

〔別紙2〕

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 原 健士朗

マウス始原生殖細胞 (PGCs) は生殖巣へ到達するまでの約3日間の移動期のうち2日間、胚性内胚葉組織内を移動する。生殖細胞の発生過程においては、時期組織特異的に体細胞組織との相互作用が重要であることが知られている。しかしながら、PGCsの移動および分化における胚性内胚葉組織の役割、およびその分子メカニズムについては、殆ど知られていない。本研究では、PGCsと胚性内胚葉の相互作用を明らかにするため、まずPGCsの移動と胚性内胚葉組織の組織移動のタイミングの関連性について経時的に追跡した。その結果、PGCsは胚性内胚葉の細胞と同じタイミングで胚体内を移動していることが明らかとなった。さらに超微細形態を観察したところ、PGCsは胚性内胚葉組織のシートに包まれた状態で円形の形態を呈しており、PGCsが受動的に移動している可能性が示された。これらの結果は、同時期のPGCsは胚性内胚葉組織の組織移動の力によって受動的に移動していることを示唆するものである。次に、この観察結果を明確に示すため、Geneticalな体細胞組織の移動阻害実験を計画した。*Sox17* 遺伝子は胚性内胚葉に発現しており、その欠損マウス胚では胚性内胚葉の細胞数が減少することが報告されている。つまり、同マウス胚はPGCsの移動の足場である胚性内胚葉の形成不全モデルマウス胚といえる。そこで、胚性内胚葉形成不全がPGCsの移動・分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、*Sox17*欠損マウス胚におけるPGCsの移動・分化を解析した。まず、アルカリフォスファターゼ染色によりPGCsの移動を調べた結果、興味深いことに、2つの異所的PGCsの集団が観察された。一つは、胚性内胚葉に移入するものの、他組織の発生が進行してもその場所から全く動かずに、腸管の入り口で留まる細胞群であった。二つ目は、一つ目の集団が出現した後に内胚葉の近位部の臓側内胚葉から出現し、臓側内胚葉組織中に拡散するPGCs群であった。これらの細胞群の数を定量的に計測したところ、総数約35個のPGCsのうち、一つ目は約15個、二つ目は約20個の集団であることが明らかになった。微細構造観察を行ったところ、一つ目の集団は分化不全の胚性内胚葉と接着結合を介して正常型とは異なり、強固に接着している様子が観察された。このことから、胚性内胚葉組織の移動が起こっていない可能性を考え、DiIで同部位を標識し *Sox17*を欠損した胚性内胚葉の移動を調べた結果、全く移動していないことが明らかとなった。一方、二つ目のPGCs群の挙動を調べた結果、異所的PGCsは臓側内胚葉組織中でアメーバ運動をしていることが観察された。本来、PGCsはアメーバ運動能を有している

という報告があることから、PGCsの自律的運動能は胚性内胚葉組織によって抑制されている可能性が考えられた。以上の結果、PGCsの後腸への的確な移動には胚性内胚葉との相互作用が重要であることが推察された。次に、この推察結果を明確にするため、胚性内胚葉のレスキュー実験を行った。具体的には、CAG-EGFP胚盤胞にSox17欠損ES細胞をインジェクションして得られたキメラを作出し同胚におけるPGCsの挙動を調べた。

Sox17はPGCsの足場となる後腸を形成する細胞群の分化に重要な転写因子であることから、ES細胞が効率よく組織に取り込まれたキメラ胚では胚性内胚葉のみが正常型、そして他の体細胞組織はSox17欠損型由来となる。キメラ解析の結果、PGCsの移動は正常に回復することが示され、PGCsの移動に胚性内胚葉の適切な分化と伸展が必須であることが明確に示された。次に、胚性内胚葉によるPGCsの分化制御の可能性について検証するため、胚性内胚葉組織中に局在していない異所的PGCsの分化能について解析した。E8.5においてPGCsではDNAの脱メチル化やヒストンのメチル化状態のダイナミックな変化が知られているが、これらの変化は異所的に移動したPGCsでも正常に認められた。このことから、PGCsの分化には胚性内胚葉は積極的に関与しない可能性が考えられた。以上の研究結果から、哺乳類の生殖細胞は胚性内胚葉の適切な分化によって後腸まで移動することが明らかとなった。同成果は、連綿と続く哺乳類の生命の連続性を保証するメカニズムとして重要なものであるばかりではなく、しばしばその性質から“脳”に例えられる腸管の発生過程におけるもっとも初期の役割を明確に示したという点においても極めて興味深いものである。これらの研究成果は、獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値のあるものと認めた。

[別 紙 3]

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 原 健士朗

成 績 ・ 合 格

審査委員一同は、平成21年1月27日、本論文申請者に対し論文の内容および関連事項について試験を行った結果、博士（獣医学）の学位を受けるに必要な学識を有する者と認め、合格と判定した。