

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 18日現在

機関番号：17401

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2011

課題番号：20200071

研究課題名（和文） 生体の生殖巣内における新たな生殖細胞誘導法の開発

研究課題名（英文） **Attempt to the establishment of new approach for mouse germ cell induction *in vivo*.**

研究代表者

田中 聡 (TANAKA SATOMI)

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：10321944

研究成果の概要（和文）：生体の生殖巣内における新たな生殖細胞誘導法の開発を目指し、マウス始原生殖細胞(Primordial germ cells, PGC)の形成に重要な因子の探索を進めた。その結果、Bmp シグナルの下流では、Six1/Six4 遺伝子が Ifitm3 の活性化に働き、さらに Dullard による Wnt シグナルの適正な活性調節が PGC 形成に必須である事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To establish the new approach for germ cell induction *in vivo*, I examined the essential signals for germ cell formation in the mouse embryo. I found that in addition to Bmp signal, Wnt signal is also essential for germ cell formation, which is strictly regulated by Dullard. Further, I also found that Six1 and Six4 transcription factors act downstream to Bmp signal in mouse germ cell formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2009年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
年度			
年度			
総計	25,100,000	7,530,000	32,630,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：生殖細胞、マウス、応用動物科学、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖細胞の形成機構は、体細胞と生殖細胞との両方への分化能を有する前駆細胞集団の形成する細胞環境において、細胞間相互作用により生殖細胞への単一の分化能に限局された始原生殖細胞 (primordial germ cells: PGC) が形成される。マウスでは、原腸陥入期胚での原始外胚葉の基部側と末端側との交換移植実験から、原始外胚葉基

部側の領域に生殖細胞形成を誘導する微小環境が存在することが示されている (Tam and Zhou, Dev. Biol., 1996)。未分化細胞に発現することが知られている *Dppa3/stella/Pgc7* や *Nanog* 遺伝子は、着床直後の原始外胚葉において一旦その発現が失われるが、始原生殖細胞 (primordial germ cells: PGC) へと選択を受けると、再びそれらの遺伝子発現を獲得する。生殖細胞の前駆

細胞集団は、細胞塊を形成することが知られており、この形成された細胞塊が、この未分化性の再獲得に働く細胞環境として機能していることが考えられるが、その詳細については、まだ十分には理解されていない。生殖細胞形成を誘導する因子としては、胚体外組織に発現する Bone morphogenic protein 4 (Bmp4) を中心とした Bmp シグナルが報告されている (Lawson et al., Gene Dev., 1999)。一方、生殖細胞の前駆細胞集団が形成する細胞塊に発現する分子としては、*interferon-induced transmembrane protein 1 (Ifitm1)/mil-2* と *Ifitm3/mil-1/fragilis* 遺伝子及び *Prdm1/Blimp1* 遺伝子が報告されている (Saitou et al., Nature, 2002; Tanaka et al., Mech. Dev., 2002; Ohinata et al., Nature, 2005)。形成された生殖細胞は、その形成を誘導する細胞環境から、次いで、その分化を誘導する細胞環境である生殖巣に移動する。生殖巣に到達した生殖細胞は、雌雄の性分化や、それぞれの性に依存したエピジェネティックなゲノム修飾や減数分裂等を経て、次世代を生み出す幹細胞として配偶子へと分化する。生殖細胞分化を誘導する生殖巣の細胞環境、特に、生殖隆起に到達する頃に生じる生殖細胞でのゲノムインプリントの消去や生殖細胞特異的遺伝子の発現誘導の制御機構についても不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

再生医療の領域において、大きな社会貢献となり得る成果の1つは、不妊治療への応用に繋がる研究成果であると考えられる。しかし、不妊治療に向けた生殖細胞の再生は、大きな社会的期待の寄せられる研究課題であるが、その安全面や倫理面から幾つかの問題点を抱えている。例えば、*in vitro* での ES 細胞から生殖細胞への分化誘導が示されていることから、iPS 細胞等においても同様の成果が期待されているが、そのもととなる細胞に遺伝的操作が加えられている上に、その誘導された配偶子が、発生学的に正常な機能を持つとは考え難く、実用化には多くの困難

