

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650110

研究課題名(和文) in vivoで体細胞から生殖細胞をつくる

研究課題名(英文) Is germ cell differentiation occurred from somatic cells in vivo?

研究代表者

小林 亨 (Kobayashi, Tohru)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：30221972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：イモリは再生能力の高い脊椎動物である。これまでに、飢餓状態や長期のエストロゲン投与により精巣索状部の柱状上皮細胞が、生殖原細胞様の細胞に変化することが古くから指摘されていたが、その真偽は不明なままであった。今回、イモリに長期間エストロゲンを投与し、この柱状上皮細胞が生殖原細胞に分化転換するかを生殖細胞に特異的に発現する分子マーカーであるVASAおよびSGSA-1を用いて調べた。その結果、柱状上皮細胞の一部は、VASA陽性を示し、かつ、生殖細胞に特有の構造物であるnuage様構造を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The characteristics of columnar cells of the peritoneal epithelium in slender cords were examined in newt, *Cynops pyrrhogaster*. The columnar cells were not positive for VASA or SGSA-1 antibodies, which are recognized germ cells containing gonial germ cells specifically. These cells did not show the localization of nuage, which is reported as germ cell specific electron-dense structure. After the treatment of estrogen benzoates, several columnar cells showed the VASA-positive. Furthermore, nuage structure was seen in these VASA-positive cells by electron microscopy. These results suggest the possibility that the columnar cell of the peritoneal epithelium in slender cords in the newt can trans-differentiate into gonial germ cell like cells after estrogen treatment.

研究分野：生殖生物学

キーワード：生殖細胞 精巣 イモリ 可塑性

1. 研究開始当初の背景

これまで発生過程における生殖細胞形成機構は種々のモデル動物の発生過程で検討されてきており、ショウジョウバエやアフリカツメガエルでは母性因子の重要性、ほ乳類では発生過程における誘導によって生殖細胞の形成が起こることが知られている。一方、体制が出来上がった後の成体の体細胞からの生殖細胞分化誘導に関する報告は、脊椎動物では最近のほ乳類で確立された iPS 細胞を介したものの以外ない。このことは非ほ乳類では情報はほとんどないことを意味する。

有尾両生類のアカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) は古くから再生能力に優れていることがよく知られており、実験条件下での細胞分化および細胞分化転換誘導の良いモデルである。発生過程における生殖細胞分化においてもアフリカツメガエルのような内胚葉由来の生殖質を持った細胞が生殖細胞に分化するのではなく、外胚葉から生殖細胞が分化誘導されることが示唆されている。アカハライモリの精巣は多葉状構造を示し、各葉とそれらを結ぶ索状部から成る特徴を有する (図 1)。この索状部は体腔上皮由来の柱状上皮といわゆる間充織層からなる。間充織層には少数の生殖原細胞があり、この生殖原細胞とそれを取り囲む細胞からなる生殖上皮の単位が尾端方向に向かって精細管形成を行い、この中で精子形成を行う。また、エストロゲンの投与により、精細管内よりもこの部分で卵母細胞の形成がみられることから、索状部は未分化生殖腺のような性質が保持されていると考えられている。また、性分化機構の解明のために成体における生殖腺の移植実験やエストロゲンの長期投与により索状部を覆う柱状上皮細胞が増殖すること、及び上皮中に生殖細胞様細胞がみられること等から索状部柱状上皮が精子形成細胞のソースであると提唱されていたが、その後、正常状態では柱状上皮細胞が生殖細胞に

分化することはない、と結論された。また、実験条件下(エストロゲンの長期投与)では、索状部柱状上皮細胞層中に柱状上皮細胞と異なった形態の細胞がみられることが報告されているが、この細胞が真に生殖細胞であるかどうかは不明なままである。これまでに柱状上皮細胞から分化した生殖細胞様細胞に関する知見では、配偶子形成への参加を含めて分子、形態レベルで「索状部の柱状上皮細胞が生殖細胞に分化することを示す証拠」はない。もし、索状部柱状上皮細胞から生殖細胞分化が誘導できるのであれば、実験条件下において in vivo で成体組織の体細胞から生殖細胞の分化誘導が初めてできることになり、生殖細胞の形成機構の分子、形態レベルでの解明に大きく貢献することは自明である。さらに、非ほ乳動物の希少種の保全技術の開発にも寄与することが期待できる。しかし、索状部柱状上皮細胞からの生殖細胞分化に関する研究は 1980 年前半で止まっており、かつ、これまでの解析では分子・形態レベルでの解像度は高くない。

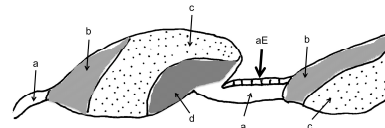


図 1. アカハライモリの精巣構造 (矢状断面。左：頭端側)。索状部で連結された多葉状構造を示す。a, 索状部。b, 未成熟部分。第一次精原細胞と第二次精原細胞を含む。c, 成熟部分。第一次精母細胞～精子を含む。d, 腺組織。ステロイド産生部位。aE, 索状部の柱状上皮細胞。

