

| | | | |
|--|--|----|------|
| 京都大学 | 博士 (医学) | 氏名 | 宮内英孝 |
| 論文題目 | Bone morphogenetic protein and retinoic acid synergistically specify female germ-cell fate in mice (BMP とレチノイン酸は協調してマウス生殖細胞の雌性決定を行う) | | |
| (論文内容の要旨) 始原生殖細胞 (Primordial germ cells; PGCs) は精原細胞・卵母細胞への二分化能を持ち、次世代にゲノムを伝える唯一の細胞である。PGCs は BMP シグナルにより運命決定を受け、細胞分裂を伴いつつ胎児生腺へ遊走・定着し、その後、胎児精巣・卵巣の環境により性分化を行う。雄では分裂を停止し前精原細胞へ分化し、雌では一連の卵母細胞が同期して減数分裂を開始する。しかし哺乳類における PGCs の性決定機構は未だ不明な点が多く、マウス PGCs の雌性決定に関しては、レチノイン酸 (Retinoic acid; RA)、そして下流の減数分裂誘導因子である STRA8 が必須とされるが、反証論文も存在し議論となっている。 一方、マウスにおいて、これまで ES/iPS 細胞から BMP シグナルにより PGC 様細胞 (PGC-like cells; PGCLCs) を誘導し、それらを精巣移植、あるいは胎児卵巣体細胞との凝集培養により、それぞれ機能的な精子・卵子に誘導する系が開発された。しかしこれらの系においても、依然 PGCLCs の性分化には生殖巣の体細胞が必要であった。また最近、PGCLCs を規定された条件にて増殖させる培養法が確立された。 そこで今回 PGCLCs とその増殖培養法を使用することで性分化誘導因子の同定を試みた。まず分化マーカーである <i>Dazl-tdTomato</i> レポーターを持つ ES 細胞を樹立し、そこから PGCLC を誘導・培養し、培養液中に液性因子を添加することで、レポーター陽性を指標に分化因子を探索した。その結果 RA と BMP を雌性決定因子として同定することに成功した。これらを用いた性決定再構成系の確立に際し、雌性決定因子とされてきた RA は STRA8 発現を誘導するものの、減数分裂マーカーである SCP3 の発現は誘導せず雌性決定には十分でないこと、BMP と RA が協調的に働くことで初めて SCP3 発現が認められ雌性決定が起こること、を見出した。これらの液性因子により PGCLCs は性分化し減数分裂を開始するが、その分化同期性や減数分裂時の染色体構造、STRA8 のノックアウトによる表現型はいずれも生体内の卵母細胞における動態と合致していた。 またこれら卵母細胞様の細胞では、今回生体の生殖細胞の網羅的遺伝子発現解析より定義した後期生殖細胞遺伝子群・卵母細胞遺伝子群の上昇を認める一方で初期 PGC 遺伝子群の低下が認められ、全発現遺伝子を用いた主成分分析では胎齢 14 日頃の卵母細胞への強い近似が認められた。加えて RA は性分化期の生殖細胞にて発現の無い遺伝子群を異所性に発現させるが、これらは BMP により抑制されることが判明した。 更に、運命決定直後の培養初期 PGCLCs においては RA・BMP シグナルによって減数分裂関連遺伝子の発現上昇が起こらない一方で、培養中期以降の PGCLCs では上昇が認められる、ということを見だし、これら遺伝子のプロ | | | |

モーターにおける DNA メチル化の減少がその発現上昇に寄与していることを示唆する結果を得た。

以上、本研究は始原生殖細胞の雌性分化を再構成することを通じて、その分化機構を包括的に明らかにしたものである。これらの成果は生殖細胞の分化機構解明の基礎となること、減数分裂研究における有用なツールとなること、ひいては不妊症の機構解明へと寄与することが期待される。

(論文審査の結果の要旨)

始原生殖細胞(Primordial germ cell; PGC)は精原細胞・卵母細胞への分化能を持ち、次世代にゲノムを伝える唯一の細胞である。PGC は BMP による運命決定後、精巣・卵巣の環境により性決定を受けるが、哺乳類における PGC の性決定機構は不明な点が多い。

申請者らはこれまで ES 細胞から BMP により PGC 様細胞 (PGC-like cell; PGCLC)を誘導する系を樹立してきた。また最近、規定された条件での PGCLC 増殖培養系を確立した。

本研究ではこれらの系を使用し、生殖巣の細胞を用いず新規に同定した液性因子により、試験管内にてマウス PGC の雌性決定を再構成することに成功した。その過程にて、雌性決定因子とされる RA は STRA8 発現を誘導するが雌性決定には十分でなく、BMP と RA が協働することで初めて雌性決定が起こることを見いだした。これらの因子により PGCLC は生体を模倣する形で雌性分化して減数分裂を開始し、その遺伝子発現は胎齢 14 日頃の卵母細胞に酷似していた。更に PGC 運命決定と雌性分化において BMP は共通因子であるが、運命決定直後の PGCLC においては RA・BMP シグナルによって雌性分化が起こらないということを見だし、DNA メチル化がその反応性に寄与することを示唆する結果を得た。

以上の研究は生殖細胞の分化機構の解明に貢献し生殖発生学の理解と応用に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 12 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降