な点が残されている。そこで、本申請研究の課題として、成体の生殖巣内における新たな生殖細胞誘導法の開発を提案する。本申請計画では、誘導する生殖細胞自体には、なんら遺伝的操作をおこなわず、*in vivo* の生殖巣内の体細胞に人為的操作を加えることにより、新たに生殖細胞の形成と分化を誘導する細胞環境を再構築することを目的としている。この点から、不妊治療への応用に繋がる研究成果として、安全面、倫理面において大きなアドバンテージをもつアプローチと考えられる。また、女性の加齢に伴う妊娠率の低下は、その原因の1つとして卵子の品質の低下と関連があると考えられているが、本申請研究の達成成果にもとづいて新たに卵子を卵巣内で作り出す事により、その妊娠率、さらには卵子の品質の低下に起因する奇形胎児の発生率等の改善の可能性が期待される。哺乳類では、例えばマウスにおいて示されているように、生殖細胞の形成を誘導する細胞環境及び、その分化を誘導する細胞環境が存在すると考えられる。生殖細胞の形成を誘導する細胞環境については、マウス原腸陥入期胚での原始外胚葉の基部側と末端側との交換移植実験から、原始外胚葉基部側の領域に生殖細胞形成を誘導する微小環境が存在することが示されている (Tam and Zhou, Dev. Biol., 1996)。未分化細胞に発現することが知られている *Dppa3/stella/Pgc7* や *Nanog* 遺伝子は、着床直後の原始外胚葉において一旦その発現が失われるが、始原生殖細胞 (primordial germ cells: PGC) へと運命決定を受けると、再びそれらの遺伝子発現を獲得することから、この細胞環境が、なんらかの未分化性に関連する要因の再獲得に働くことが推察される。そこで、この細胞環境の分子実体を解明し、生体内において再構築することにより、再び、体細胞から生殖細胞へと分化転換を誘導することに挑戦することを目的とする。

## 3. 研究の方法

生殖細胞形成を誘導する細胞環境の構築

には、生殖細胞の前駆細胞集団による細胞塊形成が深く関わっていると考えられる。そこで、全胚培養系、或は単離した原始外胚葉の培養系での *Ifitm1* 或は *Ifitm3* の異所的発現を組み合わせでおこない、*Ifitm* ファミリーとその細胞塊形成との関連を明らかにする。さらに、*Ifitm1* の異所的発現を Cre リコンビネースの発現により誘導できるようなトランスジェニックマウス (CAG-loxP-stop-LoxP-*Ifitm1*-Ires- eGFP) を作製して、解析をおこなう。*Ifitm1* 及び *Ifitm3* の異所的発現により細胞塊形成が誘導されたならば、その細胞塊の細胞での *Prdm1* の発現及び、未分化性の再獲得についてもその指標となる遺伝子群の発現を調べ、生殖細胞形成を誘導する細胞環境が再構築されているかを検討する。

生殖細胞形成を誘導する細胞環境因子の 1 つである *Bmp4* の欠損ホモマウスでは、PGC は形成されない (Lawson et al., Gene Dev., 1999)。しかし、*Bmp* シグナルがどのように生殖細胞形成に関わっているのか、その分子カスケードは不明のままである。そこでまず、*Bmp4* 欠損マウス胚と正常胚での遺伝子発現の比較をマイクロアレイ法によりおこない、*Bmp* シグナルの下流で生殖前駆細胞において働く転写因子群を同定する。次いで、その候補因子の生殖細胞形成における作用機序を解明し、*Bmp* シグナルがどのような分子カスケードを介して生殖細胞形成を誘導しているのかを明らかにする。

さらに、この候補因子を *Bmp4* 欠損マウス胚に強制発現させることにより生殖細胞形成を誘導する細胞環境の再構築がおこなわれるかを、明らかにしていく。以上から、生殖細胞形成を誘導する細胞環境内の前駆細胞集団において必須な因子を同定する。

