

マウス胚細胞における
増殖と分化に関する研究

博士（理学）

総合研究大学院大学
生命科学 研究科
遺 伝 学 専 攻

平成 7 年度
(1995年度)

はじめに

すべての動物は1個の受精卵に由来する。受精卵は細胞分裂を繰り返して、胚と呼ばれる細胞塊を形成する。胚は更に細胞分裂を繰り返してやがて個体を形成して行く。この個体発生には様々な局面が存在するが、それらはすべて細胞増殖、細胞分化、細胞運動、細胞死という細胞における4つの事象よってもたらされる。つまるところ個体発生とは細胞がとりうるこの4つの事象の総合的制御によってもたらされる現象である。個体を形成するすべての組織はこれらの秩序だった組み合わせによって形成され、この秩序の乱れは発生途上の個体の死を含む様々な形成異常に帰結する。近年分子生物学という極めて有力な手法を得て、胚発生において重要とされる様々な遺伝子の報告が相次いでなされ、正常発生にはこれら様々な因子が胚体内の特定領域に3次元的に正確に発現し、また時間という要素を含めて4次元的な正確さをもって機能することが要求されることが理解されてきた。しかしながら、これらのすべての因子は直接または間接的に先に述べた細胞がとりうる4つの事象を制御していることにほかならない。

現在の個体発生の研究はこのような細胞の4つの事象に関して研究する細胞レベルでのアプローチと、これらを制御する因子についての個体、組織形成レベルでのアプローチに大まかに2分できる。しかしながら前述のように個体発生におけるすべての現象は、これらの2面が同時に成立して始めて起こりうるものであり、1面のみに注目していても個体発生に対する理解は進まない。しかしながら未知な生命現象に新たな知見を求めるには現象をその1側面から捕える、あるいは時間的空間的により小さな要素に分解して解析を進めることが不可避である。そして分子生物学的手法が盛んな現在となっても細胞培養法等を含む細胞生物学的手法は、ある現象を個々の細胞レベルに分解して理解するために不可欠な解析手法である。

本研究の第1部はマウスを用いて発生初期の始原生殖細胞に見られる増殖停止現象について、様々な培養法を用いて解析を行った研究である。始原生殖細胞は近年培養が可能となったばかりで発生時の様々な生命現象の中でも比較的知見の少ない物の一つである。また胚組織より始原生殖細胞のみを単離する手法が無い場合、分子生物学

的手法が使いにくい分野である。本研究はこの始原生殖細胞にみられる増殖制御において、始原生殖細胞自身の自律的な増殖停止能の存在を示唆した。第2部においてはやはりマウスを用いて中枢神経系の神経細胞分化についての研究を行った。脊椎動物の中枢神経系については現在までに多くの知見が重ねられているが、特に「最初の神経分化決定を受けた細胞はいつどの様な形で現われるか」について着目して研究を行った。中枢神経系形成については分子生物学的手法による個体、組織レベルでの解析は盛んに行われているが、むしろ細胞レベルでの知見が少ない。これは初期中枢神経系細胞の培養が極めて困難であることに起因する。そこで本研究においては発生初期の中枢神経系より多数の細胞株を樹立し、これらの細胞の分化決定進行状態の解析を行った。1細胞由来の細胞集団を用いて分化能の解析が可能となり、中枢神経系分化初期においては分化決定進行段階の異なる数種の前駆細胞が同時期の胚に共存していることが示された。

以上のように本研究は胚体内で同時期（8.5 - 12.5日胚）に進行している、始原生殖細胞と中枢神経系細胞の2つの分化について主に細胞生物学的手法を用いて、個々の細胞レベルでの解析を行ったものである。したがって中枢神経系の形成、生殖器官の形成という発生時に見られる生命現象のうち各々の細胞分化という1局面について行われたものであり、膨大な細胞の増殖分化現象を包含する個体発生のきわめて特殊で小さな1事実を理解したに過ぎない。しかしこの小さな理解の積み重ねこそが、個体発生という大きな生命現象の理解に通ずることも1つの事実である、と理解している。

1996年 2月

大久保 悌

要旨

第1部 始原生殖細胞における自律的増殖制御の解析

マウス始原生殖細胞 (PGC) は胎生7日胚の胚体外中胚葉域に数個のアルカリフォスファターゼ陽性細胞集団として出現し、その後活発な増殖を行いながら後腸、腸間膜を通過して移動し、胎生11日頃までに生殖隆起 (生殖巣原基) に到達する。生殖隆起到達後もPGCはしばらく増殖を続けるが、雌雄ともに13.5日胚ではその分裂を停止し、卵巣では減数分裂、精巣では細胞分裂休止期にはいる。

近年フィーダー細胞を用いたPGCの培養系が改良され、これを用いてPGCの増殖とそれを制御する因子についての様々な報告がなされている。これらの培養系においてPGCは生体内での増殖と分裂停止を反映していると思われる特徴ある増殖パターンを示す。例えば8.5日胚から取り出したPGCは4日間増殖するが、11.5日胚から取り出したものは1日だけ増殖し、12.5日胚からのものは全く増殖が見られない。この現象はあたかも培養下のPGCが時間を計って生体内と同じ時期に分裂を停止しているように見える。しかし現在可能となっているPGC培養系では、生体内においてPGCを取り巻いている体細胞 (支持細胞) が常にPGCと共存しており、培養皿内の細胞数としてはむしろこれらの体細胞の方が数多く存在している。したがって、培養下でのPGCの増殖停止においても、共存する体細胞とPGCの相互作用によって生体内とほぼ同じ時期に分裂停止を引き起こしている可能性が考えられる。

そこでPGCの増殖停止への体細胞の影響を調べるため、8.5日胚および11.5日胚という異なる時期由来のPGCと体細胞を使った混合培養をおこなうことによって、増殖停止期をむかえる11.5日胚の体細胞から8.5日胚由来PGCへの影響、あるいは増殖期の8.5日胚体細胞から11.5日胚PGCへの影響を検討した。様々な混合比での培養をおこなったところ、すべての場合において、PGCは混合培養中に共存する他の時期の体細胞の影響を全く受けず、自己の発生時期にしたがった増殖パターンを示すと考えられる結果を示した。したがってPGCには体細胞の影響によらない自律的な増殖停止機構が存在することが示唆された。

またPGCの増殖停止現象について更に詳細な知見を得るため、PGCを限界希釈法により

単一細胞に分離して培養することにより、個々のPGC由来のPGCコロニーの増殖停止時のふるまいについて調べた。8.5日胚から取り出したPGCについては、このように希釈された条件においても培養一日目に見られたPGCのコロニーはそのほとんどが4日目まで生存し、PGCコロニーの大多数が1回以上の分裂を示したが、4日目には明瞭な増殖停止を示した。これらのコロニーにおける細胞数の分布を調べた結果、8.5日胚PGCは比較的均質な細胞集団と考えられ、例えばEG細胞株の起源となるような増殖能の大きく異なった集団等の存在は示されなかった。しかしながらコロニーサイズは大きく分散しており、個々の細胞が厳密に調節された同調的分裂をおこなうことはなく、増殖停止時期が分裂回数によって決まっている様子も見られなかった。

一方このような培養下でのPGCの細胞形態変化を調べたところ、8.5日胚から取り出して培養2日目までは高い移動能を持つと思われる伸長型のPGCが多く存在するが、培養3日目以降は移動能や接着性の低下した丸型のPGCへの移行が見られた。これは移動期型から生殖巣への定着期型への生体内PGCの形態変化を反映しているものと考えられる。したがってPGCは培養下でも生体内を反映した細胞分化が進行しており、これより、増殖停止現象や細胞形態、運動能などの変化を進行させる自律的制御機構がPGC内に存在していると考えられる。

第2部 神経上皮由来細胞株を用いた中枢神経系細胞分化の解析

マウス中枢神経系の発生は7.5日胚に見られる神経板の形成に始まる。神経板を構成する神経上皮は神経幹細胞から成ると考えられ、最初に神経細胞、続いてグリア細胞を分化しつつ中枢神経系を形成してゆく。しかしながらこのような中枢神経系における幹細胞の性質、細胞系譜については未だ不明な点が多い。本研究はこのような初期神経上皮細胞から細胞株を樹立しこれらの分化能を解析することによって神経上皮細胞の分化決定について研究を行ったものである。

温度感受性SV40T抗原遺伝子にMHC class I *H2K^b* promoterをつないで導入したトランスジェニックマウスの胎生8.0-8.5日胚より神経板を取り出し、いくつかの細胞株を樹立した。樹立された細胞株の多くが同様の性質を示し、これをNES細胞と名付けた。NES細胞

は未分化神経細胞で発現の見られるnestinを発現しており、また神経上皮細胞とラディアルグリア細胞を認識するRC1抗体陽性であった。T抗原不活化条件下では双極性に伸長した細胞が出現し、この細胞は抗ネスチン抗体、RC1抗体陽性であったが、抗ニューロフィラメント抗体、抗GFAP抗体について陽性のものは見られなかった。またNES細胞を蛍光標識試薬PKH26を用いてラベルし、マウス子宮内の14.5日胚の大脳半球に移植しその分化能について解析したところ、移植後7日目にはNES細胞は大脳皮質内に広がり、神経細胞あるいはラディアルグリア様の形態を示していた。

また同様の方法で9.0 - 9.5日胚神経上皮より細胞株を樹立した。これらの細胞株は約半数がNES細胞様であったが、ほかに培養下でT抗原を不活性化することにより神経細胞への分化を示す、抗ニューロフィラメント抗体陽性のものが多数含まれていた。またこれらの細胞も14.5日胚大脳への移植により神経細胞様の形態を示した。

これらの結果から神経上皮における細胞分化能の決定に関しては9.0日胚において重要な変化が起きていると考えられ、8.0 - 8.5日胚神経板細胞は神経細胞への分化能は持つが自律的な分化を進行しうる分化決定を受けていない状態の細胞集団であると考えられる。また発生中の脳内においては細胞分化を引き起こす内在因子が存在しており、これらの働きによって培養条件下では分化しないNES細胞が神経細胞やグリア細胞へ分化する可能性が示された。

Abstract

Part 1 Analysis of autonomous regulation of proliferation and growth arrest in mouse primordial germ cells.

Mouse primordial germ cells (PGCs) first appear in the extraembryonic mesoderm at 7.0 - 7.5 days post coitum (dpc) as a cluster of alkaline phosphatase (AP) positive cells. They migrate into the hindgut (8.5 dpc) and genital ridges (11.5 dpc) while continuing to proliferate. PGCs of migratory phase showed a temporary growth and growth arrest at a time corresponding to 12.5 dpc *in vivo*. The proliferative behavior of PGCs in culture has been shown to mimic such *in vivo* growth pattern. In these culture studies, however, there was always a large number of somatic cells isolated from embryos together with the PGCs. It is unclear whether this behavior is regulated autonomously or by co-existing somatic cells.

We performed mixed culture experiments using PGCs obtained from embryos at 8.5 (in growth phase) and 11.5 dpc (shortly before the growth arrest phase) and found no interaction between the PGCs and somatic cells at the two stages. Next, we carried out clonal culture of PGCs, and examined proliferation pattern and morphological changes of individual clones. Such clonal culture did not reveal any subpopulation of PGCs with an increased growth rate or less differentiated characteristics, which might have been suggested by formation of the embryonic germ (EG) cell lines. Our results suggest that there is an autonomous regulation of growth and cell shape change in PGCs, which occurs as stochastic events but not strictly timed by the number of cell divisions.

Part 2 Analysis of neural determination and differentiation in CNS by establishment of neuroepithelial cell lines.

Development of the central nerve system (CNS) in mouse embryos initiate with the appearance of the neural plate at 7.5 dpc. The neuroepithelium at this stage probably consists of stem cells that will first produce neurons and later glial cells during development of the CNS. We have established a number of cell lines from the

neuroepithelium at the earliest stages and analyzed their differentiation potency *in vitro* and also when transplanted into embryonic brains.

We dissected out neural plates from mouse embryos at 8.0 - 9.5 dpc, which were transgenic for the temperature sensitive SV40 TAg gene driven by the mouse *H-2k^b* promoter, and cultured under the TAg permissive condition. We isolated many cell lines from such neuroepithelium cells. Among them, a large number of cloned lines showed similar characteristics suggesting the very primitive neuroepithelial cell and was named as NIS. Other cloned lines consisted of those at more advanced stages of development because they were more easily induced to differentiate into neurons *in vitro* than the NIS cells. We obtained only the NIS cell type from the neural plate at 8.0 - 8.5 dpc, but both the NIS and more advanced types from the neuroepithelium at 9.0 - 9.5 dpc.

Under the TAg permissive condition, NIS cells expressed nestin and RC1 antigens, which are markers of the neuronal stem or progenitor cells. Under the TAg impermissive condition, NIS showed a morphological change and produced both bipolar and flattened cells. However, we have failed to demonstrate expression of the differentiation markers such as neurofilament protein (NF) or glial fibrillary acidic protein (GFAP). In contrast, many cell lines derived from the neuroepithelium at 9.0 - 9.5 dpc showed transformation into neuron-like cells with concomitant expression of NF under the TAg impermissive condition. Therefore, we conclude that the early neuronal stem cells in the neuroepithelium undergo an important step toward commitment for the neuronal differentiation at 8.5 - 9.0 dpc, and such cellular characteristics can be studied by using cell lines established from these cells at the earliest stages of the CNS development. Also, there is a possibility that the earliest stem cells such as NIS cells can be induced to produce many cell types of CNS when transferred into embryonic brains, because the injected cells migrated out of the deposited site and integrated into brain tissues with cell shapes similar to the immature neurons or radial glia cells.

目次

第1部	始原生殖細胞における自律的増殖制御の解析	
1	序論	11
2	材料と方法	
2-1	PGCの培養法	14
2-2	各種培養法による増殖パターン解析および形態変化	15
3	結果	
3-1	混合培養実験	18
3-2	単離培養実験	21
3-3	細胞形態変化の観察	24
4	考察	
4-1	PGCの自律的増殖停止について	27
4-2	PGCはどのようにして時間を計っているのか	29
4-3	PGC集団は均質であるか	31
5	引用文献	34
6	図表	38
第2部	神経上皮由来細胞株を用いた中枢神経系細胞分化の解析	
1	序論	58
2	材料と方法	
2-1	神経上皮由来細胞株の樹立と培養	61
2-2	ウエスタンプロットティング法	62
2-3	抗体染色法	63
2-4	RT-PCR法	63
2-5	細胞株の脳内移植実験	64
3	結果	
3-1	初期中枢神経系からの細胞株の樹立	65
3-2	培養下におけるNES細胞の特徴と分化能について	67
3-3	9.0 - 9.5日胚由来細胞株の特徴と分化能について	69
3-4	生体内における細胞株の分化能について	69
4	考察	
4-1	初期神経上皮の細胞分化決定	71
4-2	NESおよびTGN細胞株の分化能	73
5	引用文献	75
6	図表	80
	謝辞	101

第1部

始原生殖細胞における

自律的増殖制御の解析

1 序論

生殖細胞は自身を含む個体を形成する全ての細胞のもととなる細胞である。そしてこの生殖細胞は精子や卵の形成されるはるか以前の胚発生のごく初期から始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) として出現し、他の細胞とは異なる独自の系譜をたどる。PGC とは一体どのような細胞であるか、どのような過程を経て生殖細胞に分化するのかについては大変興味深い。

マウスPGCは胎生7.0日から7.5日胚において初めて、数個のアルカリフォスファターゼ陽性細胞として胚体外中胚葉内に検出される(Ginsburg *et al.*, 1990)。その後これらの細胞は8.0日から8.5日胚では尿嚢基部に存在し、増殖を続けながら胚体内を移動し(移動期)、後腸原基より腸間膜を通過して10.5日から11.5日胚で生殖隆起(生殖巣原基)に到達する(Fig. 1)。到達後のPGCは生殖隆起内に入り込み(定着期)、生殖隆起内でも増殖を続け、12.5日から13.5日胚で増殖を停止し、雄では生後に至るまでの増殖停止期に、雌では減数分裂期に入る(Nakatsuji, 1992; Wylie and Heasman, 1993)。このことから胎生12.5日から13.5日はPGCの増殖分化について重要な変化が起こっている時期と推測される。事実この時期には生殖巣原基内PGCにおいていくつかの原癌遺伝子の発現が変化することが既に報告されている(Coucouvani and Jones, 1993)。しかしながらPGC研究は近年まで移動期PGCの培養法がなく、また移動期PGCの単離が不可能であることから極めて解析し難い分野であった。しかしDonovanらによってSTO線維芽細胞をフィーダー細胞として用いることにより10.5日胚由来PGCの培養が可能であることが見いだされ(Donovan, *et al.*, 1986)、Matsuiらによってその移動期PGCの培養法が確立され(Matsui *et al.*, 1991, 1992)、現在はこの培養法を用いてPGCに関する様々な知見が得られている。

培養下におけるPGCの増殖パターンは生体内におけるそれと良く似た動向を示すことが明らかにされている(Donovan *et al.*, 1986; Matsui *et al.*, 1991; Dolci *et al.*, 1993)。たとえば8.5日胚より取り出したPGCは培養下において4日間増殖を続けるが、4日目には増殖を停止し、その後減少を始める。一方10.5日胚より取り出したPGCは2日間増殖を示し、11.5日胚より取り出したPGCは1日だけ増殖を示し、12.5日胚より取り出したPGCは増殖を示さない(Fig. 2)。以上のような結果からどの時期の胚より取り出したPGCもみな胎生12.5日

目相当でその増殖を停止する。先述のように生体内においても12.5日から13.5日胚においてPGCの増殖停止がみられることから、この現象は生体内で起こっている現象を反映したものと考えられる。

またPGCの生存に*Steel factor*が必須であることが、変異マウスを用いた解析等から既に確認されており(Brannan *et al.*, 1991; Flanagan *et al.*, 1991; Godin *et al.*, 1991; Keshet *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1992)、PGC培養実験でフィーダー細胞として用いているSTO細胞はこの*Steel factor*を産生していることが報告されている(Ogawa *et al.*, 1991; Yoshinaga *et al.*, 1991)。さらにこのPGC培養法を用いて増殖期のPGCの増殖と生存には*Steel factor*が必須であるが、*Steel factor*存在下でもこの12.5日目胚相当の増殖停止現象は起きることが報告されている(Matsui *et al.*, 1990)。

しかしこれらの培養実験結果はすべてPGCを取り出すために切り出した組織片に含まれる体細胞が多量に共存している培養系において得られたものである。予備実験として計測したところ、このPGCを取り出すことを目的として切り出された組織片は、むしろ体細胞の中に極少数のPGCが含まれているに過ぎないことが判明した(table 1)。この組織片をPGCとして培養に用いているため、これら共存する体細胞の影響によって生体内と似た増殖パターンが結果として示されている可能性等が考えられる。

本研究はこのPGCにみられる一定時期に起こる増殖停止が、PGC自身が何らかの機構で時間を計測することによってもたらされるのか、また共存する体細胞、あるいはPGC間の細胞間相互作用等の影響によって一定時期に制御されるのか、培養系を用いて解析し、その時間計測機構についての更なる知見を得る目的で行われた。

しかしながら先述の様に現在にいたるまで胚体組織より移動期PGCを純粹に単離する方法は確立されていない。そこで本研究においてはPGCの移動期かつ増殖期である8.5日胚尿嚢基部由来のPGCと、培養1日目に増殖停止期をむかえる11.5日胚生殖巣原基(生殖隆起: genital ridge)由来の2つの時期のPGC及びその周辺の体細胞を、混合培養を行うことによってそのPGCの増殖パターンへの影響を調べた。

また、この両時期の胚から取り出したPGCを、1PGCを1wellにまいて培養を行い(単離培養実験)、1個のPGC由来のPGCコロニーについて増殖期、増殖停止期、その後の減少

期の動向について詳細に調べた。

また胎生10.5日胚腸間膜および11.5日から13.5日胚の生殖隆起からPGCを取り出して培養直後の細胞形態を観察すると、取り出してきた胚の発生段階に伴ってPGCの細胞形態が異なっており、移動期に多い伸長型から定着期に多い丸型への移行が見られる事が報告されている(Doonan *et al.*, 1986)。この結果はこの時期にPGCが生体内で移動期型PGCから定着期型PGCへ分化していることを示唆している。本研究において8.5日胚より取り出したPGCの単離培養実験において、移動期型から定着期型PGCへの形態変化が培養下において生体内同様の時間経過で見られることが示された。したがって培養下においても生体内同様の時間経過でPGC分化が進行していると考えられた。

2 材料と方法

2-1 PGCの培養法

2-1-1 フィーダー細胞について

PGCの培養はフィーダー細胞の利用により可能となった。PGCはフィーダー細胞の存在によりその接着が助けられ、生存率も上がることで既に報告されている(Matsui *et al.*, 1991; Godin *et al.*, 1991; Dolci *et al.*, 1991)。現在一般的には線維芽細胞株STO、SI/SI4-m220等がフィーダー細胞として用いられている。序論で述べたようにSTO細胞はSteel factorを産生していることが既に報告されており(Ogawa *et al.*, 1991; Yoshinaga *et al.*, 1991)、SI/SI4-m220細胞はSteel factor遺伝子欠損mutantマウスより樹立した線維芽細胞株に、膜結合型Steel factorを発現する遺伝子を導入した細胞株である(Matsui *et al.*, 1991)。SI/SI4-m220の方がSTOに比べ、よりPGC数を高く維持し、増殖をもたらすことが知られている。本研究では混合培養実験には、混合による微妙な影響をより明確に検出するためPGC維持能の低いSTO細胞を、単離培養実験にはよりPGC維持能を持つSI/SI4-m220をそれぞれフィーダー細胞として用いた。

これらの細胞は10%のウシ胎児血清を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)を培養液として用いて、37℃ 5% CO₂で培養を行った。その後5ng/ml mitomycin Cで2時間培養(mitomycin C 処理)し、不可逆的に細胞周期を止め、これをtrypsin溶液(0.05% trypsin, 0.02% EDTA, Ca²⁺Mg²⁺ free PBS)で37℃、3-5分間の処理(trypsin処理)により解離して培養皿より回収し、遠心分離によりtrypsinを除去した後、STO細胞は1×10⁵ cells/wellの濃度でNunc社製4 well culture plate (混合培養実験用)に、SI/SI4-m220細胞は3×10⁴ cells/wellでCorning社製96 well culture plate (単離培養実験用)にまき、18時間後にフィーダー細胞として用いた。また11.5日胚生殖原基由来の体細胞をフィーダー細胞として用いた実験では、11.5日胚より生殖隆起(生殖巣原基)を摘出し、これをtrypsin溶液処理によって単細胞に解離して8時間培養し、その後mitomycin C処理を行い、これを再びtrypsin処理により解離、回収して5×10⁴ cells/wellの濃度でNunc社製4 well culture plateにまきこんだ。この時同数(5×10⁴ cells/well)のmitomycin C処理したSTO細胞を混合してまき、これをフィーダー細胞として用いた。これらの培養に使用した培養皿は全て使用前に1% gelatinで30分コーティン

グ処理を行った。

2-1-2 PGCの培養

マウスはICR系統を用いた。PGCは8.5日胚については尿嚢基部、11.5日胚については生殖隆起を摘出し、これをtrypsin溶液処理で単細胞に解離し、この懸濁液を培養液で希釈して上記のフィーダー細胞上で培養を行った。同様にして7.5日胚から12.5日胚までのPGCを取り出してSI/SI4-m220細胞をフィーダーとして培養を行い、アルカリフォスファターゼ染色(後述)を行ってPGC数の変化を計測した(Fig.2)。さらにこの細胞懸濁液の細胞濃度を血球計算板を用いて計測し、これをスライドガラスに塗布し、アルカリフォスファターゼ染色(後述)を行って含まれているPGC数を計算した(Table 1)。培養液はDMEMに0.45% glucose、0.5% non-essential amino acid (Gibco)、1% nucleoside混合液を加えた溶液(ESM)に10%ウシ胎児血清を添加して用い、培養液交換は毎日行った。

2-2 各種培養法による増殖パターン解析および形態変化

2-2-1 2時期混合培養実験(Fig.4, 5)

混合培養実験においては8.5日胚由来の細胞懸濁液をまいた1時間以内に、混合する11.5日胚由来の細胞懸濁液を培養皿に加えた。またこれらの実験において8.5日胚由来の細胞については1/2個体分(約 2×10^4 細胞)、11.5日胚由来の細胞については1/2生殖隆起分(1/4個体分、 3×10^4 細胞)の細胞を1 unitとした。またあらかじめ8.5および11.5日胚由来PGCを各1 unit用いてSTO細胞をフィーダーとして培養を行った(Fig. 3)。

またSTOフィーダー細胞の半数の細胞を、11.5日胚生殖隆起由来の体細胞と交換し、この細胞をフィーダー細胞として用いて8.5日胚由来のPGCの増殖パターンへの影響を調べた。11.5日胚生殖隆起体細胞とSTO細胞からなるフィーダー細胞の作成法は3-1-1に記した。このフィーダー細胞上に8.5日胚PGC 1 unit分を通常の方法で培養を行った。

2-2-2 単離培養実験(Fig. 6, 7, 8)

単離培養実験においては限界希釈法を用いてPGCを単離した。Table 1より8.5日胚由来

の細胞懸濁液1 unit分には1個体分につき約30個、11.5日胚では約500個のPGCが存在すると考えられる。そこで計算上1個のPGCが30%以下のwellにまかれるように懸濁液を希釈して96 well culture plateにまきこんだ。結果として培養0.5日では約30%のwellに1個のPGCの存在が確認された(96 well culture plate 1枚につき約30 well)。このような手法でPGCを単離し、1細胞由来と考えられるPGCコロニーの培養を行った。また8.5日胚由来のPGC培養において、以上の様な単離培養系において1wellに蒔かれる全細胞数を計測し、培養細胞密度を計算した(Table 2)。

2-2-3 アルカリフォスファターゼ染色と細胞数計測

培養後の細胞はPBSで1回洗った後、冷エタノールで10分間固定し、アルカリフォスファターゼによる活性染色(AP染色)を行った。

固定後のculture plateは10mM KClを含む0.1M sodium phosphate bufferで3回洗浄し、0.1M Tris buffer (pH 8.5)に0.6 mg/ml fast red、0.1 mg/ml naphthol AS-B (SIGMA)を含む溶液で15 - 30分、室温で発色反応させる。十分な発色が得られたら0.1M sodium phosphate bufferで発色液を洗い流す。これによりPGCは赤色の細胞として検出される。

これらを倒立顕微鏡とカウンターを用いてその数の計測を行った。混合培養においては、少なくとも1サンプルで8実験区以上の実験より統計的計算を行って増殖曲線のグラフを作成した。単離培養については4回の実験を行いいずれも同様な傾向が見られたため、これらの数値を合計してグラフを作成した。

2-2-4 PGC形態変化の観察(Fig. 9, 10)

単離培養後にAP染色を行ってPGCを検出し、その細胞形態により3つのグループにわけ、それぞれ形態に属するPGC数を計測した。細胞形態の分類法はDonovanらによるものを用いた(Donovan *et al.*, 1986)。すなわち細胞の最長軸の長さが最短軸の長さの2倍以上あるものを伸長型(polarized type)、接着性は伸長型同様高いが形態が伸長型を示さないものを拡張型(spread type)、他の二者に比較して接着性が低く球形をとりlamelipodiumも多くは見ら

れないものを丸型(round type)の3つに分類を行い、経時変化を追ってそれぞれに属するPGC数を計測し、その存在比を計算した。

3 結果

3-1 混合培養実験

まず始めに8.5日胚と11.5日胚よりPGCを取り出し培養を行った(Fig. 3)。8.5日胚由来のPGCは3日目まで継続的にPGC数の増加を示し、その後4日目には減少を示した。11.5日胚由来のPGCは培養1日目のみ若干の増殖を示し、2日目以降はPGC数は減少し、3日目にはそのほとんどのPGCが消失した。これらの実験にはフィーダー細胞としてSTO細胞を用いたため、8.5日由来のPGCはSI/SI4-m220をフィーダー細胞として用いた場合と比較してやや早期に増殖停止を迎える。またこれらの結果は以前に報告された培養下でのPGCの一定時期に見られる増殖の停止現象と一致していた(Matsui *et al.*, 1992; Kawase *et al.*, 1994)。

使用されているフィーダー細胞については、その種類を変えてもこの増殖停止現象が見られ、またその性質が培養される細胞の発生段階に応じて変化するとは考え難いため、フィーダー細胞がこの増殖停止現象に積極的に関与しているとは考え難い。したがって以下の3種類の可能性が考えられる。

- (a)11.5 - 12.5日胚相当の時期に体細胞より分泌されるPGC増殖因子が消失する。
- (b)11.5 - 12.5日胚相当の時期に体細胞よりPGCへ増殖停止シグナルが伝えられる。
- (c)11.5 - 12.5日胚相当の時期にPGC自身が自律的に増殖停止する。

これらいずれかの現象についての解明にはPGCを単離し、各発生段階の体細胞と共培養等が可能であれば容易と思われるが、残念ながら現在まで、これら移動期のPGCを純粹に単離する方法は確立されてはいない。そこで以下の実験を行った。

3-1-1 2時期混合培養実験

PGC培養系における増殖因子やシグナルによる制御の可能性を調べる目的で混合実験を行った。この実験は上記の(a)の様な機構が存在する場合を仮定すると、11.5日胚由来の増殖停止期を迎える直前のPGC培養系に8.5日胚由来の細胞(PGCと体細胞)を添加することにより、11.5日胚由来のPGCは8.5日胚由来の細胞から放出されるPGC増殖因子の作用を受け、PGC増殖停止時期の遅延が起こることが予想される。また仮に(b)の様な機構が存在する場合、8.5日胚のPGC培養系に11.5日胚の体細胞およびPGCを添加することにより、

