

【領域番号】 配偶子制御

【領域略称名】 3005

【領域代表者（所属）】 吉田松生（基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授）

【領域を提案した背景と設定目的】

本領域の設定目的は、互い密接に関わる以下の2つに該当する。

- (2) 異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により、当該研究領域の発展を目指すもの。
- (3) 多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究等の推進により、当該研究領域の新たな展開を目指すもの。

本研究領域がターゲットとする分野（配偶子幹細胞）、および関連分野（生殖細胞研究一般、生殖工学、発生工学など）の日本の研究水準は世界的に見て高いと言われる。事実、重要な研究成果を挙げている研究者は少なくない。しかし実際には、動物学・発生学・細胞生物学・畜産学・水産学・医学など立脚点を異にするコミュニティーに研究者が分散しており、それとともに、対象とする動物種、実験技術や方法論、研究目的はそれぞれ大きく異なっている。例えば、基礎生物学的見地からショウジョウバエ配偶子幹細胞の詳細な制御メカニズムを分子レベルで研究する研究者と、ヒトの不妊治療を視野に入れてマウスの配偶子形成を研究する研究者、有用魚種の生産効率を高めることを目的に魚類配偶子形成の操作法を研究する研究者は、同じ「配偶子幹細胞制御」というキーワードを持つにもかかわらず、共同研究や情報交換はほとんど行われていないのが実情であった。この現状は世界的にも同じであり、例えばマウスとショウジョウバエの配偶子幹細胞研究者の交流は極く限られたものに留まっている。

代表者（吉田）は、今までのキャリアの中で研究の目的意識や方法論に関してショウジョウバエ研究（者）より多くを学んだ経験を持つ。それが、比較的应用研究に近いマウス配偶子幹細胞の研究を進める上で、研究のスタンスや方法論に大きな影響を与えてきた。そのため、様々なバックグラウンドの研究者と接する機会に恵まれ、先述した配偶子幹細胞研究の問題点には常に疑問を感じていた。裏返せば、交流の乏しかった研究者同士が連携すれば、それぞれの研究に新たな視点や技術が導入されて飛躍的に発展し、その結果としてインパクトのある学術の潮流が生まれると確信していた。

このような背景のもと本新学術領域は提案された。それは、異なるバックグラウンドで「配偶子幹細胞」を研究して来た研究者が、新たな共同研究コミュニティーを創出する挑戦であったといえる。本領域から新しい研究の潮流を生み出し、関連する分野を横断的に結びつけるコアとなり、さらに世界をリードする研究者集団を作りたいと考えた。

【領域設定目的の達成度の自己評価-総評】

領域申請時に掲げた目的を本当の意味で達成し、新しい潮流を作り出すに至ったかについて、研究期間が終了した直後の現時点で評価するのは、時期尚早である。数年後、あるいは10数年後に、最終的な評価は固まるものであろう。しかし、期間内に達成した個々の研究の学術的進展、これら研究成果の与えた国内外へのインパクト、それによって示した国内外のプレゼンスを鑑みるに、相当程度目的を達成したと自己評価する。さらに、申請時に掲げなかった以下の目的について、当初想定しなかった成果をあげたと考えている。

- (4) 当該領域の研究の発展が他の研究領域の発展に大きな波及効果をもたらすもの。

本研究領域では、GSC/ニッチ・システムを動物種横断的に解析し、①GSC/ニッチの基本システムを解明すること、②季節性繁殖や有性/無性生殖の転換など、GSC/ニッチの基本システムを制御する機構を解明すること、さらに、③GSCの機能を人為的に制御することによって、技術応用に資することを目的とした。

これらのテーマについて具体的な達成目標を設定し、研究を展開した。以下具体的に述べるように、研究は順調に進展した。未だ解明・達成されていない課題もあるが、当初の目的の多くが達成された。また、研究開始前には予想し得なかった進展も多くあった。本領域の研究期間（=5年間）でこの研究分野の世界的な情勢は大きく変化したが、我々の研究領域が発信した成果がこの世界的な進展に大きく貢献出来たことを誇りに感じている。次項で、このような自己評価に至った具体的な事例を述べる。

【領域設定目的の具体的な達成状況】

① GSC/ニッチの基本システムの解明

本領域では第一に、**研究インフラの整ったショウジョウバエとマウスを中心に詳細な解析を行い、GSC/ニッチの基本システムの実体を解明すること**を目指した。具体的には、①GSC、ニッチ細胞、ニッチの場という3つのコンポーネントを組織学的に同定し、②それぞれの機能とコンポーネント間の相互作用を解明し、③そこで働く分子機構を明らかにすること、さらに、④個体発生におけるGSC/ニッチ・システムの形成過程を理解することを目的とした。

