

博士論文

精巣奇形腫瘍発症における

Teratoma Precursor 細胞発生のメカニズム

(Study of the mechanism of Teratoma Precursor Cell development  
in the pathogenesis of testicular teratomas)

横浜国立大学大学院

理工学府

今井淳稀

鈴木敦研究室

# 目次

略語.....	4
第一章 序論.....	5
1-1 精巢胚細胞腫瘍について.....	5
1-2 マウスにおける生殖細胞の発生と精巢テラトーマの発症について.....	5
1-3 マウスにおける精巢テラトーマ研究の歴史について.....	6
1-4 DND1 と精巢テラトーマ発症の関係について.....	7
1-5 <i>Dnd1</i> と <i>Nanos2</i> ・ <i>Nanos3</i> について.....	8
1-6 当論文の目的.....	8
第二章 <i>Ter</i> は <i>Dnd1</i> の null 変異を引き起こす.....	11
2-1 緒言.....	11
2-2 結果.....	11
2-2-1 <i>Dnd1</i> <sup>ΔΔ</sup> マウスはメンデル比で産まれるとともに、129 系統では精巢テラトーマの発症を引き起こす.....	11
2-2-2 <i>Dnd1</i> <sup>+Δ</sup> マウスは精子形成に異常が起こる.....	15
2-2-3 <i>Dnd1</i> <sup>ΔΔ</sup> マウスは卵形成に異常が起こる.....	17
2-2-4 129 系統の <i>Dnd1</i> <sup>+Δ</sup> マウスは精子数の減少や精子の機能に不全があり、やがて稔性が著しく低下する.....	18

2-2-5	129 系統の <i>Dnd1</i> <sup>+/-</sup> マウスにおいて不妊となる表現型は観察されない.....	21
2-3	考察.....	23
2-4	実験で使用した物品等 .....	25
2-5	実験方法 .....	35
第三章 <i>Nanos2</i> と <i>Nanos3</i> は <i>Dnd1</i> と協調的に精巣テラトーマの発症を制御する .....		43
3-1	緒言.....	43
3-2	実験結果 .....	43
3-2-1	<i>Dnd1</i> は精巣テラトーマの発症において <i>Nanos2</i> や <i>Nanos3</i> と遺伝学的な相互作用を持つ.....	43
3-3	考察.....	46
3-4	実験で使用した物品等 .....	46
3-5	実験方法 .....	49
第四章 <i>Dnd1</i> 条件付き欠損マウスを利用した精巣テラトーマ発症機構の解析 .....		52
4-1	緒言.....	52
4-2	実験結果 .....	53
4-2-1	移動期の生殖細胞において <i>Dnd1</i> を欠損させると精巣テラトーマを発症する ...	53
4-2-2	TP 細胞は <i>Dnd1</i> を失った生殖細胞から生じる .....	55

4-2-3	TP 細胞は E16.5 以降に NANOG <sup>High</sup> 、DAZL <sup>Low</sup> の細胞集団として発生する .....	57
4-2-4	DND1 を欠損すると雄性分化不全となる生殖細胞が出現する .....	59
4-2-5	<i>Dnd1</i> 非存在下において EG 細胞の形成率が上昇する.....	62
4-2-6	<i>Dnd1-cKO</i> 生殖細胞のトランスクリプトーム解析.....	66
4-2-7	<i>Dnd1<sup>Ter/Ter</sup></i> と <i>Dnd1-cKO</i> において発現変動する遺伝子の比較.....	69
4-3	考察.....	70
4-4	実験で使用した物品等 .....	73
4-5	実験方法 .....	79
第五章	総括.....	85
	謝辞.....	87
	参考文献.....	88

## 略語

NANOG : Nanog homeobox

POU5F1 : POU class 5 homeobox 1

OTX2 : Orthodenticle homeobox 2

TDRD1 : tudor domain containing 1

PIWIL2 : Piwi-like RNA-mediated gene silencing 2

DNMT3L : DNA methyltransferase 3 like

NANOS2 : nanos C2HC-type zinc finger 2

DND1 : DND microRNA-mediate repressor inhibitor 1

NMD : Nonsense-mediated mRNA decay

NANOS3 : nanos C2HC-type zinc finger 3

PCR : polymerase chain reaction

Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

Taq : *Thermus aquaticus*

APS : Ammonium Peroxodisulfate

TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Tween20 : Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate

EtBr : Ethidium bromide

DMEM : Dulbecco's modified Eagle Medium

BSA : Bovine Serum Albumin

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution

NBC : Newborn Calf Serum

FOXP3 : Forkhead box P3

BCIP/NBT : 5-Bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate/Nitroblue Tetrazolium

HRP : Horseradish Peroxidase

dNTP : Deoxynucleotide Triphosphate

PLZF : Promyelocytic leukemia zinc finger

AP : Alkaline phosphatase

TAE : Tris acetate EDTA

TBE : Tris borate EDTA

LSB : Laemmli Sample Buffer

TBS : Tris-Buffered Saline

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

PEI : polyethylenimine

PAGE : Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

HE : Hematoxylin Eosin stain

PFA : Paraformaldehyde

CCD : Charge Coupled Devices

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

bFGF : basic Fibroblast growth factor

KI67 : Marker of proliferation Ki67

GFP : Green fluorescent protein

DAZL : Deleted in azoospermia like

SYCP3 : Synaptonemal complex protein 3

IgG : Immunoglobulin G

KSR : Knockout serum replacement

CAT : Chloramphenicol acetyltransferase

PE : Proximal enhancer

FACS : Fluorescent activated cell sorting

7-AAD : 7-Amino Actinomycin D

cDNA : complementary DNA

RPM : Read per million

PCA : Principle component analysis

DAVID : Database for annotation visualization and integrated discovery

cKO : conditional Knockout

flox : loxP flanked

SCF : Stem cell factor

FSC : Forward scatter

SSC : Side scatter

SOX3 : SRY-box transcription factor 3

LEFTY1 : Left-right determination factor 1

FGF5 : Fibroblast growth factor 5

DEG : Differentially expressed gene

SYCE2 : Synaptonemal complex central element protein 2

SPO11 : SPO11 inhibitor of meiotic double stranded breaks

MEIOB : meiosis specific with OB domains

MEIKIN : Meiotic kinetochore factor

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor  $\beta$

miRNA : microRNA

# 第一章 序論

## 1-1 精巣胚細胞腫瘍について

胚細胞腫瘍は胚細胞（生殖細胞）に由来する腫瘍である。発症率は10万人に2~3人程度と稀ではあるものの、小児期（0-14歳）や思春期・若年期（15-39歳）においては最も罹患率の高い疾患の一つであり、本疾患への罹患は本邦における重要な課題である<sup>1</sup>。発症部位は、縦隔・後腹膜・仙骨部・脳・性腺など様々であるが、その中でも精巣に発症するものは精巣胚細胞腫瘍と呼ばれる。しかしながら、生殖細胞が精巣内で腫瘍化する分子メカニズムの詳細は未だに不明である。

マウスにおいてよく観察される精巣胚細胞腫瘍として、精巣奇形腫瘍（精巣テラトーマ）が挙げられる。精巣テラトーマは内胚葉・中胚葉・外胚葉の様々な組織・器官の混在する腫瘍であり、ヒト乳幼児において最も多い精巣胚細胞腫瘍の一つである<sup>2</sup>。これまでの研究からこの腫瘍は、胎生期の生殖細胞が精細管内で多能性細胞マーカーNANOG・POU5F1（OCT3/4）・OTX2を発現するTeratoma Precursor（TP）細胞に転換した後に、様々に分化することで発症すると考えられている。したがって、胎生期の生殖細胞がTP細胞へと転換する分子メカニズムを明らかにすることで、精巣胚細胞腫瘍発症機構の一端を明らかにできると考えられる。

## 1-2 マウスにおける生殖細胞の発生と精巣テラトーマの発症について

マウスの生殖細胞は、胎生7.5日目（Embryonic day 7.5；E7.5）頃に、胚体外でエピブラストと呼ばれる多能性細胞から数十程度の細胞集団として生じ、将来の生殖巣へと分裂しながら胚の中を移動する（図1：生殖細胞発生、移動増殖）。E11.5頃に胎仔精巣に到達すると、生殖細胞は体細胞からのシグナルを受けて雄性分化を開始して精子へと分化する（図1：生殖巣へ到達、雄性分化）<sup>3</sup>。すなわち、多能性関連遺伝子*Nanog*・*Oct3/4*・*Sox2*の発現減少・G1/G0期における細胞周期の停止・*Tdrd1*, *Piwil2*, *Dnmt3l*などの雄性生殖細胞に特徴的な遺伝子の発現上昇といった数々の変化が引き起こされる<sup>4,5</sup>。このような生殖細胞の雄性分化において、RNA結合タンパク質NANOS2が重要な役割を担うことが知られている<sup>6,7</sup>。これまでの研究によりTP細胞は、NANOS2を発現せずに雄性分化不全が認められる未熟な生殖細胞から出現することが明らかとなっている



(図 1: 雄性分化不全)<sup>8</sup>。しかし、このような未熟な生殖細胞が生じる原因や、これらが TP 細胞へと転換するメカニズムは未だに不明である。