8.5日胚由来PGCは11.5日胚由来細胞から放出される増殖停止シグナルの作用を受け増殖停止が起こり、PGC数の増加が低減する、あるいはPGC数増加がみられないことが期待される。

以上の予測のもとに8.5日胚および11.5日胚の2時期に着目して混合培養実験を行った。まず始めに1:1(8.5 dpc 1 unit : 11.5 dpc 1 unit)の比率で混合培養を行い、1日毎に固定しAP染色を行ってPGCを検出し、全てのPGC数を計測した(Fig. 4A)。総PGC数は1日目から2日目にかけて減少し3日目に再び増加を示した。2日目に示した値は8.5日胚PGCを単独で培養した場合示す値よりも少し高い値を示したが、3日目には8.5日胚PGC単独培養の場合とほぼ同等の値を示した。

またこのような混合培養の結果、培養系内の細胞密度が細胞添加の分だけ上昇するため、この細胞密度の上昇が増殖パターンに影響する可能性を考慮して、1:1混合と1/2:1/2混合についてあらかじめその増殖パターンを比較した(Fig. 4B)。結果としては1:1、1/2:1/2共に2日目に減少し3日目に増加するという同様の傾向が示された。よって細胞密度の差はPGC増殖パターンには影響しないと考えられた。

次に1/4:3/4 (8.5 dpc 1/4 unit : 11.5 dpc 3/4 unit) の比率で混合培養実験を行った(Fig. 4C)。その結果PGC総数は1日目から2日目にかけて激減し、3日目には極少量の増加を示した。またその値はそれぞれの時期由来のPGCを単独で(混合せず)培養を行った場合に示される値の和とよく一致した。

比率を逆にして、3/4:1/4の比で同様の実験を行った(Fig. 4D)。示される値は、これまでの混合培養実験の結果と同様、実験区のPGC数の示す値は、それぞれの時期のPGCを単独で培養した場合示される値の和とよく一致した動向を示した。特に11.5日胚由来のPGCがほとんど消失してしまう3日目には、混合培養実験の値は、8.5日胚由来のPGC単独で培養を行った場合に示される3日目の値と非常に良く一致した。

同様の方法で1/10:1、1:1/10の比率での混合培養実験を行ったが、いずれの結果においても、混合培養実験下でのPGC数の示す値は、それぞれの時期を単独で培養したPGC数の和ときわめて近い値を示した(Fig. 4EF)。

以上の結果からどのような比率で2時期の細胞を混在させても11.5日胚生殖隆起由来

PGCは3日目までにほとんどが消失すると考えられ、かつ8.5日胚由来PGCは3日目まで増殖を示したと考えられる。

3-1-2 11.5日胚生殖隆起体細胞をフィーダー細胞として用いた実験

上記の混合実験では培養系に常に存在するフィーダー細胞の影響によりPGCの増殖が高く維持されるため、3-1節冒頭に示した仮説(b)の様な11.5日胚由来の細胞からの増殖停止シグナルが検出されなかった可能性が考えられるため、フィーダー細胞であるSTO細胞からの影響を低減したうえで、増殖停止期の胚由来の体細胞からのPGC増殖能への影響の有無について検討するため以下の実験を行った。

フィーダー細胞の半数の細胞を増殖停止期を迎える11.5日胚生殖隆起の体細胞と交換し、この条件下で増殖期にある8.5日胚由来PGCの培養を行った。11.5日胚生殖隆起由来の細胞集団には多量のPGCが存在するため(table 1)、そのまま用いては8.5日由来のPGCの増殖を検出することは不可能である。そこでこの生殖隆起由来細胞集団からPGCを除去するために、またこれら体細胞の増殖を不可逆的に停止させるために、取り出された細胞に対してmitomycin C処理を行った(材料と方法3-1-1)。PGCはこの処理による細胞毒性に対して感受性が非常に高く、低濃度のmitomycin C投与を妊娠マウスに対して行うことにより、胚体内のPGCの大多数が死滅することが報告されている(Tam and Snow, 1981)。実際11.5日胚生殖隆起由来の細胞集団に対してmitomycin C処理後のPGC培養を試みた結果、2日目には全てのPGCが消失した(Fig. 5)。このようにして得られた11.5日胚生殖隆起由来の体細胞を全フィーダー細胞の半数に用い、この上で8.5日胚由来のPGCの培養を行った。この実験ではSTOフィーダー細胞が1/2の細胞数に減少した上に、1:1の2時期混合培養実験時に行った混在細胞数(3×10^4 個)の約1.7倍(5×10^4 個)の増殖停止期の体細胞が培養系に導入されることとなる。

結果は培養3日目まで増加傾向を示し、その後減少し、3日目以前に増殖停止や増加傾向の減少は見られなかった。またSTO細胞のみを1/2量フィーダー細胞に用いた場合、増加のピークは3日目であることは変わらなかったが、その増加率は通常数のSTO細胞を用いた場合に比べ約半分に減少していた。一方生殖隆起由来体細胞のフィーダー細胞を半分加

えた培養系の方がこれに比べむしろ高い増加率を示した(Fig. 5)。このことから、フィーダー細胞として共存する11.5日胚生殖隆起由来の体細胞は増殖期のPGCに増殖停止を引き起こす活性は示さず、むしろその増殖を支持したと考えられる。以上の結果から増殖停止期体細胞から増殖期PGCへ作用しうる増殖停止シグナルは存在しないと考えられる。

以上の結果から、PGCは共存する他時期由来の細胞に影響されず、自身の由来する時期に依存した増殖パターンを示すことが明らかになった。このことからPGCは共存する同時期由来の体細胞に依存せずに自律的に増殖停止を行っている可能性が高いと考えられる。先に予想した(a)または(b)の様な増殖因子や増殖停止シグナルの影響は全く検出されなかった。発生段階に依存して厳密にswitchingされる細胞間情報伝達系などの存在を仮定しなければ、3-1節冒頭で述べた(c)の事象に相当するPGC自身が自律的に増殖を停止している可能性が強く示唆された。

3-2 単離培養実験

混合培養実験の結果からPGCは自律的に増殖停止を行っていることが強く示唆された。細胞が如何にして時間を計測するかについてはいくつかの例があり、その1つに細胞分裂回数が挙げられる(考察で後述)。そこで個々のPGCが何回の分裂を経て増殖停止期に至るのかを知る事が重要となる。また本研究の混合培養実験も含めて現在までに報告されたPGC培養実験結果は常にPGC集団の総数の増減をみたものであるが、このPGC集団は均質な集団であるのか、あるいは増殖速度の異なる集団がいくつか存在しているのか、また増殖停止期におけるPGCについて全てのPGCが一斉に分裂停止しているのか、増殖停止期後もなお増殖を続ける集団が存在するかついても現在までに知見がない。以上の理由から増殖期由来の8.5日胚由来PGCおよび増殖停止期を迎える11.5日胚PGCについて、PGCを単独のPGCに単離して培養を行う単離培養実験を行った。しかしPGCと体細胞を分離することは先述の通り現在のところ不可能であるため、1胚体に含まれるPGC数の予想値から限界希釈法を用いて、体細胞を混在したままPGCを単離して培養を行った(材料と方法2-2-2)。なおこれらの実験においてはSTOと比較してより生存を維持する能力の高い、

SI/SI4-m220細胞をフィーダー細胞として使用した。

3-2-1 8.5日胚由来PGCを用いた単離培養実験

増殖期にある8.5日胚由来PGCを用いて単離培養実験を行った。まず始めに単離培養下のPGCについて、培養日数毎にその全てのPGC数の合計およびPGCの存在する全てのwell数(全コロニー数)について計測を行った(Fig. 6)。単離培養下においてもその増殖パターンはSI/SI-m220細胞をフィーダー細胞として用いた通常培養の条件下と全く同様4日目にピークを迎え、そのPGC数の増加率も全く同率であった(Kawase *et al.*, 1994)。しかしこの単離培養実験においては限界希釈法を用い96 well culture plateで培養を行った結果、通常培養時と比べ培養系に共存する体細胞密度数が約1/12に減少している(table 3)。従ってここでもまた培養系内の共存体細胞密度はPGCの増殖パターンには影響しないと考えられた。またその全コロニー数は増殖期と考えられる培養開始から4日目間の間に若干の減少傾向を示し、4日目で1日目にみられる全コロニー数の19.7%が減少するが、最大の減少を示す3日目から4日目の間でも1日に8.9%のコロニー数減少であった。しかしながら培養4日目から5日目の増殖停止期後のPGC数減少期にはこの1日間のみで20.1%もの大幅なコロニー数の減少を示した。このことから増殖期は培養1日目に存在するPGCのコロニーのうち大多数(約80%)が4日目まで維持されるが、4日目から5日目の間の増殖停止期後のPGC数減少時にはかなり多くのコロニーが消失していることが示された。

次にコロニーサイズの経時変化について計測を行った。PGCの存在する全てのwellについて、そのwell内のPGCは培養開始時まかれた1PGCに由来するものと考え、well毎のPGC数(コロニーサイズ)について培養日数毎に計測を行った(Fig. 7)。培養1日目には2細胞以上のコロニーが多数(73.8%)を占め、培養下に移された大多数のPGCが1回以上の分裂を行っていると考えられた(Fig. 7A)。培養2日目に4細胞と8細胞のコロニーが、3日目には4細胞、8細胞、16細胞のコロニーが、また4日目には更に顕著な8細胞、16細胞のピークが観察され、これら増殖するPGCは培養下である程度近い周期で分裂しているものと考えられた(Fig. 7B-D)。また1細胞からなるコロニー数については、4日目に最小値をとり、全コロニーの10%であった。したがって残りの90%のコロニーは少なくとも1回以上の分裂を行っ

たコロニーと考えられる。また2から4細胞の小さなサイズのコロニーについては5日間の培養期間を通じて常に多くその存在が見られた。これらの集団以外には4日間の増殖期を通じて、コロニーサイズは1細胞から38細胞まで幅広く分散しており、1PGC由来のコロニー内であっても途中で増殖を停止する、あるいは死滅するPGCが現れていることが示された。また特に増殖の早い集団等の存在も確認されなかった。

増殖停止期後のPGC数の減少する培養5日目にはAP染色陽性の細胞の残骸と思われる破片が多数観察され、多くのPGCが細胞死を起こしているものと考えられた。前述の全コロニー数計測の結果から(Fig. 6)、この時期にはコロニーごと消失するPGCが存在すると考えられたが、コロニーサイズに応じた消失傾向等は見いだされず(Fig. 7E)、細胞死においても特定の傾向を持つ細胞集団の存在は見られなかった。しかし、4日目の最大コロニーサイズである38細胞以上のコロニーサイズを示す集団が、5日目に5コロニー存在することから、5日目を迎えても依然増殖を示すコロニーが少数ながら存在していることが明らかになった。

3-2-2 11.5日胚由来のPGCをもちいた単離培養実験

培養1日目に増殖停止期を迎えると考えられる11.5日生殖隆起由来のPGCについても同様な方法で単離培養実験を行った(Fig. 8)。培養日数ごとの全PGC数の動向は通常の下で行った培養時の結果と一致し、2日目に大幅に減少し、その後も減少を続け、4日目にはほとんどのPGCが消失した。全コロニー数の動向は全細胞数の動向と良く一致した減少傾向を示した。またコロニーサイズは1日目に見られた4細胞が最大で、その後はサイズの大きなコロニーは見られず、全てのPGCが増殖を停止していることが示された。この結果より培養0日から1日の間に62.9%のPGCが1回ないし2回の細胞分裂を行い、その後分裂を停止したと考えられる。この実験では、前節4-2-2(Fig. 7)の実験で見られたような、増殖停止期以後にも分裂を続けるPGCは見られなかった。

以上の結果から増殖期においてはその大多数のPGCは単離培養下でも生存し、生存しているPGCの大多数は1回以上の分裂を行っていると思われた。その分裂回数は様々であり、またコロニー内でも厳密な同調はしていないと考えられ、分裂回数と増殖停止現象と

の間に相関関係は見いだされなかった。また増殖期、増殖停止期を通じて特に増殖の早いPGC集団や、コロニーサイズに特異的なPGC消失は全く見られなかった。

3-3 細胞形態変化の観察

序論で述べたようにPGCはその発生段階にしたがってその培養下での細胞形態を変化させることが既に報告されている。この報告は胎生10.5日から13.5日の胚よりPGCをとりだして培養下に移した直後のPGCの形態を観察したもので、その形態変化は胚体内のPGCの性質の変化を反映していると考えられる(Doonan *et al.*, 1986)。この事実はPGCが発生段階に応じて生体内で何らかの分化を進行させていることを示していると考えられる。本研究において単離培養実験を用いることによって、*in vitro*の条件下においてもPGCの細胞形態の変化が進行することが見いだされた(Fig. 9)。

8.5日胚由来PGC(増殖期、移動期)の単離培養後のPGCについてその形態をDoonanらの分類(Doonan *et al.*, 1986)に従い3種に分類し、経時変化を追って細胞形態ごとにその存在比率を計算した(Fig. 10)。以下にその分類法について述べる。

伸長型(polarized type) ; フィーダー細胞上に細長く伸びた形で接着し、長軸方向の長さが短軸方向の長さの2倍以上あるもの。移動期の形態と思われる。

10.5日胚までの腸間膜由来のPGCに多く見られる。

拡張型(spread type) ; フィーダー細胞上に接着し、広がった形をとる。伸長型のように伸びず、しかし丸型よりしっかりと接着している。移動期終了後の形態と思われる。10.5 - 11.5日胚生殖隆起由来のPGCに多く見られる。

丸型 (round type) ; 接着性が低く球型をとり、lamellipodium等の仮足がほとんど見られない。定着期(12.5 - 13.5日胚)の生殖巣原基由来のPGCに多く見られる。

3-3-1 増殖期PGCの培養下における形態変化

培養開始より2日目まで3形態の存在比率はほとんど変化せず、伸長型が約50%を占め、丸型は最も少数であった(Fig. 10)。しかし、3日目以降その比率は変化し、丸型が増大し始め、4日目には25.7%を占めピークを迎えた。また4日目からは拡張型が増大し、48.6%を占めた。またこれらの細胞形態は、培養3日目以降の実験区について、1コロニーに3種類の細胞ともに混在したコロニーが多く見られ(Fig. 9B-C)、その3形態の存在比率は8細胞以上の大きさのコロニーについては、コロニーサイズに因らずに同一培養日数のwellどうしではほぼ同じ比率を示した。この結果はつまり1PGC由来のコロニー内に3形態のPGCが出現してくることを示している。またこれら3形態のPGCはその形態から移動期から生殖巣原基内に定着するまでのPGCの動向と関連していると考えられ、移動期に多い伸長型から、生殖原基内に多い丸型への分化が培養下で再現されていると考えられる。更にその形態の移行時期についても、この培養実験下では3形態の存在比率が培養3日目から変化し始めるが、8.5日胚からとりだして培養を始めたこの系では、培養3日目は胚体内で移動するPGCが生殖隆起に侵入する時期である胎生11.5日目に相当すると考えられ、生体内の時間経過と同様に培養下でも形態変化を行っていると考えられる。

3-3-2 増殖停止期以後のPGC形態変化

増殖停止期を過ぎ、PGC数減少の見られる培養5日目では拡張型が最も多く存在した。しかしながらこの時期にはPGCの消失がさかんに起こっており、これは他の2形態の内特に丸型PGC数が減少したためと考えられる。また実際に増殖期とは異なり、拡張型PGCのみより構成されるコロニーが多く見られ、これらのコロニーはPGCが密接に寄り添った形のコロニーを形成していた(Fig. 9D)。また拡張型のみで大型のコロニーを形成するものも少数であるが見られた。特に5日目において4日目の最大コロニーサイズ38細胞を越えて存在する、なおも増殖進行していると考えられるコロニー(5コロニー)については、全て拡張型PGCのコロニーから構成されていた。

4 考察

4-1 PGCの自律的増殖停止について

PGCの培養下での発生段階依存的増殖停止現象についてはこれまでにいくつかの報告がなされている(Matsui *et al.*, 1992; De Felici and McLaren, 1983; Kawase *et al.*, 1994)。しかしながらこの現象について、共存する体細胞やPGC同士の細胞間情報伝達に因るものか、PGCに内在的にプログラムがなされていて培養下に移された後にも自律的に増殖停止を行うのか、そのいずれかについては現在までに全く知見がなかった。その理由は移動期にある(同時に増殖期にある)PGCを純粹に体細胞と分離することや、特定の試薬等でPGCをラベルすることが技術的に不可能なためであり、この事実は損傷に対して極めて弱く容易に細胞死にいたるPGCのもつ特性に起因すると考えられる(Tam and Snow, 1981)。本研究ではPGCのこのような特性を踏まえて、混合比率を幅広く設定した2時期混合実験や、逆にこの特性を利用した生殖隆起体細胞をフィーダー細胞として用いた実験によって、PGCの増殖停止現象がPGC自身の自律的制御による可能性を強く示した。

混合培養実験において増殖期PGCは増殖停止期の体細胞およびPGCが多くを占める培養条件下においても、自身の発生段階に依存した増殖パターンを示し、培養環境からの影響は見られなかった。また増殖停止期のPGCも増殖期のPGCと体細胞が多くを占める培養環境下でもこれらからの影響を受け再び増殖期に戻る、あるいは増殖停止が遅延する様な傾向は見られなかった。したがってシグナルを受けるPGC側にその受容能の時期特異的活性化機構(*switching*)が存在しない限り、増殖期のみ存在するPGC増殖因子や、増殖停止期に出現する増殖停止シグナルとして働く因子の存在は否定された。

通常のPGC培養時と比べ培養系に共存する体細胞密度が大幅に減少している単離培養実験においても、増殖期PGCの増殖率、増殖停止現象ともに通常培養条件下と同一の結果を示した(table 2, Fig. 6)。従って培養系内の共存体細胞密度が減少しても、PGCの増殖パターンにはほとんど影響しないと考えられる。この事実からも体細胞由来のPGC増殖制御シグナルは存在しないと考えられる。

以前Godin らによってTGF- β にPGCの増殖停止活性が存在し、実際に10.5日胚生殖隆起にTGF- β が存在し、10.5日胚生殖隆起の培養上清にその活性があるとの報告がなされた

(Godin *et al.*, 1991)。しかしながら本研究においてはこのような活性は検出されなかった。この相異はGodinらの実験において使用された培養上清が極めて高濃度と考えられること(生殖隆起10個を1mlの培養液で36時間培養して得た)、使用された精製TGF- β のPGC増殖抑制活性の見られた濃度(25 ng/ml 以上)がTGF- β が一般的な生理活性を示す濃度(100 pg/ml から5ng/ml 程度、Manning *et al.*, 1991; Samuel *et al.*, 1993; Denker *et al.*, 1995)に比べて異常に高いことなどに起因すると考えられ、彼らの行った実験は生体内を反映しているとは考え難い。しかしTGF- β は広く胚体内に存在し、生殖隆起にも存在することは示されている。したがって移動を終えて生殖隆起に侵入後(11.5 - 12.5日胚)自律的に増殖を停止するPGCに対して、2次的にTGF- β がその増殖の停止を助ける可能性が考えられる。

上記以外に、自律的制御が存在せずに、細胞間情報伝達によってこの増殖停止現象が引き起こされる場合を仮定してみる。混合培養実験系においては増殖期、増殖停止期両方の細胞が存在するため、そのような増殖あるいは増殖停止シグナルは常に存在する状態にある。増殖停止シグナルを想定した場合、8.5日胚由来PGCは増殖期の培養3日目までは増殖停止シグナルの受容体が無く(あるいは活性を失っている)、PGCは増殖を続け、培養3日目にその受容体が発現し、増殖停止シグナルが伝わって増殖を停止すると考えられる(Fig. 11B)。また逆にPGC増殖因子を想定した場合、11.5日胚由来PGCは培養開始から1日間はPGC増殖因子の受容体が存在し、このシグナルを受け取って増殖するが、1日目以降はこの受容体が消失して増殖シグナルが伝わらず、増殖を停止すると考えられる(Fig. 11A)。増殖シグナル、増殖停止シグナル両方を想定したが、どちらの場合にも情報の受け手であるPGC側のシグナル受容能の適正時期での切り替え(*switching*)が必要となる。従ってどちらのシグナルの存在を仮定してもこの増殖停止現象にはPGC側の適正時期における性質変化が不可欠である。このPGCの性質変化が仮に自律的ではないのであれば、更にその変化を誘導する外部からのシグナルを想定する必要性が生じる。しかもその誘導シグナルもまた、先に仮定した増殖シグナル、増殖停止シグナル同様に他時期のPGCに対しては効果があってはならない。このように考えると、この増殖停止現象を制御するために、時期特異性の高いシグナル分子を多種類想定する必要性が生じる。また本研究を含めPGCにおいてこのような複雑な制御を示唆する結果は現在までに報告されていない。逆にPGC側の自律的制御が

存在すれば、シグナル伝達が関与する制御を想定した場合も理解は容易である。

4-2 PGCはどのようにして時間を計っているのか

本研究の結果からPGCは体細胞やPGC同士の細胞間情報伝達を介さずに、発生段階にしたがった増殖停止を行うことが強く示唆された。そこでPGCは自律的に適正時期に増殖を停止していると考えられるが、細胞がどのようにして時間を計っているかについては、今までにいくつかの報告がある(french-Constant, 1994; Price, 1994)。

その中で最も解析の進んでいるものとしてラット視神経組織のグリア細胞前駆細胞であるO2A細胞の細胞分裂回数と分化時期が関係する例が挙げられる。この細胞はPDGFによる分化刺激後一定回数の細胞分裂を行った後、分裂を停止しオリゴエンドサイトへ分化する。この分裂回数はO2A細胞を取り出してきた胚の発生段階に依存し、早い時期の胚由来のものほど分裂回数が多いことが示された(Temple and Raff, 1986)。この結果から細胞が何らかの機能により分裂回数を数えており、それが分化のタイミングを規定しているという仮説が考えられる。

しかしながら本研究の単離培養実験の結果、増殖停止期までに1PGC由来のコロニーがとりうる細胞数(コロニーサイズや分裂回数)も、またコロニーサイズごとのコロニー数についても、示される数値には大きな幅とばらつきが見られた(Fig. 7)。この結果はPGCは一定回数の分裂後に一斉に分裂停止を起こすわけではなく、1PGC由来のコロニーの中に増殖期途中で増殖を停止するPGCあるいは消失するPGCが混在して現れていたことを示している。したがってこのPGCの増殖停止現象と個々のPGCの分裂回数との間には密接な関連はないと考えられる。更に、過去にいくつかのPGCの増殖を活性化する成長因子や培養上清についての報告があるが、これらの因子は増殖期PGCの増加率は上昇させるが増殖停止時期には影響しない(Godin *et al.*, 1990; Matsui *et al.*, 1992; De Felici *et al.*, 1993; Dolci *et al.*, 1993; Kawase *et al.*, 1994; Koshimizu *et al.*, 1995)。この結果から特定の成長因子によって分裂回数が増加してもPGCの増殖停止時期は早まらないと考えられ、細胞分裂回数と増殖停止時期には相関がない事がこの結果から示される。

また本研究において8.5日胚由来のPGCは培養下で細胞形態の変化を進行させることが

示された。これらの研究結果とPGCの示す細胞形態より、移動期から定着期にかけて、PGCは伸長型(移動期型)から拡張型を通して丸型(定着型)に形態変化を行っていると考えられる(結果3-3節)。実際8.5日胚由来のPGCは生殖隆起に侵入する11.5日胚に相当する培養3日目からその細胞形態移行を始める。移動期から定着期にある10.5日から12.5日胚のPGCをそれぞれ取り出し、培養に移し観察を行うと、取り出した時期ごとに細胞形態が異なるという結果が報告されているが(Donovan *et al.*, 1986)、これらの結果より本研究で見られた培養下のPGC形態変化は生体内で起こっているPGC分化を、形態的にも時間的にも反映している現象と考えられる。また本研究の結果からPGCが自律的に自身の形態変化を進行させていると予想される。また注意すべき点としてこれらの形態変化は1PGC由来のコロニー内において同時期に一斉に起こる訳ではなく、同一コロニー内においても3形態混在しながら徐々にその形態変化を進行すると考えられる(Fig. 9A-C)。この事実は先述の単離培養実験によって示された、増殖停止は増殖期の同一コロニー内においてもまばらに起きている事実と一致している。またコロニーサイズと3形態の存在比率にも関係は見られず、むしろ3形態の存在比率は培養日数に依存した傾向を示した。つまりこの形態変化においても増殖停止同様に分裂回数との相関は見られなかった。

これらの結果より、形態変化や増殖停止の現象は、時間によって制御された確率的事象である可能性が考えられる。つまりPGCの増殖停止は発生段階にしたがって増大する確率でPGCにもたらされる現象であり、この確率が増殖停止期の11.5日から12.5日胚で最大となるために見掛け上増殖停止となる。また細胞形態の移行についても同様に移動期初期から丸型および拡張型はみられるが数は少なく、培養3日目以降丸型への移行の確率が最大になった結果であると考えられる。このような確率変動型細胞分化仮説に沿った細胞分化の例は様々な細胞の分化におい示されており、現在までに血球(Gusella *et al.*, 1976; Gordon and Blackett, 1994)、色素細胞(Bennet, 1983)、表皮角質細胞(Rheinwald and Beckett, 1980; Levenson and Housman, 1981)、嗅覚神経細胞(Rospars and Lansky, 1993)などの報告がある。PGCにおける増殖停止や形態変化がこのような仮説に従った現象であれば、単離培養実験で示された、コロニーサイズやサイズ毎のコロニー数には大きなばらつきが見られるが、全体としては4日目に増殖のピークを迎えるという結果や、コロニーサイズによらずには

は同比率で3形態のPGCが1PGC由来のコロニー内に存在し、かつ同様の存在比率変化を示すという結果は容易に理解しうる。

以上の考察からPGCは移動期において、増殖停止時期や細胞形態変化時期(分化時期)についてあらかじめ確率論的機構で運命づけられているものと考えられ、この進行には周囲の体細胞からの制御は必要としないと考えられる。生体内においてはPGCの生存に必須であることが現在明らかになっている *Steel factor* や、生殖隆起に存在する TGF- β などの分泌型因子の作用と上記のようなPGC側に備わるプログラムが組み合わさって増殖分化が進行すると考えられる(Jessell and Melton, 1992)。

4-3 PGC集団は均質であるか

8.5日胚由来の増殖期PGCの単離培養の結果、そのコロニーサイズは幅広く、特に増殖の早い集団はみられなかった(Fig. 7)。特に11.5日胚生殖隆起由来の増殖停止期をむかえる時期のPGCは培養1日目は半数以上(64%)が増殖を示したが、培養2日目以後は全てのPGCが増殖停止を示し、増殖を続ける集団は全くみられなかった(Fig. 8)。これらの結果から、増殖期PGCはその増殖能においてはかなりのばらつきを持った集団で、特にその増殖能からいくつかの集団に分類することは難しい。また増殖停止期以後の増殖能や生存能についてはほぼ均質な集団と考えられる。

PGCを特定の培養条件下で培養することにより、一部のPGCからEG細胞(embryonic germ cell)と呼ばれるPGC由来の胚幹細胞様の全能性を持つ不死化細胞が得られる事が既に報告されている(Matsui *et al.*, 1992; Resnick *et al.*, 1992; Koshimizu *et al.*, 印刷中)。このことからPGCには少なくともEG細胞になり得る能力を持つものと、なりえないものの2種に分けられる可能性がある。しかしながら8.5日胚由来PGCを用いた単離培養実験からは明らかに異なる増殖能を示すPGC集団はみられなかった。増殖期における細胞形態変化においても特にEG細胞様の細胞形態を示す集団は確認されなかった。しかしながら8.5日胚由来PGCの単離培養実験において、増殖停止期後の培養5日目にみられるPGCのなかに特徴的な細胞同士が密接したコロニー(密接型コロニー)を形成する集団がみられた(Fig. 9D)。培養5日目には拡張型形態のPGCからなるコロニーが多くみられるようになるが、これら

の密接型コロニーも拡張型PGCによって構成されていた。また培養5日目に至ってもまだ増殖していると考えられるPGCコロニーが5個発見されたが(3-2-1)、これらはいずれもこの拡張型PGCから成る密接型コロニーであった。このような細胞移動を示さないと考えられる密接型コロニーは上記のEG細胞のコロニーにみられる特徴である(Matsui *et al.*, 1992; Resnick *et al.*, 1992; Koshimizu *et al.*, 印刷中)。しかしながらコロニーを構成する細胞形態は明らかに拡張型PGCが大部分を占め、EG細胞の細胞形態(丸型と考えられる)とは異なる。実際この様な培養系で長期にわたるPGCの培養は行ってはいないため、これらの細胞がこのまま増殖を続けるかについては不明である。さらにこの様なPGCは11.5日胚生殖隆起由来PGCを用いた単離培養実験では全くみられなかったこと、EG細胞が11.5日胚よりも8.5日胚由来PGCから樹立されやすいこと、また密接型コロニーというEG細胞と似た特徴を持つ事からも、増殖期PGCに極少数存在するこれらのタイプのPGCは大変興味深い。

8.5日胚由来PGCの単離培養実験の増殖停止期後の培養5日目に拡張型PGC比率の増加が見られるが(Fig. 10)、これは伸長型から丸型への移行が起こった結果、伸長型PGC数が減少し、また丸型PGCはこの培養条件では生存維持は困難で死滅していくと考えられ、これらの結果として拡張型が最も高頻度にみられるようになったためと考えられる。またこの丸型PGCにおいてはPGCの生存維持に必須である *Steel factor* の受容体である *c-kit* の発現が減少していることから(小清水ら、未発表)、PGCの自律的分化によって *c-kit* の発現が低下し、その結果として生存維持能が低下した可能性が予想される。いずれにせよ丸型PGCに分化したPGCはこれまでの培養条件下では生存を続けられないと考えられ、この時期以降のPGCの分化を研究するためには新たな培養実験系の確立が期待される。

5 引用文献

- Bennett, D. C. (1983). Differentiation in mouse melanoma cells: Initial reversibility and an on-off stochastic model. *Cell* 34, 445-453.
- Brannan, C. I., Lyman, S. D., Williams, D. E., Eisenman, J., Anderson, D. M., Cosman, D., Bedell, M. A., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (1991). Steel-Dickie mutation encodes a c-Kit ligand lacking transmembrane and cytoplasmic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4671-4674.
- Coucouvani, E. C. and Jones, P. P. (1993). Changes in protooncogene expression correlated with general and sex-specific differentiation in murine primordial germ cells. *Mech. Dev.* 42, 49-58.
- De Felici, M., Dolci, S. and Pesce, M. (1993). Proliferation of mouse primordial germ cells *in vitro* : A key role for cAMP. *Dev. Biol.* 157, 277-280.
- De Felici, M. and McLaren, A. (1983). *In vitro* culture of mouse primordial germ cells. *Exp. Cell Res.* 144, 417-427.
- Denker, A. E., Nicoll, S. B. and Tuan, R. S. (1995). Formation of cartilage-like spheroids by micromass culture of murine C3H10T1/2 cells upon treatment with transforming growth factor-beta 1. *Differentiation.* 59, 25-34.
- Dolci, S., Pesce, M. and De Felici, M. (1993). Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on *in vitro* proliferation of mouse primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 35, 134-139.
- Dolci, S., Williams, D. E., Ernst, M. K., Resnick, J. L., Brannan, C. I., Lock, L. F., Lyman, S. D., Boswell, H. S. and Donovan, P. J. (1991). Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352, 809-811.
- Donovan, P. J., Scott, D., Carnis, L. A., Heasman, J. and Wylie, C. C. (1986). Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44, 831-838.
- French-Constant, C. (1994). How do embryonic cells measure time? *Curr. Biol.* 4, 415-419.
- Flanagan, J. G., Chan, D. C. and Leder, P. (1991). Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the *Sld* mutant. *Cell* 64, 1025-1035.
- Ginsburg, M., Snow, M. H. L. and McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521-528.
- Godin, I., Deed, R., Cooke, J., Zsebo, K., Dexter, M. and Wylie, C. C. (1991). Effects of the *steel* gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 352, 807-809.

