

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440119

研究課題名(和文) ショウジョウバエにおける生殖幹細胞ニッチの形成過程と調節機構の解明

研究課題名(英文) The regulation mechanisms of gremlin stem cell niche establishment in *Drosophila* ovary.

研究代表者

浅岡 美穂 (ASAOKA, Miho)

筑波大学・生命領域学際研究センター・研究員

研究者番号：40370118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 幹細胞は、多くの動物において組織の維持や再生に中心的な役割を担っている。幹細胞の数は、その維持に必須なニッチ細胞の数により規定される。しかしながら、ニッチ細胞の形成過程やその数の制御機構については解析が遅れており、幹細胞数の決定機構は未だ不明な点が多い。本研究では、ショウジョウバエにおいて、生殖幹細胞数を規定するニッチ細胞の形成過程を生きた卵巣中で継続的に観察できる実験系を開発し、その形成過程を詳細に記載した。さらに、ニッチ細胞形成過程において、受容体型チロシンキナーゼの一つがニッチ細胞を生み出す前駆細胞で発現し、ニッチ細胞数を一定数に限定するために必須なことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Stem cells play a central role in maintenance and repair of the adult tissues in many organisms. To prevent tissue disorganization and hyperplasia, the number of stem cells must be tightly regulated in the normal tissues. In many tissues, stem cell numbers are determined depending on the number of surrounding supporting cells called as "niche cells". However, it remains elusive how niche cell number is restricted, as well as process of the niche cell formation itself.

In this study, we focused on a niche cell in the *Drosophila* ovary, called as "cap cell", as a model, whose number determines the number of germ line stem cells in one ovary. We developed a novel in vitro culture system of developing ovary, and performed live imaging analyses to follow the process of cap cell formation, and determined the precursors of cap cells. Moreover, we show that a member of receptor tyrosine kinase family, expressing in the precursors, is essential for the restriction of the cap cell number.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖幹細胞 幹細胞ニッチ ショウジョウバエ 卵巣

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖幹細胞は、卵や精子等の配偶子を生み出す幹細胞で、多くの動物において継続的な配偶子の産生を支えている。生殖幹細胞の数は生物種や性、季節によってほぼ一定の数に決まっており、個体毎の差は殆ど見られない。マウスの精巣、ショウジョウバエや魚類の卵巣では、生殖腺内がユニット状に分かれ各ユニット内に生殖幹細胞が複数存在するが、その数もほぼ定数に決まっており、ユニット間での差は殆どみられない。おそらく、このような「生殖幹細胞の定数性」は極端に配偶子産生能の低いユニットや不妊個体、腫瘍化の発生頻度を低くし、定数の生殖幹細胞を持つ安定した生殖腺を得ることに寄与すると考えられる。しかしながら、「生殖幹細胞の定数性を実行する分子機構」についてはこれまで殆ど解析されておらず、不明な点が多い。

(2) 多くの動物種において、生殖幹細胞は周りにある支持細胞（ニッチ細胞）により維持されることが明らかにされている。ショウジョウバエでは、卵巣中の生殖幹細胞の数がニッチ細胞数に比例して決定されることが実験的に証明されている。しかしながら、「ニッチ細胞が正常発生過程でどの細胞からどのようにして形成されるのか」も、「ニッチ細胞数がどのような分子機構により一定数に収束するのか」も未だ明らかになっていない。

(3) 成体の生殖腺に見られる生殖幹細胞は、発生過程で卵や精子への分化を開始せずに未分化な状態のまま取り置きされた前駆細胞(始原生殖細胞)から形成される。我々は、ショウジョウバエの卵巣において、発生過程で取り置きされる未分化な始原生殖細胞の数を人為的に減少させると、成虫卵巣において、生殖幹細胞数がニッチ細胞数とは独立に減少することをこれまでに見出していた。このことは、「発生過程で取り置きされる未分化な始原生殖細胞の数を決定する機構」もまた、ニッチ細胞数の限定機構と合わせて、生殖幹細胞の数の決定に重要なことを示しており、その分子機構の解明は重要な課題の一つとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ卵巣において、生殖幹細胞数を一定数に規定する機構を分子レベルで理解するため、以下の3つのこ

とを目的として研究を行った。

(1) ニッチ細胞の形成過程を再現できる組織培養系を開発し、野生型卵巣のニッチ形成過程をライブイメージングにより継続的に観察し、記載する。

(2) ニッチ細胞数を一定数に収束させる過程に関わる遺伝子を同定し、その遺伝子の機能解析から、ニッチ細胞数を限定する分子機構の一端を明らかにする。

(3) 発生過程で未分化状態のまま取り置きされる始原生殖細胞数を調節する機構に関わる遺伝子を同定し、成虫卵巣における生殖幹細胞数の決定機構への寄与を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 野生型卵巣におけるニッチ細胞形成過程の記載