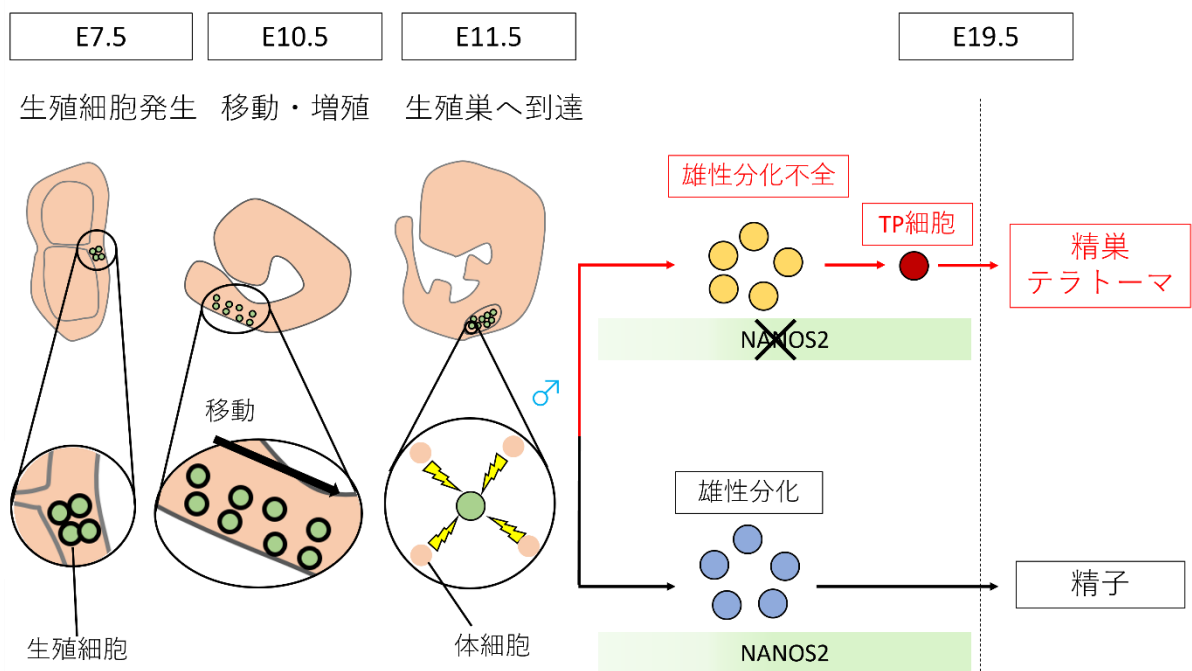


図 1 生殖細胞の発生と精巣テラトーマの発症について

生殖細胞は、E7.5 頃に胚体外で発生した後、胚の中を移動しながら増殖する。その後、生殖巣に到達すると体細胞からシグナルを受けると雄性分化を開始し、やがて精子へと分化する。一方、NANOS2 を発現しない生殖細胞の中から生じた TP 細胞は、生後に精巣テラトーマを発症する。

### 1-3 マウスにおける精巣テラトーマ研究の歴史について

TP 細胞の発生メカニズム解明のために、1954 年に Leroy C. Stevens らによって開発された 129 系統マウスは有用なツールといえる<sup>9</sup>。129 系統は精巣テラトーマを高確率で発症するマウス系統であり、通常マウスにおける精巣テラトーマの発症は数万匹に 1 匹程度の割合であるのに対し、129 系統においてはその確率が 1-7%にまで上昇する (表 1)。さらに、Stevens は 129/terSv という 129 の亜系統において、32%もの確率で精巣テラトーマを発症することも 1973 年に報告した<sup>10</sup>。129/terSv については、野口武彦・野口基子博士らにより詳細な解析が行われた。野口らは、*Ter* が単一遺伝子の変異であるという仮定の下、*Ter* をヘテロで持つ変異体 (+/*Ter*)、ホモで持つ変異体 (*Ter*/*Ter*) や野生型マウス (+/+) を区別する方法を確立して交配実験を行い、各々の遺伝型における表現型解析を行った<sup>11</sup>。この実験により、+/*Ter* は精巣テラトーマの発症率を野生型の 1.4%か

ら約 17%へ、*Ter/Ter* においては 90%以上にまで上昇させることが明らかとなった (表 1)。さらに、*Ter/Ter* においては移動期から生殖細胞が著しく失われ、精巣テラトーマを発症しない個体においては精巣が矮小化していた<sup>12</sup>。一方で、C57BL/6J (BL6)・LTXBJ・C3H/HeJ のような 129 以外のマウス系統においては、*Ter/Ter* であっても精巣テラトーマを発症せずに生殖細胞が減少するのみであった<sup>13</sup>。このように *Ter* 変異体は、生殖細胞が TP 細胞へと転換するメカニズムを研究する上で有用であると考えられる。一方で、129 系統由来の遺伝的な要因が精巣テラトーマの発症を促進することは明らかではあるが、その実体は未だに不明である。

表 1 129 系統と *Ter* 変異体における表現型のまとめ

	野生型	+ <i>Ter</i>	<i>Ter/Ter</i>
129 系統	精巣テラトーマ発症 1-7%	精巣テラトーマ発症 約 17%	<ul style="list-style-type: none"> <li>・精巣テラトーマ発症 90%以上</li> <li>・移動期から生殖細胞減少</li> <li>・精巣の矮小化 (テラトーマを発症しない場合)</li> </ul>
129 以外の系統	精巣テラトーマ発症 約 0.0001%		<ul style="list-style-type: none"> <li>・移動期から生殖細胞減少</li> <li>・精巣の矮小化</li> </ul>

#### 1-4 DND1 と精巣テラトーマ発症の関係について

*Ter* の実体解明に向けた研究も行われてきた。具体的には、連鎖解析を中心とした手法により *Ter* が存在するゲノム領域の絞り込みが行われ、2005 年には *Dnd1* 遺伝子の 3 番目のエクソン上に点変異が発見された<sup>14-16</sup>。この点変異は、*Dnd1* 遺伝子上に未成熟ストップコドンを生じさせて null 変異を引き起こすと考えられている。しかし一方で、別の研究により *Dnd1* 遺伝子を欠失させた *Dnd1<sup>KO</sup>* マウスが作製され (図 3B)、*Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* における精巣奇形腫瘍の発症率が *Dnd1<sup>Ter/KO</sup>* において減少すると共に、*Dnd1<sup>KO/KO</sup>* マウスは胚性致死であることが示された<sup>17</sup>。このことから、*Ter* により DND1 の短いタンパク質 DND1<sup>Ter</sup> が生じ、これが発現量に依存して精巣テラトーマの発症を促進することが示唆されている。このように、*Ter* 変異体が null 変異体なのか、DND1 の短いタンパク質 DND1<sup>Ter</sup> を生じる変異体なのかは議論の余地が残されている (図 2)。

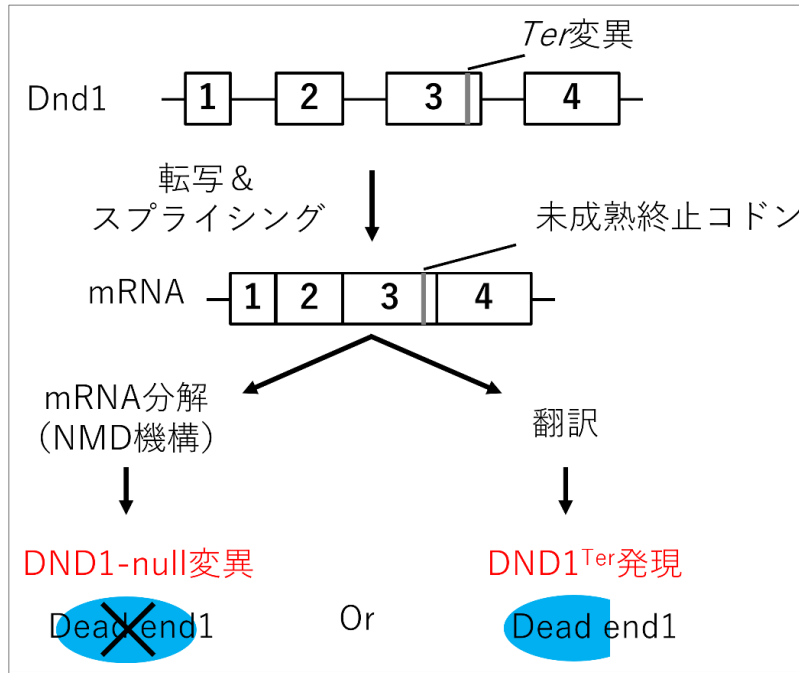


図 2 *Ter* 変異の詳細について

*Ter* は、*Dnd1* 遺伝子のエキソン 3 に生じた点突然変異である。しかし、mRNA へと転写された後に NMD によって null 変異を生じるのか、未成熟終止コドンまでが翻訳された短いタンパク質  $DND1^{Ter}$  が生じるのかは不明である。

