

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02445

研究課題名(和文)生殖細胞が胚体外に生じる意義を問う

研究課題名(英文)The mechanisms and biological significance of primordial germ cell development in extragonadal environment

研究代表者

齋藤 大介(Saito, Daisuke)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：90403360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：「生殖細胞が胚体外に生まれる意義」は発生生物学における大命題であるが、いまだ不明である。我々は「生殖腺外での生殖細胞の維持機構と移動機構」の解明を通してこの問題に迫ることとした。材料は始原生殖細胞(PGC)が生殖線までの移動路として血管を使用する鳥類胚である。我々はPGCが血管内に位置を換える細胞機構(血管形成時の内皮細胞によるPGC取り込み)、PGCが血管内から血管外へ遊出する機構(PGC高弾性による毛細血管でのトラップと膜ブレブによる血管外遊走)を明らかにした。さらに、FGFシグナルの過剰インプットによりPGCが腸管膜内でクラスターを形成することも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から得られたPGCが血管内に入り、血管外に出る機構の理解はがん細胞の血行性転移の理解に直結する。がん細胞の血行性転移の機構は体内深部で起こるため捉えにくく細胞レベルでの理解が遅れているが、詳細な生体イメージングが可能な鳥類PGCの血行性転移解析系のインパクトは極めて大きい。胚細胞腫瘍は生殖線まで移動できなかったPGCが変容してできる腫瘍と考えられるが、その発症機構の大部分は不明である中で、今回我々は過剰なFGFインプットが腸管膜におけるPGCの腫瘍化を引き起こすことを見出した。生殖細胞が胚体外に生まれる意義の理解自体、学術的にも大きなインパクトがある。

研究成果の概要(英文)：The germ cells are born in extraembryonic region, and migrate toward the gonad. Why the germ cells are formed outside the embryo (gonad) is one of major problems in developmental biology, but it remains unknown. We approached this problem by elucidating the mechanism of maintenance and migration of germ cells outside the gonad. The material is avian embryos in which primordial germ cells (PGCs) use blood vessels as the pathway to the gonad. We revealed the cellular mechanism by which PGCs relocate into blood vessels (PGC envelopment by endothelial cells during angiogenesis), and the mechanism by which PGC extravasation (occlusion of circulating PGCs in micro-capillaries due to PGC high stiffness, and transmigration using membrane blebs). Furthermore, we found that excessive input of FGF signals into PGCs transform them into large tumor-like clusters in the dorsal mesentery.

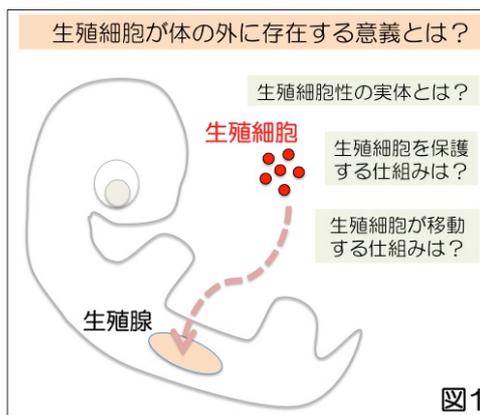
研究分野：発生生物学

キーワード：始原生殖細胞 ニワトリ胚 うずら胚 鳥類胚 イメージング 細胞移動 細胞分化 幹細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生命誕生から 40 億年の間、生物は次世代を残すことで連続的に存続してきた。その連続性を保つのが生殖であり、生殖細胞 (の情報) が次世代に伝達されることが連続性の仕組みといえる。そのため生殖細胞は、個体の一生 (生殖サイクル) を通じて大切に維持されると考えられている。成体では生殖腺 (卵巣や精巣) が特殊な環境を提供することで生殖細胞を維持する。しかしながら次世代生命体を新構築するタイミング、つまり胚体 (ヒトでいうところの胎児) の形成時期に目を向けると、そこには未解明の謎が複数存在している。そもそも初期の胚体にははじめ生殖腺がない。生殖細胞はいわば“むきだし”で存在し、しかも胎児の体を構成する細胞から遠くかけ離れた体外にある。それらはのちに体内で形成される生殖腺まで長距離を移動して定着する (図 1 参照)。