●マウスおよびショウジョウバエ GSC/ニッチ・システムの解明

本領域を提案したきっかけの一つは、**吉田**らがマウス GSC を機能的に同定、精巣内で血管の近傍に分布することを発見したことであった(*Dev Cell* 2007; *Science* 2007)。これにより、マウス GSC/ニッチ・システムの解明が具体的でチャレンジ可能な課題となっていた。

当初の仮説：当初は、「ショウジョウバエ型の GSC/ニッチ・システム」がマウスにも存在すると想定した。すなわち、「マウス GSC も、明確な構造を持つニッチ細胞及びニッチの場に繋がれていて、厳密な非対称分裂を繰り返し、ニッチに残る幹細胞とニッチを離れる分化細胞を生じる」という仮説である。この仮説のもと、未発見のニッチ細胞やニッチの場を発見し、非対称に分裂するであろう GSC の挙動を観察・検出することを目指した。

ショウジョウバエ型とは対照的なマウス GSC/ニッチ・システムの姿：しかし、独自に開発したライブイメージングやパルス標識実験を用いてマウス GSC の精巣内の挙動を解析したところ、作業仮説と異なる知見が次々と得られた。まず、①GSC から分化を開始した細胞が幹細胞へと「若返る」こと、このとき細胞間橋の断裂による合胞体の断片化や遺伝子発現の変化を伴うことを発見した(**吉田** : *Science* 2010)。次いで、②GSC は頻繁に消失する(分化や死の結果)が、近傍の GSC が数を増やして頻繁に入れ替わること、その入れ替りは確率的に起こる事象であること(**吉田** : *Cell Stem Cell* 2010)、③GSC は精巣組織で決まった場所に留まることなく活発に動き回ること(**吉田** : 論文投稿中)などを見出した。更に、④GSC ニッチを構成する新規の体細胞サブセットとそこで機能する分泌因子を同定したが、これらは、特定の位置を規定するのではなく、血管周囲に広がりを持つ「領域」を規定するものであった(**吉田** : 論文未発表)。以上の結果は、常識的な予想を覆し、マウス GSC/ニッチ・システムが「ショウジョウバエ型」とは異なる、むしろ対照をなすことを示すものであった。

ショウジョウバエ型とマウス型に共通する GSC の行動原理：しかし最近、ショウジョウバエ GSC の自己複製と分化が、非対称分裂によって厳密に制御されるわけではなく、確率的な要素を少なからず含むことが、米国のグループによって示唆された(Matunis ら 2012)。さらに本領域の**仁木**は、ショウジョウバエ GSC が、組織構築の拘束の外れた培養条件下ではマウスに似たランダムな挙動を示すことを見出した(未発表)。以上から、①ショウジョウバエとマウスの GSC は、共通してランダムに自己複製と分化を行う性質を有しているが、②組織形状やシグナル分子の局在によって異なる制御を受け、その結果異なる挙動を示す、という新しいパラダイムが浮かび上がって来ている。更に最近、③他の組織幹細胞も共通のランダム性を有することが明らかとなって来ている。

ニッチ細胞とニッチの場の実体：ショウジョウバエを中心に、GSC/ニッチ・システムの構成要素である「ニッチ細胞」と「ニッチの場」の詳細な解析を進めた。まず、①雌雄生殖腺において、細胞外基質へパラニン硫酸プロテオグリカンが、ニッチ細胞より分泌されるシグナル分子の空間的局在を規定し、これによって GSC の挙動を制御することを発見し、「ニッチの場」の概念を、分子の実体とともに明らかにした(**小林**_博 : *J Cell Biol* 2009)。②更に、ショウジョウバエ雌雄生殖腺の発生過程において、生殖細胞と生殖腺体細胞の相互作用により、バランスの取れた数の GSC とニッチ細胞が特定の部位に形成される分子機構を解明した(**小林**_博 : *PNAS* 2010, **浅岡** : *Mech Dev* 2013 および論文未発表)。③ショウジョウバエとは異なる組織構築を持つマウス精巣においても、ニッチの実体の解明が進んでいる(**吉田** : 論文未発表)。異なる動物種を貫く研究連携は、領域終了後も継続発展し、「ニッチ細胞」と「ニッチの場」の動物種間の類似点と相違点、それを貫く共通原理の解明が進行している。