- Godin, I., Wylie, C. and Heasman, J. (1990). Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108 , 357-363.
- Godin, I. and Wylie, C. C. (1991). TGF- β 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture. *Development* 113 , 1451-1457.
- Gordon, M. Y. and Blackett, N. M. (1994). Routes to repopulation - a unification of the stochastic model and separation of stem-cell subpopulations. *Leukemia* 8, 1068-1073.
- Gusella, J., Geller, R., Clarke, B., Weeks, V. and Housman, D. (1976). Commitment to erythroid differentiation by friend erythroleukemia cells: a stochastic analysis. *Cell* 9, 221-229.
- Jessell, T. M. and Melton, D. A. (1992). Diffusible factors in vertebrate embryonic induction. *Cell* 68 , 257-270.
- Kawase, E., Yamamoto, H., Hashimoto, K. and Nakatsuji, N. (1994). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Dev. Biol.* 161 , 91-95.
- Keshet, E., Lyman, S. D., Williams, D. E., Anderson, D. M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. and Parada, L. F. (1991). Embryonic RNA expression patterns of the *c-kit* receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J.* 10, 2425-2435.
- Koshimizu, U., Watanabe, M. and Nakatsuji, N. (1995). Retinoic acid is a potent growth activator of mouse primordial germ cells *in vitro*. *Dev. Biol.* 168 , 683-685.
- Koshimizu, U., Taga, T., Watanabe, M., Saitoh, M., Shirayoshi, Y., Kishimoto, T. and Nakatsuji, N. (1996). Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells in vitro and derivation of embryonic germ (EG) cells. *Development* in press.
- Levenson, R. and Housman, D. (1981). Commitment: How do cells make the decision to differentiate? *Cell* 25 , 5-6.
- Manning, A. M., Williams, A. C., Game, S. M. and Paraskeva, C. (1991). Differential sensitivity of human colonic adenoma and carcinoma cells to transforming growth factor beta (TGF- β): conversion of an adenoma cell line to a tumorigenic phenotype is accompanied by a reduced response to the inhibitory effects of TGF- β . *Oncogene* 60 , 1471-1476.
- Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K. and Hogan, B. L. M. (1991). Effect of *Steel* factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353 , 750-752.

- Matsui, Y., Zsebo, K. and Hogan, B. L. M. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.
- Matsui, Y., Zsebo, K. M. and Hogan, B. L. M. (1990). Embryonic expression of a hematopoietic growth factor encoded by the *Sl* locus and the ligand for *c-kit*. *Nature* 347, 667-669.
- Nakatsuji, N. (1992). Development of postimplantation mouse embryos: Unexplored field rich in unanswered questions. *Dev. Growth Differ.* 34, 489-499.
- Ogawa, M., Matsuzaki, Y., Nishikawa, S., Hayashi, S. I., Kunisada, T., Sudo, T., Kina, T., Nakauchi, H. and Nishikawa, S. I. (1991). Expression and function of *c-kit* in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.* 174, 63-71.
- Price, J. (1994). Glial cell lineage and development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4, 680-686.
- Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L. and Donovan, P. J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550-551.
- Rheinwald, J. G. and Beckett, M. A. (1980). Defective terminal differentiation in culture as a consistent and selectable character of malignant human keratinocytes. *Cell* 22, 629-632.
- Rospars, J. P. and Lansky, P. (1993). Stochastic model neuron without resetting of dendritic potential: application to the olfactory system. *Biol. Cybern.* 69, 283-294.
- Samuel, S. K., Hurta, R. A., Spearman, M. A., Wright, J. A., Turley, E. A. and Greenberg, A. H. (1993). TGF- β 1 stimulation of cell locomotion utilizes the hyaluronan receptor RHAMM and hyaluronan. *J. Cell Biol.* 123, 749-758.
- Tam, P. P. L. and Snow, M. H. L. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* 64, 133-147.
- Temple, S. and Raff, M. C. (1986). Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture: evidence for a developmental clock that counts cell divisions. *Cell* 44, 773-779.
- Williams, D. E., Venis, P., Namen, A. E., Widmen, M. B. and Lyman, S. (1992). The *Steel* factor. *Dev. Biol.* 151, 369-376.
- Wylie, C. C. and Heasman, J. (1993). Migration, proliferation and potency of primordial germ cells. *Sem. Dev. Biol.* 4, 161-170.
- Yoshinaga, K., Nishikawa, S., Ogawa, M., Hayashi, S. I., Kunisada, T., Fujimoto, T. and Nishikawa, S. (1991). Role of *c-kit* in mouse spermatogenesis:

identification of spermatogonia as a specific site of *c-kit* expression and function.
Development 113 , 689-699.

6 图表

Table 1 Number of PGCs and somatic cells in the tissues
dissected out from embryos at 8.5 and 11.5 dpc

tissue	PGC number	total cell number	PGC %
8.5 d.p.c. 1unit (1/2 embryo)	~30	~ 2.0×10^4	0.15
11.5 d.p.c. 1unit(1/4 embryo)	~500	~ 3.0×10^4	1.67

Table 2 Density of somatic cells
in the clonal culture and usual mass culture

a plated cell number/well	b diameter of culture well	a / b cell/mm ²
mass culture 2 × 10 ⁴ (1/2 embryo)	16mm Nunc 4 well plate	24.9
clonal culture 267 (limiting dilution)	6.4mm Corning 96 well plate	2.1

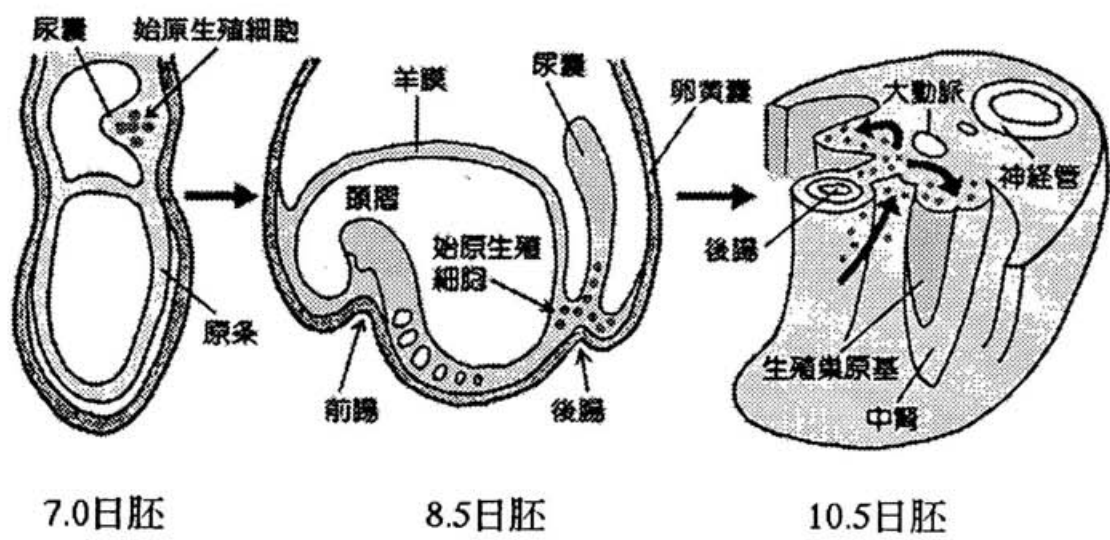
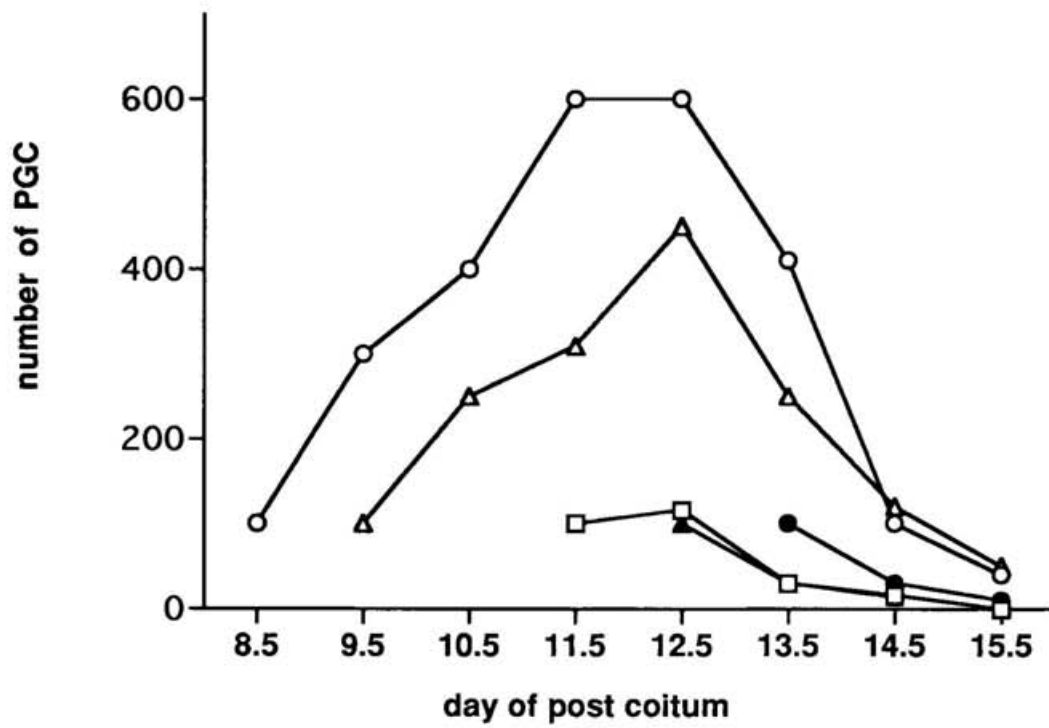


Fig. 1 PGCの出現と移動



取り出してきた胚の胎生日数

—○— 7.5 dpc

—△— 8.5 dpc

—□— 10.5dpc

—▲— 11.5dpc

—●— 12.5dpc

Fig. 2 発生段階ごとに取り出したPGCの培養下で見られる増殖停止

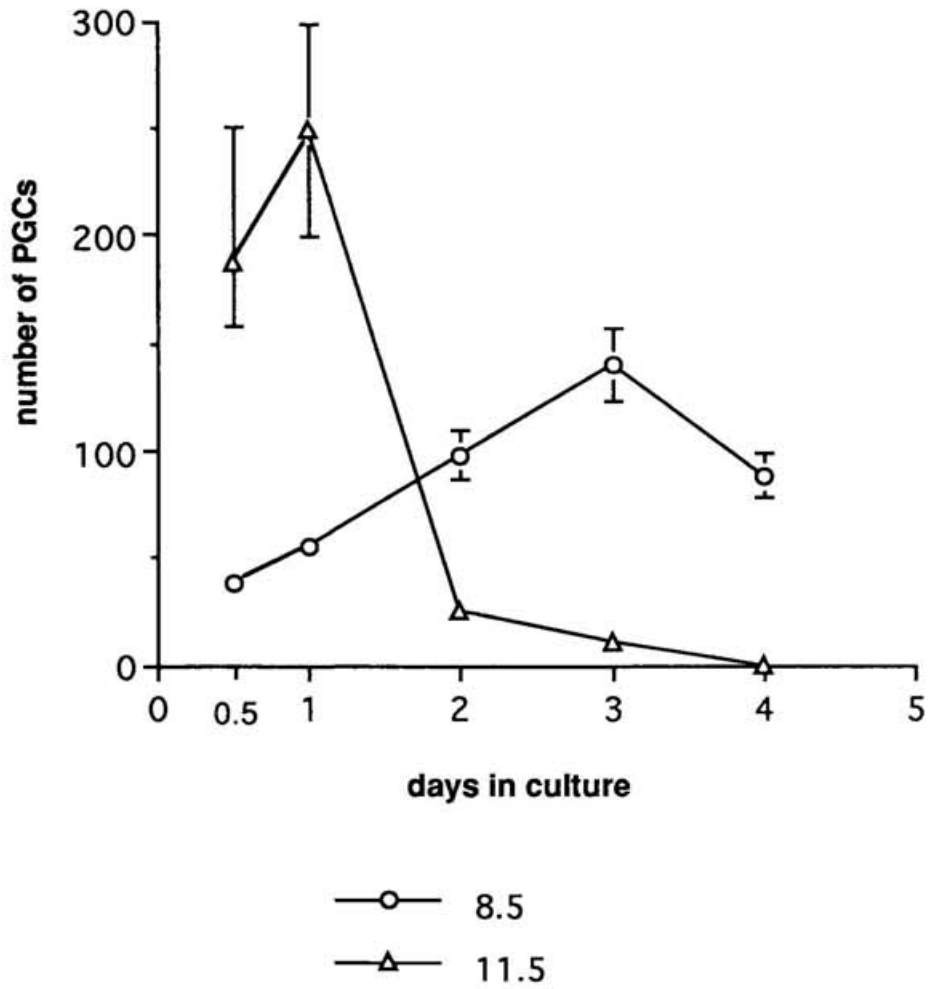


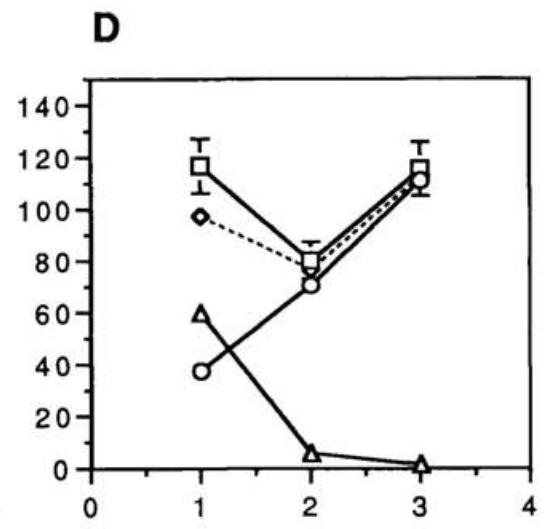
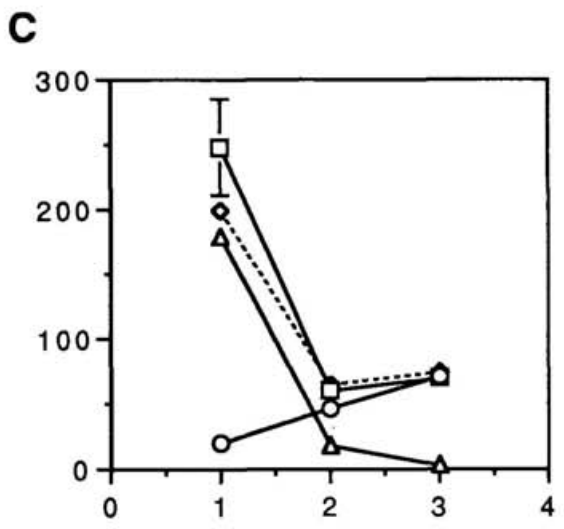
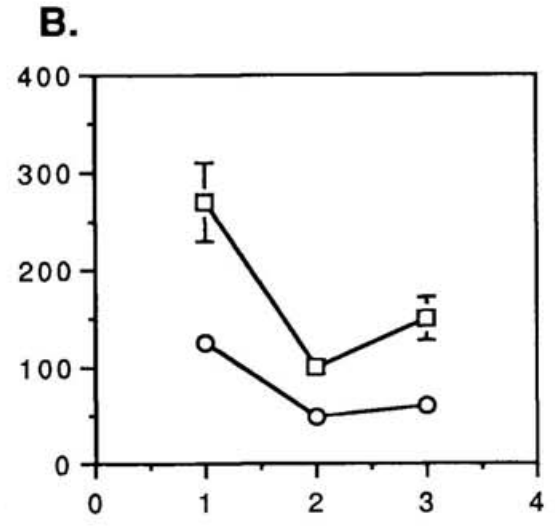
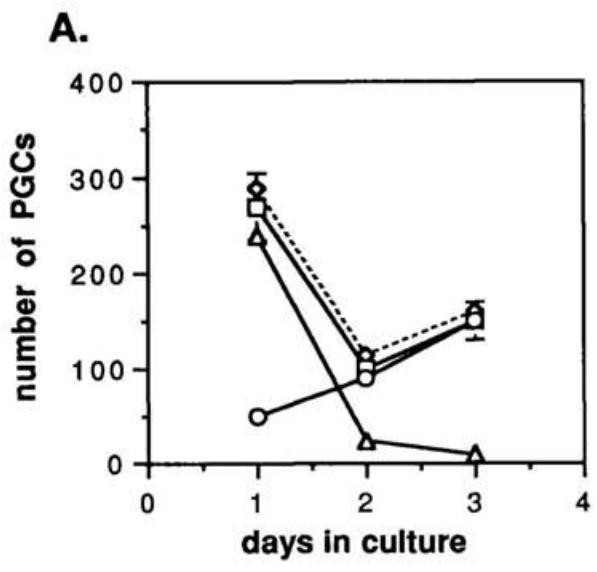
Fig. 3 8.5 日胚由来PGCと11.5日胚由来PGCの増殖曲線

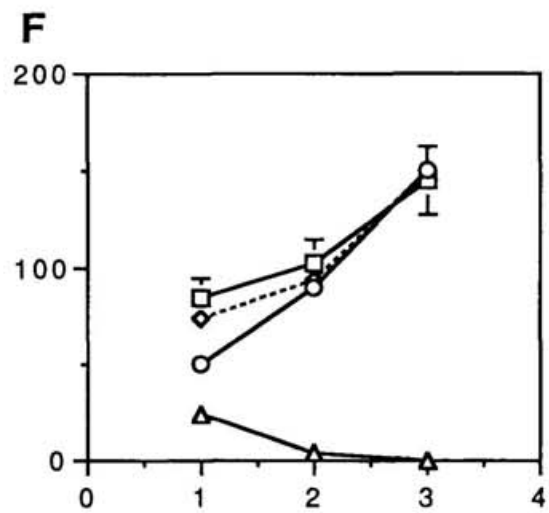
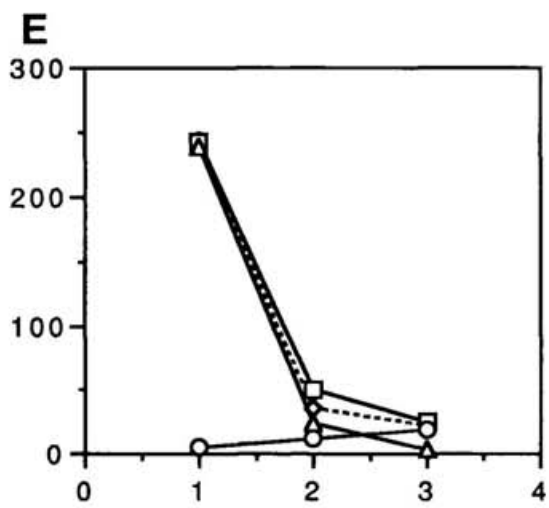
Fig. 4 混合培養実験によるPGC数の変動

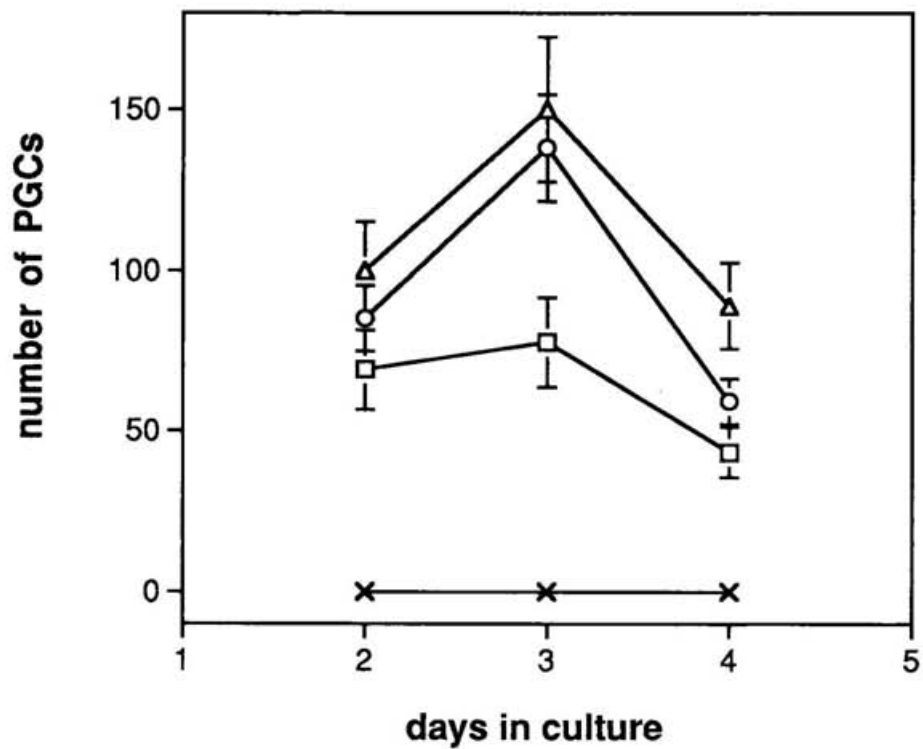
A. 1:1混合 ; ○、8.5日胚由来PGC1unit単独培養; △、11.5日胚由来PGC1unit単独培養; □、8.5日胚由来PGC1unitと11.5日胚由来PGC1unitの混合培養; ◇、8.5日胚由来PGC1unit単独培養と11.5日胚由来PGC1unitの単独培養のPGC数の和

B. 1:1混合と1/2:1/2混合の比較。傾向は変わらない。□、1:1混合; ○、1/2:1/2混合

C. - F. 各比率での混合培養、C、8.5日胚由来PGC1/4unitと11.5日胚由来PGC3/4unitの混合培養; D、同3/4対1/4unit; E、同1/10対1unit; F、同1対1/10unit.







○、11.5日胚生殖隆起体細胞を1/2量、STO細胞を1/2量feederとして培養したもの；△、全てSTO細胞をfeederとして培養したもの；□、STO細胞を1/2量のみfeederとして培養したもの；×、11.5日胚生殖隆起細胞を1/2量、STO細胞を1/2量feederとして調製しPGC培養を行わなかったもの

Fig. 5 11.5日胚生殖隆起体細胞をfeeder cellとして用いた
8.5日胚由来PGC培養実験

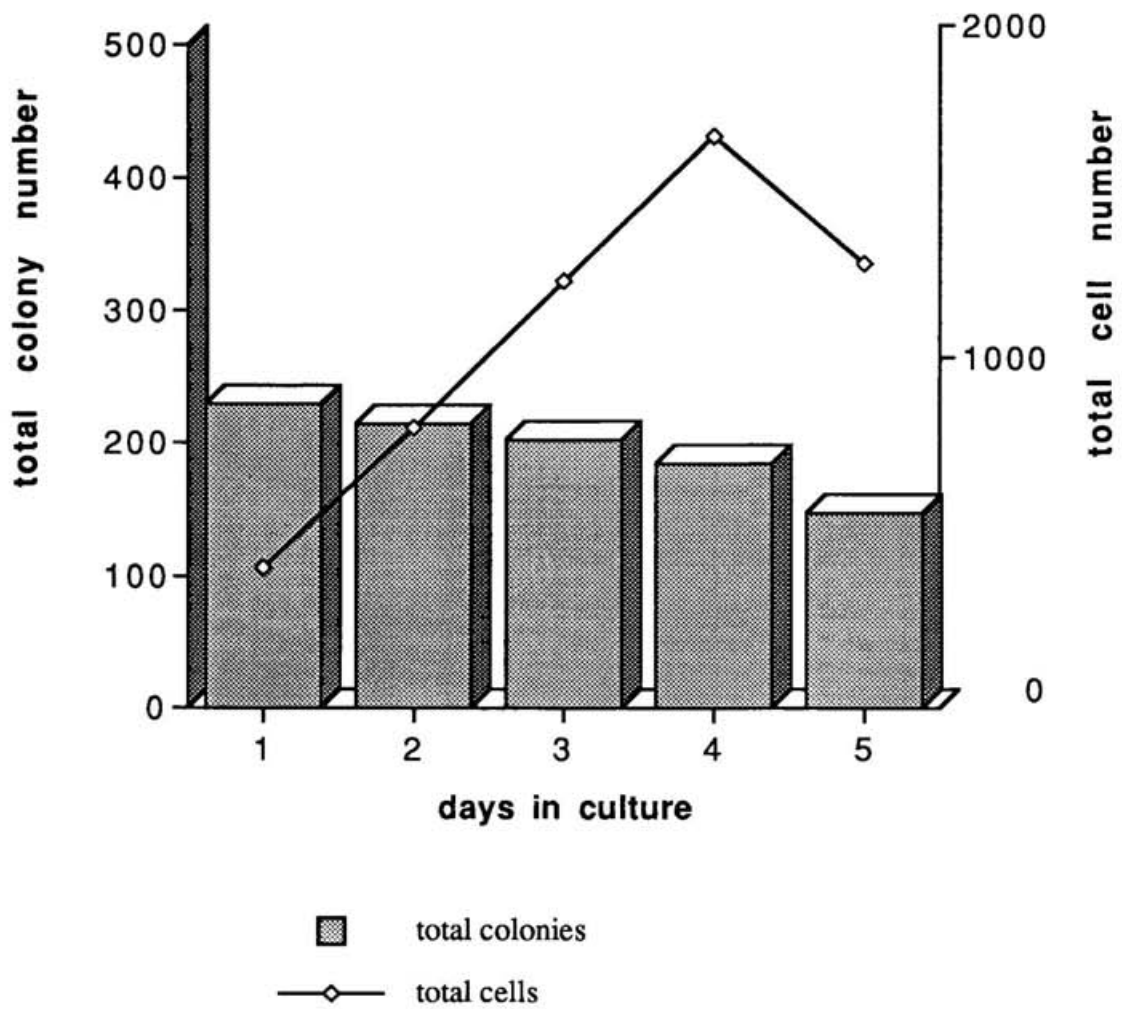
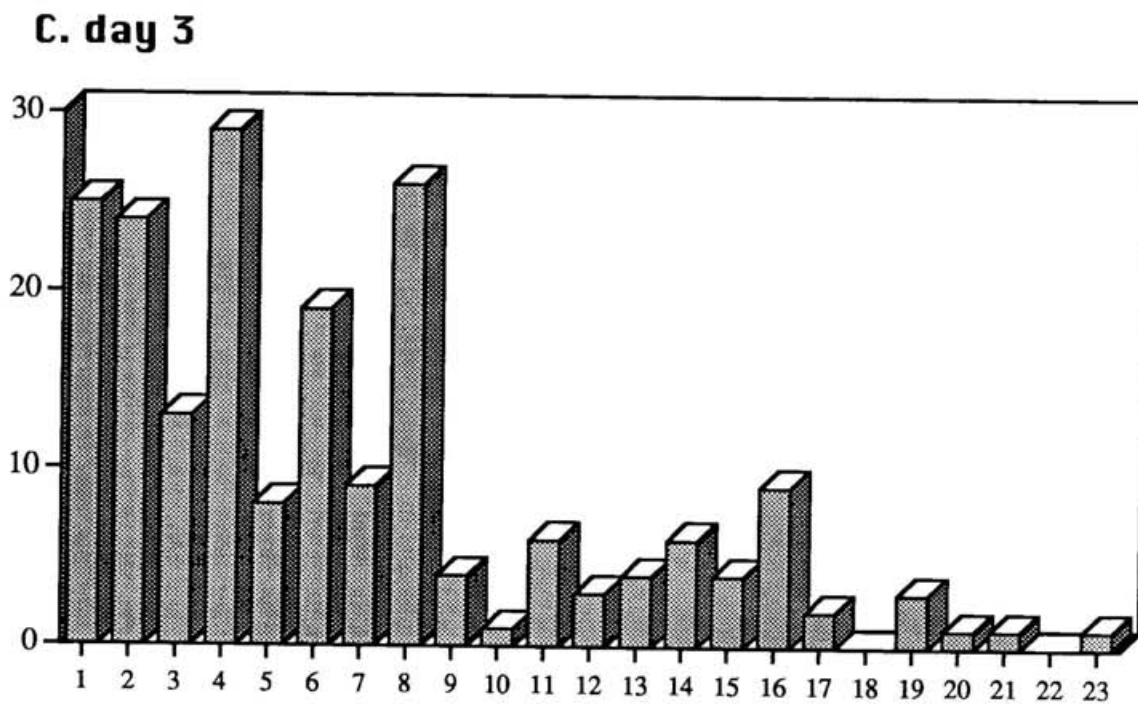
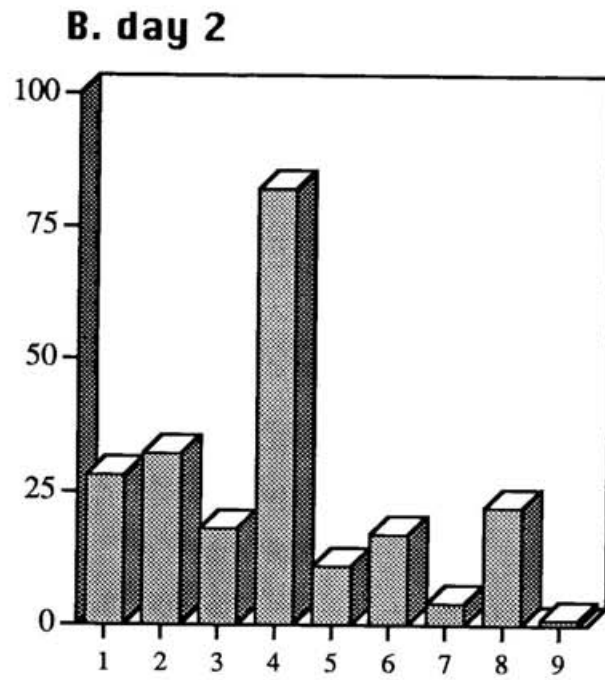
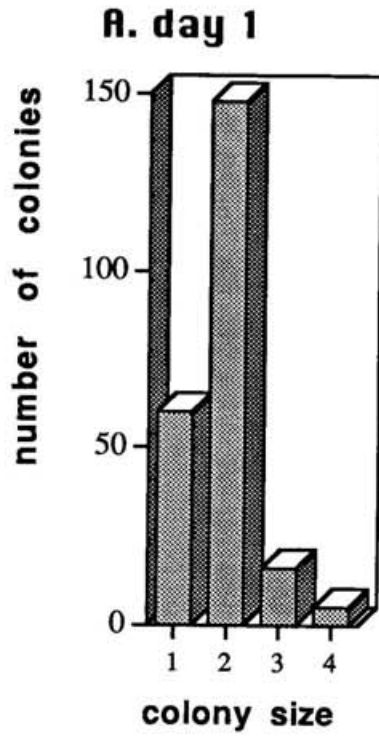


