

令和元年6月7日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18572

研究課題名(和文)生殖腺器官サイズ調節におけるAMHシグナルの役割

研究課題名(英文)The role of AMH in gonadal size

研究代表者

藤森 千加 (Fujimori, Chika)

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：50750775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗ミュラー管ホルモン(AMH)変異体であるhoteiメダカは、生殖細胞が過剰に増殖し、遺伝的オス個体のメスへの性転換が観察される。本研究では、hoteiメダカを用いて、卵巢初代培養系を確立し、初代培養系での細胞増殖能及び発現動態の変化を調査し、hotei変異体における卵巢内の支持細胞、生殖細胞の増殖について調査した。また、生殖細胞の異なる分化段階で進行が停止する変異体を調べることで、卵巢の器官形成に必須の生殖細胞の種類を同定を行った。さらに、卵巢細胞の初代培養系の実験結果から、卵巢由来の生殖細胞にも受精可能な精子に分化する能力を持つ細胞が存在するという予想外の結果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって、どの発達段階の生殖細胞が卵巢器官を形成することができるのか、また、成体の卵巢内にある生殖細胞の中でどの分化段階の生殖細胞まで精子・卵どちらにも分化できる能力を持つのかを示すことができた。今回確立した培養実験系はどのような因子が精子・卵への分化に寄与しているのかをスクリーニングするための系としても利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In previous studies, anti-mullerian hormone (amh) signal deficient medaka hotei were isolated and they showed hyperactivation of germline stem cell division, resulting germ cell excess. I performed medaka ovarian cell culture and examined the character of cultured cells. After 14 days of cell culture, functional sperm were produced from cultured ovarian germ cells, suggesting that medaka adult ovaries have germ cells with potential to differentiate into both oocytes and sperm.

研究分野：生物学

キーワード：メダカ 卵巢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗ミュラー管ホルモン(AMH)変異体である *hotei* メダカは、生殖細胞が過剰に増殖し、遺伝的オス個体のメスへの性転換が観察される。したがって、メダカにおいて AMH シグナルは生殖細胞の増殖に関与し、その生殖細胞の増殖が卵巣の形成に必須であることが知られていた。しかしながら、AMH シグナルが生殖細胞増殖にどう関与しているのか、また、増殖した生殖細胞がどのようにして卵巣を形成に関与するか不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、AMH シグナルが生殖細胞増殖にどう関与しているか、増殖した生殖細胞がどのようにして卵巣を形成に関与するかについて、AMH シグナル変異体である *hotei* メダカを用いて調査し、さらに卵巣器官サイズ調節における AMH シグナルの役割を考察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 初代培養系の確立

卵巣機能及び生殖細胞分化に対する AMH への効果を細胞レベルで詳細に調べるために、*hotei* 卵巣の初代培養系の確立を行った。細胞解離条件、培養条件などはこれまでゼブラフィッシュオス生殖細胞培養に関する論文(Kawasaki et al., 2016)を参考にした。生殖細胞(全ての生殖細胞または特定の分化段階の生殖細胞)・支持細胞をそれぞれ可視化したトランスジェニック個体を培養系に用いることによって、生殖細胞及びそれらの支持細胞の経時観察を行った。また、EdU または BrdU を取り込むことによって、生殖細胞・支持細胞の増殖能を *hotei* 変異体と野生型での比較を行った。また、生殖細胞と支持細胞それぞれの雌雄細胞マーカー(*dmt1*, *cyp11b1*, *shippo1*, *protamine*, *foxl2*, *aromatase*)の RT-PCR, *in situ hybridization*、免疫組織化学染色を行うことによって発現動態の変化を観察した。

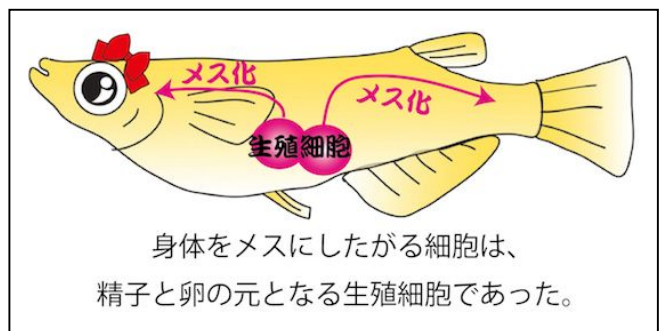
(2) 変異体の作製、表現型の調査

どの分化段階の生殖細胞が卵巣器官の形成に必要であるかについて調査するために、生殖細胞の異なる分化段階で進行が停止する変異体(*figla*, *meioC*, *dazl* 変異体)を TALEN または CRISPR により作製した。各種変異体について、*in situ hybridization* 法及び免疫組織化学染色により生殖腺の形態を観察し、それらの卵巣器官形成能について調査した。

4. 研究成果

・卵巣の器官形成に必須の生殖細胞の種類の同定

増殖した生殖細胞が卵巣器官形成に必須であるが、どの分化段階の生殖細胞が卵巣器官の形成に必要であるかについて、異なる分化段階で進行が停止する変異体(*figla*, *meioC*, *dazl* 変異体)を作製し、生殖腺の形態を観察した。その結果、性的に未分化な段階の生殖細胞のみが存在する場合であっても卵巣が形成された。したがって、性的に未分化な段階の生殖細胞であっても卵巣器官を形成する能力を持つことが明らかになった(右図)。

