

氏名	カミロヒヤ 中村 啓哉
本籍（国籍）	岩手県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 822 号
学位授与年月日	令和 4 年 3 月 2 3 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学位論文題目	マウス胎仔の精巣発達と雄性生殖細胞における遊走性 (Fetal testis development and migration of male germ cells in mouse)
学位審査委員	主査 岩手大学教授 松原 和衛 副査 岩手大学准教授 平田 統一 副査 山形大学教授 木村 直子 副査 弘前大学准教授 横山 仁

論文の内容の要旨

生殖細胞系列（Germ line）は、生命の連続性を担う細胞であり、生命情報のトランスポーターといえる。生殖細胞による世代を超えた遺伝情報の伝達は、減数分裂による多様なゲノムの変化を通じて、生命の広がり大きく貢献している。近年、生殖細胞系列が担う配偶子形成を生体外で再現する技術が確立され、医療分野のみならず、野生動物の遺伝子資源保存や有用家畜作出への応用が期待される。しかし、体外培養系による配偶子形成は、生体由来の体細胞や組織を必要としており、特に雄性生殖細胞系列では、複雑な精子形成プロセスの再構築が難しく、効率的な体外培養技術の確立には至っていない。精子形成は、生涯に渡って多量の配偶子を産生するにも関わらず、精巣にわずかに存在する精原幹細胞によって維持されている。これらの細胞は精巣内を活発に遊走し、自己複製を行っていると考えられている。生殖細胞の遊走は、始原生殖細胞（PGCs）の生殖隆起への移動や前精原細胞（ゴノサイト）の精細管基底膜への接着など、雄性生殖細胞の発達において、重要なイベントと考えられるが、分化に伴う生殖細胞の遊走能力の変化については、知見が少ない。本研究では、胚性期の遊走能力の変化について、特に、始原生殖細胞から精原細胞への分化における遊走性の変化に着目し、以下の研究を行った。

はじめに、胎仔期雄性生殖細胞の遊走関連因子の発現変化を観察した。また、その結果に基づいて、GRに定着した生殖細胞遊走を *in vitro* で誘導する方法を検討した。PGCs から精原細胞までの雄性生殖細胞で見られる細胞遊走は、いずれの分化段階でも CXCR4/SDF-1 シグナルによって制御されている。したがって、本研究では、発達に伴う CXCR4 および SDF-1 発現量の経時変化を比較検討した。その結果、PGCs が GR に定着する E11.5 から、ゴノサイトへと分化する

E14.5 にかけて、遊走ガイドシグナル受容体の CXCR4 は発現量を上昇させ、その後、出生直後の P0 まで再び発現量が低下した。一方、CXCR4 のリガンドである SDF-1 の発現は E13.5 から増加し、それ以降も発現レベルを維持していた。PGCs は GR に定着すると遊走性を消失するという報告があるが、本実験の結果から、GR 定着以降も遊走シグナルへの感受性を維持している可能性が示唆された。このため、GR に定着した PGCs を利用して、*in vitro* で遊走を誘導する方法を検討した。GR 内の PGCs の遊走を捉えるため、単離した GR の器官培養を行い生殖細胞の遊走性を評価した。その結果、GR に定着した雄性 PGCs において、SDF-1 の添加による遊走誘導が可能であることを見出した。

次に、前述の結果から、GR に定着した PGCs が遊走性を失う生理的意義を精巣発達との関連から検討した。精巣索が形成されて間もない E14.5 頃、生殖細胞は精巣索内に高密度に存在しており、精細管の原型となる構造が形成された。その後、E16.5 頃までに精巣索断面積および直径は減少し、生殖細胞密度は急激に低下した。また、この時期の精巣索を走行方向と平行に薄切した組織では、生殖細胞間に間隙が生じていることが観察された。これらのことから、E16.5 から急激に精巣索が伸長すると考えられる。生殖細胞の増殖も、この推察を支持する結果となっており、E14.5 以降、生殖細胞において Ki67 の発現が見られず、細胞分裂を停止していると考えられる。細胞増殖が停止した状態で、生殖細胞密度の低下が見られることから、精巣索の伸長に伴って、生殖細胞が精巣索全体に均一に配置される可能性が示唆された。一方、生殖細胞自身が移動して距離が生じ、均一に配置される可能性も考えられたが、生殖細胞形態が変化せず、遊走関連タンパクの発現が見られないことから、この可能性は低いと考えられた。