そもそもどうして生殖細胞は胚体の外で作られるのか (作られなければならないのか) は生殖を理解する上での根源的かつ「核心的」な問題であるにもかかわらず、理解の手がかりすらつかめていない。また、上記問いに対して階層的に一段下ではあるが、「むきだし」の生殖細胞の性質 (生殖細胞性) はどのように守られるのか、生殖細胞は生殖腺 (ゴール) までどのような仕組みで移動しているのか、そもそも生命連続性を保証する生殖細胞性の実体とは何か、との問題理解も学術的観点、および医療・家畜産業応用の観点において極めて重要である。しかしながら、上記諸問題の解析に最適化されたモデルシステムが欠如していることが大きな原因となり、解析は十分に進んでいない現状にあった。

2. 研究の目的

生殖細胞は生命の連続性を支える重要かつ特殊な細胞である。発生時期の生殖細胞は、ほぼすべての動物において胚体の外に存在し (あるいは作られ)、胚体内へ長距離移動することで生殖腺 (精巣・卵巣) の中に定着する。そして生殖細胞の性質は生殖腺の提供する特殊環境により維持されることとなる。ここに大きな疑問がある。「なぜ生殖細胞は胚体外に生まれるのか?」である。本研究課題ではこの発生生物学における大命題を明らかにすることを目的とした。具体的な目的は、「生殖細胞性の実体」の解明、「胚体外での生殖細胞の維持機構と移動機構」の解明とした。

3. 研究の方法

胚時期の生殖細胞である始原生殖細胞 (Primordial germ cell: PGC) を培養し、増殖させる。培養下で蛍光タンパク質や機能遺伝子を発現させる。このような遺伝子操作 PGC を胚に移植し、胚内移動、細胞分化、生存・増殖における影響を検証する。あるいは遺伝子操作 PGC を培養下で運動能、細胞分化、生存・増殖における影響を検証する。免疫染色あるいは in situ hybridization 法を用いて PGC やその他細胞の局在を記載する。

4. 研究成果

(1) 鳥類 PGC は血管形成 (vasculogenesis) 中の血管内皮細胞に取り込まれることで血管組織内に侵入する

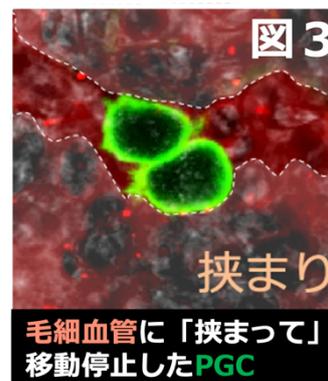
PGC の血管内侵入機構を解析する目的で、ウズラ初期胚において血管内皮細胞と PGC の免疫染色を行った。Hamburger and Hamilton (HH) ステージ 8 では、生殖三日月環領域において PGC も血管内皮細胞もそれぞれ単独の細胞として存在しており、接触している像は認められなかった。しかし HH10 までに PGC は内皮細胞に「包まれる」ことがわかった (envelopment) (図 2)。その後血管内皮細胞は PGC を包み込みながら血管形成を進行し、最終的にネットワークを持った血管の内腔に PGC が位置することがわかった。この一連の細胞間相互作用が示すことは、PGC が血管に「侵入」という表現は適当ではなく、血管が主導して細胞を血管組織に導き入れるということであり、他に例が見当たらない貴重な発見であった。がん細胞の血管内侵入に関しても、血管内皮細胞の主導的役割について注目する価値はありそうである。本内容は 2021 年、Developmental Dynamics 誌に報告している。



(2) 鳥類 PGC の血管外へ遊走には細胞の弾性調整が重要である。

血管内の鳥類 PGC が血管外へ遊出する機構を明らかにするために、EGFP ラベルした培養 PGC を孵卵 2.5 日程度のニワトリ胚血管内に移植する方法や、生体内で内在 PGC を可視化する方法を用いて、血管内における PGC 挙動のタイムラプス解析を行った。血管内において始め PGC は血流に流される形で受動的に循環移動し、特定の毛細血管領域にて移動を停止した。そののち、血