生殖細胞形成を誘導する細胞環境の構築において、その構築に必要な周囲の体細胞で発現する細胞環境因子についての検討をおこなう。我々は現在、生殖細胞形成を誘導する細胞環境因子の有力な候補の 1 つとして、*Wnt* シグナルが関与している可能性を見いだ

している。*Wnt3* は、PGC 前駆細胞が細胞塊を形成する胚後端部において局所的に発現しており、原腸陥入期の *Wnt3* 欠損マウス胚では、*Ifitm1* と *Ifitm3* の発現が消失、或は減少し、その結果、前駆細胞集団による細胞塊形成とその後の PGC の形成は認められない。また、*Dullard* 遺伝子の欠損マウス胚では、PGC 前駆細胞が形成されず、この形成異常は、*Bmp4* に非依存的におこることをみいだしつつある。このミュータントマウスを用いて、新たな細胞環境因子の同定とその検討をおこなう。先にも述べたように、*Wnt* シグナルが生殖細胞形成に関与している可能性が考えられることから、*Wnt* シグナルの関与を中心に解析を進め、生殖細胞形成を誘導する細胞環境の再構築に必須な細胞環境因子の同定をおこなう。

#### 4. 研究成果

まず、単離した原始外胚葉の培養系での *Ifitm1*、*Ifitm3* 或はその両方を組み合わせた異所的発現をおこなった結果、*Ifitm1* と *Ifitm3* を共に発現された場合、少なくとも RT-PCR 法により培養物全体での *Prdm1* の発現が上昇する傾向が観察された。さらに、*Ifitm1* の異所的発現を Cre リコンビネースの発現により誘導できるようなトランスジェニックマウス (CAG-loxP-stop-LoxP-*Ifitm1*-Ires- eGFP) を作製して解析を進めたが、生殖前駆細胞集団のみで発現を誘導できると考えていた Cre リコンビネース発現トランスジェニックマウスの発現特異性が低い、或は発現量が十分でなく、良好な結果が得られなかった。現在、再度、生殖前駆細胞集団のみで Cre リコンビネースを発現するトランスジェニックマウスの作製を、再度試みている。

*Bmp4* 欠損マウス胚と正常胚での遺伝子発現の比較をマイクロアレイ法によりおこない、*Bmp* シグナルの下流で生殖前駆細胞において働く転写因子の候補として、*Six4* 遺伝子を見いだした。興味深い事に、*Six4* と相補的な機能を持つと考えられている同じファミ

リー遺伝子の *Six1* も、*Bmp4* 欠損マウスにおいて減少していた。*Six4* は、生殖細胞及び生殖前駆細胞においても発現していることが、我々の結果とこれまでの報告 (Kurimoto et al., 2008) を含め確認された。*Six1* については、PGC を含む原始外胚葉全体でその発現が観察され、少なくとも、生殖線では、*Six1* 陰性の PGC が認められないことを確認している。*Six1* 或は *Six4* 単独のミュータントマウス胚を解析したところ、生殖細胞の形成、移動等に異常は認められなかったが、*Six1/Six4* ダブルミュータントマウス胚では、生殖腺に存在する PGC 数が減少していた。このダブルミュータントマウス胚では、PGC の移動等には異常は見られず、PGC 数の減少は、胎齢 7.5 日の PGC が形成された直後にすでに観察された。さらに、*Bmp4* のミュータントマウスとの交配実験をおこなった結果、*Bmp4* と *Six1/Six4* のトリプルヘテロマウス胚で PGC 数の減少が観察されたことから、*Six1/Six4* が、*Bmp* シグナルの下流で PGC 形成に働いていることが示唆された。近年、*Six1/Six4* の標的遺伝子の 1 つとして *Ifitm3* が報告されている (Niro et al., 2010)。このことから、*Bmp* シグナルによる *Ifitm3* 陽性の生殖前駆細胞集団の形成誘導に、*Bmp* シグナルの下流で *Six1/Six4* が働き、*Ifitm3* を活性化していることが考えられた。

