

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15001

研究課題名（和文）マウス胚において生殖細胞の起源となる細胞の同定

研究課題名（英文）Identification of origin for germ cells in mouse embryos

研究代表者

丹藤 由希子（Yukiko, Tando）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：70596212

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生殖細胞は、多細胞生物の子孫の継続を担う唯一の細胞である。哺乳類の生殖細胞は、発生に伴いシグナルタンパク質の作用で運命決定されるという考えが定説であるが、それだけでは初期胚内のわずか数細胞だけが生殖細胞に分化するメカニズムが解明されず、生殖細胞の起源となる細胞と、それを生み出す未知の因子の存在が考えられる。そこで本研究は、マウスの生殖細胞の起源となる細胞を同定することを目的とした。

生殖細胞の起源となる細胞の同定には至らなかったが、特定の細胞膜タンパク質を発現する細胞が、生殖細胞へと運命づけられる細胞である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、生殖細胞がどのように形成させるのかという疑問に対して、細胞表面に発現している遺伝子の発現の差が、生殖細胞にへと運命づけられる細胞を同定できる可能性を示した。今後の研究で生殖細胞の分化運命決定機構が明らかになれば、それを培養系に応用してこれまでよりも本来の状態に近い生殖細胞の分化誘導が可能となり、生殖細胞発生の研究がますます進展すると考えられる。また、この研究成果は、同じ哺乳類であるヒトの生殖細胞分化機構の解明につながり、生殖細胞の形成異常に伴う不妊の原因究明とその予防法の開発という形で社会に貢献できる成果になると期待される。

研究成果の概要（英文）：Germ cells are the only cells responsible for the continuation of offspring in multicellular organisms. It is a well-established idea that mammalian germ cells are fate-determined by the action of signal proteins during development, but that alone does not elucidate the mechanism by which only a few cells differentiate into germ cells. It is possible that there are origin of the germ cells and an unidentified mechanisms to produces them. Therefore, the purpose of this study was to identify the origin of mouse germ cells. Although the origin of the germ cell could not be identified, it was shown that cells expressing a specific cell membrane protein could be the origin of germ cells.

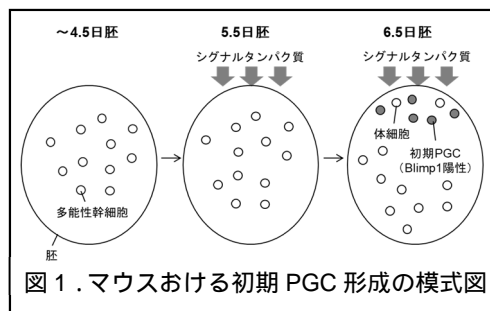
研究分野：発生生物学

キーワード：始原生殖細胞 マウス 初期胚

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、次世代へのゲノム情報の伝達によって子孫の継続を担う唯一の細胞である。どの多細胞生物にも存在して同じ機能を持つ一方で、その形成機構は動物により異なる。マウスやヒトを含む哺乳類では、胚発生が進むに従い、胚の外部からのシグナルタンパク質の誘導で生殖細胞に分化する細胞が決定すると考えられている。マウスでは受精後 6.5 日目に、BMP と Wnt シグナルの誘導で、生殖細胞分化の最終決定を担う Blimp1 という転写因子を発現する 10 個ほどの始原生殖細胞 (Primordial germ cells: PGC) が胚の特定部位に形成される (Nature 2005; 436: 207-13、図 1)。では、同じシグナルタンパク質にさらされている細胞集団の中で、なぜ特定の細胞だけが PGC になるのだろうか。この疑問は、シグナルタンパク質による誘導モデルでは説明できず、生殖細胞への運命を方向づける未知の因子の存在が考えられる。



### 2. 研究の目的

体の前後軸は、前方形成に寄与する細胞が 3~4 日胚の段階で形成されることで決定するため (Nat Cell Biol 2011; 13: 743-752)。この時点で初期胚内の細胞に不均一な極性が生じていることが示唆される。したがって、この時に生殖細胞の起源となるような細胞も区別されてくる可能性が考えられる。実際、ウイルスによる胚盤胞期の割球のマーキングで、生殖細胞と体細胞が別々の割球に由来したとの報告がある (Cell 1986; 46: 19-29)。また後述する申請者の予備実験でも、着床直後の初期胚細胞の単一細胞トランスクリプトームにある程度の不均一性があり、その中に PGC と類似のトランスクリプトームを持つ細胞の存在が示唆された。そこで本研究は、PGC と類似した遺伝子発現パターンを持つ細胞をより初期の胚に見出すことにより、マウスの生殖細胞の起源となる細胞を同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