管内で移動を停止していた PGC は血管壁を遊出することがわかった。毛細血管領域における循環停止挙動を詳しく解析したところ、PGC の多くは「挟まる」ことで停止することを見出した (図 3)。停止するメカニズムとして我々は、PGC が「硬い」細胞なのではないかと仮説した。そこで血中の PGC を取り出して原子間力顕微鏡にて細胞弾性を計測したところ、赤血球の約 8 倍の硬さを保つことがわかった。硬さの責任因子を探索した結果、F-actin が PGC の細胞膜直下に集積していることを見出し、F-actin の機能を薬剤や遺伝子ツール等で阻害したところ PGC の弾性が低下することも示された。低弾性化した PGC ではもはや毛細血管領域での循環停止が起こらず、最終的な到達地である生殖腺へも辿り着くことはなかった。これらの結果より、PGC の循環停止には F-actin によってもたらされる高弾性化が必要であることが示された。



興味深いことに、循環停止後の PGC は細胞弾性を一部キャンセルして膜ブレブと呼ばれる構造を作り出し、血管壁を通過することを確認した。これは PGC が循環移動から血管外遊出の過程でダイナミックに細胞弾性を調節することを示唆するものである。転移前のがん細胞は総じて「柔らかい」細胞であることが知られるが、一旦血管内に入り、循環移動の際に細胞弾性が変化するのはわかかっていない。循環中のがん細胞は「硬くなる」のかは興味のあるところである。この内容は 2022 年 4 月に Nature に投稿しており (2021 年 5 月現在 under consideration)、bioRxiv にも投稿済みである。

(3) 鳥類 PGC の移動の大半においてケモカインレセプター CXCR4 の機能は必要ではない

マウス、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルの PGC においてはケモカインレセプターである CXCR4 が発現しており、その機能は PGC の移動に必要であることが (程度の差はあるが) 示されている。しかしながら鳥類の PGC 移動についての機能はよくわかっていない。そこでドミナントネガティブ型の CXCR4 (DN-CXCR4) を発現する PGC を培養下で作成し、これを胚内に移植して移動能力を見ることで CXCR4 の機能検証を行った。DN-CXCR4 を発現する PGC を孵卵 2.5 日程度のニワトリ胚血管内に移植したところ、ほとんどの PGC は生殖線まで移動できないことがわかった。次にどの移動過程が阻害されているかについて検証したところ、血液循環移動、血管壁通過については全く正常に行われていた。消去法で考えると PGC において CXCR4 が必要となる移動局面は腸管膜中でのアメーバ移動過程である可能性が高い。現在この仮説の検証を進めている。また、PGC の移動過程の初期、血管内皮細胞に取り込まれるまでの過程において CXCR4 の機能が必要かも検討中である。

(4) 生殖腺外 PGC の運命解析

多くの PGC は発生中、生殖線まで移動を行うが、生殖線まで到達できない PGC (異所的 PGC) が存在することが各種動物胚において報告されている。このような PGC が将来どのような運命を辿るかについては、細胞死を起こすとの報告例はあるもののその全貌は明らかではない。そこで培養下において恒常的に蛍光タンパク質を発現させた PGC ライン、生殖細胞関連遺伝子 DDX4 レポーター PGC ライン、および幹細胞関連遺伝子 Nanog レポーター PGC ラインを作成し、これらを孵卵 2.5 日程度のニワトリ胚血管内に移植しその運命や状態変化を追跡した。孵卵 4 日程度で PGC は生殖腺に到達するが、孵卵 5 日目の段階で、頭部、および腸管膜に異所的 PGC が多く見られた。さらに孵卵を 7 日目には頭部における異所的 PGC はほとんど検出されなくなるが、腸管膜では未だ多くの PGC が観察された。そこで腸管膜での異所的 PGC の存在や状態を引き続き追跡したところ、孵卵 16 日においても PGC が観察された。これらの細胞は DDX4 および Nanog 陽性であった。興味深いことに同じステージの生殖腺内の PGC では Nanog の発現が減少するが (減数分裂の開始により)、腸管膜の異所的 PGC では以前 Nanog 陽性であった。これらの結果から、異所的 PGC は未分化な状態を維持し続けている可能性が得られた。