*Dullard* 遺伝子の欠損マウス胚を用いて、新たな細胞環境因子として Wnt シグナルの適切な活性が生殖細胞形成に必須であることを明らかにした。*Dullard* 欠損マウス胚では、PGC 前駆細胞が形成されず、この形成異常は、*Bmp4* のミュータントマウスとの交配実験等をおこなった結果より、*Bmp* シグナルに非依存的におこっていると考えられた。一方、*Wnt3* のミュータントマウスとの交配実験から、*Dullard* 欠損マウス胚での PGC 形成異常は、*Wnt3* アリルの gene dosage により制御されていることが明らかとなった。具体的には、*Wnt3* と *Dullard* のコンパウンドヘテロマウス胚では、形成される PGC 数は、ばらつきがあるものの有意に減少し、また、*Wnt3* 及び

*Dullard* の欠損ホモマウス胚では、PGC は殆ど形成されなかった。しかし、興味深いことに、*Dullard* 欠損ホモマウス胚から *Wnt3* アリルを 1 本除くと (*Dullard*<sup>-/-</sup>; *Wnt3*<sup>+/-</sup>)、部分的にレスキューされ、数は若干少ないが PGC が形成された。そこで、*Wnt3* の発現とその  $\beta$ -catenin 依存の下流遺伝子 (*T*, *Ifitm1*, *Axin2* 等) の発現を *Dullard* 欠損ホモ胚で調べた結果、*Dullard* 欠損ホモ胚では、*Wnt3* の発現が上昇し、一方、 $\beta$ -catenin 依存下流遺伝子の発現は低下していた。興味深い事に、*Dullard*<sup>-/-</sup>; *Wnt3*<sup>+/-</sup> 胚では、予想されるように *Wnt3* の発現は *Dullard*<sup>-/-</sup> 胚と比べると減少 (回復) していたが、 $\beta$ -catenin 依存下流遺伝子の発現は上昇 (回復) していた。また、*Wnt3* と *Dullard* のコンパウンドヘテロマウス胚では、*Wnt3* の発現が減少傾向にあるものは、 $\beta$ -catenin 依存下流遺伝子の発現は上昇傾向にあった。*Dullard*<sup>-/-</sup> 胚では、*Wnt3* 以外にも、*Dkk1*, *Sfrp* 等の Wnt inhibitor 類の発現も上昇していることから、おそらく、Wnt シグナル関連因子の positive-/negative-feed back 機構が働き、結果的に Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル活性が低下したもとと考えられる。また、*Dullard* ミュータント胚での *Wnt3* アリルの gene dosage の変化に伴い、*Wnt3* の発現が変化し、その発現量と負の相関をもって Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル活性が変化して、PGC 形成異常の表現型に影響を与えていると考えられた。これらのことから、生殖細胞形成を誘導する細胞環境には、Wnt シグナル活性のファインチューニングが必要であることが、明らかとなった。

さらに、内部細胞塊を含む胚盤胞に比べ PGC において強く発現する遺伝子として我々が同定した *Importin13* (*Ipo13*) 遺伝子についても、PGC 形成における役割について解析を進めている。生殖細胞の発生・分化において重要な働きを担うと考えられる *Ipo13* 遺伝子の遺伝子改変マウスを作成、その解析を行った結果、生殖細胞が形成される以前の着床期周辺で *Ipo13* 遺伝子の欠損 (*Ipo13*<sup>-/-</sup>) マウス

胚は、胚性致死を示した。胚盤胞の *in vitro* 培養系を用いて解析を進めた結果、内部細胞塊の増殖能が低下し、発生不全が生じると考えられた。現在、生殖細胞における *Ipo13* 遺伝子の役割を明らかにするため、生殖細胞特異的な *Ipo13* 遺伝子の改変マウス作成とその解析を進めている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Yasuka L. Yamaguchi, \*Satomi S. Tanaka, Naoko Oshima, Hiroshi Kiyonari, Makoto Asashima, and \*Ryuichi Nishinakamura (\*corresponding authors).

Translocon-associated protein subunit Trap-gamma/ Ssr3 is required for vascular network formation in the mouse placenta.