発生過程において、ニッチ細胞（「キャップ細胞」と呼ぶ）は、幼虫-蛹移行期に出現する。キャップ細胞は、形成直後の卵巣において、形態や位置、分子マーカーの発現により組織学的に容易に識別できる。そこで、キャップ細胞出現前のステージの3令幼虫から単離した卵巣を *in vitro* で培養し、キャップ細胞の形成が再現できるような培養条件を確立する。

キャップ細胞は、3令幼虫後期にターミナルフィラメント(TF)の後に出現し始め、幼虫-蛹移行期までに全てのキャップ細胞の形成が完了する。その直前の卵巣中において、キャップ細胞出現領域にはTF細胞とintermingled cells (ICs)と呼ばれる2種類の体細胞のみが存在する(図1)。

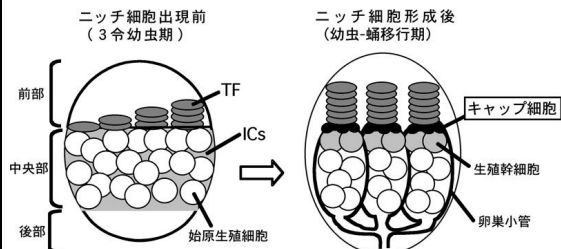


図1 卵巣におけるニッチ細胞の出現

TF細胞は細胞分裂により増殖しTFを形成する¹⁾。ICsは幼虫期に始原生殖細胞と接している体細胞で、形態的には均一に見えるが、実際にはBtlを発現するICsとしないICsが混在する(論文投稿準備中)。

¹⁾ Gancz et al., *Plos Biol.* 9: e1001202 (2011).

TF細胞、もしくは、ICsのみで特異的に緑色蛍光タンパク質 (GFP)を発現する系統の幼虫卵巣を培養し、標識された細胞の発生運命をキャップ細胞出現時期までライブイメージングにより継続的に追跡することにより、キャップ細胞を生み出す細胞種とその位置を決定する。また、その形成過程を詳細に観察する。

(2) ニッチ細胞数の限定に関わる遺伝子の同定と機能解析

キャップ細胞の由来となりうる TF 細胞やICsはもともと胚の生殖巣を構成する体細胞から分化する。以前、我々は、胚生殖巣の体細胞で高く発現する遺伝子群を同定し、それらの機能を RNAi を用いて生殖巣の体細胞中で阻害することにより、キャップ細胞や生殖幹細胞の形成に関わる遺伝子の探索を行った。この解析で、我々は、FGF シグナルの受容体をキャップ細胞の形成過程に関わる因子の一つの候補として得ていた。本研究では、FGF 受容体の機能阻害型変異蛋白質をキャップ細胞形成過程 (幼虫期) の卵巣中の様々な体細胞で発現させて機能阻害を行い、成虫卵巣でキャップ細胞の数を調べる。また、FGF 受容体に対する抗体を作成して、FGF 受容体蛋白質が発現する細胞種を特定する。これらにより、FGF 受容体が幼虫卵巣中のどの細胞で発現してキャップ細胞数の限定に機能するのかを明らかにする。

同様な方法により、FGF リガンドがキャップ細胞形成過程のどの細胞で発現し、その数の制御に関わるのかも明らかにする。

(3) 未分化な始原生殖細胞の数の調節機構

これまでに、3令幼虫後期の卵巣中で発現し、生殖幹細胞の形成に関わる遺伝子として、EGF 受容体と新規遺伝子 *Gone early* を同定していた。これらが、幼虫卵巣中で未分化な始原生殖細胞数の制御に関わるか否かを、突然変異系等や機能阻害型蛋白質の強制発現システムを用いて、調べる。さらに、その制御を通して、これらの遺伝子が成虫卵巣中の生殖幹細胞の数の制御にどの程度貢献するのかについても決定する。

4. 研究成果

(1) 正常発生過程において、キャップ細胞は3令幼虫後期 (採卵後 114 時間) に出現し始める。その直前 (採卵後 110 時間) の幼虫か

ら解剖により卵巣を取り出し、培養皿中で成虫卵巣抽出物と一緒に培養すると、12 時間以内にキャップ細胞の形成を完了することが明らかとなった。培養後の卵巣をキャップ細胞や始原生殖細胞の分化マーカーで染色し、その数や形態を調べた結果、正常発生過程と同様な数のキャップ細胞と生殖幹細胞が形成されていた。以上のように、本研究により、キャップ細胞と生殖幹細胞の形成過程を再現できる卵巣の組織培養系を、世界に先駆けて確立することができた。

さらに、この培養系では、少なくとも 12 時間のライブイメージングを行っても卵巣の分化が阻害されず、キャップ細胞の形成過程を開始から終了まで継続して観察することが可能なことも明らかとなった。