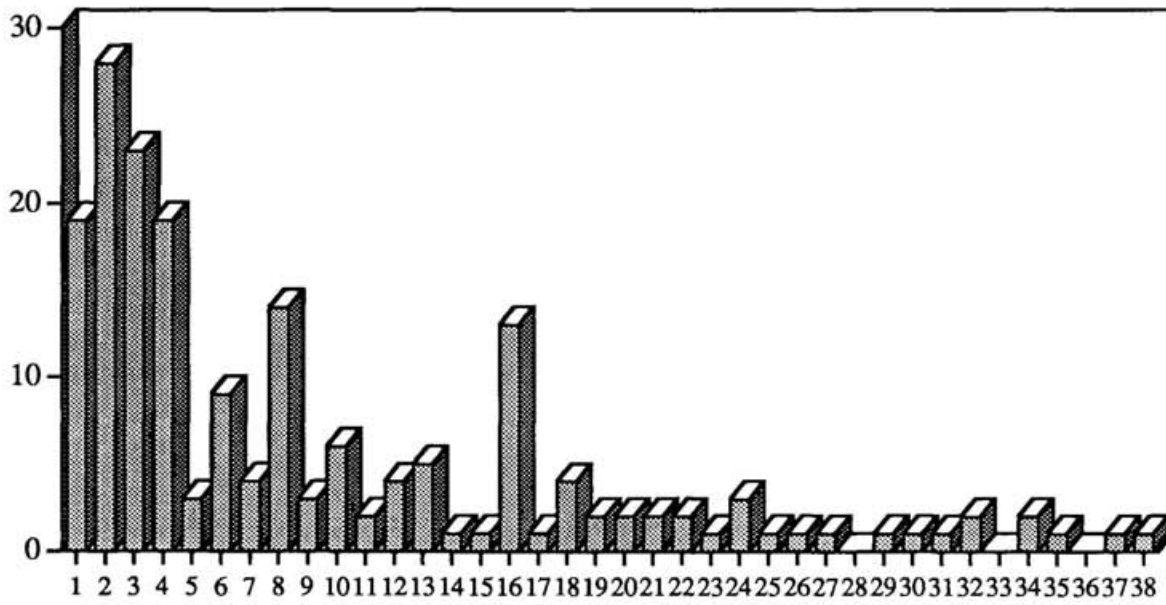
Fig. 6 8.5 日胚由来PGC単離培養実験における PGC総数とコロニー数の変化

Fig. 7 8.5日胚由来PGC単離培養におけるコロニーサイズの分布
縦軸がコロニー数、横軸はコロニーサイズを示す。

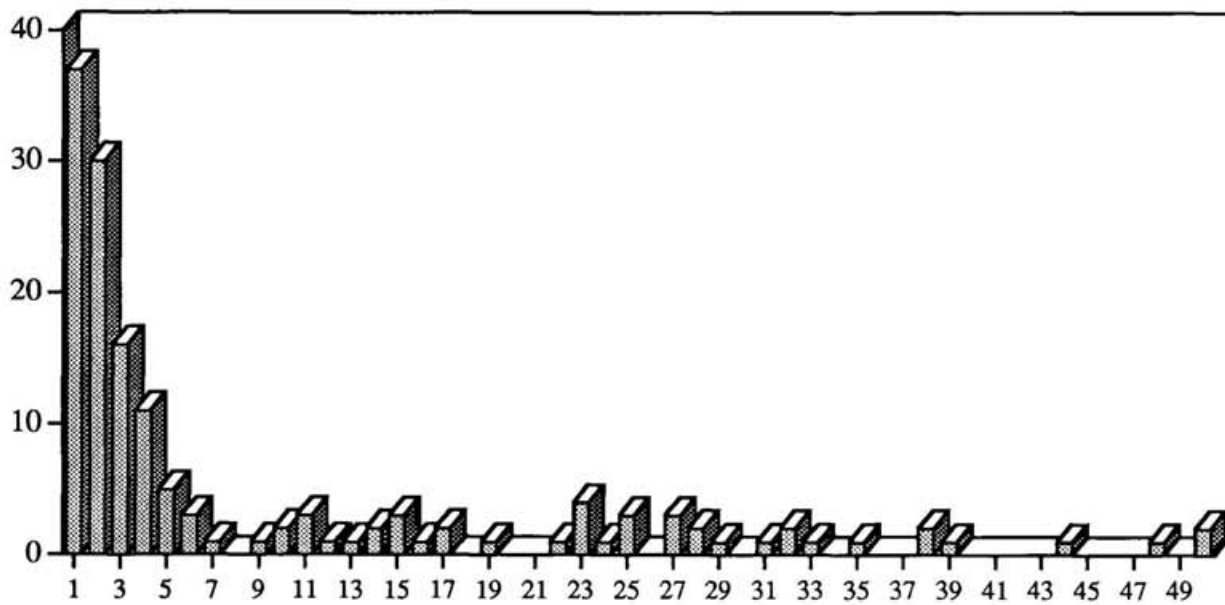
A. 培養 1 日目; B. 2 日目; C. 3 日目; D. 4 日目; E. 5 日目



D. day 4



E. day 5



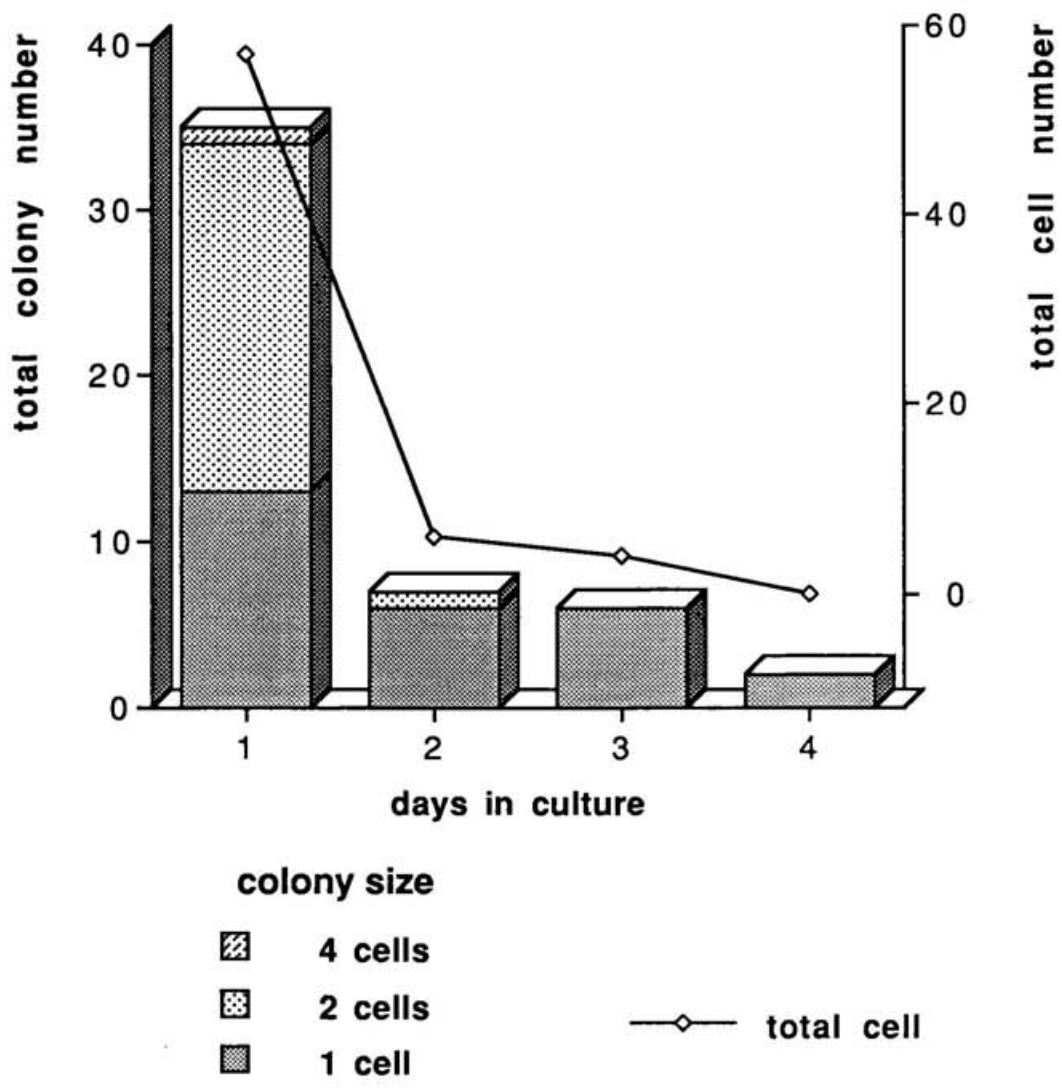
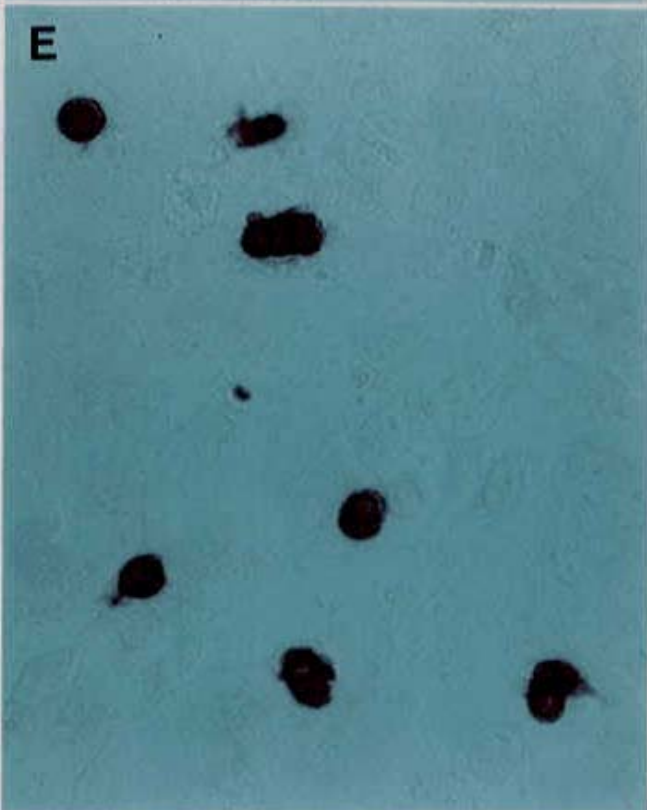
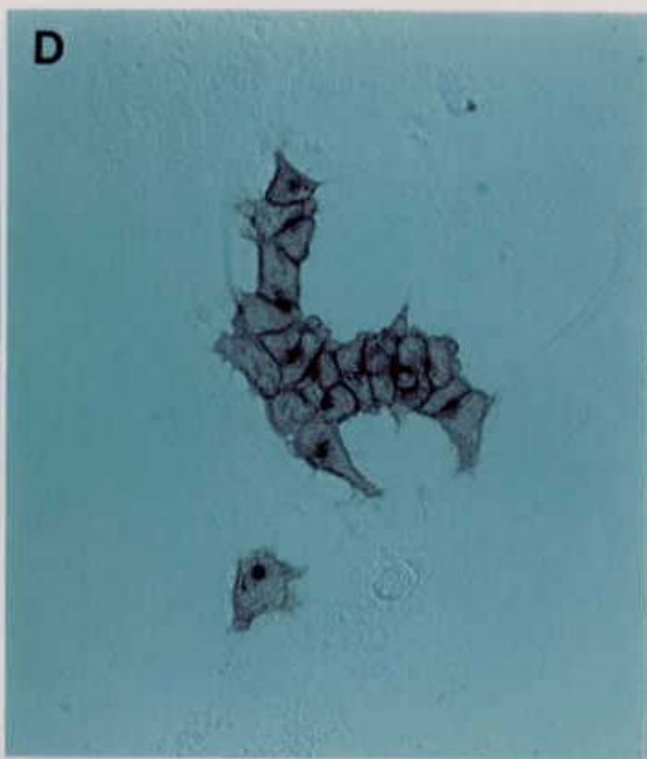
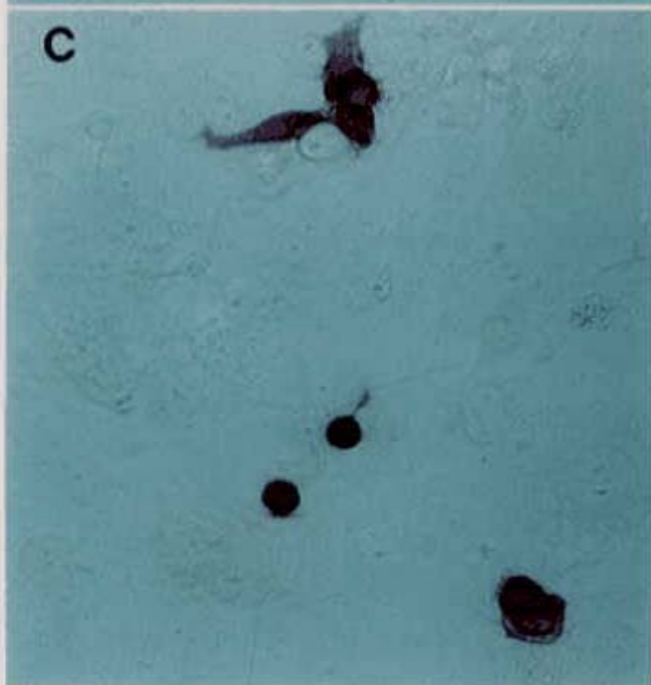
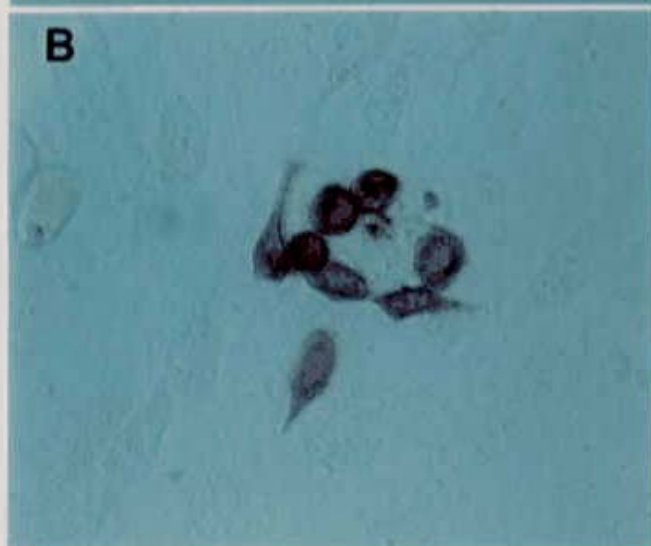
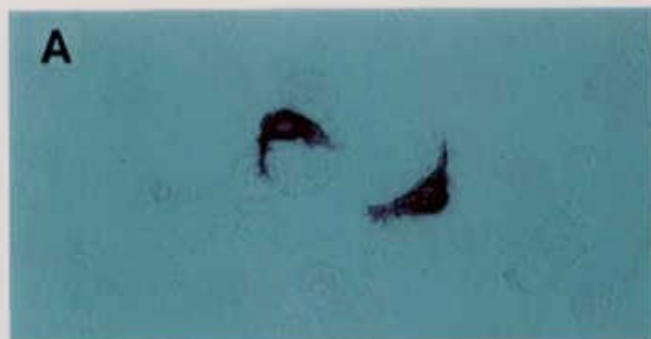


Fig. 8 11.5 日胚由来PGC単離培養実験における PGC総数とコロニー数の変化

Fig. 9 8.5日胚由来PGCの単離培養下で見られる細胞形態の変化
A, 培養1日目に多く見られる伸長型PGC; B, 培養3日目; C,
培養4日目、3種の細胞形態が混在して見られる; D, 培養
5日目に見られた拡張型PGCより成る密接型コロニー; E,
11.5日胚生殖隆起由来PGCの培養1日目、丸型PGCが大多
数を占める



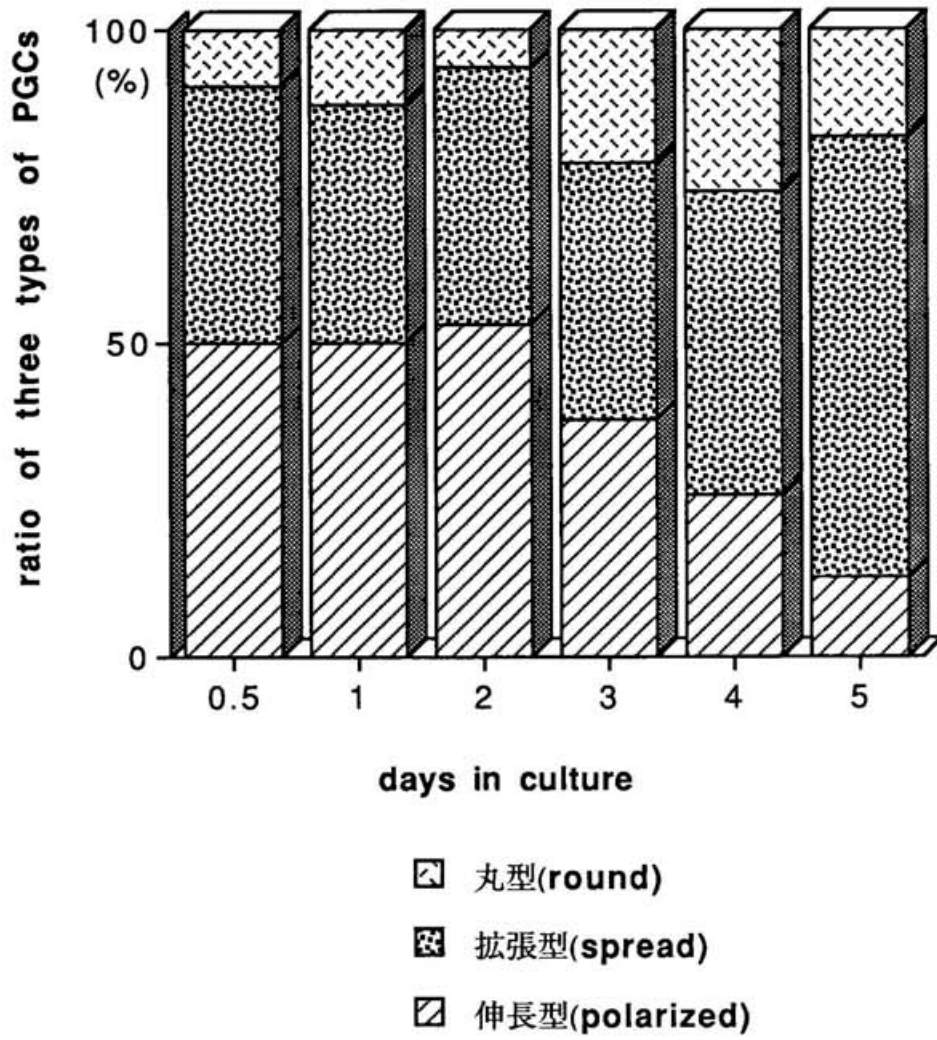


Fig. 10 8.5 日胚由来PGCの培養下で見られる
3形態のPGCの存在比率変化

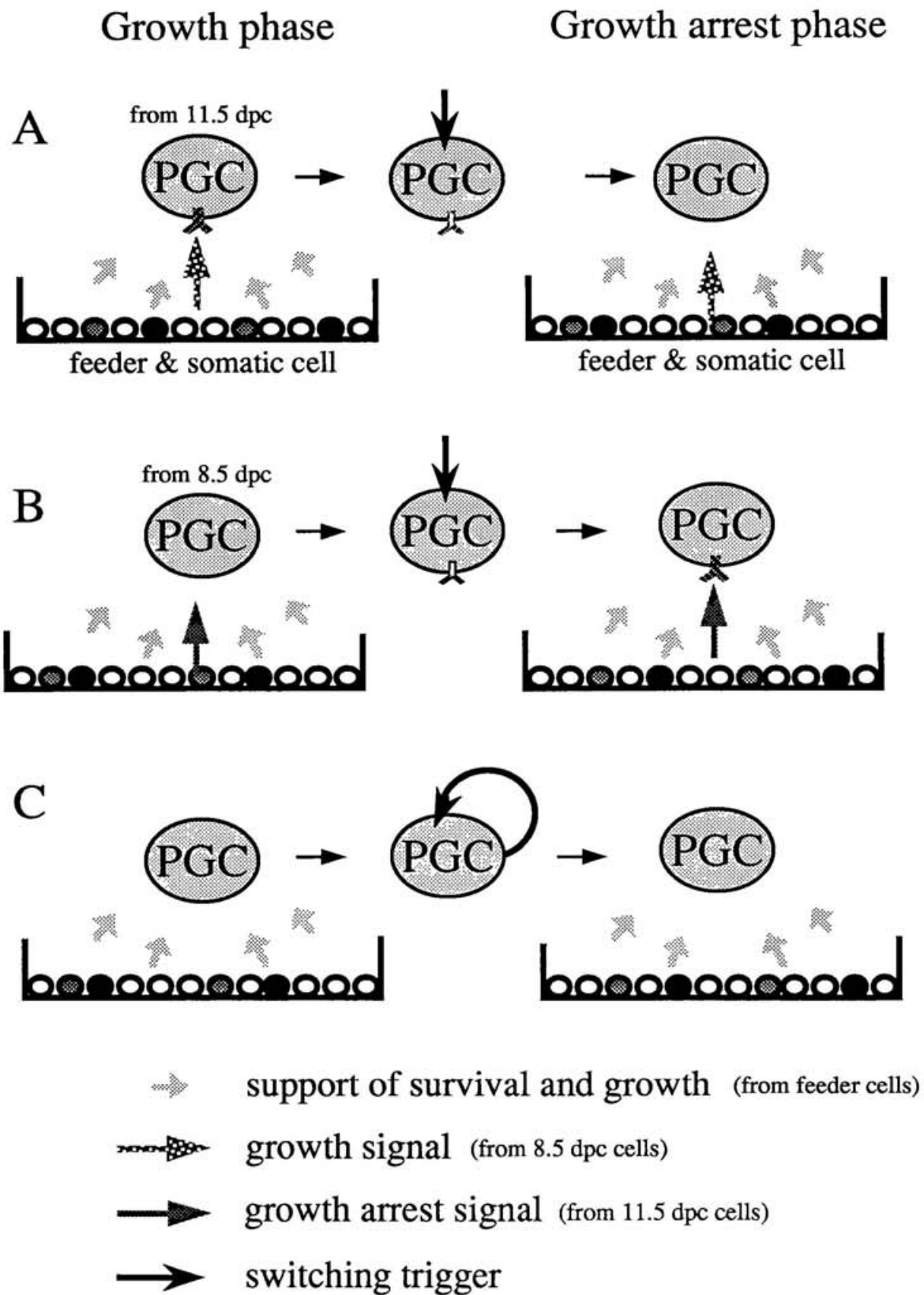


Fig. 11 混合培養実験における
増殖停止機構の仮説

第2部

神経上皮由来細胞株を用いた

中枢神経系細胞分化の解析

1 序論

きわめて複雑な構造をとる中枢神経系も1層の神経上皮に由来する。マウス胚においては胎生7.5日目に出現する神経上皮細胞は増殖しつつ形態形成を行い、9.0から10.0日胚では神経管を形成する。やがてこの管は肥厚し、複雑に屈曲して脳を形成する。この脳を構成する細胞が神経細胞とグリア細胞である。発生時の脳は脳室と呼ばれる内腔を持ち、この周りの脳室周囲層(Ventricular zone; VZ)に神経系細胞の幹細胞が存在し、これらが神経細胞やグリア細胞に分化する細胞を産み出しながら増殖を続け、脳は成長してゆく(Jacobson, 1991) (Fig. 1)。マウスの発生時の脳においては10日胚で最初の神経細胞の分化が見られ、その後にグリア細胞の分化が見られる(Jacobson, 1991; Easter *et al.*, 1993; Wood *et al.*, 1992)。これらの神経系細胞の細胞系譜については今までに多くの研究がなされており、ラット16日胚(マウス15日胚相当)の予定大脳領域VZの幹細胞は既に数種類にその発生運命が分かれている事が報告されている(Walsh and Cepko, 1992; Grove *et al.*, 1993)。しかしより発生段階の早いラット13.5から14.5日胚(マウス12.5から13.5日胚相当)およびマウス10.5日胚の神経上皮から得られた細胞は、神経細胞とグリア細胞の両方の細胞への分化能を保持していた(Cattaneo and McKay, 1990; Kilpatrick and Bartlett, 1993)。これらの事実は単離細胞の分化能を調べた培養実験と β ガラクトシダーゼをもちいた細胞標識実験からも明らかにになっている(Ogawa *et al.*, 1992; Sanes *et al.*, 1989)。

神経細胞への細胞分化について最もよく解析されているのはショウジョウバエの神経細胞分化である。様々な神経細胞変異体を用いた研究から神経細胞、グリア細胞への分化に関わる重要な遺伝子がいくつか発見され、これらの解析から神経細胞分化は未分化外胚葉細胞からproneural stage、neurogenic stageといったいくつかの分化段階を経て最終分化へ進行することが示唆されている(Artavanis-Tsakonas and Simpson, 1991; Jan and Jan, 1993, 1994; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995)。神経細胞分化の様々な共通点からこのような段階的分化決定の進行についてはショウジョウバエのみならず、哺乳類においても同様の機構の存在が予想される(Nye and Kopan, 1995; Bally-Cuif and Wassef, 1995; Calof, 1995; Simpson, 1995)。最近神経分化に関わるHLH型転写因子*Neuro D*の発見がマウス、ニワトリ、ゼノパスで報告され、やはり脊椎動物でもショウジョウバエ同様HLH型転写因子が神経細胞分化にお

いて重要な役割を果たすことが示唆され(Lee, 1995; Anderson, 1995)、神経細胞の発生分化においても多くの共通点が種を越えて存在するであろう事が示された。