### 1-5 *Dnd1* と *Nanos2*・*Nanos3* について

これまでの研究により、 $DND1$  と *in vivo* で結合するタンパク質として、RNA 結合タンパク質 NANOS2 と NANOS3 が知られている<sup>3,18</sup>。このうち、NANOS2 は胎仔精巣に到達した生殖細胞に発現し、 $DND1$  と結合して生殖細胞の雄性分化を促進することが知られている<sup>3</sup>。一方で、NANOS3 は移動期の生殖細胞に発現し、その欠損マウスは *Dnd1* 欠損マウスと同様に移動期に生殖細胞が減少して不妊となる<sup>19</sup>。さらに、*Nanos2* や *Nanos3* 欠損マウスは、129 系統マウスにおいて精巣テラトーマが発症することも明らかとなっている<sup>20,21</sup>。このように、*Nanos2* や *Nanos3* は生殖細胞の発生において *Dnd1* と関連の深い遺伝子であることが明らかとなっているが、生殖細胞が TP 細胞へと転換する現象の制御においても相互作用するかは不明である。

### 1-6 当論文の目的

以上から、当研究においては、 $DND1$  と精巣テラトーマ発症の関係を解明することを目指す。

そのために、以下の①～③の3点について解析を行う。まず、①当研究室により作製された *Dnd1*-KO マウスと *Ter* 変異体の表現型を比較することにより、*Ter* 変異体が *Dnd1* の null 変異であるのか、短いタンパク質 DND1<sup>Ter</sup>を生じる変異体なのかを明らかにする。そして、②生殖細胞が TP 細胞へと転換する現象における *Dnd1* と *Nanos2* や *Nanos3* の相互作用の有無を検証するために、*Dnd1* と *Nanos2* や *Nanos3* との遺伝的相互作用の解析を行う。最後に、③*Dnd1* 条件付き欠損マウスを利用して精巣奇形腫瘍を発症させる実験系を報告する。これにより、特定の発生ステージにおける *Dnd1* の機能が TP 細胞への転換に重要であるとともに、129 系統を利用せずに精巣奇形腫瘍の発症機構を解析できることを示す。

当論文は五章から構成されており、各章の概要は以下の通りである。

#### ・第一章 序論

本章においては、まず、129 系統マウスが精巣テラトーマの研究に有用であることを述べた。さらに、精巣テラトーマを高確率で発症する遺伝子変異 *Ter* について述べ、これが *Dnd1* 遺伝子上に生じた点変異であることから、DND1 の機能を解析する必要性があることを示した。一方で、この変異が DND1 の発現に与える影響が不明であることも説明した。そして、生殖細胞の発生における *Dnd1* と *Nanos2* や *Nanos3* の重要性を述べた上で、これらの相互作用と精巣テラトーマの関係性は不明であることを示した。最後に、当論文の目的について述べた。

#### ・第二章 *Ter* は *Dnd1* の null 変異を引き起こす

本章においては、*Ter* 変異体が *Dnd1* の null 変異体であることを示した。そのために、当研究室により作成された *Dnd1* 欠損マウスと *Ter* 変異体の表現型比較を行い、両者の表現型が酷似していることを述べた。そして、*Ter* 変異体の胎仔精巣を用いて western blot を行い、DND1 の短いタンパク質 DND1<sup>Ter</sup>が検出されないことも示した。一方で、当研究室により作成された *Dnd1* 欠損マウスと *Ter* 変異体において異なる表現型も観察された。そこで、以前の研究で *Dnd1* 欠損マウスが胚性致死となる表現型が観察されたことも含めて、その原因について考察した。

・第三章 *Nanos2* と *Nanos3* は *Dnd1* と協調的に精巣テラトーマの発症を制御する

本章においては、*Nanos2* や *Nanos3* が *Dnd1* と協調して精巣テラトーマの発症を制御することを示した。そのために、*Nanos2* や *Nanos3* と *Dnd1* のダブル欠損マウスを作製し、精巣テラトーマの発症率が相乗的に上昇することを示した。

・第四章 *Dnd1* 条件付き欠損マウスを利用した精巣テラトーマ発症機構の解析

本章においては、生殖細胞の移動期における DND1 の機能が、精巣テラトーマの発症に重要であることを示した。そのために、薬剤投与依存的に *Dnd1* 遺伝子を欠損させることができるマウスを利用し、各発生ステージにおける *Dnd1* の欠損が精巣テラトーマの発症率を調べた。そして、DND1 を失った生殖細胞について免疫染色や次世代シーケンス解析を行い、TP 細胞に転換する前の生殖細胞について詳細に解析を行った。また、この実験系は *Ter* 変異体を利用しないことから、129 系統の遺伝的背景を解明する手掛かりとなることが示唆された。

・第五章 総括

本章においては、当研究を総括し、考察および今後の展望について述べた。

## 第二章 *Ter* は *Dnd1* の null 変異を引き起こす

### 2-1 緒言

序論で述べた通り、*Ter* の実体は *Dnd1* 遺伝子のエキソン 3 に生じた点変異であることが明らかとなっている。しかしながら、この変異により *Dnd1* の null 変異体を生じるのか、DND1 の短いタンパク質 DND1<sup>Ter</sup> を生じるのかは議論になっており、*Dnd1* と精巣テラトーマの関係は未だに不明である。

本章においては、当研究室によって作製された *Dnd1* 欠損マウスを 129、BL6、MCH (ICR) 系統に戻し交配し、*Ter* 変異体と同様の表現型 (表 1) が観察されるかを検証する。また、当研究室により作製された抗 DND1 抗体<sup>3</sup> を利用して western blot を行い、*Ter* 変異体の胎仔精巣において DND1<sup>Ter</sup> が検出されるかを確認する。これにより、*Ter* 変異体が *Dnd1* の null 変異体であることを示す。一方で、*Dnd1*<sup>+/-</sup> 雄マウスは、129 系統の遺伝的背景において早期に不妊となる表現型が観察されることを示す。この表現型は、*Ter* 変異体において観察されなかったため、その原因についても論ずる。

### 2-2 結果

#### 2-2-1 *Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> マウスはメンデル比で産まれるとともに、129 系統では精巣テラトーマの発症を引き起こす

まず、当研究室により作製された *Dnd1*-Δ アリルをホモで持つ *Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> マウスが胚性致死となるかを、遺伝子型の分離比の解析を行うことで確かめた。その結果、BL6、MCH、129 系統全てにおいて、*Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> マウスがメンデル比に従って得られることが明らかとなった (表 2)。このように、*Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> マウスが胚性致死となる証拠は得られなかった。

続いて、*Dnd1*-Δ アリルが精巣テラトーマの発症に与えるか否かを解析した。そのために、精巣テラトーマ発症有無の判定を行った (図 4A、表 3)。その結果、129 系統における精巣テラトーマの発症率は野生型で 4.2% であるのに対し、*Dnd1*<sup>+/-</sup> では 28.8%、*Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> では 92.6% と有意に上

昇した。一方、MCH 系統においては  $Dnd1^{Δ/Δ}$  で約 10%の確率で精巣テラトーマを発症したことから、MCH は精巣テラトーマの発症において低感受性な系統であることが示唆された。また、BL6 系統においては、どの遺伝子型においても精巣テラトーマの発症を確認することができなかった。このように、129 系統以外ではほとんど精巣テラトーマを発症しなかった。129 系統における  $Dnd1^{+/Δ}$  と  $Dnd1^{Δ/Δ}$  マウスの精巣テラトーマ発症率が  $Dnd1^{+/Ter}$  と  $Dnd1^{Ter/Ter}$  マウスと同程度であったことに加え、その他の系統ではほとんど発症しないことは以前の研究結果と同様であった<sup>9,11,17,22</sup>。

$Dnd1^{Δ/Δ}$  マウスが胚性致死とならないことは  $Dnd1^{Ter/Ter}$  と同様であり、 $Dnd1^{-/-}$  マウスにおける精巣テラトーマ発症率も *Ter* 変異体と同程度であった。

表 2 遺伝子型の分離比の解析結果

遺伝子型の分離比の解析結果							
	<i>Dnd1</i> の遺伝子型			合計	$\chi^2$	p-value	
	+/+	+/ $\Delta$	$\Delta/\Delta$				
BL6	46	82	43	171	0.39	0.82	ns
MCH	93	171	97	361	1.09	0.58	ns
129	102	178	95	375	1.22	0.54	ns

$Dnd1^{+/Δ}$  の雄と雌マウスを交配して仔の遺伝子型を調べた。

\*ns : not significantly changed.