(5) PGC 移動における細胞自律的な FGF シグナルの役割

脊椎動物胚の PGC 移動における FGF シグナルの役割はマウスとゼブラフィッシュで一部解析されているがあまりわかっておらずかつ矛盾する面もある。鳥類 PGC の移動における FGF シグナルの機能解析はこの問題を補完できる可能性がある。そこで培養下の PGC にドミナントネガティブ型の FGFR1 (DN-FGFR1) もしくは恒常活性化型の FGFR1 (CA-FGFR1) を発現させた PGC を作成し、引き続き培養下、もしくはこれを胚内血管に移植することで移動における影響を解析した。培養下において、DN-FGFR1 発現 PGC は細胞死を起こすことが明らかとなった。また、DN-FGFR1 発現 PGC を胚内血管に移植すると、PGC の細胞死は起こらず、ほぼ正常に生殖線まで移動することが明らかとなった。なお、生殖線まで移動しないいわゆる生殖腺外 PGC の数は顕著に減少していた。これらの結果は、ニワトリ PGC において血管内から生殖線までの移動には FGF のインプットは必要ないことが示唆された。胚内において細胞死が起こらなかった原因は不明だが、他の因子による補償がなされた可能性がある。一方で、CA-FGFR1 発現 PGC を血管内に移植してもその後全く生殖線まで到達できず、ほとんどの PGC が腸管膜中に止まることがわかった。またこの際、腸管膜中で PGC はクラスターを形成した。これらの結果から、移動中の PGC における FGF シグナルの過剰なインプットは逆に移動を妨げることが示唆された。FGF シグナル過剰インプットによる細胞のクラスター化 (腫瘍化) は胚細胞腫瘍との関連が期待されるため、今後はクラスターの性質について精査する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murai Hidetaka, Shibuya Minami, Kishita Ryohei, Sunase Chihiro, Tamura Koji, Saito Daisuke	4. 巻 250
2. 論文標題 Envelopment by endothelial cells initiates translocation of avian primordial germ cell into vascular tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1410-1419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvdy.332	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamanaka Satoshi, Murai Hidetaka, Saito Daisuke, Abe Gembu, Tokunaga Etsuko, Iwasaki Takahiro, Takahashi Hirotaka, Takeda Hiroyuki, Suzuki Takayuki, Shibata Norio, Tamura Koji, Sawasaki Tatsuya	4. 巻 40
2. 論文標題 Thalidomide and its metabolite 5 hydroxythalidomide induce teratogenicity via the cereblon neosubstrate PLZF	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e105375
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2020105375	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshino, T. and Saito, D.	4. 巻 92
2. 論文標題 Epithelial-to-mesenchymal transition-based morphogenesis of dorsal mesentery and gonad.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Semin. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 105-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcd.2018.09.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Egawa, S., Saito, D., Abe, G. and Tamura, K.	4. 巻 5
2. 論文標題 Morphogenetic mechanism of the acquisition of the dinosaur-type acetabulum.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 R. Soc. Open Sci.	6. 最初と最後の頁 180604
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsos.180604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 玉木恵、村井英隆、米井小百合、阿部玄武、田村宏治、齋藤大介
2. 発表標題 鳥類始原生殖細胞が持つ微絨毛の機能解析
3. 学会等名 第42回・日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Saito, D.
2. 発表標題 Cell stiffness is critical for germ cell migration in avian embryo
3. 学会等名 Tokyo 2018 Cell and Developmental Biology Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 矢口陽菜、齋藤大介
2. 発表標題 鳥類始原生殖細胞の各移動ステップにおけるSDF-1/CXCR4シグナルの役割
3. 学会等名 第92回日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木克弥、齋藤大介、熱田勇士
2. 発表標題 幹細胞因子Lin28による始原生殖細胞の自己複製制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
フランス	INSERM			