2. 研究の目的

本研究では、体細胞から生殖細胞への分化・形成機構を明らかにするために以下の項目により、成体イモリ精巣組織索状部の柱状上皮細胞 (図 1. aE) を生殖細胞に分化誘導するための条件と分化の詳細を分子レベルで

明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生殖細胞分化の分子マーカー遺伝子の単離とその特異抗体の作製：イモリ精巣および卵巣から抽出したtotal RNAからcDNAプールを作成し、生殖細胞に特異的に発現する遺伝子として、nanos, vasa cDNA をクローニングした。予想アミノ酸配列からC末アミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、これを抗原としてウサギに免疫後、得られた抗血清について抗原ペプチドに対するアフィニティーカラムを用いて精製し、これを抗体として解析に用いた。

(2) エストロゲンの長期投与による成体雄アカハライモリの精巣組織索状部柱状上皮細胞層における VASA 陽性反応
成体雄アカハライモリに estrogen benzoate (200 µg/newt) を4週間に1回の割合で6ヶ月、腹腔内に投与した。摘出した精巣組織索状部についてwholeおよび組織切片を用いたイモリ VASA 抗体による免疫組織化学解析を行った。

4. 研究成果

(1) 生殖細胞分化の分子マーカー遺伝子の単離とその特異抗体の作製
生殖細胞に特異的に発現する遺伝子として、nanos, vasa cDNA をクローニングし、これらに対する抗体をC末アミノ酸配列に相当するペプチドを合成し、これを抗原として作成した。vasa は717アミノ酸からなり、C末アミノ酸配列に相当するペプチドに対して作成した抗体は、newt vasa cDNA を用いて作成した大腸菌リコンビナントタンパク質を特異的に検出できた。さらに精巣組織を用いたイムノプロット解析において約80kDaのシングルバンドを特異的に検出することが明らかとなった。免疫組織化学法を用いて検討した結果、VASA 抗体は、精巣組織における精原細胞を特異的に認識することが確認できた(図1)。

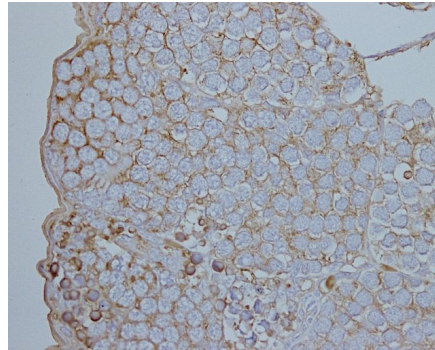


図1. 精巣組織における VASA 陽性細胞

(2) エストロゲン長期投与における精巣組織索状部における VASA 陽性細胞

VASA 抗体を用いて精巣組織を免疫染色した結果、精原細胞、精母細胞は特異的に認識したが、精巣索状部では、間充織中に散在する生殖原細胞は特異的に認識したが、索状部柱状上皮細胞層では特異的陽性反応はみられなかった。エストロゲン投与6ヶ月のイモリ精巣組織を調べたところ、10例中3例において生殖原細胞および、柱状上皮細胞において VASA 陽性反応が認められた。時系列で精巣組織索状部柱状上皮細胞について調べた結果、VASA 陽性反応は最初、核周辺にドット状で見られ始めることが観察された(図2)。

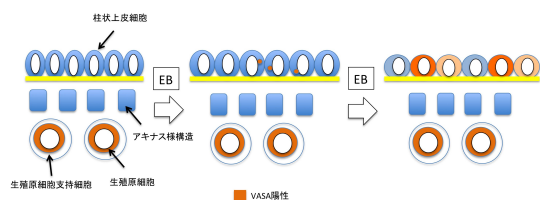


図2. エストロゲン長期投与による精巣組織索状部柱状上皮細胞の変化

私たちが既に作成した生殖原細胞を特異的に認識できる抗体 SGSA-1 を用いた解析から、エストロゲン投与6ヶ月後の VASA 陽性を示すサンプルにおいても柱状上皮細胞で陽性反応が見られることが確認された。これらのことから、エストロゲン長期投与によって柱状上皮細胞が生殖細胞の性質をもつようになることが強く示唆された。また、本研究で作成した VASA 抗体は、電顕用固定標本にお

いても使用出来ることが確認できたので免疫電験法により検討した結果、この VASA 陽性反応と生殖細胞で特異的にみられる nuage 様構造との関係性を確認した。

現在、柱状上皮細胞を蛍光色素等で特異的に標識し、上記エストロゲン誘導系において標識された柱状上皮細胞の動態について解析を行っており、その生殖細胞分化過程の詳細について検討している。

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 1 件) 現在、投稿準備中。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 亨 (KOBAYASHI TOHRU)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：30221972