

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15111

研究課題名（和文）原始卵胞ストックを作るマウス始原生殖細胞の系譜動態と不均一性の解明

研究課題名（英文）Lineage dynamics and heterogeneity of primordial germ cells producing primordial follicles

研究代表者

池田 達郎（Ikeda, Tatsuro）

基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・特任助教

研究者番号：60803963

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000 円

研究成果の概要（和文）：まず、マウス始原生殖細胞（PGCs）を多様なDNAバーコードで標識したのち、卵巣の発生過程におけるバーコード分布の経時変化を測定した。初期PGCsが卵巣に移動する過程、および卵巣に入ったPGCsから原始卵胞が生じる過程のそれぞれで、バーコードの削減が観察され、PGCクローンの剪定（ブルーニング）が示唆された。一方、初期PGCsのクローンの単位では卵巣に入った後はクローンのレパートリーが維持された。また、バーコード標識した卵巣PGCsのバーコードと遺伝子発現をシングルセル同時測定した。クローンと関連した遺伝子発現の偏りが検出され、この差が原始卵胞の質の違いにつながる可能性が提起された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で雌のPGCsが原始卵胞ストックそして次世代を作る過程をクローン解像度で明らかにしたことで、クローンの動態が雌性生殖細胞の発生と遺伝に与えるインパクトを調べる基礎ができた。また、由来するPGCクローンに依存して生殖細胞の質が変わる可能性を示すデータを得て、新たな問いを提起することができた。ヒトや他の資源生物においても原始卵胞の質とクローナリティは妊孕性や遺伝の原理に直結する重要な問題である。本研究によるマウスをモデルとした雌性生殖系列のクローン動態の理解は、不妊治療や育種技術の改良に貢献して将来的に社会に還元されると期待できる。

研究成果の概要（英文）：First, we labeled mouse primordial germ cells (PGCs) with diverse DNA barcodes and then measured the temporal changes in barcode distribution during ovarian development. Barcode reduction was observed during both the process of PGCs migrating to the ovaries and the process of primordial follicles arising from PGCs that entered the ovaries, suggesting the pruning of PGC clones. However, at the clonal unit level of early PGCs, the repertoire of clones was maintained after entering the ovaries. Additionally, we simultaneously measured the barcodes and gene expression of barcode-labeled ovarian PGCs at the single-cell level. A bias in gene expression correlated with clones was detected, suggesting that this difference might lead to variations in the quality of primordial follicles.

研究分野：発生生物学

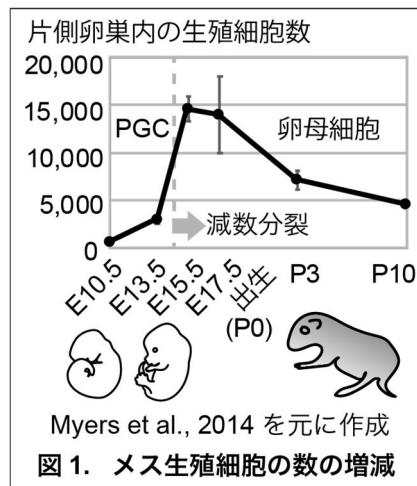
キーワード：マウス 始原生殖細胞 原始卵胞 卵母細胞 細胞系譜 クローン バーコード 遺伝子発現

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

効率的な卵の産生は、動物が有性生殖によって種を維持するために不可欠である。哺乳類において卵は胎仔に生じた始原生殖細胞 (PGCs) に由来する。PGCs は出生前に減数分裂を開始して卵母細胞となり、その後卵母細胞を中心として原始卵胞が形成される。この原始卵胞が生涯で産生される全ての卵の元であり、原始卵胞のストックが十分な数かつ高品質に作られることが安定的な卵の産生に必須である。

原始卵胞の数は発生過程における PGCs/卵母細胞の増減に依存して決定される。哺乳類のモデル動物であるマウスでは、PGCs は交尾後 6.5 日目 (E6.5) ごろに胚後方に数十個誘導されたのち、移動して E10.5 ごろに左右の生殖巣に入り、その後性分化が起こる。雌では卵巣に入った PGCs は E15.5 ごろに減数分裂を開始して卵母細胞となり生後に原始卵胞を作る。この前後で細胞数は図 1 に示すように一度約 15,000 個まで増加したのち、大規模な細胞死によって 1/3 程度まで減少する (Myers et al., *Reproduction* 2014, Pepling, *Genesis* 2006)。こうして生じた原始卵胞は内部の卵母細胞が不均質であることが知られており、アポトーシスをしつつある細胞や早期に発育を開始して消失するもの (次世代に寄与しない) が混在する (Niu and Spradling, *PNAS* 2020)。