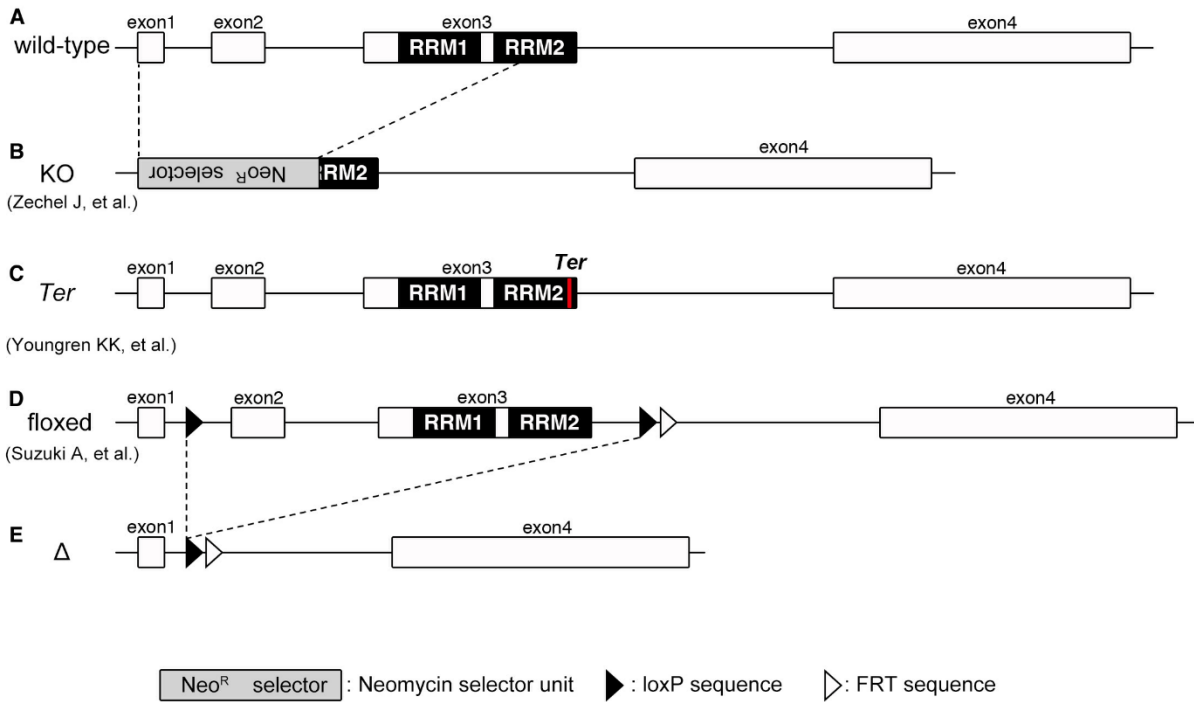


図 3 *Dnd1* 変異ゲノムの概要

- (A) *Dnd1* の野生型アレル。
- (B) Zechel J, et al.<sup>17</sup>において作成された *Dnd1* 欠損アレル。
- (C) *Ter* アレル<sup>14</sup>。
- (D) Suzuki et al.<sup>3</sup>において作成された *Dnd1-flox* アレル。
- (E) Suzuki et al.<sup>3</sup>において作成された *Dnd1-Δ* アレル。

129-4W testes

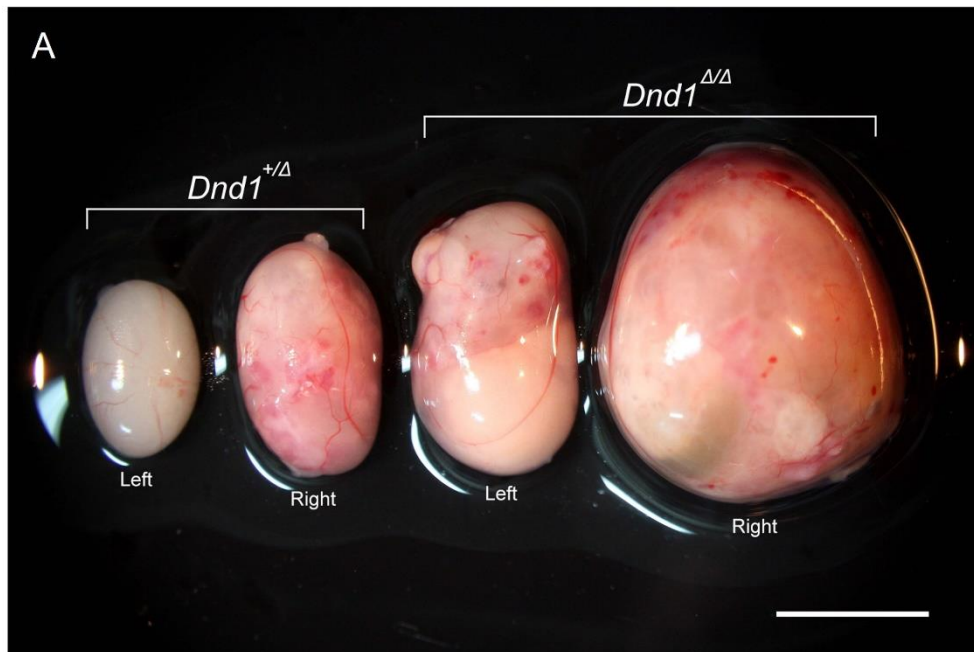




図 4 *Dnd1* 欠損マウスにおける精巣テラトーマの発症例

(A) 4 週齢の 129 系統マウスにおける *Dnd1*<sup>+/*Δ*</sup> と *Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> における精巣テラトーマの発症例。*Dnd1*<sup>+/*Δ*</sup> では、右側の精巣のみが腫瘍を発症しており、*Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> では、両側の精巣が腫瘍を発症している。スケールバー：5mm を示す。

表 3 精巣テラトーマ発症有無の判定の結果

精巣テラトーマ発症有無の判定の結果				
BL6				
<i>Dnd1</i> の遺伝子型	合計	左側	右側	両側
+/+	0% (0/32)	-	-	-
+/ <i>Δ</i>	0% (0/36)	-	-	-
Δ/Δ	0% (0/20)	-	-	-
MCH				
<i>Dnd1</i> の遺伝子型	合計	左側	右側	両側
+/+	0% (0/47)	-	-	-
+/ <i>Δ</i>	0% (0/85)	-	-	-
Δ/Δ	10.2% (6/59)	5.1% (3/59)	1.7% (1/59)	3.4% (2/59)
129				
<i>Dnd1</i> の遺伝子型	合計	左側	右側	両側
+/+	4.2% (4/97)	3.1% (3/97)	1.0% (1/97)	-
+/ <i>Δ</i>	28.8% (42/146)	14.4% (21/146)	7.5% (11/146)	6.8% (10/146)
Δ/Δ	92.6% (50/54)	9.3% (5/54)	20.4% (11/54)	63.0% (34/54)
<i>Dnd1</i> <sup>+/<i>Δ</i></sup> の雌マウスと、 <i>Dnd1</i> <sup>+/<i>Δ</i></sup> もしくは <i>Dnd1</i> <sup>+/+</sup> の雄マウスを交配して精巣テラトーマの発症率を調査した。				
*Fischer の正確性検定：MCH- <i>Dnd1</i> <sup>+/<i>Δ</i></sup> と MCH- <i>Dnd1</i> <sup>Δ/Δ</sup> , p=0.00404、129- <i>Dnd1</i> <sup>+/<i>Δ</i></sup> と 129- <i>Dnd1</i> <sup>Δ/Δ</sup> , p=2.2E-16、129- <i>Dnd1</i> <sup>+/+</sup> と 129- <i>Dnd1</i> <sup>+/<i>Δ</i></sup> , p=5.28E-7				

## 2-2-2 *Dnd1*<sup>+Δ</sup> マウスは精子形成に異常が起こる

続いて、*Dnd1-Δ* アリルが精子形成に与える影響を解析することにした。

そのために、まず、4 週齢の雄マウスについて、*Dnd1*<sup>+/+</sup>、*Dnd1*<sup>+Δ</sup>、*Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> における精巣重量と体重の比の計測を行った。その結果、全てのマウス系統において、*Dnd1*<sup>+Δ</sup> マウスの体重に占める精巣重量の割合は野生型に比べて有意に減少し、*Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> においては野生型や *Dnd1*<sup>+Δ</sup> に比べて有意に減少していた (図 5A-D)。

さらに、精巣切片の HE 染色を行うと、*Dnd1*<sup>+Δ</sup> では精子形成に異常が生じている精細管が観察され、*Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> においては生殖細胞を観察することができなかった (図 5E-M)。*Dnd1*<sup>+Δ</sup> において異常な精細管の割合測定を行ったところ、全ての系統で野生型に比べて割合が上昇したが、129 系統では上昇幅が特に大きかった (図 5N-P)。このように、*Dnd1-Δ* をホモで持ったマウスは生殖細胞が消失し、ヘテロで持っても精子形成に異常をきたすことが明らかとなった。

