

氏 名 中 馬 新 一 郎

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第404号

学位授与の日付 平成11年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究所 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 マウス胎仔生殖細胞の培養系における増殖・分化に関する研究

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 桂 勲
助 教 授 城石 俊彦
助 教 授 林 茂生
助 教 授 藤澤 敏孝
松居 靖久（大阪府立母子保健総合医療センター）

論文内容の要旨

マウス予定始原生殖細胞は原腸陥入期前後の未分化幹細胞の集団である胚盤葉上層において、胚体外外胚葉からの作用を受ける近位部領域内に存在する。発生運命の限定を受けたと考えられる始原生殖細胞(PGC)は胚体外中胚葉領域に出現し、予定生殖巣原基領域への移動と増殖を行う。PGCは多くの表面抗原や転写因子を初期全能性幹細胞と共有する一方、生殖系列細胞への系譜の限定、全能性の抑制を受けているものと考えられる。

PGCの培養下での液性増殖因子検索の過程で、LIF(leukemia inhibitory factor)およびbFGF(basic fibroblast growth factor)存在下で、初期未分化幹細胞と類似したEG(embryonic germ)細胞の出現が報告され、初期胚への移植による全能性が示された。LIFおよびFK(forskolin)またはRA(retinoic acid)存在下においても同様の細胞の出現が報告されたが、その分化能の検討は行われてこなかった。本研究ではFK、RA存在下でのEG細胞株を樹立し、再構成胎仔生殖巣との凝集片の成体生殖巣への移植を行った。その結果、体細胞組織からなる繊維芽細胞腫、奇形腫等が形成され、生殖細胞の分化は認められなかった。これは樹立されたEG細胞株が、その由来と考えられる生殖系列細胞よりも未分化な多能性幹細胞としての性質を示し、PGCから多能性幹細胞への脱分化もしくはその増殖がbFGF以外の増殖因子によっても起こる事を示す。

生殖巣原基である泌尿生殖隆起(UGR)へ到着したPGCは数回の体細胞分裂を行った後、雄においては前精原細胞として体細胞分裂期におけるG0停止、雌においては卵母細胞への分化、第一減数分裂前期への移行とMI停止を行う。初期全能性幹細胞と共有する多くの表面抗原は、これら胎仔期のG0、MI停止移行後に消失する。

従来マウスPGCの体細胞分裂期から減数分裂移行に関する解析は、器官培養、再構成生殖巣による解析が主体であり、減数分裂移行の様式や影響を与える因子の同定は殆ど行われてこなかった。これは相対的に解析の容易な平面培養下でのPGCの体細胞分裂期から減数分裂移行の解析系が作成されなかった事が理由の一つと考えられる。

本研究において、Ubel遺伝子検出によるマウス胎仔雌雄判別法の作製、PGCの初期マーカーとしてALPase(alkaline phosphatase)とSSEA-1および初期減数分裂期蛋白質としてsynaptonemal complex構成因子であるSycp3とマウスrecAホモログであるDmclの使用、また、PGCの平面培養条件の検討等を行った。その結果、雌PGCの初代培養に関して、平面培養下でのPGCの体細胞分裂後の初期減数分裂期蛋白質の発現および第一減数分裂前期のleptotene - early zygotene期への移行が確認された。これは従来観察された平面培養下でのPGCの自律的な増殖停止、消失が、分化の進行に伴う初期マーカーの発現低下による事を示す。また、生体内における雄胎仔生殖巣内の胎仔生殖細胞が初期減数分裂期遺伝子を発現する事が明らかとなった。

上記培養系を用いて、PGCの体細胞分裂期から初期減数分裂への移行が同調する傾向が観察された。また、UGR到達以前の胎仔腸間膜からのPGCの培養後、生体内

と相当する時期からのSycp3蛋白質の発現が認められた。これはPGCの減数分裂への移行が胎仔生殖巣到達以前に決定される事を示唆する。また、未分化幹細胞であるES細胞の分化抑制因子であり、PGCの増殖、生存因子である LIFが PGCのSycp3蛋白質発現を抑制する事が明らかとなった。これはLIFによるPGCの体細胞分裂から減数分裂への移行の抑制を意味する。IL6/sIL6R complexおよび抗gp130抗体の効果から、LIFによるPGCの減数分裂移行の抑制が、そのレセプターサブユニットであるgp130を介する事が示された。また、雌において減数分裂移行が開始する時期に雄胎仔生殖巣でのLIF発現が上昇する事が明らかとなった。

