

氏 名 Pui Han Pin

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1839 号

学位授与の日付 平成28年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Regulation of gonocytes-to-spermatogonia transition (GST)  
in the murine testes

論文審査委員 主 査 准教授 酒井 則良  
教授 澤 斉  
教授 平田 たつみ  
教授 川上 浩一  
教授 大保 和之 横浜市立大学大学院

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

Spermatogenesis is a highly coordinated process of sperm production that occurs throughout life in male animals. This continuity is supported by the spermatogonial stem cells (SSCs). Thus the establishment of SSCs in the testes represents a crucial developmental event in male reproduction. The SSCs originate from the primordial germ cells (PGCs). In the mouse embryos, PGCs are formed at embryonic day (E) 7.25. These embryonic germ cells migrate and reach the developing gonad by E11 after which they are enclosed by somatic cells. Once PGCs become residents in the gonad, they are referred to as gonocytes. In the gonads, gonocytes experience exponential proliferation before they progressively enter mitotic arrest from E13.5. By E15.5, most gonocytes have arrested at G0/G1 of the cell cycle. At E18.5 (a day prior to birth), these quiescent germ cells begin to relocate from the central region to the inner periphery of the seminiferous cords. At postnatal day (P) 1.5 (one day after birth) gonocytes resume the cell cycle. During this perinatal period, gonocytes-to-spermatogonia transition (GST) occurs. However, the precise timing of GST is unclear due to the lack of a definitive distinction between gonocytes and nascent spermatogonia. At GST, the gonocytes may choose between two alternative cell fates – the SSCs or differentiating spermatogonia. However it is unknown how these cell fate decisions are regulated in the gonocytes during GST.

In the first part of my thesis, I determined the precise timing of GST and investigated extrinsic signalings involved in regulating GST. For this purpose, I generated developmental expression profiles of known adult spermatogonial stem cell (SSC) marker genes (*Gfra1*, *Ret*, *Plzf* and *Nanos2*) and differentiating spermatogonial marker genes (*Stra8*, *Ngn3* and *cKit*) during gonocytes development from E13.5 to P5.5 using RT-qPCR and immunohistology. I found that a subset of gonocytes up-regulated spermatogonial markers as early as E18.5. These nascent spermatogonia correlated with the previously observed relocating and re-proliferating gonocytes in the perinatal testes. Thus spermatogonial genes expression serves as a definitive marker of GST. To identify signalings that are involved in regulating GST, I evaluated the requirement of fibroblast growth factor (FGF), glial Cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), retinoic acid (RA), bone morphogenetic protein (BMP) and Nodal signaling using conditional gene ablation *in vivo* or organ culture *in vitro*. I found that FGF signaling was required for the up-regulation of both SSC and differentiating spermatogonial marker genes, and for the relocation and re-proliferation of gonocytes. I showed that FGF receptor inhibitor (FGFRi) suppressed the expression of GDNF and RA receptors in cultured testes. FGFRi mainly suppressed the MEK/ERK pathway. MEK inhibitor (MEKi)

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

recapitulated FGFR1's inhibition of SSC markers expression and gonocytes relocation. Whereas inhibition of PI3K/Akt pathway (a known mediator of GDNF and RA signaling) suppressed differentiating spermatogonial markers expression and gonocytes re proliferation. Taken together, I proposed that FGF signaling functions upstream of GDNF and RA signaling to regulate SSC and differentiating spermatogonial markers expression, and the relocation and re proliferation of gonocytes during GST.

In the second part of my thesis, I investigated intrinsic regulation of GST. For this purpose, I focused on an RNA-binding protein NANOS2 which is functionally required in both the gonocytes and SSCs. I found that gonocytes expressed heterogeneous levels of NANOS2 during and prior to GST. I hypothesized that NANOS2<sup>High</sup> gonocytes give rise to SSCs and NANOS2<sup>Weak</sup> gonocytes give rise to differentiating spermatogonia. To test this hypothesis, I examined the emergence of SSCs or differentiating spermatogonia in double transgenic mice carrying *Nanos2* reporter (*Nanos2-CHERRY* and *Gfra1-GFP* or *Stra8-EGFP*) during GST. Unexpectedly, SSCs (*Gfra1-GFP*<sup>+</sup>) emerged from *Nanos2-CHERRY*<sup>Weak</sup> gonocytes in addition to differentiating spermatogonia (*Stra8-EGFP*<sup>+</sup>). Immunohistological analyses revealed that *Stra8*<sup>+</sup> differentiating spermatogonia constituted a subset of *GFRA1*<sup>+</sup> SSCs in the perinatal testes. Lineage tracing experiments confirmed that E18.5 *Gfra1*<sup>+</sup> nascent spermatogonia (by *Gfra1-Ert2Cre*) gave rise to both SSCs and differentiating spermatogonia; while E18.5 *Stra8*<sup>+</sup> nascent spermatogonia (by *Stra8-Ert2Cre*) exclusively gave rise to differentiating spermatogonia. On the other hand, *Nanos2-CHERRY*<sup>High</sup> gonocytes up-regulated *Gfra1-GFP* but not *Stra8-EGFP* in P3.5 testes. Conditional ablation and overexpression of *Nanos2* in gonocytes demonstrated that the expression levels of NANOS2 is an intrinsic regulator of GST timing and cell fate decisions of gonocytes.

