

博士論文要約 (Summary)

2017年 4月入学

連合農学研究科 生物生産科学 専攻

氏名 中村 啓哉

タイトル	マウス胎仔の精巣発達と雄性生殖細胞における遊走性
<p>「序論」</p> <p>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である。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、生命の多様性に大きく貢献している。始原生殖細胞 (PGCs) は生殖細胞系列の最も未分化な状態として定義される。PGCs は、胚発生初期より体細胞系列から独立して出現し、個体の発達に伴って、性に依存した分化成熟過程を経る。古くから脊椎動物および無脊椎動物胚で研究されており、魚類、両生類、鳥類および、ヒトを含む哺乳類、尾索動物など多くの生物種で報告されている。</p> <p>マウス PGCs は、E7.5 に原条の後部、胚体外中胚葉の尿膜基部において、シグナル分子により特徴付けられ、体細胞化を抑制しながら、数十個の細胞からなるクラスターを形成する。その後、PGCs は特異的な遺伝子群の発現を獲得しながら、将来の生殖腺である生殖隆起 (GR) に向かって移動する。PGCs の GR への定着が完了した E12.5 には、PGCs は移動能力を失い、雄では精原細胞へ、雌では卵原細胞へと分化するため、性に依存した制御を受ける。これらの性分化制御は、将来の精巣・卵巣の支持細胞や間質細胞などの前駆体が担い、生殖細胞を配偶子形成へと導く。生殖細胞が分化を開始すると、未分化な PGCs が保持していた活発な遊走能力は消失するとされている。一方、ライブセルイメージングの発達に伴って、雄性生殖細胞系列では、分化後にも精巣内で遊走能力を発揮していることが明らかとなった。</p> <p>近年、生殖細胞系列が担う配偶子形成を <i>in vitro</i> 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ている。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、PGCs の GR への移動や前精原細胞 (Gonocytes) 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、マウスの胚性期の遊走能力の変化について、特に、PGCs から精原細胞への分化における遊走性の変化に着目し、研究を行った。</p> <p>「本論」</p> <p>本研究では、雄性生殖細胞の移動能力に着目し、分化に伴う遊走能力の変化や精巣発達との関連性の解析、生殖細胞遊走アッセイ法の開発を目指し、PGCs の定着から雄性生殖細胞への分化における遊走能力の変化を解析し、雄性生殖細胞発達時の組織構造の変化と細胞遊走の関連性を検討するとともに、鳥類-哺乳類の異種間移植をモデルとして、生</p>	

殖細胞の遊走評価法を検討した。

はじめに、胎仔期雄性生殖細胞の遊走関連遺伝子および減数分裂マーカー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の遊走を *in vitro* で誘導する方法を検討した。PGCsの運命決定や移動様式は、生物種によって多様性が見られるが、PGCsの移動制御機構には類似点が多い。発生段階の胚におけるPGCsのGRへの秩序的な移動は、PGCsの能動的な細胞運動、体細胞からの誘引シグナル、細胞間相互作用の三つによって実現される。多くの生物に共通するPGCsの誘引シグナルとして、間質細胞由来因子1 (SDF-1) とその受容体 C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) が報告されており、PGCsは誘引シグナルをガイドとしてGRに遊走する。また、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発現量の経時変化についても比較検討した。

その結果、PGCsがGRに定着するE11.5から、Gonocytes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は発現量が上昇し、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。また、SDF-1の第二の受容体である、CXCR7の発現変動を解析したところ、CXCR4と同様の発現変動が観察された。新生仔マウス精巣の解析から、精巣発達に伴うCXCR4およびCXCR7の発現変動は類似していることが報告されており、胎仔精巣においても同様の変動が見られることが示唆された。PGCsはGRに定着すると遊走性を消失するが、本研究の結果から、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可能性が示された。したがって、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に定着した雄性のPGCsは、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。これは、PGCsは遊走性を保持しているものの、GR組織の範囲内で、拡散することなく留まっていることを示唆している。一方、GRへ遊走中および定着後のPGCs/Gonocytesが発現するタンパク質を組織化学的に検索したところ、遊走期にはOct4やSSEA-1などの多能性維持に関わる分子の発現が見られた。また、E11.5以降、GRに定着したPGCsはMVHやSTRA8など、生殖細胞特異的タンパク質の発現により、生殖細胞としての特徴を強めた。GR定着以降の生殖細胞は、MT1-MMPやc-kitなどの遊走期特異的な分子の発現が消失していた。これらの分子はPGCsの遊走時に機能するが、精原細胞以降の遊走には関与しない可能性が考えられる。