このように、*Dnd1-Δ* アリルが精子形成に与える影響は、*Dnd1-Ter* アリルとよく似ていることが明らかとなった<sup>11</sup>。

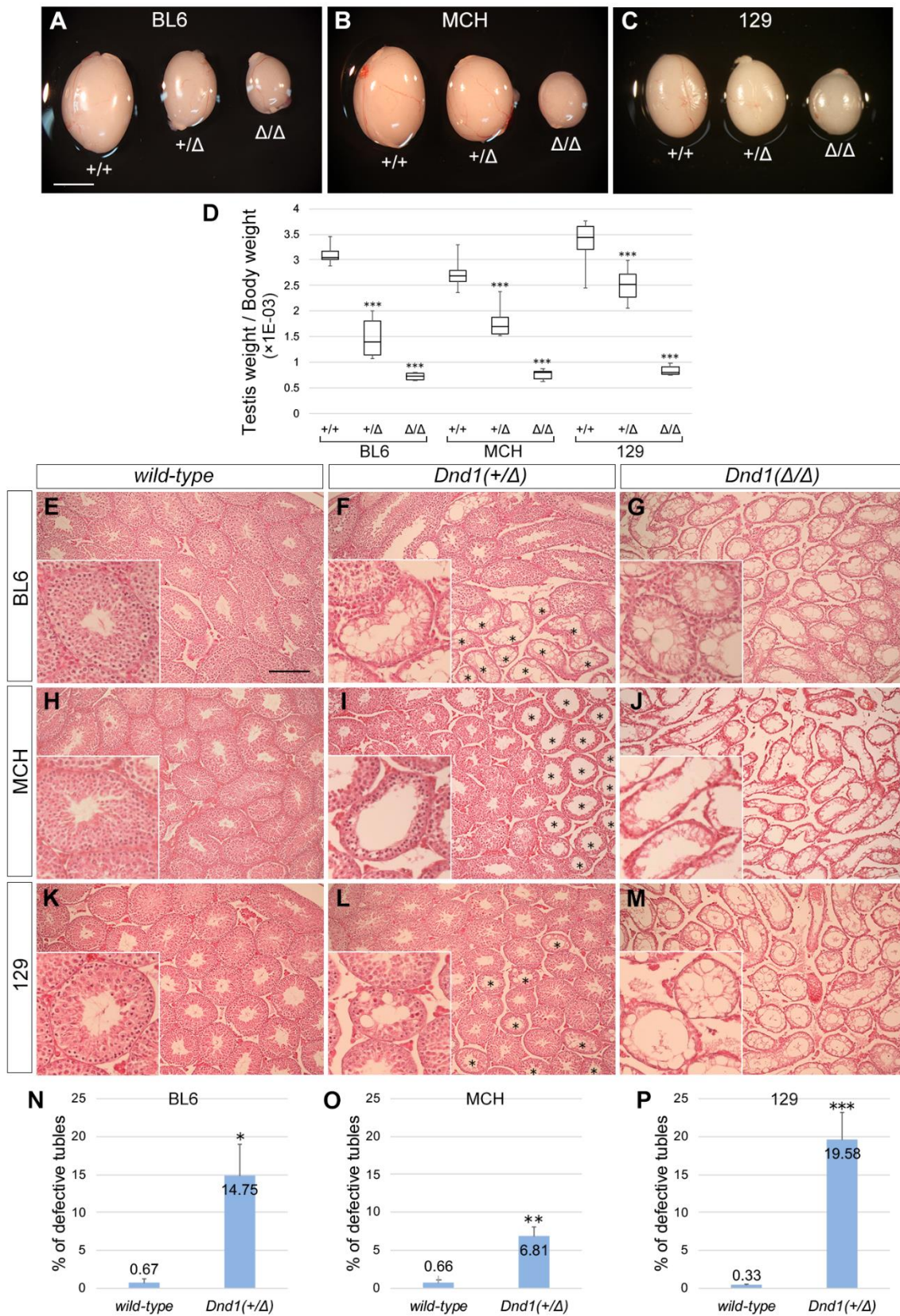


図 5 *Dnd1* 欠損マウス精巢の組織学的解析

(A-C) 各系統における *Dnd1* 欠損マウス精巢の代表的な写真。それぞれ、(A) BL6、(B) MCH、(C)

129 系統の写真を示す。(D) 各系統における *Dnd1* の遺伝子型を横軸に、精巣重量と体重の比を縦軸に示した箱ひげ図。\*\*\* :  $p < 0.001$  (student の t 検定) (E-M) 各系統における *Dnd1* 欠損マウス精巣切片の HE 染色。(E, F, G) BL6、(H, I, J) MCH、(K, L, M) 129 系統、(E, H, K) *Dnd1*<sup>+/+</sup>、(F, I, L) *Dnd1*<sup>+/-</sup>、(G, J, M) *Dnd1*<sup>-/-</sup> の写真を示す。アスタリスクは異常な精細管を示す。各写真に拡大写真が埋め込まれている。(N-P) 遺伝子型を横軸に、異常な精細管の割合を縦軸に示した棒グラフ。(N) BL6、(O) MCH、(P) 129 系統のグラフを示す。黒色のバーは、平均値+標準誤差を示す。\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$  (Student の t 検定)。スケールバー : 5mm (A) は B, C と共通、200 $\mu$ m (E) は F-M と共通。

### 2-2-3 *Dnd1*<sup>-/-</sup> マウスは卵形成に異常が起こる

次に、*Dnd1*-A アリルが卵形成に与える影響を解析することにした。

そこで、雌マウスについて卵巣の観察を行った。その結果、どの系統においても *Dnd1*<sup>-/-</sup> において卵巣が著しく小さくなっていたが、*Dnd1*<sup>+/-</sup> においては精巣とは異なり見た目に大きな差は観察されなかった (図 6A-C)。さらに、129 系統では、他の系統に比べて *Dnd1*<sup>-/-</sup> の卵巣が大きいように見えた (図 6C)。

また、卵巣の HE 染色を行うと、BL6 や MCH 系統では卵がほとんど観察されなかったが、129 系統では他の 2 系統に比べて多くの卵が残っていた (図 6D-L)。また、*Dnd1*<sup>-/-</sup> 雌マウスの産仔数計測を行ったところ、どの系統においても野生型と *Dnd1*<sup>+/-</sup> で大きさの差は観察できなかった (図 6M)。一方、*Dnd1*<sup>-/-</sup> において MCH や BL6 系統では産仔を得ることができなかったが、129 系統においては野生型や *Dnd1*<sup>+/-</sup> に比べて少ないものの、産仔を得る事ができた。

以上の結果より、*Dnd1*-A アリルが卵形成に与える影響は、*Dnd1*-Ter アリルとよく似ていることが明らかとなった<sup>11</sup>。

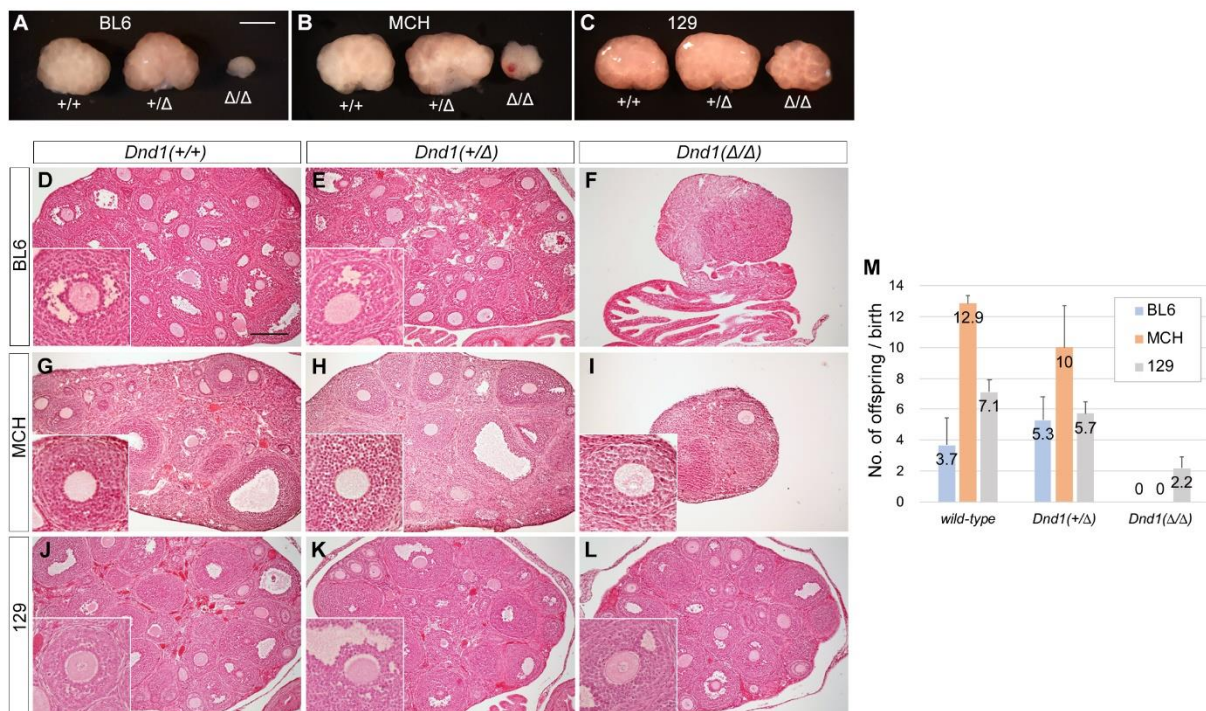


図 6 *Dnd1* 欠損雌マウスの卵巣と産仔数の解析

(A–C) 各系統における *Dnd1* 欠損マウス卵巣の代表的な写真。それぞれ、(A) BL6、(B) MCH、(C) 129 系統の写真を示す。(D–L) 各系統における *Dnd1* 欠損マウス卵巣切片の HE 染色。BL6 (D, E, F)、MCH (G, H, I)、129 系統 (J, K, L)、*Dnd1*<sup>+/+</sup> (D, G, J)、*Dnd1*<sup>+/-</sup> (E, H, K)、*Dnd1*<sup>Δ/Δ</sup> (F, I, L) の写真を示す。各写真に拡大写真が埋め込まれている。(M) 縦軸に 1 回あたりの産仔数、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。黒色のバーは、平均値+標準誤差を示す。青色：BL6、オレンジ色：MCH、灰色：129 系統を示す。スケールバー：5mm (A) は B, C と共通、200 $\mu$ m (D) は E–L と共通。