上記の結果から、雄性生殖細胞の遊走能力は潜在的に維持されつつも、精巣発達において遊走性が発揮されないことで、効率的かつ均一な精巣の構築を実現していることが示唆された。しかし、マウスを始めとし、哺乳類の胎仔精巣内での細胞イメージングは困難である。このことから、雄性生殖細胞の遊走能力を生体内に近い環境で評価するため、ニワトリ胚への異種間移植法によるアッセイ系の確立を検討した。本研究では、グリーンマウス由来 PGCs およびゴノサイト、線維芽細胞、脾臓細胞をニワトリ胚血管に移植した。その結果、マウス由来ゴノサイトを含む精巣細胞がニワトリ胚の GR に移動することが確認された。さらに、生殖細胞と同様に、CXCR4 を発現するリンパ球を含む脾臓細胞をニワトリ胚に移植したところ、GR へ移動することが示された。一方、マウス PGCs および線維芽細胞の GR への移行は確認できなかった。したがって、ニワトリ GR への移動には CXCR4/SDF-1 シグナルが必要であり、生殖細胞に限らず GR に移行可能であると考えられる。また、マウス PGCs を含む GR 由来細胞は、ニワトリ胚の GR 内への移行が観察されなかったが、移植細胞数に占める PGCs の割合が低い可能性が考えられた。

本研究により、胚性期の雄性 PGCs が潜在的に遊走能力を維持していること、一方、精巣発達において生殖細胞の遊走停止が生殖細胞の均一な配置に寄与していることが示唆された。さらに、生殖細胞の遊走解析における異種間移植の

有用性が示された。

論文審査の結果の要旨

近年、配偶子形成を *in vitro* で再現する技術が確立され、有用家畜作出などへの応用が期待されている。しかし、体外培養系による精子形成は複雑なプロセスの再構築が難しく、効率的な体外培養技術の確立には至っていない。精子形成を支える分子基盤として、生殖細胞の遊走が挙げられる。生殖細胞の遊走は、始原生殖細胞 (PGCs) の生殖隆起 (GR) への移動や前精原細胞 (ゴノサイト) の精細管基底膜への接着、精原幹細胞のニッチへのホーミングなど、雄性生殖細胞の発達において重要である。しかし、分化に伴う生殖細胞の遊走能力の変化についての知見は少ない。本研究では、マウスの胚性期生殖細胞の遊走能力の変化について検討した。

胎仔期雄性生殖細胞の遊走関連遺伝子の発現変化を解析した結果、PGCsがGRに定着する胚齢11.5日以降も、遊走シグナル受容体CXCR4とリガンドであるSDF-1の発現レベルは維持されていた。PGCsはGRに定着すると遊走性を消失するが、本実験の結果から、GR定着以降も遊走シグナルに対する感受性を維持していることが示唆された。次に、GRに定着したPGCsが *in vitro* で遊走誘導可能かを検討した。GRの器官培養で、生殖細胞の遊走性を評価した結果、GRに定着したPGCsは、SDF-1添加によって遊走誘導が可能であることを見出した。また、GRに定住したPGCsが遊走を停止する生理的意義を精巣発達との関連から検討した。胚齢14.5日頃、生殖細胞は精巣索内に高密度に存在していたが、その後、胚齢16.5日までに生殖細胞密度は急激に低下し、生殖細胞間に間隙が生じている様子が観察された。したがって、胚齢16.5日から急激に精細管が伸長すると考えられる。さらに、胚齢14.5日以降、生殖細胞ではKi67の発現が見られず、細胞分裂は停止しており、生殖細胞密度の低下が見られた。したがって、精巣発達における増殖・遊走の停止が、効率的・均一な精巣の構築に寄与していることが示唆された。一方、雄性生殖細胞遊走の解析では、子宮内に存在する哺乳類胎仔精巣の細胞イメージングは困難である。そこで、雄性生殖細胞の遊走能力を生体内に近い環境で評価するため、ニワトリ胚へのマウス細胞移植によるアッセイ系の確立を検討した。グリーンマウス由来PGCsおよびゴノサイト、線維芽細胞、脾臓細胞をニワトリ胚血管に移植した結果、マウスゴノサイトおよびCXCR4を発現する脾臓細胞がGRへ移動することが観察された。したがって、ニワトリGRへの移動にはCXCR4/SDF-1シグナルが必要であり、生殖細胞に限らずCXCR4を発現する細胞はGRに移行可能と考えられる。

本研究により、胚性期の雄性 PGCs が潜在的に遊走能力を維持していること、精巣発達において生殖細胞の遊走停止により、生殖細胞の均一な配置に寄与していること、生殖細胞の遊走解析において異種間移植の有用性が示唆された。

よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士 (農学) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Hiroya Nakamura, Gaku Iwakawa, Kazuei Matsubara
Activation of migratory ability in male mouse primordial germ
cells by *in vitro* organ culture
Journal of Medical Sciences. Volume 22