**Dev Dyn**, 240: 394-403, 2011.

査読有り。

2. \*Satomi S. Tanaka, Yasuka L. Yamaguchi, Kirsten A. Steiner, Toru Nakano, Ryuichi Nishinakamura, Kin Ming Kwan, Richard R. Behringer and Patrick P.L. Tam (\*corresponding author). Loss of *Lhx1* Activity Impacts on the Localization of Primordial Germ Cells in the Mouse. **Dev Dyn**, 239: 2851-2859, 2010.

査読有り。

3. Yukako Uchiyama, Masagi Sakaguchi, Takeshi Terabayashi, Toshiaki Inenaga, Shuji Inoue, Chiyoko Kobayashi, Naoko Oshima, Hiroshi Kiyonari, Naoko Nakagata, Yuka Sato, Kiyotoshi Sekiguchi, Hiroaki Miki, Eiichi Araki, Sayoko Fujimura, Satomi S. Tanaka, Ryuichi Nishinakamura.

Kif26b, a kinesin family gene, regulates

adhesion of the embryonic kidney mesenchyme.

**Proc Natl Acad Sci U S A**, 107: 9240-9245, 2010.

査読有り。

4. Shahidul M. Islam, Yohei Shinmyo, Tatsuya Okafuji, Yuhong Su, Iftekhar Bin Naser, Giasuddin Ahmed, Sanbing Zhang, Sandy Chen, Kunimasa Ohta, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, Satomi Tanaka, Ryuichi Nishinakamura, Toshio Terashima, Toshio Kitamura, Hideaki Tanaka.

Draxin, a Repulsive Guidance Protein for Spinal Cord and Forebrain Commissures.

**Science**, 323: 388-393, 2009,

査読有り。

[学会発表] (計 8 件)

1. S. S. Tanaka et al., *Dullard* controls primordial germ cell formation by regulating canonical WNT signalling in the mouse embryo. International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ Cells” .

Nov 22, 2010, Fukuoka, Japan. シーホークホテル

2. L. Y. Yamaguchi, S. S. Tanaka et al., *Sall4* is a crucial transcriptional regulator for mouse primordial germ cell specification.

日本発生生物学会、

2010年5月22日、京都、国際会議場

3. S. S. Tanaka et al., *Dullard* is required for mouse primordial germ cell formation by coordinating canonical Wnt signalling in the embryo.

日本発生生物学会、

2010年5月21日、京都、国際会議場

4. S. S. Tanaka et al., *Dullard* is required for mouse primordial germ cell formation by coordinating

canonical Wnt signalling in the embryo.  
日本発生生物学会、  
2009年5月30日、新潟、朱鷺メッセ

5. Y. Fujimoto, S.S. Tanaka et al.,  
Six1 and Six4 Homeoproteins are required  
for Sex Determination in Mice Gonad.  
日本発生生物学会、  
2009年5月28日、新潟、朱鷺メッセ

6. S.S. Tanaka et al.,  
Functional analysis of Dullard in ES cell  
differentiation, which is essential for  
germ cell formation in the gastrulating  
mouse embryo.  
The 23<sup>rd</sup> Naito Conference,  
2008年11月12日、神奈川、湘南国際村

7. S.S. Tanaka et al.,  
*Dullard* is essential for primordial germ  
cell formation and posterior  
extraembryonic mesoderm differentiation  
in the gastrulating mouse embryo.  
日本発生生物学会、  
2008年5月29日、徳島、徳島文化会館

8. 田中聡 他、  
Ifitm/mil/fragilis ファミリーによるマウ  
ス生殖細胞の移動の制御。  
頭部形成研究会、  
2008年4月15日、熊本、阿蘇、ホテルグリ  
ーンピア南阿蘇

〔図書〕(計1件)

1. Satomi S. Tanaka, Yasuka L. Yamaguchi,  
Vanessa J. Jones and Patrick P. L. Tam.  
Analyzing gene function in whole mouse  
embryo and fetal organ *in vitro*.  
**In** Methods in Molecular Biology (Mark  
Lewandoski ed.), Totowa NJ: Humana press,  
2012 (*in press*).  
ISBN: 978-1-60327-290-2.

6. 研究組織  
(1) 研究代表者

田中 聡 (TANAKA SATOMI)  
熊本大学・発生医学研究所・助教  
研究者番号: 10321944

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号: