

令和 2 年 6 月 24 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860505

氏 名 伊神香菜子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： カリフォルニア州 ノバトー（国名： アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
哺乳類メスの生殖細胞の運命決定メカニズムの解明
3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日
4. 受入機関名及び部局名
Buck Institute for Research on Aging Center for Female Reproductive Longevity and Equality
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

【 哺乳類メスの生殖細胞運命はどのように決まるのか 】

本研究では、哺乳類メスの生殖細胞の運命決定メカニズムを明らかにすることを目的とした。哺乳類メスの生殖細胞は胎生期にほぼ形成される。生殖細胞は発生初期に体細胞分裂により一時的に増殖し、その後徐々に死滅する。マウスでは増殖した生殖細胞のうち、わずか 20%しか生き残らず、この生き残った細胞が卵母細胞となる。なぜ少数の卵母細胞しか残らないのか、どの細胞が生き残り卵母細胞になるのか未だ明らかになっていない。

生殖細胞が体細胞分裂により増殖するとき(E14.5 まで)、(図 2)、2 つの娘細胞はちぎれることなく細胞間橋 (intercellular bridge (ICB)) で繋がった状態を維持する。複数回分裂することで、複数の細胞が ICB で繋がった合胞体(シスト)を形成する。このシスト内でミトコンドリアや中心体、ゴルジ体などのオルガネラの輸送が起こり、同シスト内の一部の細胞にオルガネラの集合体を形成する。この細胞が後に卵母細胞になると考えられる(図1)。そして、オルガネラを失った細胞は死滅する。

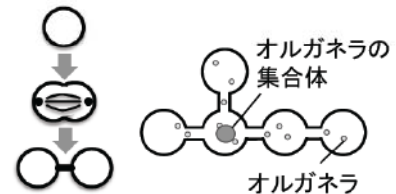


図 1. 生殖細胞の合胞体の構造
A. 分裂後も娘細胞は ICB によって繋がっている。B. 一部の細胞に向かってオルガネラが輸送され、オルガネラの集合体を形成する。合胞体を構成する細胞の数や枝分かれのパターンは様々ある。

体細胞分裂によって増殖した生殖細胞は、E14.5 以降には ICB によって繋がっていた細胞同士がちぎれて合胞体が崩れだす(図2) (Lei and Spradling, 2013)。これまで我々は、早期に合胞体からちぎれて単一細胞になった細胞はアポトーシスにより死滅し、ICB を 3 つ以上持つ細胞(枝分かれ構造を持つ細胞)は生き残る傾向にあることを示唆する結果を得た。さらに、シストの崩壊パターンを数理モデル化と比較し、枝分かれ構造を持つ細胞に結合している ICB がちぎれにくいという結果を得た。この現象はシスト内で起こる以下のようなイベントを想起させる。枝分かれ細胞が隣接する細胞からオルガネラを受けとり、生き残って卵母細胞になる。以上のことから、メスの生殖細胞ではシストを構成する細胞のうち、枝分かれを持つ細胞が卵母細胞になる確率が高いことが示唆された。そこで本研究では、枝分かれ構造を生み出す機構に着目し、その一端を明らかにした。

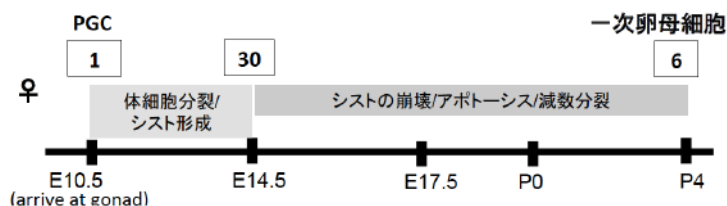


図 2. マウスのメスの生殖細胞形成のタイムライン
四角内は単一の始原生殖細胞(PGC)から生み出される細胞数(平均)。

《方法、結果および考察》

実験 1, 枝分かれ構造は規則を持って形成されるのか

合胞体を構成するすべての細胞は同調して分裂するため、8 細胞シストで始めて枝分かれ構造が観察される(図 3)。そこでまず、枝分かれ構造がランダムに形成されているのか、規則性を持って形成されているのかを検討するため、8 細胞シストに着目した。CreERTM/loxP システムを用いた単一細胞系譜追跡の系を使い、単一始原生殖細胞

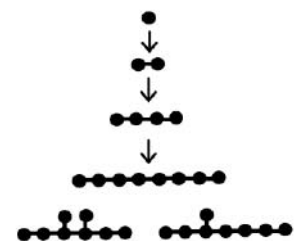


図 3. 1 細胞から8細胞シストの形成
8 細胞シストは 3 種類のパターンが観察される。

(PGC)由来の細胞集団(クローン)を識別、さらに ICB 認識マーカーの抗体染色と組み合わせることでそれぞれの合胞体構造を識別した。もし、ランダムに枝分かれ構造が作られるのであれば、8細胞シストの発現頻度は、枝分かれなしのシスト、一つ枝分かれを持つシスト、2つ枝分かれ細胞を持つシストがそれぞれ、25%、50%、25%の頻度で観察されると予想される。しかし、実際には、46%、19%、35%の頻度で観察された(図 4)。これは、枝分かれ構造がランダムに作られているのではなく、何かによって制御されている可能性を示唆する。

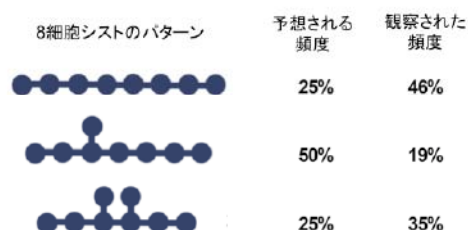


図 4. 8細胞シストの発現頻度

3種類の8細胞シストの発現頻度は、ランダムで枝分かれ構造を形成するときに予想される頻度と大きく異なる。

実験 2, E-Cadherin と中心体、ICB の発現パターン

シストの枝分かれ構造の形成は、細胞の分裂方向と ICB の接続位置に左右される(図 5, 7)。そこで、まず細胞分裂方向に大きく影響を与える中心体の発現に着目した(図 5)。枝分かれ構造が形成され始める E12.5 の生殖細胞を、生殖腺のホルマウント免疫染色法を用いて観察した。すると、細胞接着に重要な因子である E-Cadherin が生殖細胞の細胞膜に発現していた。その発現は、生殖細胞同士の接触部分で特に強くみられた。さらに、中心体は E-Cadherin を強く発現している細胞膜側に位置する傾向があった(図 6)。これまでの結果は、2018 Cold Spring Harbor meeting: Germ Cells でポスター発表した。

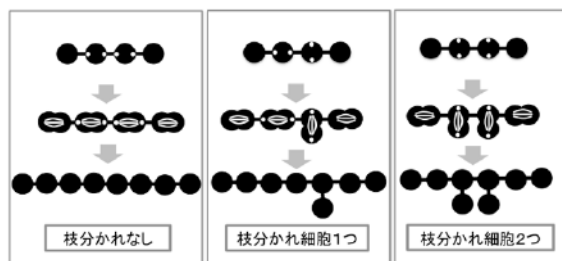


図 5. 中心体の位置が細胞分裂方向を決める

3種類の8細胞シスト形成は、中心体によって制御される細胞分裂方向に左右される。

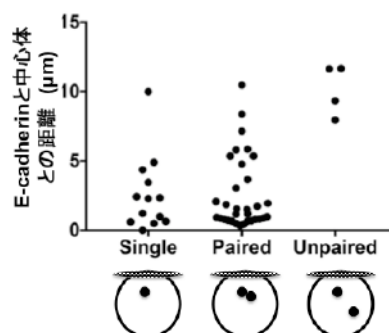


図 6. E-cadherin と中心体との距離

中心体は E-cadherin を強く発現している細胞膜側に位置する傾向にある。

ICB の細胞への接続位置も、枝分かれ構造の形成に影響する(図 7)。ICB の位置と E-Cadherin の発現の関係性を観察すると、ICB は常に生殖細胞同士が接触することにより形成される E-Cadherin 接合面の際に位置していた。つぎに、4細胞シストに着目した。4細胞シストの内側の2細胞のみが、次の細胞分裂の際に枝分かれ細胞を形成することができる。枝分かれ構造を形成するかは、一つの細胞に接続している2つの ICB 間の距離に依存する(図 7)。