2-2-4 129 系統の *Dnd1*<sup>+/-</sup> マウスは精子数の減少や精子の機能に不全があり、やがて稔性が著しく低下する

続いて、*Dnd1*- $\Delta$  アリルと *Dnd1*-Ter アリルが引き起こす表現型に差があるかを解析した。

*Dnd1*- $\Delta$  アリルがマウス個体に与える影響を調べる過程で、*Dnd1*<sup>+/-</sup> の雄マウスにおいて、BL6 や MCH 系統においては産子を継続的に得ることができるが、129 系統は次第に稔性を失っていくことに気が付いた。詳細な解析を行うために、*Dnd1*<sup>+/-</sup> マウスの産仔数計測を行った。その結果、BL6 や MCH における *Dnd1*<sup>+/-</sup> の雄マウスは、20-24 週齢でも稔性を維持し続けた (図 7A, B)。しかし、129 系統においては、10-12 週齢で産仔を得られたものの、その後は稔性が著しく低下することが

明らかとなった (図 7C)。なお、掛け合わせた雌マウスに膣プラグは付いたため、交配が行われていることは確認できた。129 系統であっても野生型の雄マウスは、20-24 週齢においても産仔は得られたので (図 7D)、この表現型は *Dnd1*<sup>-A</sup> アリルをヘテロで持った時に 129 系統特異的に引き起こされる表現型であることが明らかとなった。

この 129 系統における *Dnd1*<sup>+A</sup> の雄マウスに特異的な表現型が観察される原因を探るため、各系統の 4 週齢と 12 週齢の *Dnd1*<sup>+A</sup> の雄マウスについて、精巣重量と体重の比の計測を行った。その結果、上述の通り、どの系統においても、野生型に比べて *Dnd1*<sup>+A</sup> の精巣重量と体重の比は減少することが明らかとなった (図 7E-G)。さらに、BL6 や MCH 系統においては、*Dnd1*<sup>+A</sup> の精巣重量と体重の比は 4 週齢から 12 週齢にかけて増加するのに対し、129 系統では減少することが明らかとなった。この結果から、129 系統の *Dnd1*<sup>+A</sup> においては、精子形成の異常によって精巣の発達に障害が起こっていることが示唆された。

そこで、精子数計測を行ったところ、どの系統においても野生型に比べて *Dnd1*<sup>+A</sup> で精子数が有意に減少することが明らかとなった (図 7H-J)。しかし、BL6 や MCH 系統では精子数が半分程度の減少に留まっていたのに対し、129 系統では 5 分の 1 程度まで減少していた。精子数の減少は必ずしも、不妊に繋がるとは限らないため<sup>23</sup>、129 系統における *Dnd1*<sup>+A</sup> マウスの精子が機能的であるかを体外受精により確かめた。その結果、野生型においては 90%程度の卵がブラストシストまで到達したが、*Dnd1*<sup>+A</sup> では 3.9%程度と大幅に減少した。このことから、12 週齢の 129 系統の *Dnd1*<sup>+A</sup> マウスにおいて、精子の機能に異常が生じることが明らかとなった (図 7K)。以上のことから、129 系統の *Dnd1*<sup>+A</sup> 雄マウスは稔性を失うことが明らかになるとともに、その原因は精子数の減少と精子の機能に異常が生じることにあると考えられた。

さらに、精子数の減少と精子の機能に異常が生じる原因について考察する過程で、このような表現型が生じる原因が精原細胞における異常に起因しているのではないかと仮定を立てた。なぜなら、*Dnd1* は精原細胞において発現すると共に、これらの細胞の維持において重要な役割を持つことが知られているからである<sup>18</sup>。そこで、12 週齢において各系統の野生型と *Dnd1*<sup>+A</sup> マウスを用いて、DND1 と同じ精原細胞に発現する PLZF に対する抗体を用いてフローサイトメトリー解

析を行った (図 8A-H)。その結果、PLZF 陽性の精原細胞は、BL6 と 129 系統で有意に減少することが明らかとなった (図 8C,F)。しかし、BL6 系統における *Dnd1*<sup>+/-</sup> マウスの精原細胞は 129 系統よりも減少するにも関わらず、精子数は 129 系統の方において減少の程度が大きかった。さらに、MCH 系統は、精原細胞が減らないにも関わらず精子数は減少したことから、精原細胞の数と精子数の減少には相関が観察されなかった (図 8I)。

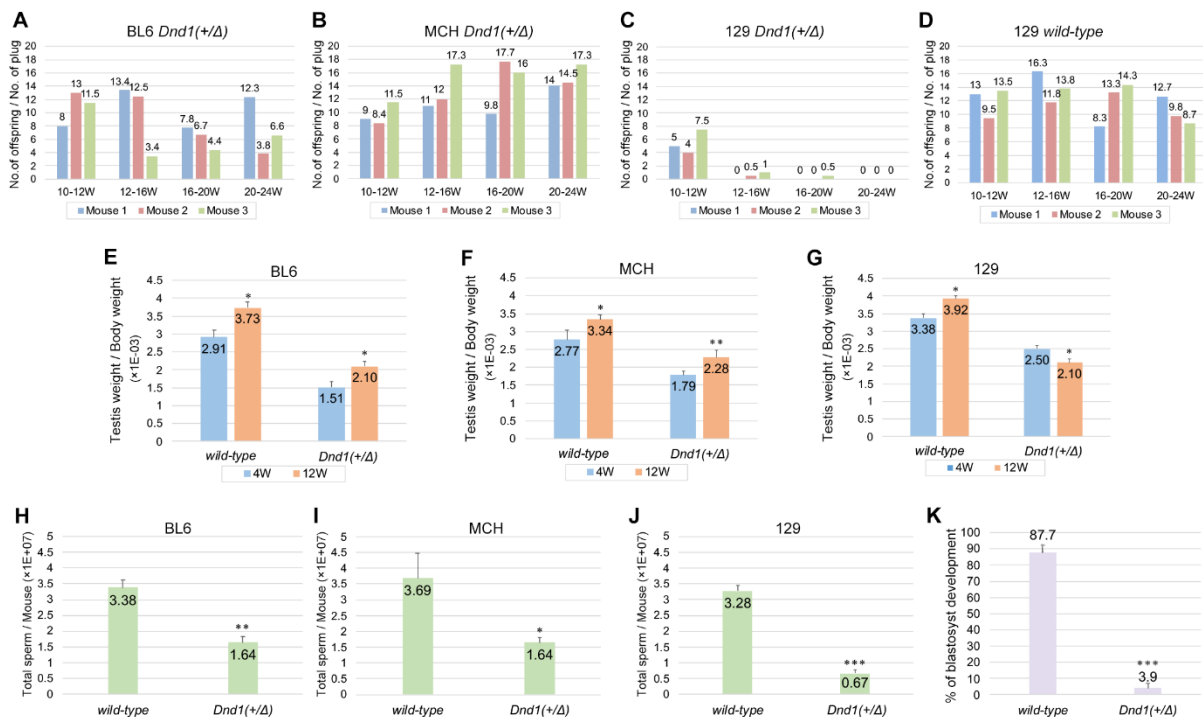


図 7 *Dnd1* ヘテロ欠損雄マウスの精巣重量と体重の比

(A-D) 縦軸に膣プラグ 1 回あたりの産仔数、横軸に雄マウスの週齢を示した棒グラフ。青色：マウス 1、赤色：マウス 2、緑色：マウス 3 を示す。(A) BL6 系統における *Dnd1*<sup>+/-</sup>、(B) MCH 系統における *Dnd1*<sup>+/-</sup>、(C) 129 系統における *Dnd1*<sup>+/-</sup>、(D) 129 系統における野生型マウスの結果を示す。(E-G) 縦軸に体重当たりの精巣重量、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。青色：野生型、オレンジ色：*Dnd1*<sup>+/-</sup> を示す。(E) BL6 系統、(F) MCH 系統、(G) 129 系統における結果を示す。(H-J) 縦軸に 1 匹当たりの精子数、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。(H) BL6 系統、(I) MCH 系統、(J) 129 系統における結果を示す。\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  (Student の t 検定)。(K) 縦軸にブラストシストまで到達した胚の割合、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。黒色のバーは、平均値 + 標準偏差を示す。\*\*\* :  $p < 0.001$  (student の t 検定)。