In conclusion, I defined the precise initiation of GST in E18.5 mouse testes using spermatogonial marker genes expression. I revealed that FGF signaling is required during GST for the expression of spermatogonial genes and gonocytes relocation and re proliferation. Finally, I demonstrated that the timing of GST and cell fate decisions of gonocytes are intrinsically regulated by the expression levels of NANOS2. My study contributes to the understanding of cell fate regulation of gonocytes in the murine testes.

(別紙様式 3)  
(Separate Form 3)

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

マウスの始原生殖細胞は雄の生殖原基に到達した後、一旦増殖し休止期に入る。この胎児期の生殖細胞はgonocyteと呼ばれる。そして、出生後に細胞分裂を再開して精原細胞 (spermatogonia) へと分化する。この精原細胞は幹細胞性を獲得する精原幹細胞と減数分裂にコミットメントされた細胞へと分かれるが、gonocyteからこれらの細胞へ分化する過程の分子基盤は不明であった。Hanさんはこの過程に興味をもち、以下の解析を行った。

はじめに、gonocyteから精原細胞が出現する時期を、精原幹細胞と減数分裂細胞で特異的に発現する遺伝子を用いて詳細に解析して、出生の1日前ですでに分化が始まっていることを見つけた。そこで、この分化の細胞外制御因子を同定することを目的に、遺伝子ノックアウトマウスや精巣器官培養法を用いて、fibroblast growth factor (FGF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), レチノイン酸 (RA), bone morphogenetic protein (BMP) および Nodalシグナルの影響を解析した。さらに、FGFシグナルの細胞内伝達因子MEK/ERKと、GDNFとRAシグナルの細胞内伝達因子PI3K/Aktを阻害してその影響を解析した。その結果、FGFシグナルがgonocyteから精原細胞への分化に必要であること、その下流でGDNFシグナル、RAシグナルが働いて精原細胞の幹細胞性の獲得や減数分裂を促進させることを見つけた。

次に、gonocyteの分化を制御する内在性因子を知る目的で、Nanos2の転写、翻訳レベルの解析を進めた。NANOS2は精原幹細胞の維持に重要な働きをするRNA結合蛋白である。その結果、出生1日前よりも前のgonocyteでNanos2のmRNAとタンパクの発現にばらつきがあることを見つけた。さらに、精原幹細胞のマーカーとして知られるGFRA1と減数分裂への分化マーカーのSTRA8との発現パターンを解析し、NANOS2の発現が弱い細胞でGFRA1とSTRA8の発現が強いという結果を得た。そこで、*Nanos2*, *Gfra1*および*Stra8*のプロモーターあるいはエンハンサーの制御によりタモキシフェン誘導Creリコンビナーゼを発現する系統を用いて、それぞれが強く発現する細胞を標識して細胞系譜解析を行った。その結果、STRA8を強く発現する細胞は全て減数分裂に入るのに対して、NANOS2を強く発現する細胞は多くが精原幹細胞に分化することを見つけた。GFRA1を強く発現する細胞は、一部は精原幹細胞に分化するものの過半数は減数分裂に入るという、中間の結果となった。これらの結果は、NANOS2の機能解析とあわせて、NANOS2の発現が、gonocyteが精原細胞に移行するよりも前に、減数分裂に入るか幹細胞性を獲得するかを制御していることを示している。

Hanさんはコンディショナルノックアウトやトランスジェニックマウスの解析と器官培養法を用いて豊富な実験データを提示し、gonocyteから精原細胞に移る過程の分子基盤を明らかにしている。これまで、gonocyteにheterogeneityがあるというモデルは提唱されていたものの、実際にNANOS2がその分子的な実体であり、幹細胞に分化するgonocyteと、減数分裂にすぐ入るgonocyteが、少なくとも出生1日前には既に運命決定されているということを実験的に明らかにした意義は大きい。さらに、FGFシグナルが精原細胞への移行を制御する因子であることを新たに示した意義も大きい。以上の理由から、Hanさんの博士論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。