しかしながら脊椎動物にみられる神経上皮分化と神経細胞分化についてはいまだ不明な点が多い。遺伝的解析についても高等動物であるほど中枢神経系の異常は致死に至りやすいため、マウス変異体の報告例は無脊椎動物に比べて少ない(Johnson and Snider, 1995, Strachan and Read, 1994; Silos-Santiago *et al.*, 1995)。また神経系細胞は初代培養が難しいことや、胚を用いた研究においては得られる細胞数が少ない点から、神経細胞分化機構を生化学的、分子生物学的手法で解析をする上で難点が多い。そこで本研究ではマウス胚のこのような中枢神経細胞分化の最も初期と思われる時期の神経上皮細胞から細胞株を多数樹立してそれらの細胞分化能から神経上皮の分化決定段階について解析し、さらにこれらの神経分化初期段階の細胞株の胚への脳内移植実験系の確立を目的として細胞株樹立を行った。

中枢神経系由来細胞株については今までにもマウス、ラットを含めていくつかの報告例がある(Cepco, 1989; Lendahl and McKay, 1990; Ryder *et al.*, 1990; Renfranz *et al.*, 1991; Eves *et al.*, 1992; Frisa *et al.*, 1994; Nakafuku and Nakamura, 1995)。しかしこれら報告されている株細胞は全て神経細胞分化の既に進行している時期(マウス11.5日胚以後)の中枢神経組織を用いて株化されている。既に報告のある細胞株の内、比較的発生早期の胚より樹立された細胞はMcKayらによってラット16日胚海馬より樹立されたHiB5細胞株であるが、この細胞は培養条件下では未分化神経幹細胞様の性質を保持し、神経幹細胞マーカーである中間径フィラメントネスチンの発現が検出された(Renfranz *et al.*, 1991)。このHiB5細胞株をラット生後5日目の大脳や海馬に移植を行って分化能を検討したところ、これらの細胞は大脳皮質顆粒神経細胞様の形態を示した。また生後2日のラット小脳内に移植を行うと小脳顆粒神経細胞様およびBergmann glia細胞様の形態を示した。これらのことからHiB5細胞株は脳内微小環境に反応して分化することが示唆された(Renfranz *et al.*, 1991)。またCepkoらのグループも新生仔マウス小脳より樹立された細胞を新生仔に移植し、多分化能を持つことを示している(Evan *et al.*, 1992)。また最近中福らによってラット12日胚(マウス11.5日胚相当)の神経上皮(VZ)より培養下で多分化能を示す細胞株が樹立された(Nakafuku and

Nakamura, 1995)。しかしこれらの研究はいずれも取り出してきた胚の発生段階が既に神経細胞の最終分化が見られる時期以降であることから、分化段階がある程度進行している神経幹細胞であると考えられる。出現時は均質な細胞からなるとされる神経上皮は9.0 - 10.5日胚の初代培養において初めて細胞間に分化能の差異がみられることから(Miyata and Ogawa, 1994)、この時期の神経上皮でどのような遺伝子発現の変化と細胞特性の変化が起きているかについては大変興味を持たれる。

本研究は神経分化のきわめて初期段階、未分化外胚葉から中枢神経系への分化方向の定められた直後の神経上皮においてどのような分化決定の進行がなされているかについて解析する目的で、これらの初期神経上皮細胞を不死化培養を行いながら個々の細胞に単離し、単一細胞由来の細胞株化を試みた。その結果多数の細胞株の樹立に成功しこれらの分化能について間接抗体染色法、RT-PCR法等を用いて解析を行った。またこれら細胞株の生体内における分化能を解析する目的で、神経細胞分化がさかんに起きている14.5日胚のマウス胎仔脳内にこれらの細胞を移植してその分化能の解析を行った。

2 材料と方法

2-1 神経上皮由来細胞株の樹立と培養

細胞株の樹立にはImmorto Mouse (Charles River Laboratories)を用いた(Jat *et al.*, 1991)。このマウスは温度感受性変異型SV40 large T遺伝子(tsA58)をマウスMHC class I *H2K^b* プロモーターにつなぎ、CBA/Ca×C57BL/6の受精卵内に遺伝子導入して得られたトランスジェニックマウスであり、遺伝的バックグラウンドはC57BL/6に変えられ維持されている。このマウスより取り出した細胞をinterferon- γ 存在下で培養することによりT抗原遺伝子の発現が誘導され、かつ33℃で培養を行うことにより発現したT抗原蛋白質が活性を持つ(増殖条件)。逆に培養液よりinterferon- γ を除去し、39℃で培養を行うことによりT抗原遺伝子の発現は低下し、残存するT抗原蛋白質は不活性化される(T抗原不活化条件)。このようなマウスを用いて多数の細胞株を樹立した。

8.0 - 8.5日胚の神経板領域及び9.0 - 9.5日胚の頭部予定大脳領域を切りだし、これらをdispase処理によって神経上皮と間充織に分離した。分離した神経上皮はタンゲステン針を用いて100 - 200 μ m四方のシート状に切り分け、細胞塊として数日培養を行い、その後trypsin処理を行って解離し、新たな培養皿にまき直した。神経細胞同様神経系幹細胞もculture plateに対する接着性が線維芽細胞などに比べて弱い。そこでこの特徴を利用して神経系細胞を選別した。具体的には解離した細胞をculture dish (Falcon)を用いて培養を行い、1時間後に培養液を回収する。混在する線維芽細胞等の非神経系細胞は短時間でculture dishに接着するが、神経系細胞はまだ浮遊している状態にあるか、培養液回収操作で剥がれてしまう程度の接着しかしていないので回収した培養液中に多数存在する。この回収した培養液を新たにculture dishにまきなおす。この操作を3回行って非神経系細胞を除去した。選別した細胞は最後にコラーゲンコート培養皿またはPrimaria culture dish (Falcon)で培養を行った。増殖条件で培養を行い、約1ヵ月継代培養を続けた後、これらの細胞を希釈して低濃度 (200-300 cells/100mm culture dish)にまきなおし、更に培養を続けコロニーを形成させ、コロニーをクローニングカラムを用いて隔離してtrypsin処理を行い細胞を回収し単離を行った。同様の操作を3回繰り返して単離した細胞集団をクローンとして使用した。

単離終了までには約3ヵ月を要し、この時点で増殖条件下で正常な増殖の見られる細胞集団について、細胞株化に成功したと判断し、凍結保存を行った。培養皿からの細胞回収は全てtrypsin処理によって行った(第1部、材料と方法)。

培養液は増殖条件ではinterferon- γ 400U/ml、10%FCSを含むDMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)、T抗原不活化時には3% FCSを含むDMEMを用いて培養を行った。樹立初期(培養に移してから単離終了まで)には更に良い栄養条件にするためDMEMのかわりに20% FCSを含むESM(第一部、材料と方法)を用いた。また増殖条件時には33°C 5% CO₂で培養を行った。T抗原不活化時には培養液交換後一旦39°C 5% CO₂で24時間培養を行った後、37°C 5% CO₂で培養を行った。これはinterferon除去後培養1日目まではT抗原蛋白質が残存しているが、2日目以降はほとんど消失するという結果(Fig. 3)と、39°Cの培養条件下では神経細胞等の生存状態が悪いという結果を考慮して行ったものである。またT抗原不活化時には神経細胞分化に適した、lysin - laminin coat glass (Becton Dickenson)を培養基質として用いた。

2-2 ウェスタンブロッティング法

T抗原蛋白質の存在量変化を33°C interferon存在下(増殖条件下)と、interferon除去後39°C(T抗原不活化条件下)に変更後の時間経過にしたがってウェスタンブロッティング法を用いて調べた。得られた細胞株を用いて33°C interferon存在下の細胞、interferon除去し39°Cで培養後1、2、5、10日目の細胞、コントロールのCOS7細胞、STO細胞をそれぞれSDS sample buffer (125mM Tris-HCl pH6.8, 3% SDS, 10% glycerol, 2% β -ME, 10 μ g/ml BPB)で可溶化して泳動用サンプルとした。これらを10% acrylamide SDS-PAGE法で泳動を行い、展開した蛋白質をナイロンメンブレンに転写した。このメンブレンをPBS10分3回洗浄後2-3節同様に2%スキムミルクを含むPBSで30分blockingを行い、抗SV40 large T antigen monoclonal antibody (Ab-1, Ab-2; Oncogene Science)を用いて抗体染色を行った。2次抗体はanti mouse IgG biotin conjugate (DAKO)、3次抗体はVectastain kitを用いてHRP法によって発色を行った。

2-3 抗体染色法

培養後の細胞は、4% formaldehyde PBS(-)、1次抗体によっては冷エタノールで4℃ 15分以上固定を行った。その後PBSで3分3回洗浄を行った後、2%スキムミルクを含むPBSで20分blocking処理を行った。Formaldehyde固定の場合はあらかじめ0.2% Triton X-100を含むPBSで5分間permeabilizationを行い、それから洗浄、blockingを行った。Blocking処理の後1次抗体を適量含むPBSで室温で45-90分反応させた。その後PBSで3分3回洗浄を行った後、蛍光標識2次抗体を1次抗体と同様に処理を行った。一部の抗体は2次抗体にbiotin結合のものを用い、蛍光標識avidinまたはHRP標識avidinでシグナル検出を行った。

用いた抗体を以下に示す。

抗ネスチン-ウサギポリクローナル抗体(東京理科大学、友岡康弘博士より贈与)

抗RC-1マウスモノクローナル抗体(筑波大学、山本美幸博士より贈与)

抗ニューロフィラメントウサギポリクローナル抗体(Transformation Research, Inc.)

抗MAPsウサギポリクローナル抗体(BioMakor)

*MAPsファミリー間でMAP-2との親和性が特に高い。

2次抗体は抗ウサギ免疫グロブリン、抗マウス免疫グロブリン共にDAKO社の標識抗体を用いた。

2-4 RT-PCR法

NES 8、NES 9細胞について33℃interferon存在下と39℃interferon非存在下で10日間培養を行ったものについて、RT-PCR法を用いて中枢神経系に発現する遺伝子についてその遺伝子発現を調べた。用いたプライマーを以下に示す。

Mash1; 5'-TAAGAATTCAACGAGCGCGAGCGCAACCG-3'

and 5'-GCAGGATCCGCGGATGTATTTCGACCGC-3' (Johnson *et al.*, 1990)

Neuro D; 5'-AAGCT(G/C)(A/C)G(A/G)(A/C)G(A/G)ATGAAGGC(A/T/C)AACGC(A/T/C)(A/C)G-3' and 5'-ATCT(A/G)(G/C)(A/T)(G/C)AG(A/T/G)GCCCA(A/G)AT(A/G)TAGTTCTT-3' (Lee, *et al.*, 1995)

Otx1, 2; 5'-CACCCC(G/C)CGGAA(A/G)CAGCGA(A/C)GGGAG-3'

and 5'-GGCGGCACTT(A/G)GC(G/T)C(G/T)(G/T)CG(A/G)TTCTT-3' (Simeone et al, 1993; Ang et al., 1994)

HES-1; 5'-GGCGAATTCATGCCAGCTGATATAATGGAG-3'

and 5'-GCGGGATCCACGCTCGGGTCTGTGCTGAGAGC-3' (Ishibashi et al., 1994)

Notch1; 5'-TTGGATGAGTACAACCTGGTG-3' and 5'-CAGGAACTGGGTAGTGGTCAT-3'

(del Amo et al., 1993)

それぞれの細胞より Quick Prep mRNA purification kit (Pharmacia Biotech) を用いて mRNA を抽出し、AMV RT-PCR kit (TAKARA) を用いて RT-PCR を行った。

2-5 細胞株の脳内移植実験

得られた細胞株のうちいくつかのものについて、生体内での分化能を検討する目的で子宮内14.5日胚の脳領域に細胞移植実験を行った。

まず始めに増殖条件下の培養株細胞を trypsin 処理によって解離、回収し、この懸濁液に蛍光標識試薬 PKH26 を $2 \times 10^{-4} \text{M}$ になるよう加え、5分間攪拌して細胞のラベルを行った。その後培養液で洗浄、遠心を行って遊離の色素を除き、最後に pipetting によって細胞を懸濁し、これを移植サンプルとした。

移植(脳内注入)には ICR 系統の胚を用いた。膣栓確認を0.5日として、妊娠14.5日の妊娠マウスをネンブタールを用いて麻酔を行い、開腹し、子宮を取り出し、子宮内の胎仔の脳領域に細く引いたガラス管を用いて、蛍光ラベルした細胞を各胚あたり約 5×10^4 細胞を注入した。注入後子宮を体内に戻し、外科用クランプを用いて縫合した。その後妊娠を継続させ、正常分娩により得られた新生仔より、脳を取り出し4% formaldehyde によって固定後脳組織スライスを作製し蛍光顕微鏡を用いて移植された細胞の局在および形態を観察した。

3 結果

3-1 初期中枢神経系からの細胞株の樹立

8.0 - 8.5日胚の神経板の神経上皮細胞および9.0 - 9.5日胚予定大脳領域の神経上皮細胞は増殖条件下で一様に増殖を続け、通常の初代培養で見られる増殖低下などの現象は見られず、多数の細胞株を樹立することが出来た。増殖条件下では8.0 - 8.5日胚由来細胞株はほぼ全ての細胞が初代培養の場合と同様の細胞形態を示し、形態的には細胞の多様性は低いと思われた。この細胞集団からは46株を単離した。9.0 - 9.5日胚由来細胞株については上皮様から線維芽細胞様まで様々な形態の細胞が存在しており、これらから120株を単離した。また単離後の1細胞由来の同一株内に多種類の細胞形態を示すものも多く見られた。

まず始めに全ての細胞株について、T抗原不活化条件下で神経上皮様あるいは神経系細胞様の形態を示すものを選択した。中枢神経系細胞株を目的とするため、これらに属さない形態をとる細胞株(線維芽細胞等)についてはここで除外した。8.0 - 8.5日胚由来細胞株については、除外した間充織と思われる細胞以外は全て同様な形態を示し、増殖条件下では神経上皮細胞様の形態をとり、T抗原不活化条件下では増殖を停止し、扁平な細胞および双極性の伸長した細胞が現れた。先述のように全て同じ形態を示したため、ここで8.0 - 8.5日胚由来細胞株については6株だけを選択した。9.0 - 9.5日胚由来細胞株については樹立した細胞株のうち60株について形態観察を行ったところ、約半数の細胞は形態的には8.0 - 8.5日胚由来細胞株に多く見られた細胞と増殖条件下、T抗原不活化条件下ともに同様の細胞形態を示した。そこでこのタイプの細胞株3系統を含み、ほかに様々な形態をとる細胞を計18株選択した(table 1)。

次に選別された細胞株について増殖条件下で抗ネスチン抗体を用いて抗体染色を行い、ネスチン蛋白質を発現する細胞を選別した。ネスチンは未分化神経細胞および未分化骨格筋細胞に発現する中間径フィラメントであり、抗体により容易にその発現を検出できる(Lendahl *et al.*, 1990; Sejersen and Lendahl, 1993; Tohyama *et al.*, 1993; Zimmerman *et al.*, 1994; Dahlstrand *et al.*, 1995)。8.0 - 8.5日胚より樹立した細胞株は6株全てがネスチン陽性であった。このことから取り出してきた神経板由来の細胞が効率良く株化されたと考えられる。また9.0 - 9.5日胚由来細胞株についても18株中17株がネスチン陽性であった。従ってこれ

ら17株を選択した(table 1)。

次にこれらの細胞株について、T抗原不活化条件下で5日間培養を行い、その形態変化について観察すると同時に、神経細胞分化の初期マーカーであるMAP-2の発現について抗体染色法を用いて解析した(Binder *et al.*, 1986)。8.0 - 8.5日胚由来の細胞についてはT抗原不活化条件下での形態も細胞株どうしほぼ均一であった。これらの細胞はT抗原不活化条件に変更後1日で増殖を停止し、培養開始後3日で主に扁平な細胞形態が観察された(Fig. 2B)。そのまま培養を続けると扁平な細胞の上に双極性の伸長した細胞が数多く現れた(Fig. 2C)。9.0 - 9.5日胚由来細胞株については増殖条件下同様に様々な形態が存在した。これらをおおまかに3つのタイプに分類した結果をtable 2に示した。以下にその3タイプを示す(Fig. 6)。

type I 8.0 - 8.5日胚由来細胞株に多く見られた、

扁平な細胞の上に双極性の細胞が見られたもの。

type II 増殖条件下でtype I よりも接着性の弱い伸長した形態を示し、T抗原不活化条件下では扁平な細胞と伸長した細胞が見られたもの。

type III 神経細胞様の形態をとる細胞が見られたもの。

また抗MAPs抗体による抗体染色の結果、8.0 - 8.5日胚由来細胞株は全て陰性であったが、9.0 - 9.5日胚由来細胞株については17株中14株が陽性であった(table2)。残り3株の陰性の細胞はすべてtype Iに属していた。

またこれらの細胞のグリア細胞への分化能を検討するため、同様にT抗原不活化条件下で5日間培養を行い、グリア細胞特異的に発現の見られる中間径フィラメントGFAP(Chen and Liem, 1994)の発現について抗体染色法を用いて解析した。その結果8.0 - 8.5日胚由来細胞株については先程同様陽性細胞は見られなかった。9.0 - 9.5日胚由来細胞株については1細胞株のみ陽性が検出された。

以上の様にして得られた細胞株のうち、8.0 - 8.5日胚由来細胞株をNES 8 (neuroepithelial early stem)細胞と名付けた。9.0 - 9.5日胚由来細胞株のうちNES 8とは異なるtype II、type III細胞株についてはNES 9と名付けた。

3-2 培養下におけるNES 8細胞の特徴と分化能について

NES 8細胞については同時に樹立された6細胞株(No.1-6)についてそれぞれ分離して解析を行ったが、いずれもほぼ同じ性質を示した。細胞形態については増殖条件下では神経上皮様の形態をとり、T抗原不活化条件に変更後1日で増殖を停止し、培養開始後3日で主に扁平な細胞形態が観察された(Fig. 2A, B)。そのまま培養を続けると扁平な細胞の上に双極性の伸長した細胞が数多く現れた(Fig. 2C)。また増殖条件下で低密度で培養を行ってコロニーを作らせた後にinterferonを除き37℃で培養を行うと、1日目で増殖を停止し、細胞間隙の明瞭なタイプ1アストロサイトに似た形態を示す細胞が多く見られた(Fig. 2D)。

またこれらの細胞株はT抗原不活化条件下においては、不死化を目的として使用しているT抗原遺伝子を不活性化するため、この条件では初代培養時と同様の細胞分化が再開されることが期待される。実際T抗原の蛋白質存在量の変化をウェスタンブロッティング法で調べたところ、増殖条件下では高い発現が見られ、培養条件変更後1日目までは残存が見られたが2日目以降は検出されなかった(Fig. 3)。培養条件変更後1日目に残存蛋白質は見られるが、NES 8細胞はT抗原不活化条件に変更後1日で増殖を停止することから、温度感受性変異T抗原遺伝子(tsA58)を使用しているためT抗原蛋白質は完全に不活性化されていると考えられる(Jat *et al.*, 1991)。

さらに抗体染色を行って各種マーカー遺伝子の発現を調べた(Fig. 4)。増殖条件下では神経上皮マーカーであるネスチンの発現が見られ、また神経上皮細胞に発現の見られるRC1抗体(Culicjan *et al.*, 1990)による染色も陽性であった。また神経細胞、グリア細胞両方の前駆細胞に発現が見られるA2B5抗体(Eisenbarth *et al.*, 1979)も陽性であった。

一方T抗原不活化条件下に移して10日目のNES 8細胞について同様に解析を行った。T抗原不活化条件で培養開始後3日で主に扁平な細胞形態が観察され、そのまま培養を続けると培養5-6日目に扁平な細胞の上に双極性の伸長した細胞が数多く現れるが(Fig. 2)、扁平に形態変化した細胞でのネスチン発現は消失し、双極性の細胞に依然強い発現が見られた(Fig. 4)。またRC1については、どちらの細胞にもその発現が見られた。また、神経細胞の初期分化マーカーであるMAP-2、神経細胞のマーカーであるニューロフィラメントについては、どちらも検出されなかった。またグリア細胞の分化マーカーであるGFAPについて

も、陽性細胞は全く検出されなかった。

また現在までに報告のある神経細胞分化誘導因子のNES 8細胞に対する効果について検討してみた。bFGF (Murphy *et al.*, 1990; Kengaku and Okamoto, 1993)、NGF (winter *et al.*, 1988; Cattaneo and McKay, 1990)、PDGF (Richardson *et al.*, 1988)、CNTF (Hugfies *et al.*, 1988; Saadat *et al.*, 1989)、retinoic acid (Maden and Holder, 1992) 等を培養系に添加したが、これまでのところ有効な作用は見られなかった。またペトリ皿を用いて増殖条件下で数日間培養を行い細胞凝集塊を形成させ、これを通常の培養皿にまきなおしてT抗原不活化条件で培養を行っても、神経細胞分化は確認されなかった。

増殖条件下とT抗原不活化条件下のNES 8細胞についてRT-PCRをおこなって、中枢神経系に発現の見られるいくつかの遺伝子についてその発現を調べた(Fig. 5)。ショウジョウバエのproneural遺伝子AS-C (achaete-scute complex)のマウスホモログとしてクローニングされ、マウス12.5日胚終脳腹側から間脳、後脳、脊髄と発生時の中枢神経系で高い発現が見られるMASH1遺伝子(Johnson *et al.*, 1990)、ゼノパスでは表皮運命細胞を神経細胞に分化させる事が知られるNeuro D遺伝子(Lee *et al.*, 1995)はともにNES 8細胞ではいずれの条件でも検出されなかった。一方8.0日胚神経板から発現が見られ、中脳より前側の中枢神経領域に発現の見られるOtx遺伝子(Ang *et al.*, 1994)、およびショウジョウバエ神経分化阻害因子hairyのマウスホモログとしてクローニングされマウス神経管内VZの未分化神経幹細胞で発現の見られるHES-1遺伝子(Ishibashi *et al.*, 1994)については増殖条件、T抗原不活化条件共にその発現が検出された。またショウジョウバエ神経分化の側方抑制因子Notch遺伝子のマウスホモログNotch1遺伝子(Artavanis-Tsakonas *et al.*, 1995)は増殖条件下のみ発現が見られ、T抗原不活化条件下では消失した。

以上の結果から、NES 8細胞は神経上皮の未分化神経系細胞のマーカー遺伝子の発現は見られるが、分化細胞のマーカーの発現は一切見られず、未分化神経系細胞の細胞株であると予想された。しかし、T抗原不活化条件下で見られる双極性の細胞は、双極性に突起を延ばし、ネスチン、RC1陽性であったことからラディアルグリア細胞に分化している可能性も考えられた。

3-3 9.0-9.5日胚由来細胞株の特徴と分化能について

細胞形態およびネスチン陽性の選択により、17種の細胞株が得られた。しかしこれらの細胞は形態によっておおまかに分けて3タイプに分類され、タイプ内の形態は類似していた(Table 2)。特にtype IIIのT抗原不活化条件下で10日間培養を行って神経細胞様の形態をとるものについて、抗MAPs抗体染色は全て陽性であった(Fig. 7)。また神経細胞に発現の見られるニューロフィラメント抗体を用いて調べた結果、MAP-2陽性細胞の全てがニューロフィラメントについても陽性であった(Fig. 7)。しかし、グリア細胞のマーカであるGFAP抗体について陽性細胞は1細胞(NES 9-53)であった。またこの1細胞はtype IIIに分類され、抗ニューロフィラメント抗体についても陽性の細胞が存在した。

このニューロフィラメント陽性細胞株3系統についてRT-PCR法によって、Neuro D、HES-1、Notch1の発現について調べた(Fig. 8)。いずれの系統も培養条件に関わらずNeuro D、HES-1遺伝子を発現しており、Notch1遺伝子も1系統を除いて全てに発現が検出された。

以上の結果から9.0-9.5日胚由来細胞株NES 9については培養下で神経細胞への分化がみられ、8.0-8.5日胚由来細胞株と比較してより分化決定の進行した状態にある細胞株であると考えられる。

3-4 生体内における細胞株の分化能について

蛍光標識したNES 8細胞を子宮内胎仔大脳に移植を行い、生体内での分化能を解析した。14.5日胚は大脳においてさかんに細胞分裂と分化が起こっており、ここにNES 8細胞を移植することによって、脳内の分化因子の作用で培養下では見られない細胞分化が起こる可能性が考えられる。NES 8細胞は8.0-8.5日胚由来であるから、8.0-8.5日胚神経上皮へ移植して分化能を検討することが望ましいが、マウスの8.0-8.5日胚に移植を行うには子宮より胎仔を取り出す必要があり、そのまま発生を正常に進行させることは不可能である。14.5日胚であれば子宮を切開することなく外部より胎仔を観察して、その大脳領域にガラス針を用いて注入することが可能である。そこで妊娠14.5日マウスに麻酔を行い、開腹手術によって子宮を露出させて、子宮内の胎仔大脳に細胞注入を行った。その後子宮を母体内に戻して、正常発生を進行させ自然分娩により新生仔マウスを得た。

得られた移植マウスより大脳を取り出し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った(Fig.9)。対照実験としてマウス線維芽細胞株STO細胞を同様の方法を用いて移植を行ったが、これらの細胞は注入箇所から移動せずに留まっているのが観察された(Fig. 9BC)。一方NES 8細胞は注入箇所から脳内を広く移動して、様々な細胞形態をとるものが観察された(Fig.9)。脳内のVZを離脱した細胞も広く脳内を移動することが知られており(Lois and Alvarez-Buylla, 1994)、NES 8細胞が生体内の脳神経系細胞同様に脳組織に取り込まれたと考えられる。また注入箇所から離れた位置まで移動した細胞に、突起を延ばし幼若な神経細胞様の形態をとるものが多く観察された。またVZ内に入り込む細胞も数多く見られ、またsubventricular zoneから柔膜(pia)方向へ伸長して細長い突起を延ばすradial glia様の形態を示す細胞も多く観察された(Fig. 9)。これらの細胞形態からNES 8細胞は脳内で神経細胞あるいはグリア細胞に分化している可能性が示唆された。

9.0 - 9.5日胚由来細胞株NES 9についても同様に脳内移植を行った。移植された細胞はNES 8細胞の場合同様、脳内に広く分散し、前中脳のほぼ全域でその存在が確認された。分散した細胞は周囲の組織に適合した形で神経細胞やグリア細胞に似た形態を示した。またこれらの細胞はVZにも数多く組み込まれた。細胞形態を観察するかぎりにおいてその脳内分化能はNES 8細胞と変わりは見られなかった。

4 考察

4-1 初期神経上皮の細胞分化決定

従来初期神経板細胞の分化段階については、遺伝子発現パターンの解析や、初代細胞培養によって解析されてきた。しかしこれらの初代培養法は神経上皮由来の細胞を細胞塊のまま培養を行うもので、細胞間相互作用等によって培養下でも神経細胞の分化決定が進行していることが容易に予想される。本研究で用いた細胞株樹立法は胚体よりとりだした細胞に即時にT抗原遺伝子発現を誘導し強制増殖させたものであり、このような不死化遺伝子による強制増殖条件下では細胞分化の培養下での進行が妨げられ細胞増殖のみ進行する事が期待される。つまりT抗原を用いた不死化操作により、胚体からとりだしてきた細胞の分化進行の時間経過を止め、強制的に細胞増殖を行いながら個々の細胞由来の細胞集団に分離することにより、同じ分化決定段階の細胞を大量に得ることができると考えられる。特に本研究で不死化に用いたT抗原遺伝子は培養液中のinterferonの有無および培養温度によりその活性を2重に制御できるため、樹立した細胞株の分化能を不死化遺伝子の発現しない状態に戻して解析することが可能である(Jat *et al.*, 1991)。

8.0 - 8.5日胚神経上皮由来細胞株の典型であったNES 8細胞は、ネスチンおよびRC1抗体染色結果が陽性であること、HES-1、Notch1遺伝子の発現が見られることなどから、未分化神経上皮の性質を保持した細胞株と考えられる。これらの遺伝子発現は10.5日胚以降のVZに存在する神経幹細胞の遺伝子発現と一致する。しかしVZで遺伝子発現の見られるMash1の発現はNES 8では見られず、またOtxの発現が見られることからこの細胞が後期胚(10.5日胚以後)のVZの幹細胞とは明らかに異なる性質の細胞であることを示しており、取り出してきた8.0 - 8.5日胚神経板神経上皮細胞の性質を保持して株化された細胞と考えられる。このNES 8細胞をT抗原不活化条件下で10日間の培養を行ったところ、Notch1遺伝子発現の消失が見られた。これらの消失は培養下でのNES 8細胞の分化の若干の進行を反映している可能性も考えられる。しかしT抗原不活化条件による培養を行い、更にいくつかの神経分化誘導因子を加えた培養を行っても、radial glia細胞への分化の可能性を除いては、成熟した神経系細胞への分化(GFAP、NFの発現)は全く見られなかった。したがって

NES 8細胞は生体内の分化誘導刺激等の存在下であれば神経細胞等へ分化しうる能力を持つが、培養下の条件では自身では分化しない状態にある細胞である可能性が大きい。一方9.0 - 9.5日胚神経上皮由来細胞株についてはその約半数はNES 8細胞と類似した細胞株であった。しかし培養下で神経細胞に分化する細胞株グループNES 9が含まれることから、この時期の神経上皮において神経細胞への分化決定の最終段階が進行していると考えられる。NES 9細胞株には突起を延ばした神経細胞様の形態に変化し、神経細胞への分化(MAP-2、NFの発現)を示す細胞株も多数見られた。またこれらの細胞株では神経細胞分化に関わる遺伝子Neuro Dの発現が検出された。また一部の細胞株ではT抗原不活化条件下でNotch1遺伝子の発現低下が見られた。しかしグリア細胞のマーカー遺伝子であるGFAP発現の見られる細胞は1系統しか得られず、その細胞形態も明瞭なグリア細胞様には見えず、幼若なグリア細胞に類似していた。このことから9.0 - 9.5日胚由来の細胞株には、NES 8細胞と同様な未分化な細胞集団の他に、既に神経細胞へと分化することが決定され、培養下でも神経分化の進行を示す細胞が多数含まれていると考えられる。

