胞を供給し続けていたため、長期幹細胞である事が証明された。しかし、抗 Bmi1 抗体を用いた免疫組織染色では、精子形成幹細胞を含む未分化型精原細胞以外に分化した細胞 (分化型精原細胞や精母細胞) にも Bmi1 が発現していると報告されている。Cre/loxP システムには閾値が存在すると考えられているため、これらの細胞間で Bmi1 遺伝子の発現量が異なる可能性が示唆された。そこで Bmi1^{GFP/+} mice 精巣から生殖細胞を採取し FACS 解析したところ、Bmi1 遺伝子の発現が多い Bmi1 強陽性細胞と発現量の少ない Bmi1 弱陽性細胞が存在した。これらの異なる細胞群において qPCR を用いて生殖細胞の種々の遺伝子発現を解析したところ、精子形成幹細胞マーカーの可能性のある GFR α 1、ID4、Nanos2 は Bmi1 強陽性細胞群に多く発現していた。また、免疫組織染色を施行したところ、Bmi1 由来 initial labeled cell に GFR α 1 が発現していた。以上より、今回我々が命運追跡にて解析した細胞は Bmi1 強陽性細胞と考えられ、Bmi1 強陽性細胞に精子形成幹細胞が含まれていると考えられた。

次に、5Gy の放射線傷害後修復過程における Bmi1 強陽性細胞動態について解析したところ、定常状態よりも早く Bmi1 強陽性細胞から生殖細胞が供給された。これより Bmi1 強陽性細胞は放射線抵抗性であり、生殖細胞の維持・再生に重要な役割を果たすと考えられた。

マウスの精子形成は 12 の stage (精上皮 stage) で規則正しく周期しており、効率よく精子を供給している。この事から精子形成幹細胞も特定の精上皮 stage で増加していると考え、Bmi1 強陽性細胞と精上皮 stage の関係を調べた。その結果、Bmi1 強陽性細胞は特定の精上皮 stage (IV~VII) で有意に増加し、続けて細胞周期に入った後に自己複製するか分化細胞を供給していた。以上より、Bmi1

強陽性細胞は精上皮 stage と関連して増加し、長期幹細胞として機能していると考えられた。

【考察】

我々は生殖細胞を維持し傷害時の修復に関わる **Bmi1** 強陽性幹細胞を同定した。今まで精子形成幹細胞と精上皮 stage との関連性は不明であったが、今回の研究で我々がこの関連性を示唆した。今後、さらなる **Bmi1** 強陽性細胞の動態解明が、精子形成幹細胞の解明に繋がると考えている。