以上のように、主として異なる方法論や実験手法で解析されて来たショウジョウバエとマウスの GSC 研究が緊密に連携することによって新しい展開が得られた。これらの動物種の GSC/ニッチ・システムの相違点、と両者に共通する性質を見出した。更に、ここで見出された性質が、他の幹細胞に共通する幹細胞の行動原理となっていることが明らかとなるに至り、幹細胞研究領域一般の発展に大きな波及効果を与えることが出来た。その結果、2010 年ころから現在も続く幹細胞生物学のパラダイムシフトを産んだ原動力の一つとなったと自負している。

● 魚類 GSC/ニッチ・システムの解明：

ニジマスにおいて、移植による機能的同定と形態学的特徴をつなげ、雌雄の GSC を同定した (吉崎：**Development 2010** および未発表)。さらに、メダカ研究から、魚類雌雄生殖腺における GSC とニッチの構造的基盤が明らかとなった。魚類は、体全体の作りはほ乳類や鳥類と非常に近いが、生殖腺の構造はショウジョウバエと共通する特徴を備えており、GSC/ニッチ・システムの進化を考える上で重要な位置を占める動物分類群である。中村は、メダカ雌雄生殖腺において GSC とニッチ細胞およびニッチ構造を同定し **germinal cradle** と名付けた。ほ乳類と異なり魚類は、メスも GSC/ニッチ・システムを持つが、GSC とニッチを生殖腺内で同定した初めての研究である。体全体の作りはマウスに類似しているが、GSC/ニッチの基本システムはむしろショウジョウバエを彷彿とさせるものであり、注目を集めた(中村：**Science 2010**)。

動物種を越えた連携による研究推進を旨とする本研究領域において、魚類の GSC/ニッチ・システムの解明に向けての重要な成果が得られたこと、更に、動物種を俯瞰した GSC/ニッチ・システムについての重要な洞察を得ることが出来たことは、本研究領域の発展・新展開として、大変意義深い。

② GSC/ニッチ・システムに特異的な制御機構

この項目では、**他の体細胞性幹細胞には見られない、GSC/ニッチの基本システムに特異的な制御機構を解明**することを目的とした。具体的には、①季節性(システムの活動と休止の制御)、②性の可塑性(システムの性的二型)、③有性/無性生殖の転換(システムの消失と誘導の制御)、を取り上げた。これらはいずれも動物の生殖戦略に直結する特徴的な制御機構である。さらに、公募研究を中心に④栄養状態などの環境要因による GSC/ニッチ・システムの解析を行った。詳細は後の業績欄に記載するが、ここでは、特に大きな成果を挙げた GSC/ニッチ・システムの性的二型について記す。

● GSC/ニッチ・システムの性的二型のメカニズムの解明

GSC/ニッチ・システムは、オス(精子を作る)とメス(卵を作る)の二型を持つことが大きな特徴である。GSC とともに、ニッチ細胞を含む生殖腺(巣)の体細胞も二型(精巣と卵巣)を持つ。「発生期に GSC の性がどのようにして決まり、一生を通してどのようにして維持されるのか？」は長年の課題であり、多くの研究が行われて来た。広く動物種を越えて、発生期に体細胞の性が先に決まり、それに従って生殖細胞の性が決まると考えられて来た。また、一旦雌雄の決まった GSC の性がどのように維持されるのかははっきりと分かっていなかった。

本研究領域では、これらに対して重要な知見が得られた。まず、①ショウジョウバエ GSC の前駆細胞である始原生殖細胞が、**生殖腺体細胞と共に生殖腺を作る以前から、細胞自律的にオスメスの性を決めることを発見した**。同時に、GSC の性的二型を決める内在的メカニズムの存在を発見した(小林^橋：**Science 2011**)。この、定説を覆す発見を端緒に、他の生物種でも同様の機構があることが分かりつつあり、本研究のインパクトは大きい。それとともに、体細胞による誘導の優位性も改めて浮き彫りとなった。②ショウジョウバエにおいては、**生殖細胞自律的に性の方向が決まったのちにも、生殖腺の体細胞の性に従って、最終的な GSC の性の変更され得ることが分かった**(小林^橋：**Science 2011**)。③さらに、ニジマスにおいて、**機能的なメス GSC として卵を作っている細胞が、幼若なオス個体に移植すると体細胞により、精子を作るオス型 GSC に転換できることを発見した**(吉崎：**Development 2010**)。吉崎自身による先行研究と合わせて、一旦性の決まった成体型 GSC であっても体細胞による誘導が優位に性を変えうるということが分かり、魚類の性の可塑性を支える GSC の柔軟な性質が明らかとなった。

このように、本研究領域の成果は、動物種を越えて GSC/ニッチ・システム、ひいては配偶子形成の性的二型について、飛躍的な発展をもたらした。今後、本研究領域を母体とした連携研究によって、更に詳細な生殖細胞自律的および非自律的な分子メカニズムの動物種を越えた共通性と特殊性が浮かび上がることが大いに期待される。

