

論文内容要旨

論文題目 SOD1 ノックアウトマウスにおける精子形成細胞障害の熱ストレスによる促進

責任講座： 代謝再生統御学講座 腎泌尿器外科分野

氏名：石井達矢

【内容要旨】

【目的】哺乳類の精巣は陰嚢内に位置し、体温より数度低く保たれている。精子形成にはこのような低温環境が必要なことに由来するが、理由は明確になっていない。先天的に精巣が陰嚢内に下降せず腹腔内に留まる停留精巣においては精子形成障害が起ることから、体温でさえも熱ストレスとなると考えられる。しかしその細胞障害機構については不明な点が多い。精巣が熱ストレスを受けることで代謝が亢進し、それに伴い増加した活性酸素種が精子形成細胞を障害する可能性を考えた。本研究では酸素分子が一電子還元を受けて最初に生じる superoxide に着目してその関与について以下の検討を行った。

【方法】(1) 活性酸素種からの保護に働く抗酸化酵素が存在するが、Superoxide dismutase (SOD) は superoxide を消去する酵素で、3つのアイソザイムが存在する。そのアイソザイムの1つで、細胞質に存在する CuZnSOD をコードする遺伝子 SOD1 を欠損するマウスと野生型マウスを用いて精巣を腹腔内に留める手術を施した停留精巣モデルマウスを作製し、組織学的ならびに生化学的解析を行った。(2) 両マウス精巣より精子形成細胞を単離し、初代培養細胞を用いてその温度感受性を比較した。(3) ラット精巣より精子形成細胞とセルトリ細胞を初代培養し、活性酸素ならびに熱に対する感受性を比較検討した。

【結果と考察】(1) 停留精巣手術後 2, 4, 7, 14 日目の精巣切片を作成し、HE 染色により組織障害を、また TUNEL 染色により DNA が断片化された細胞数を比較したところ、DNA 断片化を伴う精子形成細胞の障害が SOD1 欠損マウスでは野生型マウスよりも早期に現れた。この時、MnSOD, Prx1 といった CuZnSOD 以外の抗酸化酵素の発現量に違いはなく、この結果は SOD1 欠損に起因すると考えられる。(2) 単離した精子形成細胞を 32.5 度と 37 度で培養した結果、SOD1 欠損マウス由来の細胞では細胞死が早期に起り、熱に対する感受性が高いことが分かった。(3) 精子形成細胞とセルトリ細胞の培地に Xanthine oxidase とその基質を加えて生成される superoxide の影響を調べたところ、セルトリ細胞には影響のない程度の量によって精子形成細胞で Cytochrome c の細胞質への流出を起こした。この結果は、熱ストレスを受けた精巣では精子形成細胞が選択的に障害されることに一致している。さらに、熱付加によっても Cytochrome c の流出が起り、それは superoxide 消去剤である Tiron によって抑制された。

熱ストレスを受けた細胞では代謝が亢進する結果、活性酸素種の生成が増すと考えられるが、精子形成細胞は活性酸素種に対して感受性が高いためにセルトリ細胞に比べて障害されやすいと考えられる。代謝とそれに由来する活性酸素の生成を抑えることが、精巣を低温状態に維持する理由の一つである可能性が示唆された。

平成 17 年 / 月 27 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 腎泌尿器外科分野 石井達矢

論文題目： Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress.
(SOD1 ノックアウトマウスにおける精子形成細胞障害の熱ストレスによる促進)

審査委員：主審査委員

倉智博久 (印)

副審査委員

木村 理 (印)

副審査委員

内藤 輝 (印)

審査終了日：平成 17 年 / 月 21 日

【 論文審査結果要旨 】

本論文では、SOD1-KO マウスを用いて、対照の wild type (WT) マウスとの比較で以下の点を明らかとしている。

1. SOD1-KO マウスでは、WT マウスと比べ、より早期から停留精巣重量が有意に減少し、アポトーシス細胞数が増加する。
2. 培養中に、SOD1 ノックアウトマウスで、より大きな精子形成細胞の減少がみられ、WT マウスでは tiron によるリカバリーがみられる。
3. Xanthine oxidase による cytochrome c の細胞質内への移行が、32.5 度での培養で、spermatogenic cells ではみられたが、Sertoli cells ではみられず、spermatogenic cells がより酸化ストレスに感受性が高いと考えられた。
4. Spermatogenic cells では、42 度という熱ストレスによる cytochrome c の細胞質内への移行が観察されたが、これは tiron によって抑制された。

停留精巣における精子形成障害の分子機構を明らかにする目的で、酸化ストレスが精子形成障害の一因となっているという仮説のもとに、SOD1-KO マウスを用いて上記の結果を得た研究である。SOD1-KO マウスを用いて詳細な検討がなされた意欲的な仕事で十分に新しい知見も得られている。

審査の過程で、Major criticism として、「タイトルの「SOD1 ノックアウトマウスにおける精子形成細胞障害の熱ストレスによる促進」を強く支持するデータはどれか？」という問題点を指摘したところ、実験の追加をして、改めて妥当な実験結果が得られ、それに添って論文も修正されている。また、Minor criticism として、学位論文、論文内容要旨ともにいくつかの記述の不備が見られたが、これらも修正された。

よって、本論文は十分に博士号に資する研究であると思われる。 (1, 200 字以内)