上記の過程で原始卵胞の数と質の不均一性は PGCs に由来しており、個々の PGC の子孫細胞 (クローン) ごとに細胞分裂の活性やアポトーシスの頻度、卵母細胞の発育タイミングが異なることが示唆されている (Lei and Spradling, *Development* 2013, Nguyen et al., *Curr Top Dev Biol* 2019, Reizei et al., *PLoS Genet* 2012)。しかしこれまでは解析手法の限界から次のような問いが手付かずだった。

- ・ PGC の何割が原始卵胞に実質的に寄与し、その選抜はいつおこなわれるのか？
- ・ PGC が作る原始卵胞の数と質の不均一性の度合い、およびその違いはいつ生じるのか？
- ・ より多数の原始卵胞ストックを作って次世代へと細胞系譜を繋げる PGC の特性とは？

### 2. 研究の目的

本研究では以下の 3 つの目的・アプローチで、雌マウス生殖細胞のクローン動態、およびクローンと生殖細胞の性質の関係を解析した。

**目的 (1):** 雌マウスの PGCs を非常に多様な DNA バーコードによって標識し、PGCs から原始卵胞が作られる過程のバーコード分布の変化を測定して、個々の PGC クローンの原始卵胞ストックへの寄与がいつ、どのような違いとして生じるのかを明らかにする。

**目的 (2):** 胎仔期に PGCs をバーコード標識した雌から連続的に産仔を取得して含まれるバーコードを計測して、PGC クローンの次世代への寄与を解析する。

**目的 (3):** 発生期生殖細胞のバーコードとトランスクリプトームをシングルセルで同時測定することにより、PGC クローンと遺伝子発現の関係を検証する。そこから、質の高い原始卵胞ストックを多数作ってより次世代に寄与する PGC クローンの特性を推定する。

### 3. 研究の方法

**目的 (1) に向けて:** PGCs でバーコードを導入するために、PGCs 特異的に Tamoxifen 依存型 Cre レコンビナーゼ (MiCM) を発現する *Prdm14-MiCM* マウスと、Cre の組み替え依存的にバーコードを生成する *Polylox* マウス (Pei et al., *Nature* 2017) を交配させ、両方の遺伝子を持つ胎仔を発生させた。PGCs が誘導された直後の交配後 6.5 日目 (E6.5)、もしくは PGCs が増殖・移動して卵巣に入った E11.5 において母体に 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) を投与して、胎仔 PGCs を MiCM の組み替え依存的にバーコード標識した。その後、胎仔期 (E6.5 標識では E8.5、E12.5、E14.5 および E16.5、E11.5 標識では E12.5 および E13.5) および生殖細胞が減少して原始卵胞が生じた生後 4 日目および 10 日目において卵巣をサンプリングし、バーコードを増幅して Sequel IIe ロングリードシーケンサー (PacBio) で測定した。同様にバーコード標識した複数個体の結果を取得して数理統計学的な解析を行なった。

目的(2)に向けて:この実験では、できるだけ多数の産仔からデータを取得するため、*Prdm14-MiCM*および*Polylox*マウスを含むICR系統のマウスを作成して用いた。*Prdm14-MiCM*および*Polylox*マウスを交配してE6.5でPGCsにバーコードを導入したのち、出生・性成熟した雌マウスを野生型の雄と継続的に交配した。得られた産仔は母親の卵に由来するバーコードをゲノムに含む(母親がヘテロでバーコードを持つため、約半数の仔にバーコードが伝達する)。その配列をサンガーシーケンシングにより決定・解析した(継続中)。

目的(3)に向けて:(1)のバーコード解析から、PGCsが卵巣に入った段階で不均一なクローンのサイズ分布が生じていることが判明した。この時期における個々のPGCクローンの質の違いを知るため、バーコードがmRNAとして転写される*PolyloxExpress*マウス(Pei et al., *Cell Stem Cell* 2020)を用いた解析を行なった。*Prdm14-MiCM/Dppa3-ECFP*マウスと*PolyloxExpress*マウスを交配し、E6.5でバーコード標識したのち、卵巣に入って性分化が開始したE13.5の段階でECFPシグナルを指標に胎仔卵巣からPGCsをFACSソートしたのち、Chromium X(10X genomics)を用いてシングルセルでcDNAを増幅しバーコードおよびトランスクリプトームを次世代シーケンシング測定した。Cell index配列で2種類のシーケンス情報を統合したのち、PGCsにおける遺伝子発現の不均一性とそのクローン情報との相関を探索した。

#### 4. 研究成果

目的(1)に対して:E6.5でPGCsをバーコード標識した複数のマウスのバーコード分布の継時変化を測定した結果、まずPGCsの遊走期である性分化以前のE8.5と比べて、卵巣にPGCsが移動して性分化を開始したE12.5でバーコード種類数の減少と不均一な拡大が生じていた。一方でE12.5から生後10日にかけての期間では、生殖細胞数が1/3に減少するにも関わらず、含まれるバーコードの種類数とリード数(サイズ)分布は大きく変化しないことがわかった。この結果から、PGCsが卵巣に至る過程でクローンの剪定(pruning)が生じること、卵巣に入った後はE6.5で区別されたPGCクローンのレパートリーが維持されることが示唆された。この観察は並行して解析を進めている、まったく異なる細胞増殖を示す雄の生殖細胞系列(雌と異なり胎仔期に減数分裂を開始せず、出生後に精子幹細胞を生じて生涯にわたり自己複製と分化を継続する)と共通しており、非常に興味深い。