3.5、4.5、5.5 日胚の細胞の中で初期 PGC と類似の遺伝子発現パターンを持つ細胞の抽出と、その細胞と初期 PGC で発現が増加している遺伝子の選出

初期胚のシングルセルトランスクリプトームデータ (アクセッション番号: GSE1000597) を用い、6.5 日胚の初期 PGC と類似の遺伝子発現パターンを持つ細胞を抽出した。また、それらの細胞で発現が増加している遺伝子の選出を行った。

#### PGC 分化に關与する転写因子の局在解析

本研究の実施中に、OTX2 が PGC 分化を抑制し、OTX2 の消失が PGC 分化に必須であることが報告された (Zhang et al, Nature 2018: 562; 595-599)。この報告から、OTX2 が消失する細胞は PGC へと運命づけられている可能性が考えられた。そこで、エピプラスト (E5.0~E7.5 にかけて) で OTX2 の消失が特定の細胞に見られるようになる時期と、その細胞の局在を詳細に観察した。

### 4. 研究成果

3.5、4.5、5.5 日胚の細胞の中で初期 PGC と類似の遺伝子発現パターンを持つ細胞の抽出と、その細胞と初期 PGC で発現が増加している遺伝子の選出

GSE1000597 のシングルセルトランスクリプトームデータの中から 6.5 日胚の中で Blimp1 と Oct4 の FPKM 値が 1 以上の 24 細胞( Blimp1+/Oct4+ )を PGC とみなして抽出し、同データベースの 5.5 日胚のシングルセルの FPKM 値( 192 細胞 )とともに PCA を行った結果、Blimp1+/Oct4+の集団に近い分布を示す 5.5 日胚の 4 細胞が抽出された( 図 2、○で示した細胞 )。しかしながら、Blimp1+/Oct4+の細胞と 6.5 日胚の他の細胞の PCA では両者の分布が分かれず、遺伝子発現プロファイルで Blimp1+/Oct4+の細胞を

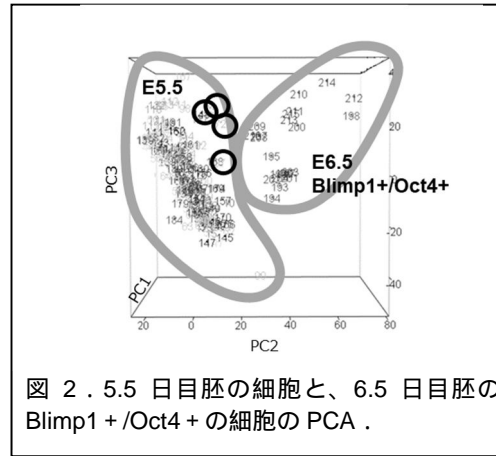


図 2 . 5.5 日目胚の細胞と、6.5 日目胚の Blimp1 + /Oct4 + の細胞の PCA .

分けることができなかった。そこで、明確に初期 PGC として単離された 6.75 日胚のシングルセル定量 PCR による遺伝子発現解析データ ( Biol Reprod 2006; 75: 705-716 ) の中で、初期 PGC で有意に発現が高い 6 遺伝子 ( Prdm1, Sox2, Dnmt3b, Fgf8, Nodal, Wnt5b ) について、GSE1000597 の 5.5 日胚の 192 細胞での発現を調べた。その結果、Fgf8 と Wnt5b の両方を発現する細胞が複数個抽出された。Fgf8 欠損マウスでは PGC が出現するため ( Genes & Dev 1999; 13: 1834-1846 ) PGC の形成に必須とは言えないと考えられた。Wnt5b について報告は無いため、PGC 形成に関わる遺伝子の候補とした。