9.0 - 9.5日胚由来細胞株の約半数がNES 8細胞型であったことから、この時期はまだ多くの細胞は神経系にはcommitmentされているが最終分化は進行しないというNES 8細胞と同様の分化状態にあり、一部に神経細胞分化決定を受け細胞分化を始めようとする最終段階を迎える細胞(NES 9型細胞)が現れ始めている状態にあると考えられる。一方、8.0 - 8.5日胚神経板神経上皮細胞は神経系の細胞への分化方向は既に決定された細胞集団ではあるが、分化決定は中途段階にあり、未分化状態で増殖を繰り返し、単離された状態ではそれ以上の細胞分化は進行しない状態にあると考えられる。この時期の神経上皮はNES 8細胞に見られるような未分化神経系細胞からなるほぼ均質な細胞集団と考えられる。その後9.0 - 9.5日胚の時期に神経細胞への分化決定がさらに進行して最終分化の進行が運命づけられると思われる。またグリア細胞への分化はNES 9細胞株においてもほとんど見られなかった。脳神経系発生時においてグリア細胞への分化が起こるのは神経細胞分化がみられた後(ラット12日胚、マウス11.5日胚相当)であり(Miyata and Ogawa, 1994; Williams and Price, 1995)、またこの時期以降の発生段階の神経上皮より樹立された細胞株では培養下でグリア細胞への分化が見られること(Ryder *et al.*, 1990; Eves *et al.*, 1992; Nakafuku and Nakamura,

1995)などから、グリア細胞への分化決定はもう少し後期(マウスでは11.5日胚以降)の神経上皮においてなされると考えられる。

4-2 NES 8およびNES 9細胞株の分化能

本研究において樹立された細胞株はすべて胚神経上皮由来であり、培養下で神経細胞分化を示すもの、示さないものの2つに分けられた。分化を示さないNES 8細胞タイプの細胞が多く樹立された8.0 - 8.5日胚神経板細胞はまだ神経細胞分化決定の中途段階にあり、神経系の細胞に分化することは運命づけられているが(commitment)、それ自身では培養下では最終分化(differentiation)にはいたらない状態にあると考えられる。実際NES 8細胞を神経組織形成時のマウス大脳領域に移植を行ったところ、移植された細胞に神経細胞への分化と考えられる細胞形態を示す細胞が現れた。したがってこのNES 8細胞は神経系細胞へ分化する能力を持ち、増殖をする幹細胞であると予想される。発生時の脳内には様々な分化誘導因子の存在が予想され、神経細胞のみならず多種類のグリア細胞を分化させるための複数の誘導因子による分化誘導機構が存在すると思われる。培養下では分化が見られない細胞株が、脳内移植によって分化形態を示す例は他にも報告されており(Renfranz *et al.*, 1991; Snyder *et al.*, 1992)、脳内の未知の因子の働きによってNES 8細胞は最終分化へ誘導される可能性が考えられる。またNES 8細胞において、神経細胞分化に抑制的に働くと考えられるHES-1、Notch1遺伝子の発現が見られた。NES 8細胞の分化を抑制し増殖へ向かわせる為にこれらの分化抑制因子ホモログが発現している可能性が示唆される。事実、哺乳類のNotch1遺伝子はショウジョウバエとは異なり、非神経細胞から神経細胞への分化時ではなく、神経管VZの幹細胞でそのmRNA発現が見られ、不等分裂によってこのNotch1蛋白質を持つ細胞と持たない細胞に分れ、Notch1蛋白質を持つ細胞がVZを離れてIntermediate zoneへ移動し、この後Notch1蛋白質の消失時に神経細胞へと最終分化を開始する(Chenn and McConnell, 1995)。またHES-1遺伝子はやはり神経管細胞のVZに発現が見られ、この領域の幹細胞で発現し、分化を抑制すると考えられる。実際HES-1遺伝子は異所的強制発現によって神経細胞やグリア細胞への分化を抑制することが明らかになっている(Ishibashi *et al.*, 1994)。以上の事実から、NES 8細胞は中枢神経系の幹細胞の細胞株である

と考えられ、かつOtx遺伝子を発現することおよびMash1遺伝子を発現しないことから10.5日胚以降のVZの幹細胞とも異なる性質を持ち、取り出された発生段階を反映した初期神経板を構成する神経上皮細胞株であると考えられる。

また9.0 - 9.5日胚由来細胞株NES 9では培養下でも神経細胞への分化が見られ、脳内移植においても神経細胞様の形態を示した。NES 9細胞のなかには神経細胞のみならずグリア系細胞への分化を示す多分化能を持つ細胞も存在することが予想され、中枢神経系細胞の初期分化を解析するうえで貴重な情報を得られる細胞株であることが期待される。また本研究において確立された子宮内胎仔大脳領域への細胞移植技術は発生工学的にも利用価値がきわめて大きく、今後の脳神経系研究への応用が期待できる。

5 引用文献

- Anderson, D. J. (1995). Spinning skin into neurons. *Curr. Biol.* **5**, 1235-1238.
- Ang, S.-L., Conlon, R. A., Jin, O., and Rossant, J. (1994). Positive and negative signals from mesoderm regulate the expression of mouse *Otx2* in ectoderm explants. *Development* **120**, 2979-2989.
- Artavanis-Tsakonas, S., and Simpson, P. (1991). Choosing a cell fate: a view from the *Notch* locus. *Trends Genet.* **7**, 403-408.
- Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225-232.
- Bally-Cuif, L., and Wassef, M. (1995). Determination events in the nervous system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 450-458.
- Binder, L. I., Frankfurter, A., and Rebhum, L. I. (1986). Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **466**, 145-166.
- Calof, A. L. (1995). Intrinsic and extrinsic factors regulating vertebrate neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 19-27.
- Cattaneo, E., and McKay, R. (1990). Proliferation and differentiation of neural stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* **347**, 762-765.
- Cepko, C. L. (1989). Immortalization of neural cells via retrovirus-mediated oncogene transduction. *Ann. Rev. Neurosci.* **12**, 47-65.
- Chen, W.-J., and Liem, R. K. H. (1994). The endless story of the glial fibrillary acidic protein. *J. Cell. Sci.* **107**, 2299-2311.
- Chenn, A., and McConnell, S. K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric

inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell* **82**, 631-641.

Culican, S. M., Baumrind, N. L., Yamamoto, M., and Pearlman, A. L. (1990).

Cortical radial glia: identification in tissue culture and evidence for their transformation to astrocyte. *J. Neurosci.* **10**, 684-692.

Dahlstrand, J., Lardelli, M., and Lendahl, U. (1995). Nestin mRNA expression

correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, region of developing central nervous system. *Develop. Brain Res.* **84**, 109-129.

del Amo, F. F., Gendron-Maguire, M., Swiatek, P. J., Jenkins, N. A., Copeland, N.

G., and Gridley, T. (1993). Cloning, analysis, and chromosomal localization of Notch-1, a mouse homologue of *Drosophila* Notch. *Genomics* **15**, 259-264.

Easter, S. S. Jr., Ross, L. S., and Frankfurter, A. (1993). Initial tract formation in the mouse brain. *J. Neurosci.* **13**, 285-299.

Eisenbarth, G. S., Walsh, F. S., and Nirenberg, M. (1979). Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4913-4917.

Evan, Y. S., Deitcher, D. L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartweig, E. A., and Cepko, C. L. (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* **68**, 33-51.

Eves, E. M., Tucker, M. S., Roback, J. D., Downen, M., Rosner, M. R., and

Wainer, B. H. (1992). Immortal rat hippocampal cell lines exhibit neuronal and glial lineages and neurotrophin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- Frisa, P. S., Goodman, M. N., Smith, G. M., Silver, J., and Jacobberger, J. W. (1994). Immortalization of immature and mature mouse astrocytes with SV40 T Antigen. *J. Neurosci. Res.* **39**, 47-56.
- Grove, E. A., Williams, B. P., Li, D.-Q., Hajihosseini, M., Friedrich, A., and Price, J. (1993). Multiple restricted lineages in the embryonic rat cerebral cortex. *Development* **117**, 553-561.
- Hughes, S. M., Lillien, L. E., Raff, M. C., Rohrer, H., and Sendtner, M. (1988). Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocytes differentiation in culture. *Nature* **335**, 70-73.
- Ishibashi, M., Moriyoshi, K., Sasai, Y., Shiota, K., Nakanishi, S., and Kageyama, R. (1994). Persistent expression of helix-loop-helix factor HES-1 prevents mammalian neural differentiation in the central nervous system. *EMBO J.* **13**, 1799-1805.
- Jacobson, M. (1991). *Developmental Neurobiology, 3rd ed.* Plenum Press, New York.
- Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1993). HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* **75**, 827-830.
- Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1994). Neuronal cell fate specification in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 8-13.
- Jat, P. S., Noble, M. D., Ataliotis, P., Tanaka, Y., Yannoutsos, N., Larsen, L., and Kioussis, D. (1991). Direct derivation of conditionally immortal cell lines

from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5096-5100.

Johnson, J. E., Birren, S. J., and Anderson, D. J. (1990). Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors. *Nature* **346**, 858-861.

Johnson, E. M. J., and Snider, W. D. (1995). Molecular genetics of neuronal survival. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 42-49.

Kengaku, M., and Okamoto, H. (1993). Basic fibroblast growth factor induces differentiation of neural tube and neural crest lineages of cultured ectoderm cells from *Xenopus* gastrula. *Development* **119**, 1067-1078.

Kilpatrick, T. J., and Bartlett, P. F. (1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: Requirements for proliferation and differentiation. *Neuron* **10**, 255-265.

Lee, J. E., Hollenberg, S. M., Snider, L., Turner, D. L., Lipnick, N., and Weintraub, H. (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neuron by Neuro D, a basic helix-loop-helix protein. *Science* **268**, 836-844.

Lendahl, U., Zimmerman, L. B., and McKay, R. D. G. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* **60**, 585-595.

Lendahl, U., and McKay, R. D. G. (1990). The use of cell lines in neurobiology. *Trends Neurosci.* **13**, 132-137.

Lois, C., and Alvarez-Buylla (1994). Long-distance neuronal migration into adult mammalian brain. *Science* **264**, 1145-1148.

Maden, M., and Holder, N. (1992). Retinoic acid and development of the central

nervous system. *BioEssays* **14**, 431-438.

Miyata, T., and Ogawa, M. (1994). Developmental proteins of early telencephalic neuroepithelial cells: a study with microexplant culture. *Dev. Growth Differ.* **36**, 319-331.

Murphy, M., Drago, J., and Bartlett, P. F. (1990). Fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural precursor cells in vitro. *J. Neurosci. Res.* **25**, 463-475.

Nakafuku, M., and Nakamura, S. (1995). Establishment and characterization of a multipotential neural cell line that can conditionally generate neurons, astrocytes and oligodendrocytes in vitro. *J. Neurosci. Res.* **41**, 153-168.

Nye, J. S., and Kopan, R. (1995). Vertebrate ligands for Notch. *Curr. Biol.* **5**, 966-969.

Ogawa, M. (1992). *Molecular Basis of neuronal Connecting* edited by Satake, M., Kohko-do, 5-7.

Renfrantz, P. J., Cunningham, M. G., and McKay, R. D. G. (1991). Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* **66**, 713-729.

Richardson, W. D., Pringle, N., Mosley, M. J., Westermarck, B., and Dubois-Dalcq, M. (1988). A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* **53**, 309-319.

Ryder, E. F., Snyder, E. Y., and Cepko, C. L. (1990). Establishment and characterization of multipotent neural cell lines using retrovirus vector-

mediated oncogene transfer. *J. Neurobiol.* **21**, 356-375.

Saadat, S., Sendtner, M., and Rohrer, H. (1989). Ciliary neurotrophic factor induces cholinergic differentiation of rat sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* **108**, 1807-1816.

Sanes, J. R. (1989). Analyzing cell lineage with a recombinant retrovirus. *Trends Neurosci.* **12**, 21-28.

Sejersen, T., and Lendahl, U. (1993). Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J. Cell Sci.* **106**, 1291-1300.

Silos-Santiago, I., Greenlund, L. J., Johnson, E. M. J., and Snider, W. (1995). Molecular genetics of neuronal survival. *Curr. Biol.* **5**, 42-49.

Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M. R., Nigro, V., and Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* **12**, 2735-2747.

Simpson, P. (1995). Positive and negative regulators of neural fate. *Neuron* **15**, 739-742.

Snyder, E. Y., Deitcher, D. L., Walsh, C., Arnold-Aldea, S., Hartweig, E. A., and Cepko, C. L. (1992). Multipotent neural cell lines can engraft and participate in development of mouse cerebellum. *Cell* **68**, 33-51.

Strachan, T., and Read, A. P. (1994). Pax genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 427-

- Tohyama, T., Lee, V. M.-Y., Rorke, L. B., Marvin, M., McKay, R. D. G., and Trojanowski, J. Q. (1993). Monoclonal antibodies to a rat nestin fusion protein recognize a 220-kDa polypeptide in subsets of fetal and adult human central nervous system neurons and in primitive neuroectodermal tumor cells. *American Journal of Pathology* **143**, 258-268.
- Walsh, C., and Cepko, C. L. (1992). Widespread dispersion of neuronal clones across functional regions of the cerebral cortex. *Science* **255**, 434-440.
- Williams, B. P., and Price, J. (1995). Evidence for multiple precursor cell types in the embryonic rat cerebral cortex. *Neuron* **14**, 1181-1188.
- Winter, J., Forbes, C. A., Sternberg, J., and Lindsay, R. M. (1988). Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron* **1**, 973-981.
- Wood, J. G., Martin, S., and Price, D. J. (1992). Evidence that the earliest generated cells of the murine cerebral cortex from a transient population in the subplate and marginal zone. *Dev. Brain Res.* **66**, 137-140.
- Zimmerman, L., Lendahl, U., Cunningham, M., McKay, R., Parr, B., Gavin, B., Mann, J., Vassileva, G., and McMahon, A. (1994). Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursor. *Neuron* **12**, 11-24.

6 图表

Table 1 細胞株樹立と細胞形態および抗ネスチン抗体による選択

	8.0-8.5日胚由来細胞株	9.0-9.5日胚由来細胞株
総樹立細胞株数	46	60
形態的選択株数	6	18
このうち ネスチン陽性株数	6	17

Table 2 樹立された細胞株の形態的分類と抗体染色性

ネスチン陽性選択株	8.0-8.5日胚由来細胞株	9.0-9.5日胚由来細胞株
	6	17
細胞形態による分類		
I 型	6	3
II 型	0	3
III 型	0	11
MAP-2陽性細胞株数	0	14
GFAP陽性細胞株数	0	1

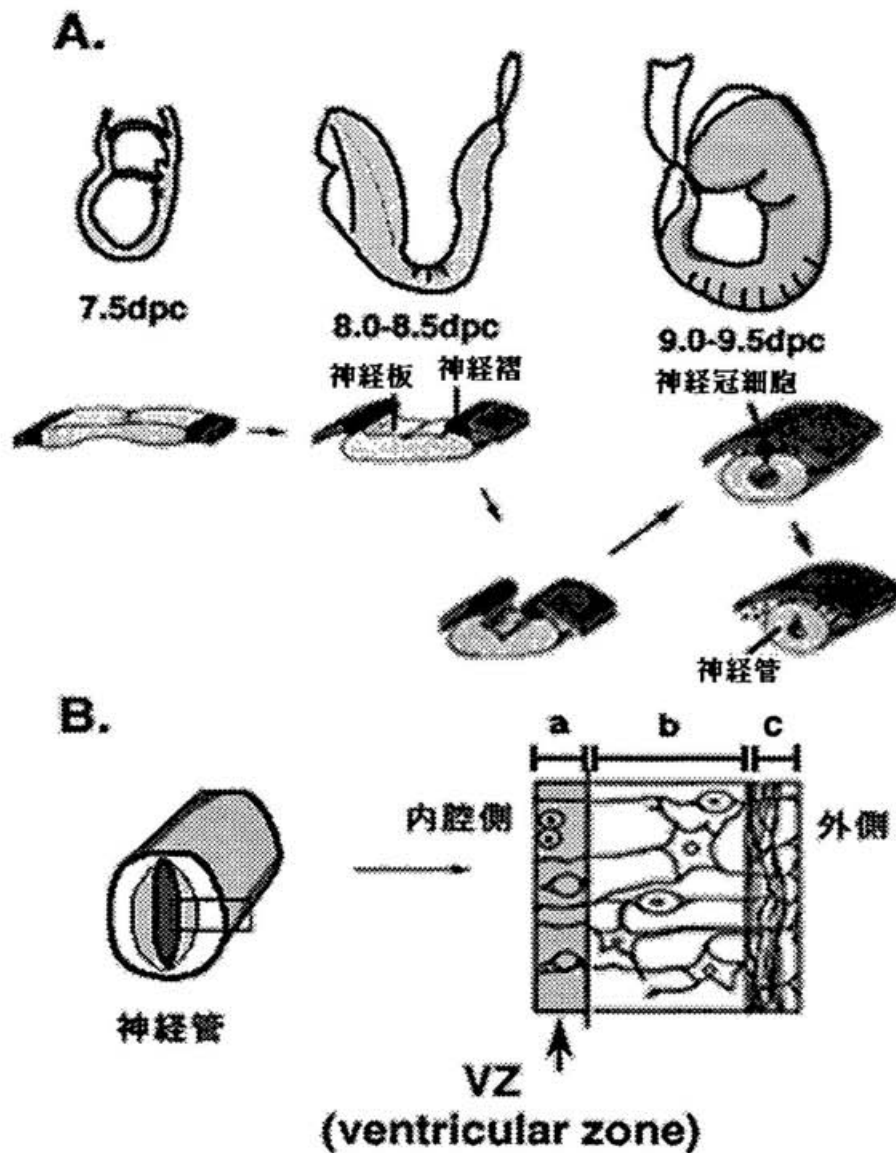


Fig. 1 神経板の形成と中枢神経系の発生

(A) 神経板と神経管の形成

7.5日胚で出現した神経上皮は8.0-8.5日胚で肥厚して神経褶を形成し、9.0-10.5日胚にかけて背側で融合し、神経管を形成する。

(B) 脳室周囲層(Ventricular zone)の概要

a. Ventricular zone 幹細胞が存在し細胞分裂する。

b. Intermediate zone と c. Marginal zone

神経細胞とグリア細胞が存在する。

Fig. 2 NES 8 細胞の細胞形態の変化

(A)増殖条件下

(B)低密度で培養後T抗原不活化条件に移し10日目

(C)高密度で培養後T抗原不活化条件に移し10日目

(D)interferonを除去し37℃で培養10日目

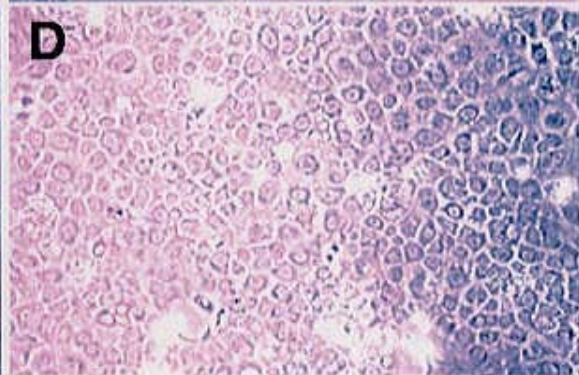
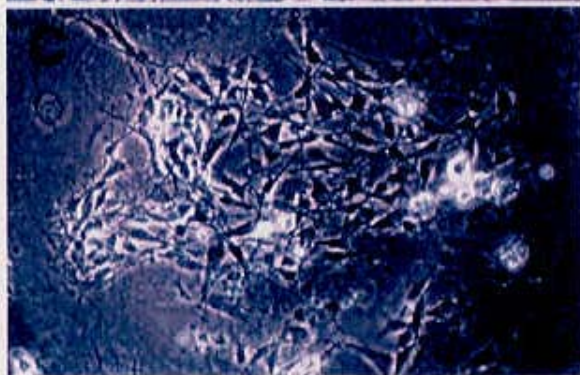
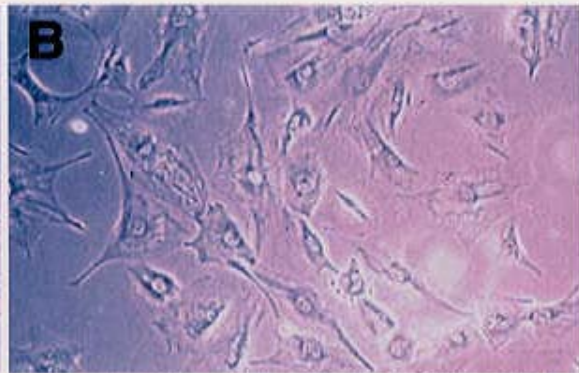
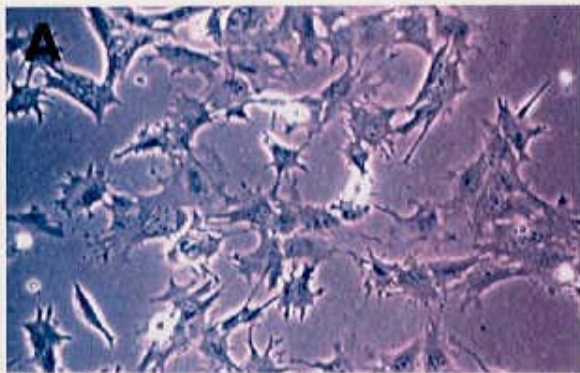


Fig. 3 NES 8 細胞におけるT抗原蛋白質存在量の変化
a. 増殖条件; b. T抗原不活化条件1日目; c. 2日目; d. 5日目
e. 10日目; f. T抗原遺伝子を継続して発現するCOS7細胞;
g. T抗原遺伝子を持たないSTO線維芽細胞

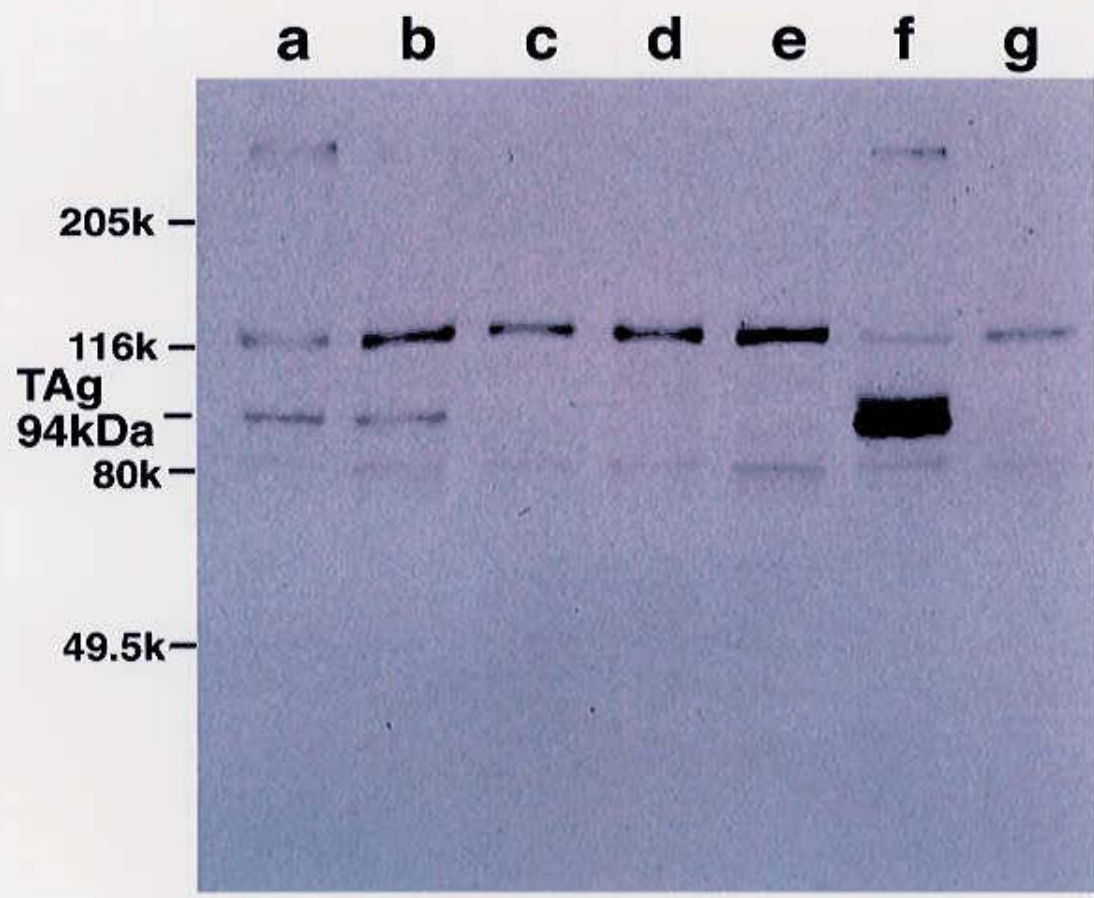


Fig. 4 NES 8 細胞における間接蛍光抗体染色
(A, B)抗ネスチン抗体染色 (C, D) RC 1 抗体染色
(A, C) 増殖条件下 (B, D) T抗原不活化10日目

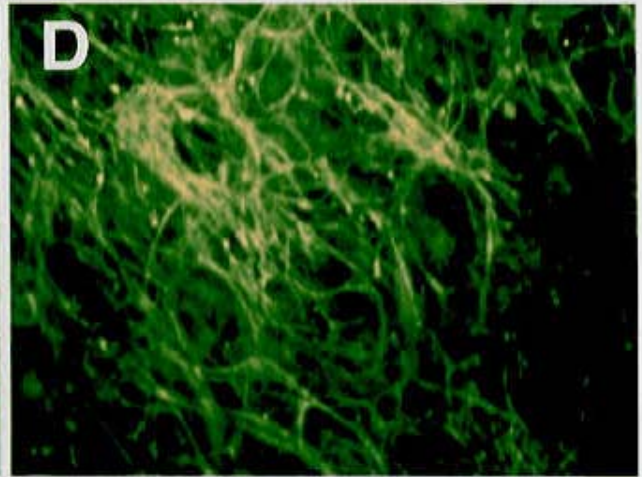
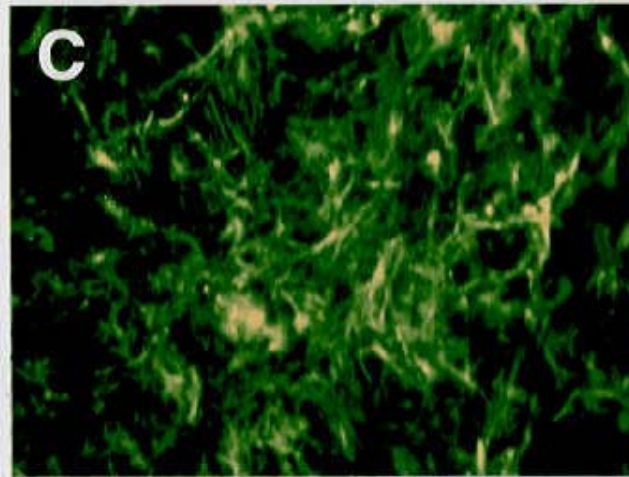
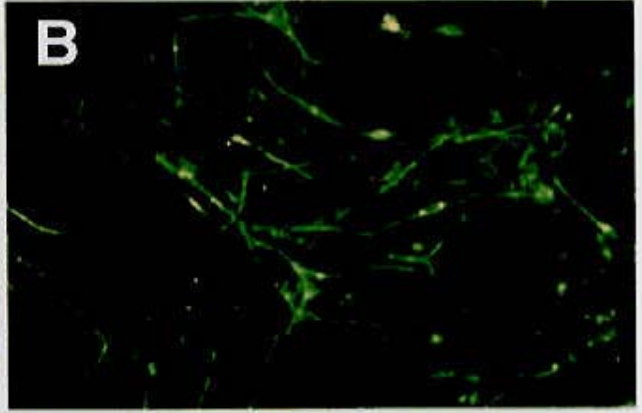
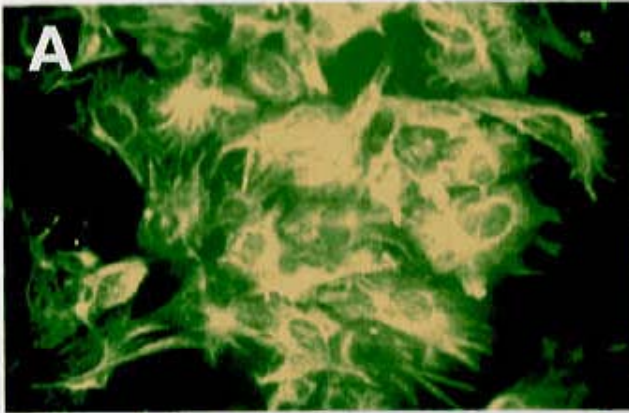
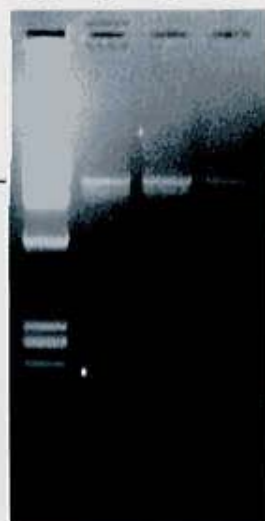


Fig. 5 NES 8 細胞におけるRT-PCR法による遺伝子発現の検定
目的遺伝子の増幅されたバンドを矢頭で示す。
a. 増殖条件; b. T抗原不活化条件10日; c. 10日胚頭部;
M. DNA分子量マーカー