(2) キャップ細胞が卵巣中のどの体細胞からどのように形成されるのかを知るため、前駆細胞の候補である TF 細胞と ICs のどちらかでのみ緑色蛍光タンパク質 (GFP)を発現する系統の卵巣を単離し、ライブイメージングにより、それらの細胞の発生運命を追跡した。その結果、キャップ細胞には、少なくとも 2 つの由来があり、TF 細胞と ICs の両方から形成されることが明らかとなった。この結果は、キャップ細胞の細胞系譜の初めての記載となった。

(3) ショウジョウバエでは、FGF 受容体ホモログが 2 種類存在する。それら *Breathless* (*Btl*)と *Heartless* (*Htl*)は、それぞれ異なるリガンドを特異的に認識し、異なる発生現象に必要とされ、互いに機能を共有できないことが知られている。本研究において、ショウジョウバエの 3 令幼虫の卵巣中では、*Btl* は一部の ICs で、*Htl* はターミナルフィラメント全体を包む *sheath* 細胞で発現することが明らかとなった。これらの受容体の機能阻害型変異蛋白質を、すべての体細胞中で、もしくは、TF 細胞中でのみ、もしくは、ICs 中でのみ特異的に強制発現させて機能阻害した場合のみ、キャップ細胞の数が正常数より少ないものや多いものが現れ、すなわち、偏差が大きくなり、一定数に収束しなくなることが明らかとなった。このことから、キャップ細胞数の限定過程には *Btl* 特異的な FGF シグナル経路が関わるということが明らかとなった。

Btl のリガンドをコードする *branchless* (*bnl*) 遺伝子は、3 令幼虫卵巣中にある始原生殖細胞の一部でのみ高く発現しており、それ

らは未分化な始原生殖細胞特有のスペクトロソームと呼ばれる細胞小器官を持つことから、生殖幹細胞の前駆細胞であることが示唆された。このことから、キャップ細胞数は、生殖幹細胞の前駆細胞から発信される FGF リガンドの量に対応して、ICs 中で働く Btl シグナルの量が変化し、ICs からキャップ細胞への分化が調節されることで定数に限定される可能性が示唆された。この生殖幹細胞とニッチ細胞の両方の前駆細胞間でのシグナルのやり取りによりニッチ細胞数が限定され、その結果、幹細胞数が定数に限定されるというモデルは、今後、さらなる詳細な解析により証明されれば、これまでに全くない新しい概念を提唱できると確証する。

(4) Gone early (Goe)の突然変異系統を作成し、機能解析をした結果、Goe は、新規膜タンパク質であり、3 令幼虫卵巣中で全ての始原生殖細胞の細胞表面で発現し、周りにある ICs に働きかけて、ICs 中でのヘパリン硫酸プロテオグリカンである Dally タンパク質の発現の発現調節を介して、始原生殖細胞の未分化状態の維持に必須な Dpp 蛋白質の分布を制御することで、未分化な始原生殖細胞数を決定することが明らかとなった(発表論文)。また、ICs の細胞表面で発現する EGFR 受容体も、未分化な始原生殖細胞数の決定に関与していることも明らかとなった(発表論文)。さらに、Goe 突然変異と EGFR 受容体シグナル経路の遺伝学的関係を調べた結果から、始原生殖細胞上の Goe は、ICs 上の EGFR 受容体に作用して EGFR シグナル量を抑えることを介して、Dally 発現や未分化な始原生殖細胞数を制御することが示唆された(発表論文)。このように、未分化状態で置きされる始原生殖細胞の数もまた、キャップ細胞数と同様に、始原生殖細胞と ICs 間の相互作用により調節されることが明らかとなった。

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 2 件)

S. Matsuoka, S. Gupta, E. Suzuki, Y. Hiromi and M. Asaoka. *gone early*, a novel germline factor, ensures the proper size of the stem cell precursor pool in the *Drosophila* ovary. *PLoS ONE*,

査読有, 9 巻, e113423 (2014).

DOI: 10.1371/journal.pone.0113423.

S. Matsuoka, Y. Hiromi and M. Asaoka. Egr signaling controls the size of the stem cell precursor pool in the *Drosophila* ovary. *Mech. Dev.*, 査読有, 130 巻, pp.241-253, (2013).

DOI: 10.1016/j.mod.2013.01.002.

[学会発表](計 1 件)

浅岡美穂、ショウジョウバエの生殖戦略 - 速攻性と持続性のバランス -、第 7 回 Germ Cell の会、2013 年 11 月 6 日、公立学校共済組合 蒲郡保養所(愛知県・蒲郡)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/DevGen/hiromi.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

浅岡 美穂 (ASAOKA MIHO)

筑波大学・生命領域学際研究センター・研究員

研究者番号：40370118