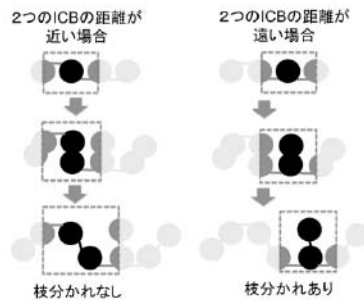


図 7. ICB の位置は枝分かれ構造の形成に影響を与える
4 細胞シストの中心 2 つの細胞において、接続する 2 つの ICB の距離が遠い場合、次の分裂で枝分かれ構造をつくりにくい(左)。一方で、2 つの ICB が近い場合、枝枯れ構造をつくりやすい(右)。

そこでシスト内側の2細胞において、ICB 間の距離を測定した。すると、野生型では距離が遠いものから近いものまで、様々なパターンが観察された。4 細胞シストにおいて、内側 2 つの細胞における ICB の距離の組み合わせを観察すると、図 8 で示す A, B, C の3つのパターンのどのパターンも観察された。これは、8 細胞シストの 3 つのパターンのどれも形成することを示唆する。

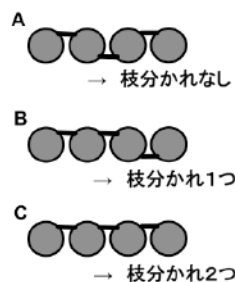


図 8. 4 細胞シストにおける ICB の位置は 8 細胞のシスト構造に影響する
4 細胞シストの内側 2 細胞において、(A)それぞれ結合する 2 つの ICB 同士が遠い場合、(B)1つの細胞では遠く、もう一方では近い場合、(C)どちらの細胞でも近い場合、それぞれ 8 細胞シストは、(A)枝分かれ構造をたない、(B)枝分かれ細胞を1つもつ、(C)枝分かれ細胞を 2 つもつシストが形成されると予想される。

次に、ICB の位置における E-Cadherin の影響を観察した。E-Cadherin のコンディショナルノックアウトマウス(ストックセンターから提供)を用い、シストを形成する前(E10.5)で生殖細胞での発現を抑制し、シスト形成に影響を与えるかを観察した。GFP 発現レポーター遺伝子を持つマウスと掛け合わせて単一細胞系譜追跡の系と組み合わせ、E-Cadherin がノックアウトされた細胞を GFP で識別できるようにした。野生型と同様に、シスト内側の2細胞において ICB 間の距離を測定したところ、E-Cadherin を欠損した生殖細胞では、全ての細胞でほぼ同じ距離であった。4 細胞シストにおいて、内側 2 つの細胞における ICB の距離の組み合わせを観察すると、観察したすべての 4 細胞シストにおいて、図 8 で示す A と C の中間のパターンを示した。

次に、E-Cadherin を欠損した生殖細胞における 8 細胞シストに着目し、図 4 で示す 8 細胞シストのパターンがどのような頻度で観察されるかを検討した。その結果、E-Cadherin を欠損した生殖細胞では、3 つのパターンの8細胞シストがランダムに形成されるときに頻度、25%,50%,25%に近い割合で観察された。以上の結果は、E-Cadherin が ICB の位置づけに影響を与え、枝分かれ構造の形成に関与することを示唆している。ここまでの結果は香港で開催された 2019 Gordon Conference Germinal Stem Cells で口頭発表した。現在論文にまとめている段階である。