③ 応用へ向けた研究の展開

以上記して来た研究は、**GSC/ニッチ・システムを人為的に制御する生殖医学・生理工学的技術の基盤**となる。独立した研究項目として設置してはいないが、①不妊医療の革新的展開(小川)、②家畜・家禽・養殖魚生産の飛躍的効率化(吉崎、吉村)、更に、③絶滅危惧種や産業上有用種の遺伝子資源保護(吉崎)など、GSC/ニッチ・システムの制御を通じた応用への展開を意識した研究を遂行した。

● マウス精巣の in vitro 培養による機能的精子形成

小川は、GSCのみを含む幼弱なマウス精巣組織を器官培養し、減数分裂を経て、精子への分化を完了させる培養法を確立し、顕微授精法 (ICSI) により健常な産仔を得ることに成功した。更に、凍結した幼若精巣組織から機能的精子へと分化させることに成功した (小川: *Nature* 2011)。ほ乳類精子形成の分野で長年成功していなかった夢を克服した本研究は、大きなインパクトを与えた。

上記の培養系を応用し、長期間 in vitro で培養した樹立精子幹細胞株から機能的な精子を in vitro で作り出すことに成功した (小川: *Nature Communications* 2011)。更に小川は、無精子症マウスの精巣を、培養液組成を工夫した器官培養によって「in vitro 治療」して、機能的な精子を作ること成功した (小川: *PNAS* 2012)。このように、このブレイクスルーは、不妊治療に全く新しいストラテジーを導入し、医学分野など他の研究領域の発展に大きな波及効果をもたらしており、今後の更なる発展が期待される。

研究開始当初の想定を越えて本研究が成功するのに、本研究領域において行われたマウス GSC/ ニッチ・システムの基礎的研究、ショウジョウバエや魚類の GSC およびニッチ細胞の培養研究との連携や密接な情報交換が非常に重要な貢献を果たした。まさに、異なる学問分野の研究者が連携して行う共同研究等の推進により研究領域が発展し、多様な研究者による新たな視点や手法による共同研究によって研究領域の新たな展開を見た、顕著な例である。

● 魚類の GSC 移植による借り腹配偶子生産技術の発展

吉崎は、独自に開発した GSC の移植技術を発展させ、借り腹 (借り生殖腺) による配偶子生産技術を特段に進展させた。ニジマスにおいてオスメスいずれの GSC から精子、卵いずれも生産できることを示した (吉崎: *Development* 2010)。これは、前述のように、GSC の性的二型の可塑性についての重要な成果であると同時に、応用に供する意義が大きい。水産漁業分野に応用する例としては、①天然資源に依存しない完全養殖を実現して水産資源の枯渇を防ぐ、②効率よく世代を回して交配して魚種の育種を実現する、③オスメスによって産業上の価値が異なる魚種の性比を制御する (例えば、XX の卵原細胞をオス宿主に移植することで、宿主個体に X 精子のみを生産させることが可能となり、次世代で全メス集団を得ることができる。) など、革命的な進展が見込まれる。

実際に吉崎は、これら応用に向けての研究を進めており、この成果を他の産業上有用な魚種へ応用することにも成功している。一例として、クロマグロの精原細胞を各種サバ科宿主の腹腔内に移植し、生殖腺内に到達させることに成功した (吉崎: 未発表)。今後、宿主生殖腺内で機能的な GSC として機能し、精子と卵を作ることが期待される。クロマグロは絶滅が危惧される食用有用魚種で社会的に問題となっているが、本研究の成果がこれらの解決につながることを期待されている。

更に特筆すべき展開として、冷凍保存したニジマス精巣から GSC を含む細胞を調製して仮親個体に移植、雌雄の配偶子を生産して、完全な次世代個体を得ることに成功した (吉崎: *PNAS* 2013)。従来、魚類精子の保存は可能であったが、卵の保存ができなかった。本研究の一連の技術が確立したことにより、GSC を含む細胞や組織を長期間保存したのち、近縁種を宿主として配偶子を生産、個体として復元するという生存個体に依存しない全く新しい遺伝資源保存の方法論が確立した。

この手法は、有用動物 (品種) の保存や絶滅危惧種の保全という重要な課題に対するブレイクスルーとなると強く期待される。吉崎は、絶滅に瀕している米国アイダホ州のベニザケ地域集団 (通称 red fish) の生殖細胞凍結による保全事業に取り組んでいる。

以上のように、本研究領域は「配偶子幹細胞の生物学とその応用」をキーワードに新たな研究領域を開拓し、顕著な発展を成し遂げることが出来たと自己評価している。