上記の解析では候補遺伝子一つしか得られなかったため、PGC 形成に必要な BMP シグナル経路に関わる遺伝子発現を、上記 5.5 日胚のシングルセルトランスクリプトームデータで調べることにした。BMP2/4 の受容体の中で、type I のどちらか、かつ type II のどれかを発現し、かつ R-Smad と Co-Smad ( Smad4 ) を発現する細胞を選出した結果、51 細胞が抽出された。そこで、51 細胞と残り 141 細胞で遺伝子発現を比較し、51 細胞で 5 倍以上値が高い遺伝子を抽出したところ、74 遺伝子が該当した。74 遺伝子の Functional annotation 解析の結果、細胞膜や細胞間相互作用に関わる遺伝子が複数個存在した。そこで特定の細胞膜タンパク質が PGC になりうる細胞に発現し、PGC への分化に関与している可能性を考え、該当する細胞膜タンパク質の中から 7 遺伝子をさらなる解析の候補遺伝子とした。次に 5.5 日胚のエピプラストの上部と下部の細胞でシングルセル PCR を行い、エピプラストの下部に比較して上部で発現が高ければ、PGC 形成に関わる可能性が高いと考えられる。

#### PGC 分化に關与する転写因子の局在解析

OTX2 が PGC 分化を抑制しており、OTX2 の消失が PGC 分化に必須であることが報告されたため、OTX2 が消失する細胞は PGC へと運命づけられている可能性が考えられた。そこで、5.5 日胚を Whole mount で OTX2 免疫染色し、OTX2 の蛍光強度が低い細胞の有無を検証した。その結果、6.5 日胚では確かに Blimp1 タンパク質を特異的に発現する PGC は周囲の細胞と比べて OTX2 の発現が低下していることを確認した。そこで次に、5.5 日胚における OTX2 の発現を検証した。その結果、OTX が低発現な細胞が 1 個程度存在する胚が見られ

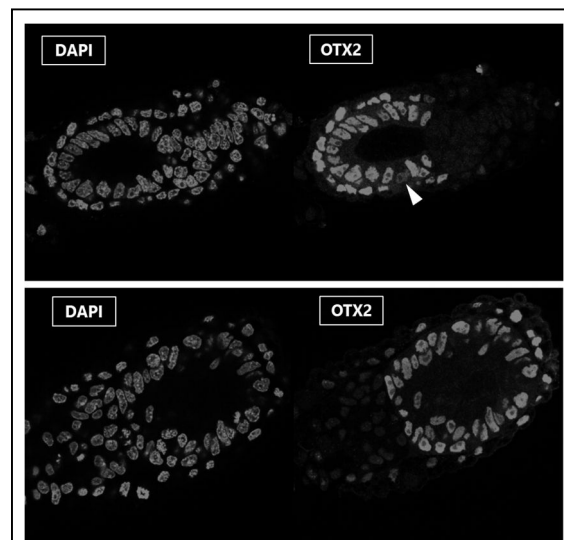


図 3 . 5.5 日目胚の OTX2 免疫染色 . 上段の胚には OTX2 低発現の細胞 ( 矢頭 ) が存在するが、下段の胚には存在しない。

たものの、そのような細胞が見られた胚は、解析した胚の 10%にとどまった（図 3）。よって、OTX2 の発現は PGC が形成される直前に発現が低下し、PGC 形成に寄与しているものと考えられた。

以上の結果をまとめると、シングルセルトランスクリプトームの解析から、生殖細胞の起源となる細胞で特異的に発現している可能性のある候補遺伝子を同定した。また、OTX2 の発現は生殖細胞の起源となる細胞の同定に有用ではないことが示された。今後は、シングルセルトランスクリプトームで同定した候補遺伝子の発現解析や遺伝子改変マウスを用いた解析により、これらの遺伝子と生殖細胞の起源となる細胞との関連が明らかになると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mochizuki K, Tando Y, Sekinaka T, Otsuka K, Hayashi Y, Kobayashi H, Kamio A, Ito-Matsuoka Y, Takehara A, Kono T, Osumi N, Matsui Y	4. 巻 145
2. 論文標題 SETDB1 is essential for mouse primordial germ cell fate determination by ensuring BMP signaling.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 Dec 3;145(23)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.164160	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 An Y, Sekinaka T, Tando Y, Okamura D, Tanaka K, Ito-Matsuoka Y, Takehara A, Yaegashi N, Matsui Y.	4. 巻 446
2. 論文標題 Derivation of pluripotent stem cells from nascent undifferentiated teratoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 43-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2018.11.020.	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0件

〔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
---------	---------