前述の結果から、GR定着から間もない雄性生殖細胞の遊走能力は、活発な状態で維持されていることが示唆された。一方、その後の遊走性の変化や組織の発達との関連は不明であった。したがって、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。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。以上のことから、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。また、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、生殖細胞形態は変化せず、遊走関連マーカー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る。精巣内の精細管は、どの領域においても生殖細胞で満たされている。前述した結果から、生殖細胞の増殖が停止すること、さらに精細管が伸長することで、精子形成を支える基盤が作られていることを示唆している。精巣発達の早い時期に精細管が伸長し、生殖細胞が組織全体に均一に配置されることは、精子形成において、配偶子の多様性を均一に保つ上でも重要であると考えられる。本研究期間内では、実証には至らなかったが、胎仔期精巣における生殖細胞の配置と産生される精子のバリエーションについて、DNA バーコーディングやパルス標識によって細胞を追跡することで検証できると考えられる。

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ため、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。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、ニワトリ胚への異種間移植法によるアッセイ系の確立を検討した。

野生動物の遺伝子資源保存や有用家畜の産出などの観点から、PGCs や精原幹細胞の移植は、魚類や鳥類において盛んに行われており、効率的な生殖細胞系列の置換に成功している。しかし、マウスとニワトリのように進化的に大きく離れた異種間での生殖細胞の移植は行われていない。鳥類 PGCs の血管移行様式は、ユニークかつダイナミックでありながら、秩序的な PGCs の移動を実現している。血管に取り込まれた PGCs は、血管網に広く拡散した後、血流と形態形成運動によって運ばれ GR 近傍で捕捉される。この受動的な移動は、PGCs と同径のカジノキ花粉を胚血管に移植した実験によって検証されており、胚血管中の花粉粒子が GR 近傍に到達することから、血流を介した受動的な移動は、PGCs 特異的に起こる現象ではないと考えられている。鳥類と哺乳類の PGCs の移動経路は異なるため、その特殊な移動様式に異種の PGCs が適応可能かは未解明であった。一方、生殖細胞遊走様式の動物種間における差異や共通性を理解することで、生物種の垣根を超えた種の保存に寄与できる可能性がある。また、ニワトリ胚を利用した種々の細胞の遊走アッセイ法の確立や、発生工学技術への応用も考えられる。

はじめに、ニワトリ胚内の環境においてマウス生殖細胞が遊走可能かを検討するため、共通の遊走経路である腸間膜構造の比較を行なった。発生中の腸間膜組織は一般的な組織構造ではなく、腸管ループ形成に伴って後腸が左側に傾くことで、左右非対称な細胞構成の組織となる。ニワトリ胚を用いた研究では、腸間膜の左右では細胞密度や細胞間接着因子が異なることが報告されており、左側は細胞密度が高くタイトであり、右側は細胞密度が低くルーズな組織として区別される。この非対称な組織において、PGCs は細胞間隙が大きい右側のルーズな領域を遊走することが示唆されている。一方、マウス腸間膜組織の構造と PGCs の遊走の関連性を不明であった。本研究の結果、マウス胚の腸間膜構造が、ニワトリ胚と同様に非対称な組織構造であり、PGCs が腸間膜右側に偏って局在していることが観察された。このことから、血管内の循環というニワトリ特有の移動様式を除くと、マウスとニワトリの GR への遊走環境は非常に類似していると考えられた。

この結果を受け、マウス-ニワトリ間の異種間胚血管移植を行い、マウス生殖細胞がニワトリの胚内を移動し、GR に移行するか否かを検討した。グリーンマウス由来 PGCs および Gonocytes、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 Gonocytes 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 へ移動することが観察された。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 CXCR4 を発現するリンパ球なども 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ず、移植細胞数に占める PGCs の割合が低かった可能性が考えられた。

「結論」

以上より、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により、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。また、生殖細胞の遊走解析における異種間移植の有用性が推察された。

本研究から、マウス雄性生殖細胞の分化に伴う遊走能力の維持や、遊走が停止する意義の一端が明らかになりつつある。しかし、生殖細胞の遊走を詳細に検討するためには、胎仔精巣におけるライブイメージングが最も有効と考えられるが、母胎内に胚が存在する哺乳類においては、全胚培養技術の開発が待たれる。一方、精巣器官培養法の確立など生体内に依存しない観察方法や、本実験で実施したニワトリ胚移植による異種間生殖細胞遊走アッセイ法を利用することで、本研究から得られた結果を、検証することが可能である。特に、近年急速に発展した、2 光子顕微鏡を使用したタイムラプスイメージングにより、1 細胞レベルの動態を観察することで、より詳細な遊走細胞の解析が可能であると考えられる。また、異なる分化段階の生殖細胞や遊走中の生殖細胞のシングルセル解析により、遊走維持機構の分子メカニズムを明らかにすることで、複雑な精子形成の再現や生殖細胞移植の効率化など、医学や畜産分野に応用可能な知見が得られると期待される。

※注1 博士論文要約はインターネットの利用により公表されるので、記載内容については十分注意してください。

※注2 公表できない「やむを得ない事由」(特許、知的財産等に係る部分)は記載しないでください。

※注3 全体で4頁～5頁程度を目処にしてください。