A. *Otx 1,2*

M a b c



G3PDH —

B. *HES-1*

M a b c



C. *Notch1*

M a b c



Fig. 6 9.0-9.5 日胚神経上皮由来細胞株の3形態
(A, B) I型細胞株の例 (C, D) II型細胞株の例
(E, F) III型細胞株の例
(A, C, E)増殖条件 (B, D, F) T抗原不活化条件5日目

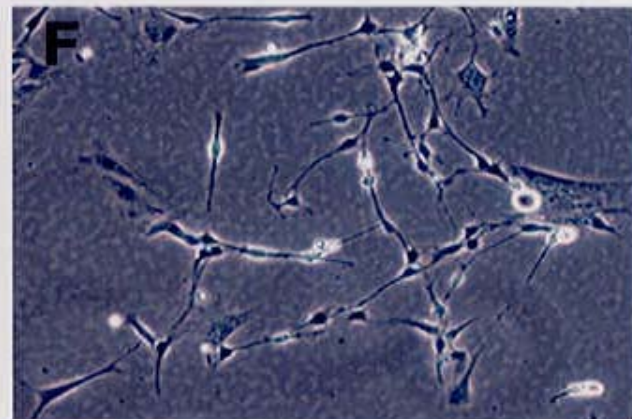
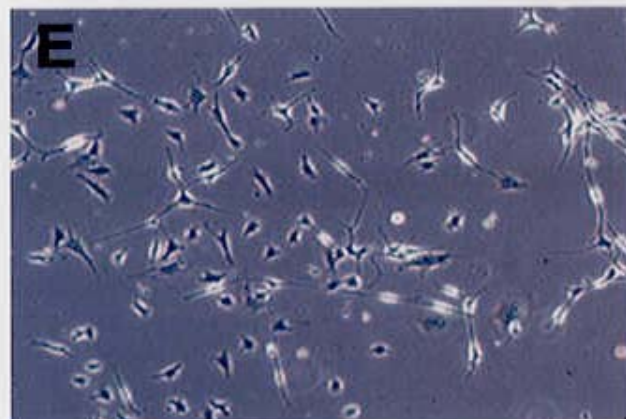
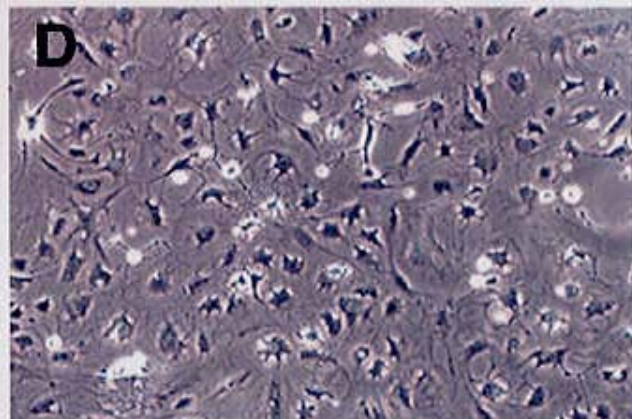
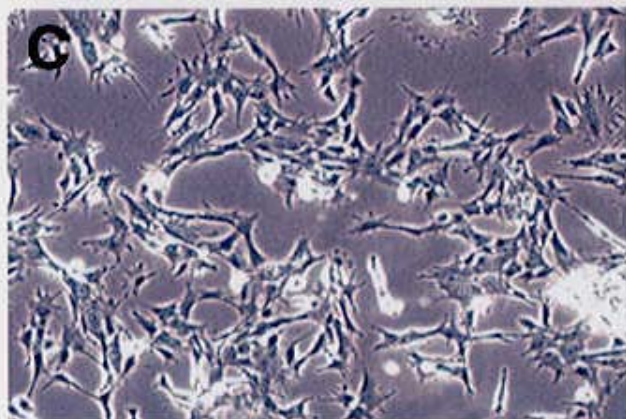
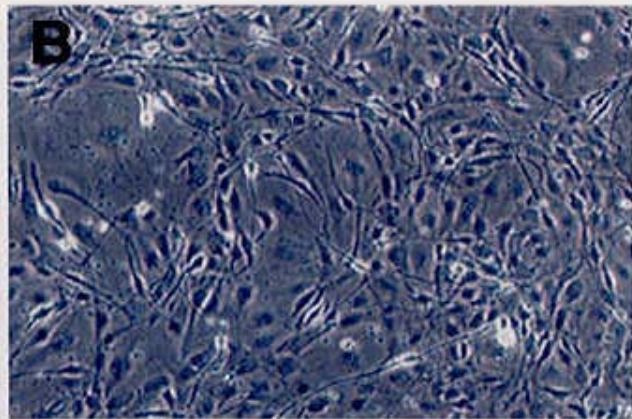
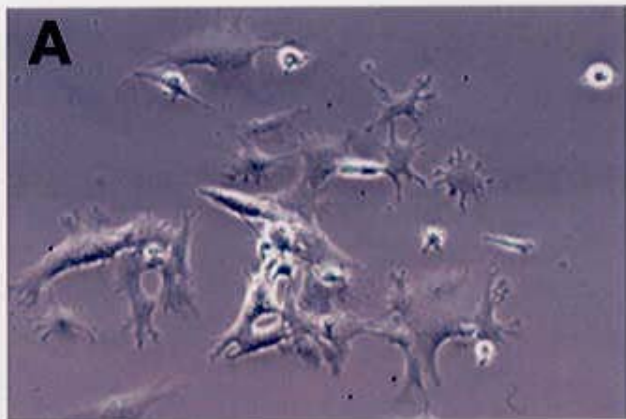


Fig. 7 Type III NES 9 細胞株の抗体染色

(A-D) 抗ニューロフィラメント抗体染色

(A, C) 増殖条件 (B, D) T抗原不活化条件10日目

(A, B) NES 9-91細胞株 (C, D) NES 9-101細胞株

(E) T抗原不活化条件6日目の抗MAPs抗体染色

(F) 増殖条件下の抗ネスチン抗体染色

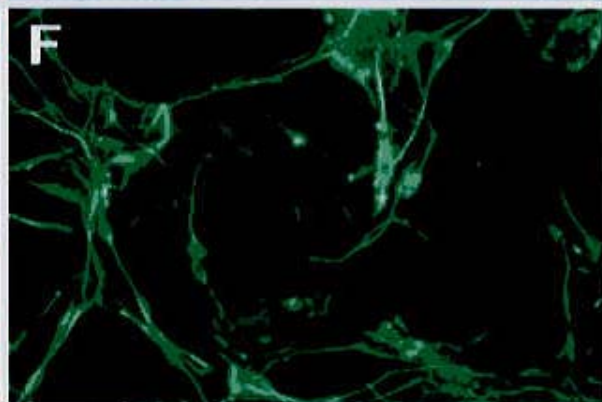
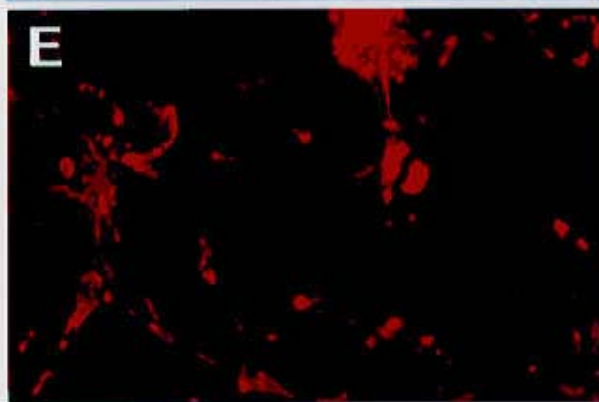
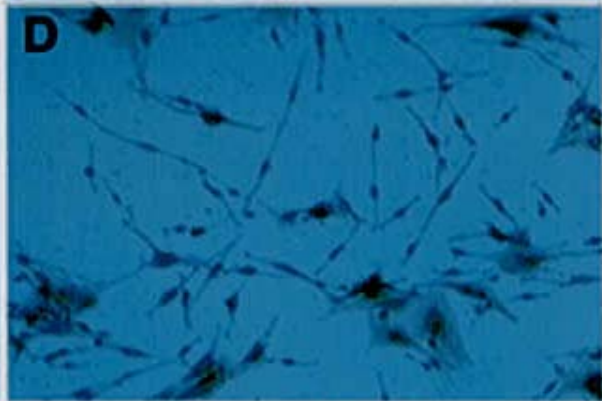
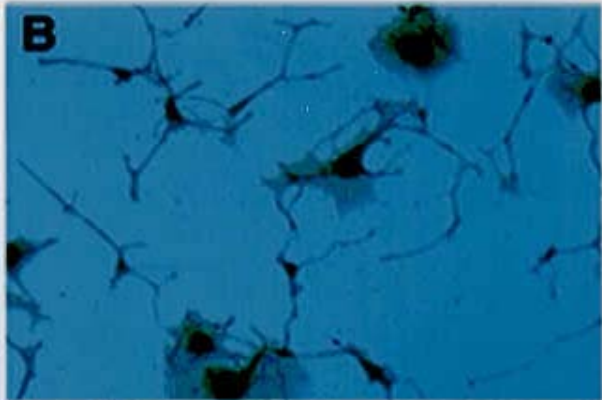
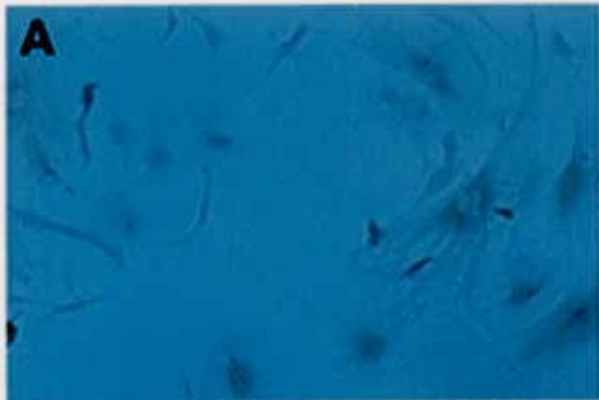


Fig. 8 NES 9 細胞株におけるRT-PCR

a. c. e. 増殖条件 b. d. f. T抗原不活化条件

a-b. NES 9-53細胞 c-d. NES 9-100細胞 e-f. NES 9-102細胞

g. 10日胚頭部

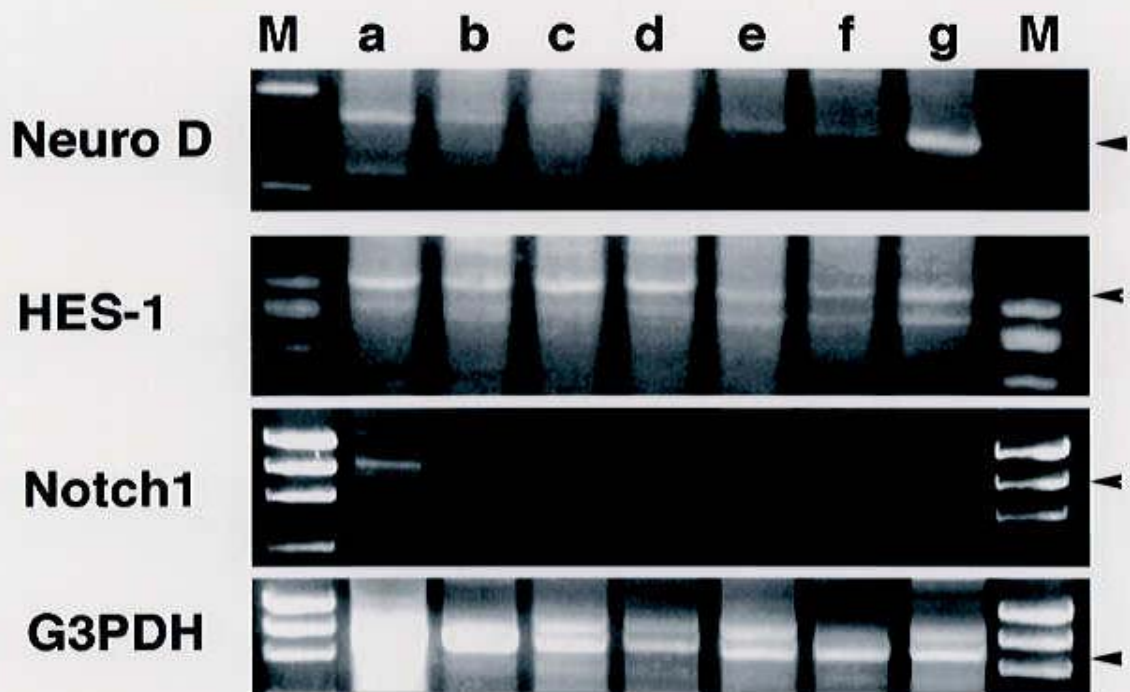


Fig. 9 NES 8 細胞の脳内移植実験による細胞分布と形態変化。蛍光標識されたNES 8 細胞が赤色に検出される。細胞注入箇所を*で示す。

(A) NES 8 細胞の移植例、大脳皮質を含む脳内に広がっている

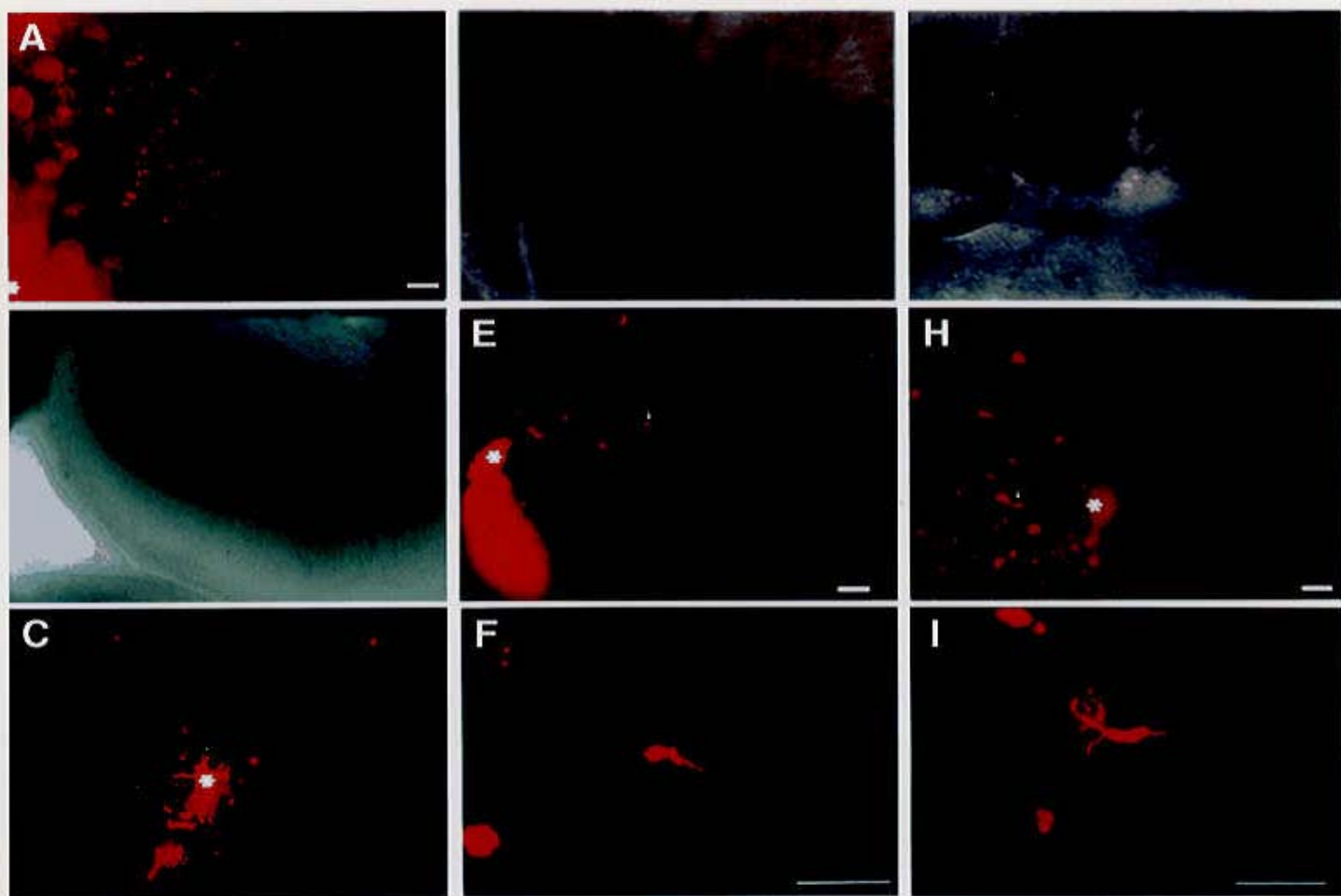
(B, C) STO線維芽細胞の移植例、細胞は注入箇所から広がらない

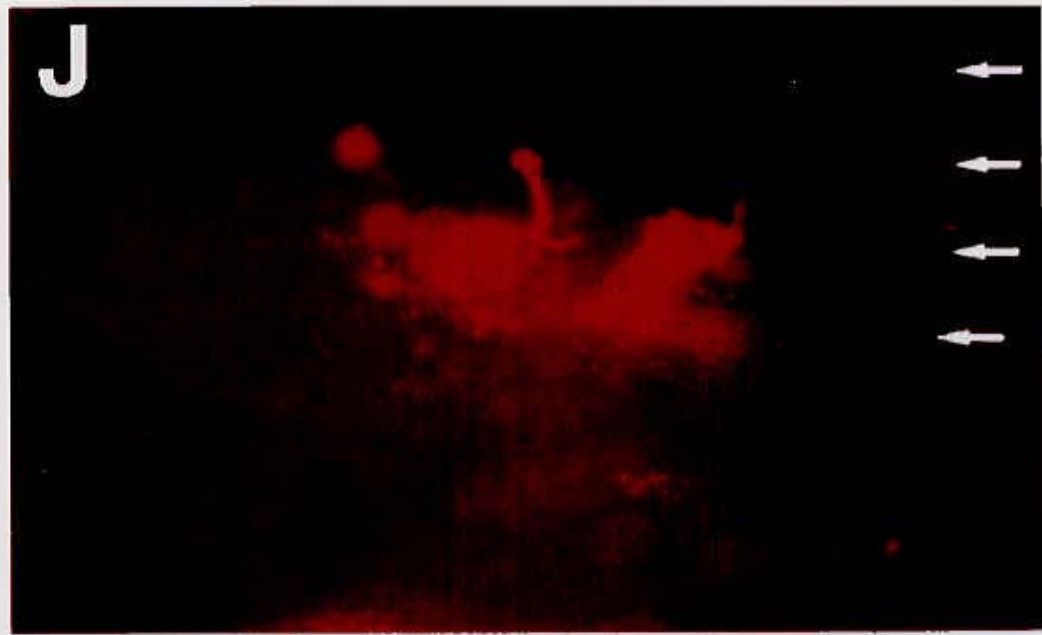
(D-I) 移植されたNIS細胞の形態

(D) 明視野像 (E) 注入箇所から移動したNIS 8 細胞は幼若な神経細胞様の形態を示した(矢印) (F) 矢印で示された細胞の拡大図

(G-I) も同様

(J, K) 移植されたNIS 8 細胞にはラディアルグリア細胞様の形態を示すものも見られた(矢印)。





謝辞

本研究について御指導をいただきました中辻憲夫教授に心から感謝いたします。また多くの貴重な御助言を頂きました白吉安昭博士に感謝いたします。共同研究者として第2部の脳内移植実験を担当していただき、また貴重なアドバイスを頂いたイバダン大学 M. T. Shokunbi博士に感謝いたします。

当専攻の桂勲教授、藤沢敏孝助教授、城石俊彦助教授、松本健一助手、服田昌之助手には多くのご助言をいただきました事に感謝いたします。第1部の研究について貴重なご助言をいただいた大阪大学小清水右一博士、明治乳業川瀬栄八郎氏に感謝いたします。

マウスの管理等多大な研究支援をして頂いた、発生工学研究室 山本博士氏、内田歩さん、清水啓子さん、菅谷恵子さん、青木登志江さんに感謝いたします。共に切磋琢磨し合った遺伝学研究所の学生の皆様、特に食堂会のメンバーに感謝いたします。

また私に研究という世界を教えていただいた東北大学 井出宏之教授に深く感謝いたします。

おわりに

発生現象における2つの細胞、PGCと中枢神経系細胞の増殖、分化について研究を行ってきた。どちらも興味深い結果が得られたと自負するが、どちらもまだ不完全な研究ともいえる。もっとも研究とはよほどつまらない事をやらない限り、1つの事実が判明すると必ず次の問題がみえてくるものでもあり、「完全」にはそう容易にいたるものではない。

PGC研究の今後の展望としては、この自律的な増殖と増殖停止の現象に関与する因子についての分子生物学的な探索が期待されるが、このような初期のPGCを大量に回収しcDNAライブラリー等を作成することは前述の通り現在のところ難しい。したがって他の細胞において増殖や増殖停止に関与する因子についてのPGCにおける働きを調べるといったアプローチ、またはPGCの増殖時に存在することが明らかとなっている唯一の因子である*c-kit*に関係する因子を探すといった方向の研究に限られてしまう。このようなアプローチでも多くの事実を知ることが可能かもしれないが、やはりPGC研究の分子レベルでの展開には何らかの技術的革新によるPGCの大量調整が要望されている。

また第2部で示した中枢神経系由来細胞株については、得られた細胞株の脳内での分化能について詳細に解析する目的で、株細胞にマーカー遺伝子を導入し、発生時の脳内への移植を行い、成体まで育ててその分化状態を解析することを計画しており、現在マーカー遺伝子の導入を行っている。これにより脳内でのこれらの株細胞の分化能を検証するのみならず、特定遺伝子の発生時の脳内異所的強制発現実験系を確立し、今までに報告されているCadherin (Matsunami and Takeichi, 1995)、Plexin (Ohta et al., 1995)等的大脑発生時の機能的ネットワーク形成に関与すると考えられる因子の異所的強制発現による機能解析を予定している。

私の拙い研究成果が上記の計画の様に速やかに発展し、発生という生命現象の更なる解明に向けて、大きく進展していくことを期待している。

Matsunami, H. and Takeichi, M. (1995) Fetal brain subdivisions defined by R- and E- cadherin expressions: evidence for the role of cadherin activity in region-specific, cell-cell adhesion. *Dev. Biol.*, 172, 466-478.

Ohta, K., Mizutani, A., Kawakami, A., Murakami, Y., Kasuya, Y., Takagi, S., Tanaka, H. and Fujisawa, H. (1995) Plexin: a novel neuronal cell surface molecule that mediates cell adhesion via a homophilic binding mechanism in the presence of calcium ions. *Neuron*, 14, 1189-1199.

Autonomous Regulation of Proliferation and Growth Arrest in Mouse Primordial Germ Cells Studied by Mixed and Clonal Cultures

YASUSHI OHKUBO,*† YASUAKI SHIRAYOSHI,* AND NORIO NAKATSUJI*¹

*Mammalian Development Laboratory, National Institute of Genetics, and †Department of Genetics, The Graduate University for Advanced Studies, 1111 Yata, Mishima 411, Japan

In culture, mouse primordial germ cells (PGCs) proliferate and undergo growth arrest with a time course similar to that *in vivo*. It is unclear whether this behavior is regulated autonomously or by coexisting somatic cells. We performed mixed culture experiments using PGCs from 8.5- and 11.5-d.p.c. embryos and found no interaction between the PGCs and somatic cells at the two stages. Next, we carried out clonal culture of PGCs and examined the proliferation of and morphological change in individual clones. Such clonal culture did not reveal any subpopulation of PGCs with an increased growth rate or less differentiated characteristics, which might have been suggested by formation of the embryonic germ cell lines. Our results suggest that there is an autonomous regulation of growth and cell shape change in PGCs which occur as stochastic events but are not strictly timed by the number of cell divisions. © 1996 Academic Press, Inc.

INTRODUCTION

Mouse primordial germ cells (PGCs) first appear in the extraembryonic mesoderm at 7.0–7.5 days post coitum (d.p.c.) as a cluster of alkaline phosphatase (AP) positive cells [1]. They migrate into the hindgut (8.5 d.p.c.) and genital ridges (11.5 d.p.c.) while continuing to proliferate. In the developing gonad, PGCs cease mitotic cell division at 13.5 d.p.c. and enter into either mitotic arrest in the fetal testis or meiosis in the ovary [2, 3]. Therefore, the period between 12.5 and 13.5 d.p.c. is very critical for regulation of their proliferation and differentiation. For example, it is known that the expression of several protooncogenes in PGCs changes at these stages [4].

The proliferative behavior of PGCs in culture has been shown to mimic the growth pattern *in vivo* [5, 6]. For example, PGCs obtained from embryos at 8.5 d.p.c. proliferated for 4 days before ceasing growth, while

PGCs at 10.5 d.p.c. proliferated for 2 days and those at 11.5 d.p.c. proliferated only for 1 day. There was no proliferation of PGCs obtained at 12.5 d.p.c. These results suggest that PGCs at various developmental stages stop their proliferation at the time corresponding to 12.5 d.p.c. In these culture studies, however, there was always a large number of somatic cells isolated from embryos together with the PGCs. Therefore, the observed proliferation pattern may be influenced by such somatic cells.

Recently, we showed that tumor necrosis factor- α increased the proliferation of PGCs at earlier migration stages, but it did not change timing of the growth arrest [7]. Forskolin has been shown to increase the proliferation of PGCs [8, 9] and also to prolong the growth period for several days (Kawase *et al.*, submitted for publication). Furthermore, continuation of cell proliferation by a small population of PGCs in certain culture conditions has led to the transformation of PGCs into pluripotent stem cells, named "EG cells" [10, 11, Koshimizu *et al.*, submitted for publication].

In this study, we examined the timing of growth arrest in PGCs and the mechanisms that mediate it. There have been several examples of systems in which growth is regulated by cell–cell interaction or by autonomous events timed by cell division [12, 13]. PGCs are surrounded by somatic cells *in vivo*, and the presence of a large number of somatic cells in culture should be taken into consideration for analysis of the regulative mechanism of the cell proliferation and growth arrest. To circumvent such a problem, we carried out mixed culture of PGCs and somatic cells at different stages, as well as clonal culture to analyze proliferative behavior of individual PGCs.

Our results indicate that proliferation, growth arrest, and morphological changes of PGCs in culture are autonomously programmed and related to the germ cell differentiation in embryos. They also suggest that such programmed changes occur stochastically, but are not strictly measured by the age or number of cell division.

MATERIALS AND METHODS

Feeder cells. For mixed culture experiments, we used STO fibroblasts as feeder cells, because they have been used in many studies

¹ To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Mammalian Development Laboratory, National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima 411, Japan. Fax: 81-559-81-6828. E-mail: nnakatsu@ddbj.nig.ac.jp.

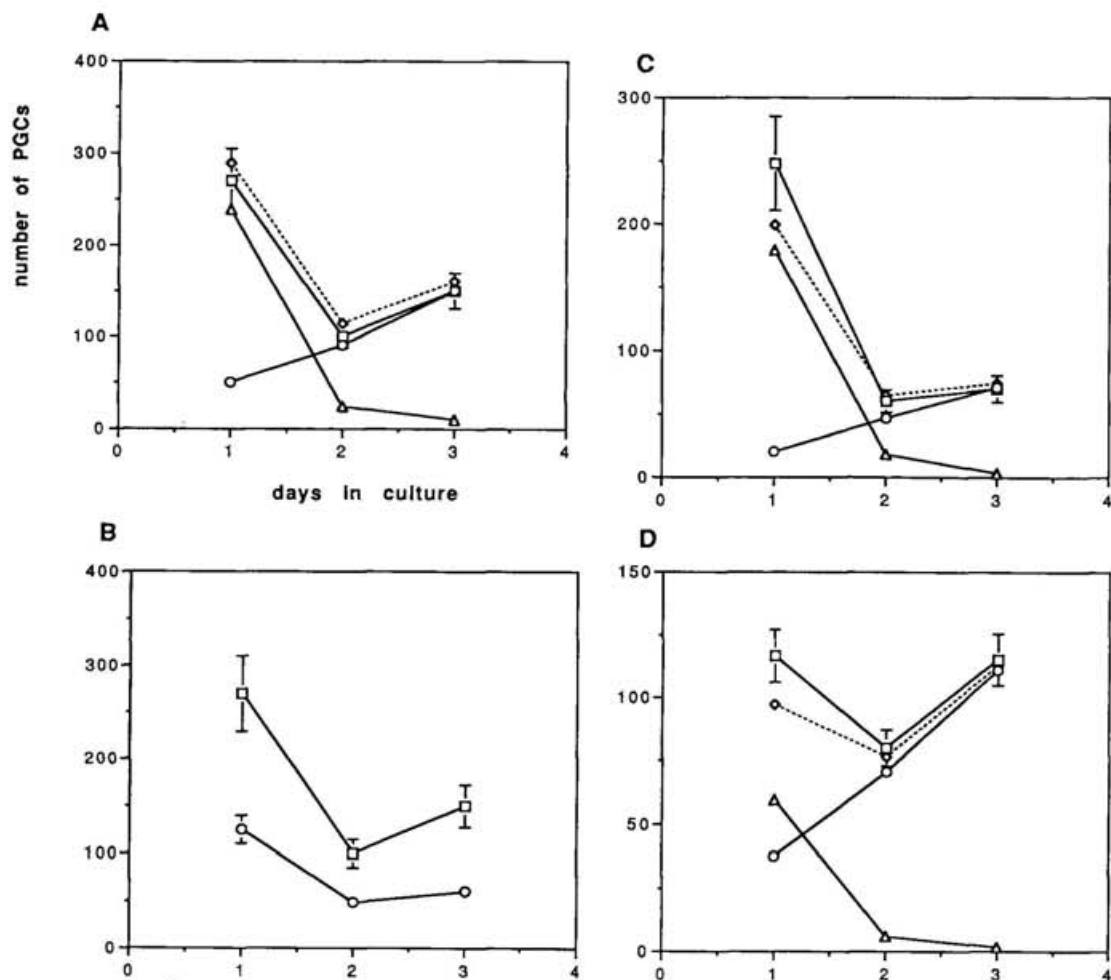


FIG. 1. (A) Changes in PGC number in the mixed culture experiment. ○, culture of 1 unit of the 8.5-d.p.c. PGCs; □, the mixed culture of 1 unit each of the 8.5- and 11.5-d.p.c. PGCs; ◇, calculated sums of the two separate cultures of the 8.5- and 11.5-d.p.c. PGCs. (B) No effect was observed when cell density was reduced by mixing $\frac{1}{2}$ unit of the 8.5- and 11.5-d.p.c. PGCs (○). (C-F) The mixed culture similar to A, but the ratio of mixture was changed to $\frac{1}{4}$ unit of the 8.5-d.p.c. PGCs and $\frac{3}{4}$ unit of the 11.5-d.p.c. PGCs (C), $\frac{2}{5}$ and $\frac{3}{5}$ unit (D), $\frac{1}{10}$ and 1 unit (E), or 1 and $\frac{1}{10}$ unit (F).

of the PGC proliferation *in vitro* [5, 14-16]. For the clonal culture experiments, we used SI/SI⁴-m220 cells. They stably express the membrane-bound form of murine steel factor [10], support PGC growth more effectively than STO cells, and thus, are more adequate for culturing single PGCs. Another reason to use the SI/SI⁴-m220 feeder cells is that the steel factor is the only growth factor so far shown to play a role for PGCs *in vivo* [17-20]. It is not known whether other factors having effects on PGCs in culture have significant roles *in vivo*.