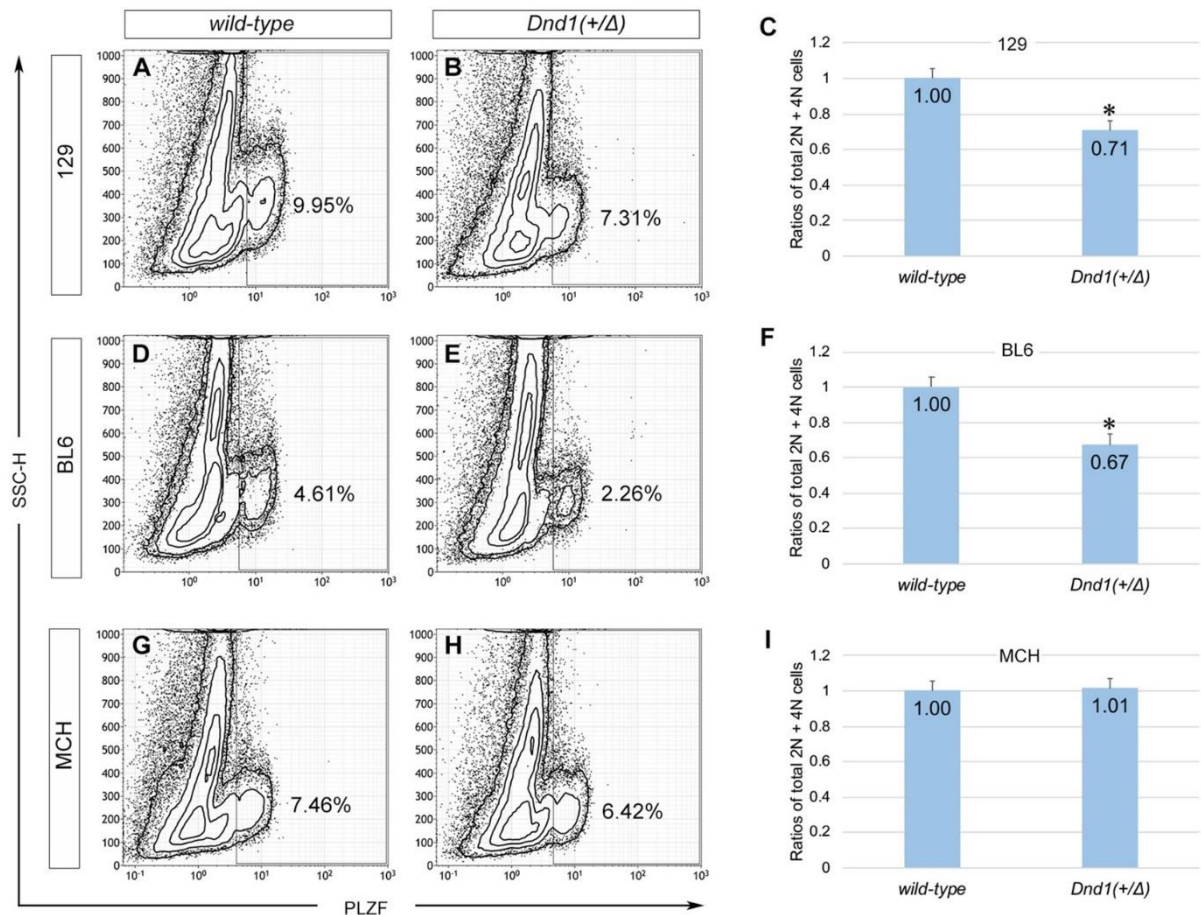


図 8 *Dnd1* ヘテロ欠損雄マウスの精原細胞数

(A, B, D, E, G, H) 各系統における *Dnd1* ヘテロ欠損マウス精巣のフローサイトメトリーの代表的な写真。縦軸は SSC-H、横軸は PLZF のシグナルを示す。それぞれ、129 (A, B)、BL6 (D, E)、MCH 系統 (G, H)、野生型 (A, D, G)、*Dnd1*<sup>+/-</sup> (B, E, H) の写真を示す。(C, F, I) 縦軸に核型が 2N もしくは 4N の細胞に占める PLZF 陽性細胞の割合、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。(C) 129、(F) BL6、(I) MCH 系統における結果を示す。黒色のバーは、平均値 + 標準誤差を示す。\*:  $p < 0.05$  (Student の  $t$  検定)。

#### 2-2-5 129 系統の *Dnd1*<sup>+/-</sup> マウスにおいて不妊となる表現型は観察されない

精巣テラトーマの発症や精子形成、卵形成について、*Dnd1*-A アリルと *Dnd1*-Ter アリルが与える影響は類似していたが、129 系統において *Dnd1*<sup>+Ter</sup> が不妊となる表現型はこれまでに報告されていない。そこで、*Dnd1*<sup>+Ter</sup> において不妊となる表現型が観察されるかを確かめることにした<sup>11</sup>。そこで、まず、12 週齢で、129 系統において野生型と *Dnd1*<sup>+Ter</sup> の精巣重量と体重の比を計測した。その結果、*Dnd1*<sup>+Ter</sup> において精巣重量と体重の比は 70%程度に減少していた (図 9A)。しかし、



野生型と比較して *Dnd1*<sup>+Δ</sup> マウスでは 50%程度まで減少していたため、その減少の割合は小さかった。

そして、精子数計測を行うと、*Dnd1*<sup>+Ter</sup> では野生型よりも精子数が減少する傾向にあったが、有意差は見られなかった (図 9B)。さらに、*Dnd1*<sup>+Ter</sup> 雄マウスの産仔数計測を行ったところ、129 系統における *Dnd1*<sup>+Ter</sup> の雄マウスは 20-24 週齢においても、稔性を維持し続けることが明らかとなった (図 9C)。*Dnd1*<sup>+Δ</sup> と *Dnd1*<sup>+Ter</sup> マウスの遺伝的背景は同一なため、*Dnd1*<sup>+Δ</sup> と *Dnd1*<sup>+Ter</sup> において異なる表現型が観察されることは、両者の間に *Dnd1* の発現を失うこと以外に、別の遺伝子発現の差が生じていることを示唆するものであった。

そこで、*Ter* 変異が DND1 の発現を失う変異ではなく、DND1<sup>Ter</sup> というエクソン 1-2 とエクソン 3 の一部からなる短いタンパク質を生じる変異であるという報告に着目した<sup>17,24</sup>。DND1<sup>Ter</sup> の発現有無を解析するために、まず、western blotting による培養細胞を用いた DND1<sup>Ter</sup> の検出を行った。実験には、当研究室が以前作成した DND1 のウサギ (rabbit, rab) とギニアピッグ (guinea pig, gp) 抗体を利用した<sup>3</sup>。その結果、ウサギ抗体による DND1<sup>Ter</sup> の検出感度は低かったが、ギニアピッグ抗体については#1、#2、#3 全てにおいて抗 FLAG 抗体と同程度のシグナル強度で検出することができた (図 9D)。次に、ギニアピッグの#2 抗体を利用して western blotting による胎生 15 日目精巢を用いた DND1<sup>Ter</sup> の検出を行った。その結果、*Dnd1*<sup>+Ter</sup> において DND1 の発現は野生型に比べて有意に低かったが、5 匹の *Dnd1*<sup>+Ter</sup> 胎仔全てにおいて DND1<sup>Ter</sup> を検出することができなかった (図 9E, F)。

このことから、*Ter* 変異体は DND1 の null 変異体であることが強く示唆された。一方で、*Dnd1*<sup>+Δ</sup> マウスの精子数減少や稔性の低下は、*Dnd1* の発現が失われたこととは別の原因があることが示唆された。