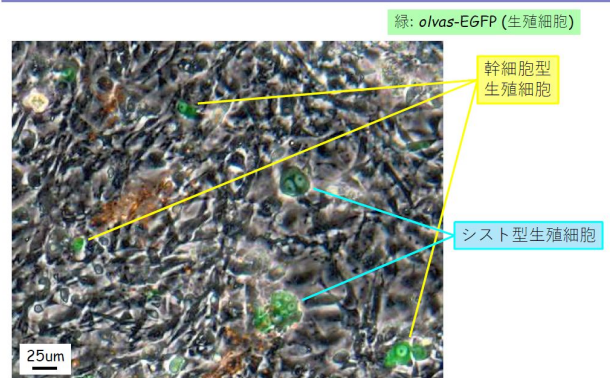


・卵巣由来の細胞の初代培養実験

確立した初代細胞培養系では、各種成長因子を含んだ DMEM 培地に卵巣由来の細胞を 5% CO2 条件下で培養することによって、生殖細胞、支持細胞ともに二週間以上維持することができた。また、生殖細胞と支持細胞を可視化するトランスジェニックメダカを培養系に用いることによって、これらの細胞の動態を経時的に観察することが可能になった(右図は培養3日後の細胞、緑色: 生殖細胞、赤: 支持細胞)。

hotei 変異体は生殖細胞の過剰増殖が観察されるが、BrdU または EdU 取り込みによる増殖能の調査により、培養条件において、生殖細胞の分裂は支持細胞と接触している場合にのみ起こることが明らかになった。一方で、支持細胞の分裂も観察されたが、その分裂は支持細胞もしくは生殖細胞など他細胞との接触と関連は見られなかった。

培養3日後



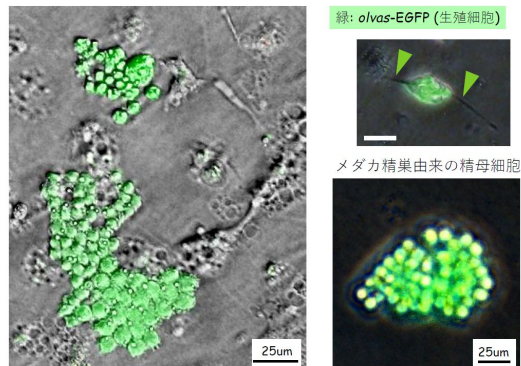
・ 卵巣由来の生殖細胞の精子への分化

予想外なことに、確立した初代細胞培養系では培養6日目以降から精母細胞と形態的に類似した細胞が観察され、14日後には運動能を持った精子に類似した細胞が観察された(右図)。この培養14日目の培養液に、未受精卵を入れ培養すると、受精し卵が発生した。したがって、卵巣由来の生殖細胞にも受精可能な精子に分化する能力を持つ生殖細胞が存在することが明らかになった。

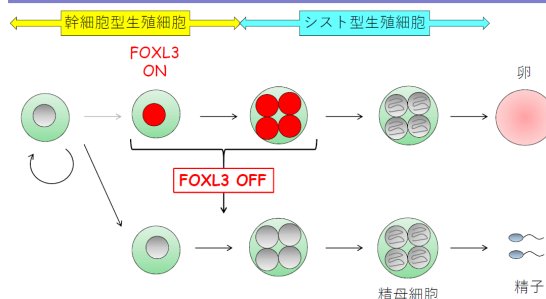
この精子形成が観察される時期の体細胞環境を調べるために、雄体細胞マーカーと雌体細胞マーカーの発現の有無をRT-PCRによって調査を行った。その結果、雄体細胞マーカーである *dmrt1*、*cyp11b1* の発現は見られず、雌体細胞マーカーである *foxl2* の発現は観察された。また、培養液中にエストロゲン(Estradiol)、プロゲステロン(17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one)を添加した条件の培養において受精可能な精子の分化が見られている。したがって、*hotei* 卵巣由来の生殖細胞からの精子分化は、周囲の体細胞の雄化によって引き起こされたわけではないことが考えられる。

さらに、どの分化段階の生殖細胞が受精可能な精子に分化する能力をもつのかを調べるために、各分化段階で特異的に光るトランスジェニックメダカの卵巣を用いた培養を行った。その結果、卵への分化決定に關与する因子である FOXL3 が発現した後の生殖細胞からも精子への分化が観察された。また、FOXL3 抗体を用いた免疫組織化学染色の結果から、培養後速やかに FOXL3 の発現が失われていくことが明らかになった。以上の結果から、FOXL3 を一度発現した生殖細胞でも、その発現を下げて精子形成細胞に分化する能力を持つことが考えられた(右図)。

培養14日目



卵巣由来の生殖細胞から受精可能な精子を得た



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nishimura T., Yamada K., Fujimori C., Kikuchi M., Kawasaki T., Siegfried KR., Sakai N., Tanaka M. 2018. Germ cells in the teleost fish medaka have an inherent feminizing effect. PLoS Genet. Mar 29;14(3):e1007259. (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

藤森千加

性と生殖の懇談会 2017年1月

メダカ卵巣由来の生殖細胞培養について

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。