本研究において示したマウスPGCの体細胞分裂期から減数分裂移行の解析は、その制御機構解明の基礎を供する一つと考える。

論文の審査結果の要旨

中馬新一郎君は、主として細胞培養の手法を用いて、マウス初期胚における生殖系列細胞の分化と増殖の研究を行った。

マウスの始原生殖細胞(PGC)は、最初に交尾後7.25日の初期胚でアルカリホスファターゼ陽性を示す数十個の細胞群として認められるが、その後、予定生殖巣原基領域へ移動し、交尾後13.5日では約25,000個になる。この時期以降に雌では減数第一分裂前期に入り、雄では体細胞分裂でG0停止する。PGCは、初期胚に移植した時にキメラ胚への寄与がないことから、全能性が抑制されていると考えられている。PGCをLIF(leukemia inhibitory factor)とbFGF(basic fibroblast growth factor)の存在下で培養すると、未分化幹細胞に似たEG細胞株が得られる。EG細胞は、初期胚への移植でキメラ胚へ寄与することから、PGCがEG細胞に変わる際に、多能性幹細胞への脱分化が起こったと考えられる。

bFGFの代わりにレチノイン酸やホルスコリンを用いても、EG細胞と思われる細胞が得られる。中馬君は、この細胞と胎児の生殖巣体細胞を混ぜて成体の生殖巣に移植すると、成熟生殖細胞はできず、繊維芽細胞腫や奇形腫ができることを見つけた。一方、胎児の生殖巣(生殖細胞と体細胞の両方を含む)を解離して同様の移植を行うと、移植した生殖細胞の成熟が起こることを確認した。したがって、このEG細胞は、LIFとbFGFで作ったEG細胞と同様に脱分化して多能性を回復していること、多能性の回復にbFGFは必ずしも必要ないことが示唆された。

また、中馬君は、観察に便利なように、フィーダー細胞上でPGCを平面培養するという方法を開発し、PGCの減数第一分裂前期への移行を解析した。この実験では雌のPGCを使う必要があるため、短時間でPGCの性別を決定する技術を開発した。また、減数分裂移行のマーカーとして、減数分裂で働くSycp3およびDmcl1遺伝子の発現が適当なことを*in vivo*の系で確認した。実験結果は、予定生殖巣原基領域へ到着する前のPGCでも、培養すると減数分裂マーカーの発現が起こることを示し、生殖巣体細胞からの信号なしにここまでの分化が起こることが明らかになった。しかし、シナプトネマ構造の出現は、予定生殖巣原基領域へ到着後のPGCを培養した場合にしか起こらず、これには生殖巣体細胞からの信号が必要なのかもしれない。減数分裂マーカーの発現の強さは、異なるPGCコロニー間では差があるがコロニー内では均一なことから、細胞間の細胞質連絡により分化を同調させていることが示唆された。興味深いことに、中馬君は、この培養系に*in vivo*と同程度の濃度のLIFを添加すると減数分裂マーカーの発現が抑制されることを発見した。また、LIF受容体成分の1つであるgp130に対する抗体でこの効果がなくなること、*in vivo*でLIFの発現レベルは雌より雄の方が高いこと、PGCがgp130を、周囲の細胞がLIFを発現していることを明らかにし、LIFの信号がgp130を通して効き、*in vivo*でも減数分裂への移行を負に制御することを示唆した。

これらの研究は、中馬君が、マウス初期胚の扱いや細胞培養・遺伝子操作の技術に習熟していること、緻密な実験計画を立てられること、有用な新しい実験系を開発する能力があることを示している。また、LIFが減数分裂を負に制御すると

いう興味ある発見は、生殖細胞の分化に新たな知見を加えるものである。これらの理由で、審査委員会は、全員一致で、この論文が博士論文として十分であるとの結論に達した。

博士論文審査会の公開発表と質疑応答、およびその後の非公開の質疑応答において、中馬君は、専門分野および基礎分野で、博士号を得るのに十分な知識と理解力もつことを示した。博士論文は日本語で書かれているが、中馬君自身が英語で書いた別の論文を見て、中馬君は優れた英語能力を持つと判断した。