Both types of cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). They were treated with 5 ng/ml mitomycin C for 2 h and plated at a density of 1×10^5 cells per well of Nunc four-well plates (STO cells for the mixed culture) or 3×10^4 cells per well of 96-well plates (SI/SI⁴-m220 cells for the clonal culture). They were cultured for at least 18 h before use as feeder cells. Culture wells had been pretreated with 1% gelatin for 30 min before plating the feeder cells. For the

experiment using a feeder layer enriched with somatic cells, genital ridges dissected from embryos at 11.5 d.p.c. were dissociated into single cells and cultured for 8 h without feeder cells. They were treated with 5 ng/ml mitomycin C for 2 h and replated at a density of 5×10^4 cells per well of Nunc 4-well plates together with the same number of STO cells.

Culture of PGCs. Tissue fragments around the base of allantois (8.5 d.p.c.) or genital ridges (11.5 d.p.c.) were dissected out from embryos of random-bred Sl:ICR mice. They were dissociated into single cells by incubation with 0.05% trypsin, 0.02% EDTA in Ca²⁺- and Mg²⁺-free PBS for 5 min at 37°C with gentle pipetting. This suspension of PCGs and somatic cells was diluted with the culture medium (ESM as described later) and plated on the feeder layer. In the mixed culture experiments, another cell suspension obtained from embryos at a different stage was plated over the initial cells within 1 h. Aliquots of cell suspension described as one unit in the mixed culture experiments corresponded to half of a fragment of the

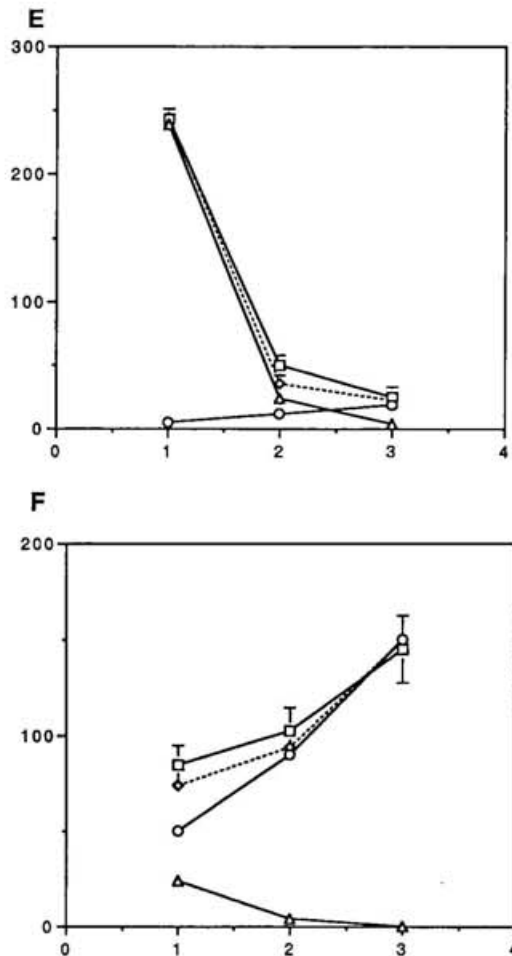


FIG. 1—Continued

allantois region of 8.5-d.p.c. embryos (ca. 2×10^4 cells) or half of a genital ridge of 11.5-d.p.c. embryos (ca. 3×10^4 cells). In the clonal culture experiments, the cell suspension was processed through limiting dilution so that a single PGC would be plated in 30% of wells of 96-well culture plates. The ESM culture medium used in this study consisted of DMEM supplemented with 10% FCS, nonessential amino acids, and nucleosides [7]. The culture medium was replaced everyday with fresh ESM.

AP staining and cell counting. Cultured samples were fixed with cold ethanol for 10 min and stained with histochemistry for AP activity as described previously [7]. The AP-positive cells were counted manually by using an inverted microscope and counters. Growth curves were obtained by calculating the means and standard deviation from results of at least eight wells in three or four separate experiments in the mixed culture, or six wells in two separate experiments using the somatic cell enriched feeder. In the case of clonal culture, we repeated the experiment three times. Each one included six 96-well plates, and we examined all the wells and counted PGCs in each well. We found PGCs in ca. 30% of wells as expected. We also classified and counted cells according to morphological criteria (polarized, spread, and round) described in previous studies [5]. The results of the three separate clonal culture experiments gave the same tendency, and we used them together for calculation and presentation in Figs. 3–6.

RESULTS

Mixed Culture Experiments

As a preliminary experiment to confirm the previously reported growth pattern, PGCs and coexisting somatic cells obtained from 8.5- or 11.5-d.p.c. embryos were cultured on the STO feeder layer (Fig. 1A). The 8.5-d.p.c. PGCs increased in number for 3 days. The 11.5-d.p.c. PGCs showed a drastic decrease between Day 1 and Day 2, and they almost disappeared on Day 3. When examined more closely, the 11.5-d.p.c. PGCs showed a small increase for 1 day after plating (data not shown). These data are consistent with the growth pattern *in vitro* reported previously [7, 10]. Thus, PGCs *in vitro* seemed to mimic the pattern of proliferation and growth arrest *in vivo*.

Then, we examined whether coexisting somatic cells have regulative effects on the growth pattern of PGCs in culture. We carried out the mixed culture of 1 unit of the 8.5-d.p.c. cells and 1 unit of the 11.5-d.p.c. cells (1:1). Such mixed culture (1:1) showed a decrease of PGCs between Days 1 and 2, but an increase on Day 3 (Fig. 1A). Sums of numbers in simultaneous culture without mixing would give an expected value if there is no interaction between cells at two different stages. The number of PGCs in the mixed culture came very close to such expected values (Fig. 1A). We confirmed that there was no influence on the growth pattern of the cell density in culture wells (Fig. 1B).

In addition, PGCs and somatic cells at 8.5 d.p.c. were mixed with the cells at 11.5 d.p.c. at various ratios to detect the possible effect of the somatic cells at 11.5 d.p.c. on PGCs at 8.5 d.p.c. or vice versa. There was no such effect in all experiments (Figs. 1C–1F). Even after changing the ratio, the total PGC number in these mixed cultures was similar to the expected number. In particular, the final number of PGCs on Day 3 came very close to the expected number in all experiments.

We carried out another experiment aiming at increasing possible influence from the somatic cells by replacing half the STO feeder cells with somatic cells from genital ridges. To remove PGCs from dissociated cells of genital ridges at 11.5 d.p.c., we treated them with mitomycin C as described under Materials and Methods, because it causes more damage on PGCs than other cells in embryo [21]. In fact, all PGCs disappeared by 2 days in culture after the treatment. Therefore, all PGCs detected after Day 2 in the mixed culture using such prepared feeder layer (Fig. 2) should have originated from 8.5-d.p.c. embryos. The number of PGCs increased until Day 3 in such experiments, and we did not detect any growth-arresting effects from the genital ridge somatic cells at 11.5 d.p.c.

Thus, our results indicated that PGCs in the mixed culture followed an autonomous pattern of proliferation until 12.5 d.p.c. and growth arrest on 12.5–13.5

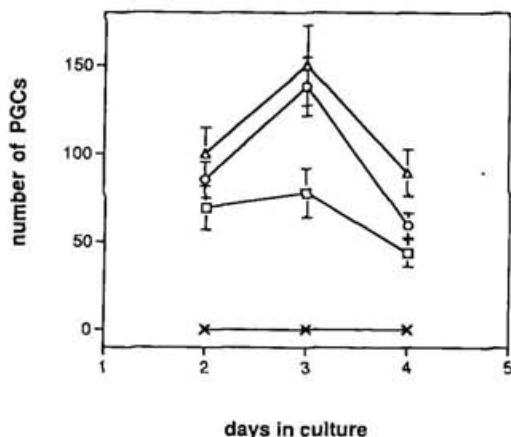


FIG. 2. Changes in PGC number on a feeder layer enriched with somatic cells at 11.5 d.p.c. ○, PGCs from 8.5-d.p.c. embryos cultured on the somatic and STO cells; △, on a usual STO feeder; □, on a half number of STO cells; ×, somatic cell feeder without plating PGCs from 8.5-d.p.c. embryos.

d.p.c., and that they were not affected by coexisting somatic cells at a different stage.

Clonal Culture of PGCs at 8.5 d.p.c.

To obtain more detailed information about the proliferation pattern of PGCs, single PGCs from 8.5-d.p.c. embryos were cultured separately in wells of 96-well culture plates (Figs. 3A–3E). The SI/SI⁴-m220 cells were used as feeder cells for such clonal cultures to improve the survival and to allow proliferation. Counts of the AP-positive cells in each well and histograms showing distribution of colony sizes indicated presence of weak peaks at 4 and 8 cells per well on Day 2 and 4, 8, and 16 cells on Day 3. Such distribution of the cell numbers suggested high viability and weakly synchronized cell division of PGCs for 4 days. There were many small colonies (colony size of 2–4) throughout the culture period.

On Day 5, however, we observed debris of AP-positive cells on feeders, indicating cell death of PGCs (data not shown). The histogram of Day 5 showed a decrease in the colony number irrespective of size. There was no indication that any particular group was death-prone. There were a few colonies that continued proliferation until Day 5 and which consisted of more than 38 cells (Fig. 3E). In such experiments, the number of wells containing more than one PGC did not decrease significantly for 4 days (less than 7% per day), but it decreased by ca. 20% on Day 5 (Fig. 4), again indicating high viability until Day 4 and the beginning of cell death on Day 5.

Clonal Culture of PGCs at 11.5 d.p.c.

The pattern of growth arrest of PGCs was examined by clonal culture of PGCs at 11.5 d.p.c. (Fig. 5). PGCs

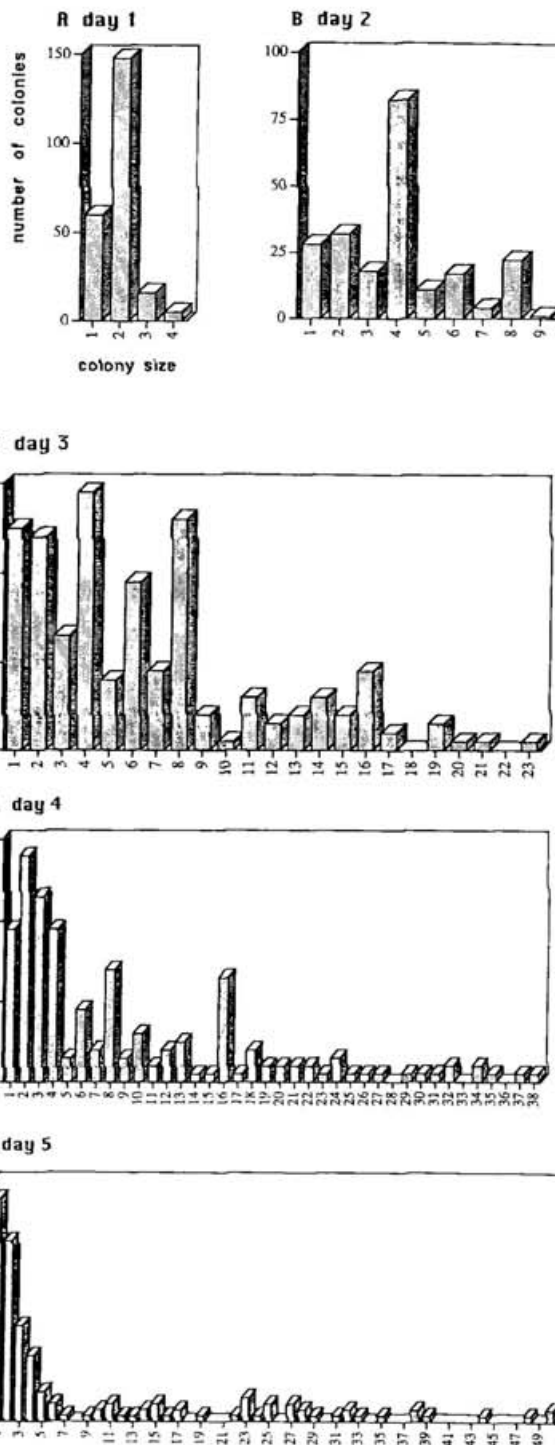


FIG. 3. Histograms showing distribution of the colony size in the clonal culture of the 8.5-d.p.c. PGCs. Vertical axis indicates number of colonies (wells), and horizontal axis indicates colony size (cell number). (A–E) Day 1 to Day 5, respectively.

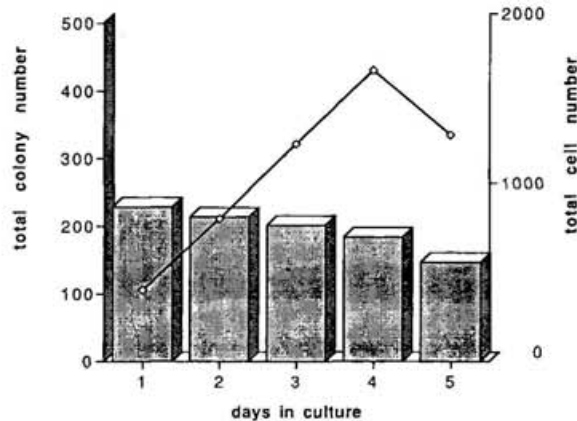


FIG. 4. Changes of the total colony number (bars) and total cell number (\diamond) in the clonal culture of the 8.5-d.p.c. PGCs.

isolated from the gonads at 11.5 d.p.c. were cultured separately in 96-well plates. Counting of the PGC number in each well indicated that 60% of PGCs divided once during the first day, and all PGCs stopped their proliferation by Day 1. Then, 80% of PGC colonies and 86% of PGCs disappeared between Day 1 and Day 2. All colonies having two or four PGCs disappeared by Day 3.

Morphological Changes of PGCs

We noticed that the morphology of PGCs in culture changed with age and duration of culture period. Therefore, we classified the PGCs into three categories and enumerated each category in the clonal culture of the 8.5-d.p.c. PGCs (Figs. 6, 7A-7C). The first polarized type is well spread on the substrate and shows polarization with the length of the long axis being at least twice that of the short axis. Thus, they probably have

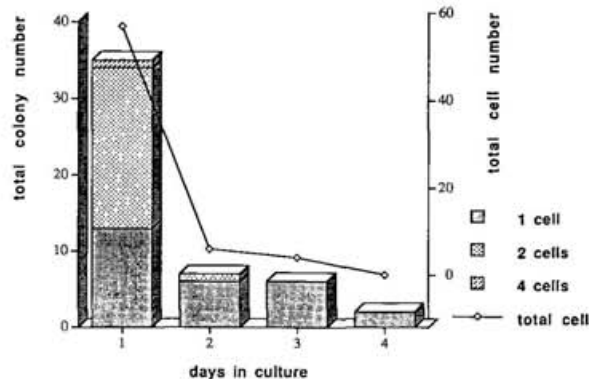


FIG. 5. Changes of the colony number and colony size (bars), and the total cell number (\diamond) in the clonal culture of the 11.5-d.p.c. PGCs.

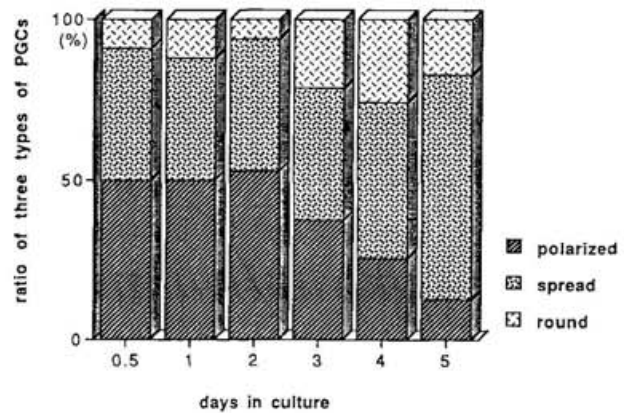


FIG. 6. Changing ratios of the three types of PGCs in the clonal culture of the 8.5-d.p.c. PGCs.

characteristics of motile cells during the migrating phase. The second or "spread" type is well spread but shows no polarization. The last or "round" type is rounded up, lacks lamellipodia, and is not adherent to the feeder cells.

During the first 2 days, relative ratios of the three types did not change. From Day 3, however, the spread and round types increased at the expense of the polarized type (Fig. 6). The change of ratios probably indicates transformation from the polarized to the spread or round types. It is very unlikely that the change was caused by death of the polarized cells because the whole population of the PGCs in our culture system showed no sign of cell death until Day 4 (Fig. 4). We also observed that almost all the wells contained a mixed colony in which two or three types of PGCs were present in a single well on Days 3 and 4 (Figs. 7A-7C). On Day 5, the spread type increased, but the round type decreased. PGCs of the spread type seemed to survive better than the round type so that the apparent ratio of the spread type increased on Day 5. In fact, there were many less mixed colonies on Day 5 than on Days 3 or 4 (Fig. 6), and we noticed AP-positive cell debris on Day 5.

DISCUSSION

Autonomous Regulation of the PGC Proliferation

PGCs in culture are characterized by age-dependent proliferation and growth arrest [7, 10, 22] suggestive of either autonomous regulation or regulation by coexisting somatic cells. Because it is difficult to obtain purified PGCs without somatic cells or to label PGCs with some reagents during the migrating phase, we carried out the mixed culture experiments at various ratios to detect any influence from the somatic cells between different developmental stages. In all the mixed cul-

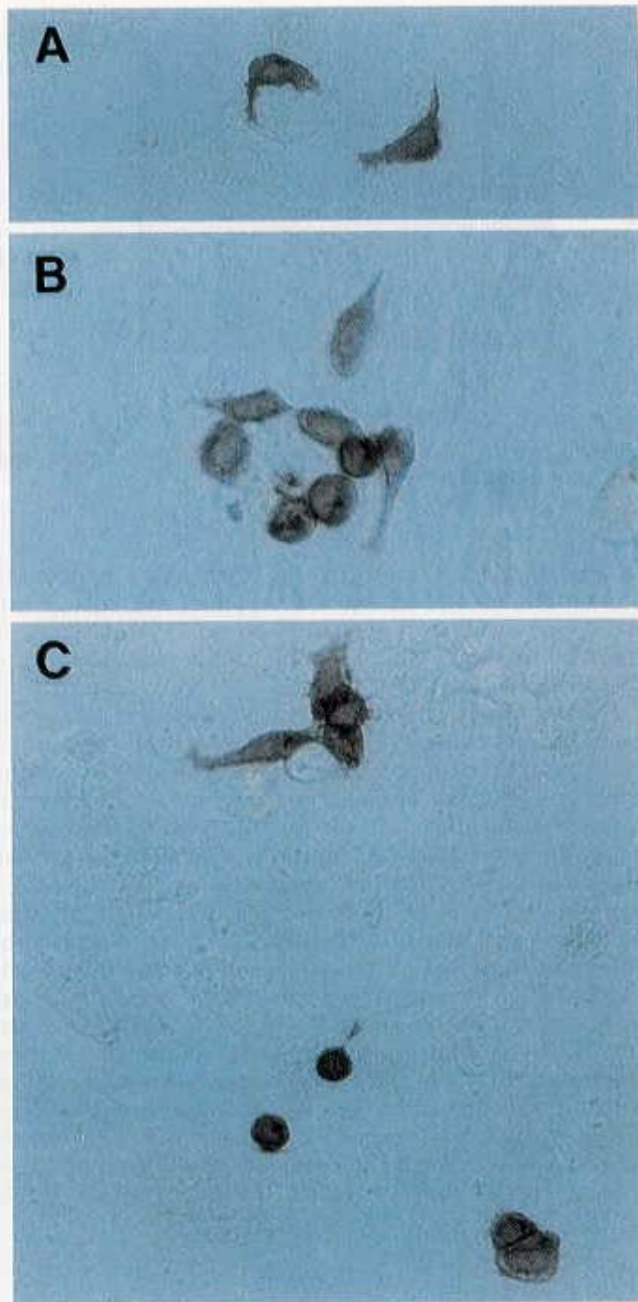


FIG. 7. Morphology of PGCs from embryos at 8.5 d.p.e. in clonal culture. (A) PGCs of the polarized type on Day 1. (B and C) Mixed colonies consisting of the three types of PGCs on Days 3 and 4, respectively. All photographs are at the same magnification of 500 \times .

tures, including those which used the feeder layer enriched with somatic cells, there was no detectable effect of somatic cells on the growth pattern of PGCs. Instead, the PGCs showed an age-dependent proliferation pattern. For example, there was neither a growth ar-

resting effect of 11.5-d.p.e. somatic cells on PGCs at 8.5 d.p.e. nor a growth-promoting effect of 8.5-d.p.e. somatic cells on PGCs at 11.5 d.p.e. The proliferation-arresting activity, such as that of TGF- β [23], was not detected in the genital ridge cells at 11.5 d.p.e. in our experiments. Our results indicate that there is an autonomous regulation mechanism in PGCs which causes spontaneous transition from cell proliferation to growth arrest at an age corresponding to 12.5–13.5 d.p.e.

How Do PGCs Measure Their Time?

Since the PGCs can regulate their proliferation and growth arrest without any instruction from somatic cells, they must measure their time autonomously. There are several mechanisms so far known for the measurement of timing in cell differentiation. For example, differentiation of the glial progenitor O2A cells is timed by the number of cell division [12, 13, 24]. Results of our clonal culture, however, indicated a large variation of colony size at the time of growth arrest. Therefore, the number of cell division is not directly connected to growth arrest in PGCs. Moreover, the data so far reported indicate that the increased proliferation of PGCs in the presence of several growth factors does not significantly alter timing of growth arrest [7, 10, 14].

PGCs from 8.5-d.p.e. embryos showed morphological changes *in vitro*. The ratios of the three types of PGCs started to change on Day 3. The polarized type decreased, while the spread and round types increased. This transformation of the PGCs in our culture seems to follow the differentiation process of PGCs *in vivo*, because examination of PGCs freshly obtained from embryos at various stages showed the similar differences in cell shapes [5]. Our present results indicate that PGCs at 8.5 d.p.e. have an autonomous capacity to transform from the polarized to round type via the spread type. Such change simulates the developmental progress *in vivo* when PGCs arrive at the genital ridge after migration and differentiate into nonmotile gonial cells. It is important to note that the three types of PGCs appeared not as separate colonies but in single PGC colonies very frequently on Days 3 and 4, thus making mixed colonies.

These results on the proliferation and morphological changes in the clonal culture of PGCs are most consistent with the hypothesis that they are stochastically regulated events. So far, several stochastic models have been reported in differentiation of the erythroid cells [25, 26], pigment cells [27], keratinocytes [28, 29], and olfactory neurons [30]. These models predict that the proliferation arrest and morphological transition of PGCs would occur as a stochastic event with its probability increasing with development until 12.5–13.5 d.p.e. During the earlier phase, almost all PGCs continue proliferation without morphological change.

Then the probability increases gradually, leading to a higher frequency of growth arrest and morphological transition. Such a stochastic model is in excellent agreement with our results on the wide distribution of colony sizes on Days 4 and 5, when the proliferation is arresting, and also on the appearance of the mixed colonies consisting of the morphologically different types of PGCs in each colony.

No Subpopulation of PGCs?

Our results did not suggest the presence of any subpopulation of PGCs with higher proliferation ability or less differentiated status. Appearance of the EG cell lines from PGCs under certain culture conditions [10, 11] might have suggested the presence of a subpopulation having less differentiated characteristics similar to the stem cells. In our clonal culture, however, individual PGCs proliferated to give distribution of the colony size without clear indication of two or more subpopulations. It may be possible that the small colonies (colony size 1–4) represent a subpopulation of PGC with limited proliferation capacity. However, they may well include PGCs damaged in isolation and culture procedures. The cell death and disappearance of PGCs in the clonal culture also seemed to occur randomly. In addition, pattern of the morphological transition of PGCs indicated absence of any subpopulation related to the three types of PGCs. Although PGCs of the spread type increased their number on Day 5 in the culture, it was probably an outcome of the cell death and disappearance of the round-type PGCs which are not sufficiently supported under the present culture condition.

We thank U. Koshimizu and E. Kawase for valuable discussion, Y. Matsui and D. A. Williams for providing SV/Sl⁻-m220 cells, and M. T. Shokunbi for reading the manuscript. We also thank H. M. Yamamoto and A. Uchida for skillful technical assistance. Y. Ohkubo thanks all members of Dinner Seminar Group in N.I.G. for discussion. This work was supported by Grants-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

REFERENCES

- Ginsburg, M., Snow, M. H. L., and McLaren, A. (1990) *Development* **110**, 521–528.
- Nakatsuji, N. (1992) *Dev. Growth Differ.* **34**, 489–499.
- Wylie, C. C., and Heasman, J. (1993) *Semin. Dev. Biol.* **4**, 161–170.
- Coucouvanis, E. C., and Jones, P. P. (1993) *Mech. Dev.* **42**, 49–58.
- Donovan, P. J., Scott, D., Carnis, L. A., Heasman, J., and Wylie, C. C. (1986) *Cell* **44**, 831–838.
- Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K., and Hogan, B. L. M. (1991) *Nature* **353**, 750–752.
- Kawase, E., Yamamoto, H., Hashimoto, K., and Nakatsuji, N. (1994) *Dev. Biol.* **161**, 91–95.
- De Felici, M., Dolci, S., and Pesce, M. (1993) *Dev. Biol.* **157**, 277–280.
- Dolci, S., Pesce, M., and De Felici, M. (1993) *Mol. Reprod. Dev.* **35**, 134–139.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. M. (1992) *Cell* **70**, 841–847.
- Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L., and Donovan, P. J. (1992) *Nature* **359**, 550–551.
- French-Constant, C. (1994) *Curr. Biol.* **4**, 415–419.
- Price, J. (1994) *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 680–686.
- Godin, I., Wylie, C., and Heasman, J. (1990) *Development* **108**, 357–363.
- Godin, I., Deed, R., Cooke, J., Zsebo, K., Dexter, M., and Wylie, C. C. (1991) *Nature* **352**, 807–809.
- Dolci, S., Williams, D. E., Ernst, M. K., Resnick, J. L., Brannan, C. I., Lock, L. F., Lyman, S. D., Boswell, H. S., and Donovan, P. J. (1991) *Nature* **352**, 809–811.
- Matsui, Y., Zsebo, K. M., and Hogan, B. L. M. (1990) *Nature* **347**, 667–669.
- Brannan, C. I., Lyman, S. D., Williams, D. E., Eisenman, J., Anderson, D. M., Cosman, D., Bedell, M. A., Jenkins, N. A., and Copeland, N. G. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 4671–4674.
- Flanagan, J. G., Chan, D. C., and Leder, P. (1991) *Cell* **64**, 1025–1035.
- Keshet, E., Lyman, S. D., Williams, D. E., Anderson, D. M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Parada, L. F. (1991) *EMBO J.* **10**, 2425–2435.
- Tam, P. P. L., and Snow, M. H. L. (1981) *J. Embryol. Exp. Morphol.* **64**, 133–147.
- De Felici, M., and McLaren, A. (1983) *Exp. Cell Res.* **144**, 417–427.
- Godin, I., and Wylie, C. C. (1991) *Development* **113**, 1451–1457.
- Temple, S., and Raff, M. C. (1986) *Cell* **44**, 773–779.
- Gusella, J., Geller, R., Clarke, B., Weeks, V., and Housman, D. (1976) *Cell* **9**, 221–229.
- Gordon, M. Y., and Blackett, N. M. (1994) *Leukemia* **8**, 1068–1073.
- Bennett, D. C. (1983) *Cell* **34**, 445–453.
- Rheinwald, J. G., and Beckett, M. A. (1980) *Cell* **22**, 629–632.
- Levevson, R., and Housman, D. (1981) *Cell* **25**, 5–6.
- Rospars, J. P., and Lansky, P. (1993) *Biol. Cybern.* **69**, 283–294.

Received September 22, 1995

Revised version received October 16, 1995