一方で、卵巣に入ったE11.5でバーコード標識したマウスの継時変化を解析すると、誘導直後のE12.5と比べて生後10日までにバーコードが約半数に減少していた。このことは、E11.5のPGCのクローンとしては生後10日の卵母細胞に寄与するものと絶滅するものが存在することを示唆している。

以上のE6.5およびE11.5のどちらの標識の実験においても、現状の個体数がまだ十分でないため、今後個体数を増やすことでより統計学的に妥当な評価をすることが必要である。また、雄の解析で先行している数理モデルを用いたバーコード分布変化のモデリングを、雌においても進める予定である。

目的(2)に対して:E6.5でPGCsをバーコード標識した雌マウスの産仔に現れるバーコードを解析した。ICR系統にバーコード遺伝子を移植したため、一腹から平均9匹以上のバーコード遺伝子を含む産仔を、雌2匹から現在それぞれ5腹および4腹、取得している(現在も継続中)。現在まで、1腹あたりに含まれる胎仔は4~7種類の多様なバーコードを含み(つまり多様なPGCに由来し)、顕著な出現バーコードの偏りは確認されていない。一方で雌マウスの生涯としては現状の2倍以上の産仔が期待されるため、引き続き産仔に現れるバーコードの測定を継続し、バーコードごとの累積を解析する。出産のタイミングと出現バーコードの関係も解析する。また、4OHT投与による組換え効率がICR系統で低く、現状では約50%のPGCsでしかバーコードが組み変わっていないため、雌マウスをさらに取得して産仔を統計学的に解析するとともに、4OHT投与のタイミングを1日程度遅らせることによって(MiCMの発現増加により)より多い割合のPGCsをバーコード標識した雌マウスで解析する可能性も検討している。

目的(3)に対して:E6.5でバーコード標識したE13.5胎仔のPGCsをシングルセルRNA-seq解析し、まずPGCsにおいて不均一に発現する遺伝子群を見出した。先行研究のデータを再解析してこれらの遺伝子の発生に伴う継時的なPGCsでの発現を調べた結果、主成分分析をして得られる遺伝子発現の軸の一つは明確に発生の進行(減数分裂の開始)を反映していることがわかった。このデータに*PolyloxExpress*のバーコード情報を載せたところ、同じバーコードを持つクローンの細胞はPCAプロット上で偏った領域に局在し、特に上記で示した発生の進行を反映したPC軸について有意に偏ることが明らかとなった。また、計測された細胞数もバーコードによって1、

2 個から 50 個以上までばらつきがあったが、上記の遺伝子発現との相関は現在のところ明確でない。細胞数がクローンサイズを正確に反映しているかどうかは不明で今後さらに慎重な評価が必要である。また、E13.5 のクローンと関連した遺伝子発現の差がそれまでの発生過程でどのように生じ、その後生じる原始卵胞の性質の差につながるのかは今後問うべき課題である。

総括：本解析によってマウス PGCs の誘導直後から原始卵胞ストックが形成される過程、さらには次世代の仔に至る過程をクローンのレベルで追跡することができた。また、原始卵胞の質の違いにつながりうる PGCs のクローンと関連した遺伝子発現の偏りを見出すことができた。一方で、本解析はより論文化に迫っている雄の生殖系列のクローン動態解析と並行しながら行われたため、いまだサンプル数等が十分ではなく、今後のデータの補充と数理統計学的に詳細な検討が必要である。国内外の学会で雄の研究成果を発表しながら並行して、本研究で見出した雌の動態についても議論を行ってきた。今後は雄との比較、および雌のクローン動態が発生と遺伝に与えるインパクトを丁寧に議論・考察して論文発表することを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 池田 達郎
2. 発表標題 バーコード分布の数理モデリングによる始原生殖細胞のクローン動態推定
3. 学会等名 第11回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 池田達郎
2. 発表標題 DNAバーコードによる細胞系譜追跡法の発生研究における適用例とその将来性
3. 学会等名 NGS発生生物学現場の会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田達郎
2. 発表標題 発生・幹細胞研究におけるDNAバーコード技術の可能性とは？
3. 学会等名 幹細胞シンポジウム若手の会・つくしの会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

基礎生物学研究所 生殖細胞研究部門 吉田研究室  
<http://www.nibb.ac.jp/germcell/index.html>

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
研究協力者	吉田 松生  (Yoshida Shosei)  (60294138)	基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授    (63904)	

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		
ドイツ	ドイツ癌研究センター (DKFZ)	ハイデルベルク大学	