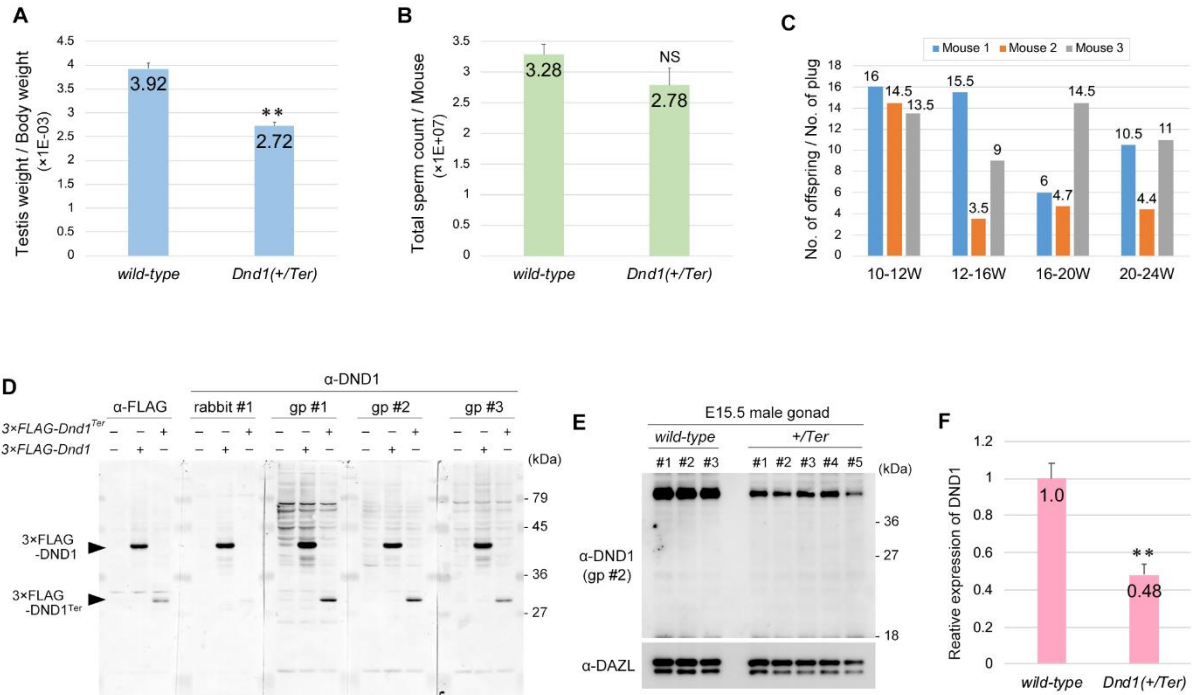


図 9 *Dnd1<sup>+/Ter</sup>* の胎仔雄マウス精巢を用いた *DND1<sup>Ter</sup>* の検出

(A) 縦軸に体重に占める精巣重量、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。黒色のバーは、平均値+標準誤差を示す。\*\* :  $p < 0.01$  (student の t 検定)。(B) 縦軸に 1 匹当たりの精子数、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。黒色のバーは、平均値+標準誤差を示す。NS : Not Significantly Changed (Student の t 検定)。(C) 縦軸に膣プラグ 1 回あたりの産仔数、横軸に雄マウスの週齢を示した棒グラフ。青色 : マウス 1、赤色 : マウス 2、灰色 : マウス 3 を示す。(D) HeLa 細胞に、3 $\times$ FLAG タグ付きの *DND1* もしくは *DND1<sup>Ter</sup>* をトランスフェクションし、 $\alpha$ FLAG 抗体、rabbit で作成した  $\alpha$ DND1 抗体 (rabbit #1)、guinea pig で作成した  $\alpha$ DND1 抗体 (gp #1、gp #2、gp #3) でウェスタンブロッティングにより検出した結果。(E) E15.5 の胎仔精巣について、 $\alpha$ DND1 抗体 (gp #2) と  $\alpha$ DAZL 抗体を利用してウェスタンブロッティングにより検出を行った結果。DAZL は loading control のために検出を行った。(F) 縦軸に DAZL のシグナル強度に対する *DND1* のシグナル強度、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。黒色のバーは、平均値+標準誤差を示す。\*\* :  $p < 0.01$  (student の t 検定)

## 2-3 考察

本章では、まず、当研究室により作成された *DND1* 欠損マウスについて、「遺伝子型の分離比」、「精巣テラトーマ発症有無」、「成体マウスの精巣」、「成体マウスの卵巣」について解析を行い、*Ter* 変異体と同様の表現型が観察されることを示した (表 2, 表 3, 図 5, 図 6)。さらに、胎生 15 日目精巣を用いた *DND1<sup>Ter</sup>* の検出を試みたものの、*DND1<sup>Ter</sup>* を検出することはできなかった

(図 9E)。これらの解析から、*Ter* 変異体は、以前の研究と同様に DND1 の null 変異体であることが強く示唆された<sup>14</sup>。しかしながら、本研究だけでは完全に DND1<sup>Ter</sup> の存在を否定することはできなかった。それは、胎生 15 日目以外の発生ステージにおいて DND1<sup>Ter</sup> が発現する可能性や、DND1<sup>Ter</sup> 検出できないレベルでごく少量発現する可能性が考えられるからである。実際に、*Dnd1*<sup>+/-</sup> 雄マウスが不妊となる表現型が *Dnd1*<sup>+Ter</sup> 雄マウスで起こらなかったことは、DND1<sup>Ter</sup> によって DND1 の機能の一部が補完されているからなのかもしれない。

一方で、129 系統における *Dnd1*<sup>+/-</sup> 雄マウスが不妊となる表現型が *Dnd1*<sup>+Ter</sup> 雄マウスで起こらなかったことは、*Dnd1-Δ* アリルが *Dnd1* のエクソン 2 と 3 を含む配列を欠損させていることに起因している可能性がある (図 3D)。つまり、*Dnd1* 遺伝子座の周辺には 16 の遺伝子が密集しており、欠損させた配列に近傍の遺伝子の発現制御領域が含まれていて、それらの発現に影響を及ぼしている可能性が考えられる (表 4)。つまり、*Dnd1* 遺伝子座近傍の 15 遺伝子の中に精子形成に重要な遺伝子が含まれ、*Dnd1-Δ* アリルの導入によってその遺伝子の発現を変化させている可能性がある。さらに、以前報告された *Dnd1* 遺伝子のエクソン 1 から 3 までを欠損させたノックアウトマウスが胚性致死となった理由も、同様のメカニズムが働いているからかもしれない<sup>17</sup>。すなわち、欠損させた領域に *Dnd1* 遺伝子座近傍の 15 遺伝子の発現制御領域が含まれており、その領域を欠損させたことで胚性致死となる遺伝子発現変化が引き起こされた可能性がある。いずれにせよ、これらの遺伝子について詳細に解析する必要があると考えられる。

表 4 *Dnd1* 遺伝子座近傍の遺伝子と表現型報告

	gene	location on Ch. 18	knockout (KO) mouse line	phenotype in KO mouse
1	<i>Vaultc5</i>	36,801,763..36,802,107	not reported	
2	<i>Zmat2</i>	36,793,923..36,799,660	not reported	
3	<i>Hars2</i>	36,783,202..36,792,562	generated by IMPC	Phenotyping has not been finished
4	<i>Hars</i>	36,766,528..36,783,205	not reported	
5	<i>Dnd1</i>	36,763,671..36,766,214		
6	<i>Wdr55</i>	36,760,222..36,763,708	Youngren KK, et al. <i>Nature</i> . 2005	Embryonic lethal
7	<i>Ik</i>	36,744,656..36,757,639	generated by IMPC	Embryonic lethal , Prewaning lethal
8	<i>Ndufa2</i>	36,742,332..36,744,587	not reported	
9	<i>Tmco6</i>	36,735,019..36,742,400	generated by IMPC	Prewaning lethal, Increased or absent threshold for auditory brainstem response
10	<i>Cd14</i>	36,725,064..36,726,815	Haziot A, et al. <i>Immunity</i> . 1996	Resistant to septic shock
11	<i>Gm41699</i>	36,709,020..36,718,962	not reported	
12	<i>E230025N22Rik</i>	36,684,923..36,696,091	not reported	
13	<i>Slc35a4</i>	36,679,215..36,683,862	not reported	
14	<i>Apbb3</i>	36,671,154..36,679,366	generated by IMPC	No significant phenotypes reported
15	<i>Sra1</i>	36,667,187..36,670,311	Liu S, et al. <i>Journal of Biological Chemistry</i> . 2014	Resistant to high fat diet obesity
16	<i>Etf4ebp3</i>	36,664,060..36,666,324	generated by IMPC	Increased vertical activity , Decreased monocyte cell number

*Dnd1* 近傍の 15 遺伝子を 18 番染色体上の位置順に並べた。遺伝子欠損マウスラインと表現型について記載した。IMPC : The international Mouse Phenotyping Consortium。

## 2-4 実験で使用した物品等

### 2-4-1 使用した試薬・製品

- PCR チューブ (理科研)
- DdeI (Takara)
- タモキシフェン (TRC)
- HCl (Fujifilm Wako)
- グリセロール (Fujifilm Wako)
- キシレンシアノール (Fujifilm Wako)
- 10x PCR バッファー (Toyobo)
- Taq DNA ポリメラーゼ (Takara)
- アガロース粉 (理科研)
- アクリルアミド (Fujifilm Wako)
- TEMED (Fujifilm Wako)
- NaOH (Fujifilm Wako)
- 10x Dulbeccos' PBS (Fujifilm Wako)
- Canget Signal Solution1 (Toyobo)
- Protainase K (Fujifilm Wako)
- Tris (Fujifilm Wako)
- Sesame Oil (Sigma)
- EDTA (Dojindo)
- ブロモフェノールブルー (Fujifilm Wako)
- 蒸留水 (大塚製薬)
- dNTP (QIAGEN)
- 酢酸 (Fujifilm Wako)
- ホウ酸 (Fujifilm Wako)
- APS (Fujifilm Wako)
- 2-メルカプトエタノール (Fujifilm Wako)
- スキムミルク (Fujifilm Wako)
- SDS (Fujifilm Wako)
- Canget Signal Solution2 (Toyobo)

- ピクリン酸 (Fujifilm Wako)
- NaCl (Fujifilm Wako)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (Fujifilm Wako)
- tween20 (Sigma)
- エタノール (Fujifilm Wako)
- パラフィン (Sigma)
- スライドガラス (松浪)
- キシレン (Fujifilm Wako)
- エオシン (武藤化学)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fujifilm Wako)
- VectaMount Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories)
- CARD HyperOva (九動)
- human chorionic gonadotropin (hCG) (あすかアニマルヘルス)
- 流動パラフィン (ナカライテスク)
- CARD MEDIUM (九動)
- KSOM (九動)
- BSA (Roche)
- トリプシン (gibco)
- FDXP3 Transcriptome Factor Staining Buffer Kit (Life Technology)
- pcDNA<sup>TM</sup>3.1(+) (Thermo Fisher Scientific)
- BCIP/NBT phosphatase substrate kit (SeraCare)
- Western BLoT Chemifluorescence HRP Substrate (Takara)
- ホルマリン (Fujifilm Wako)
- KCl (Fujifilm Wako)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fujifilm Wako)
- EtBr (Nippon Gene)
- ブタノール (Fujifilm Wako)
- パラフィン包埋容器 (硝英製作所)
- カバーガラス (松浪)
- ヘマトキシリン (武藤化学)
- コラゲナーゼ (Fujifilm Wako)
- 血球計算版 (Emtech Laboratories)
- DMEM (Sigma)
- 3cm ディッシュ (FALCON)
- CARD FERTIUP (九動)
- セルストレーナー (FALCON)
- 10x HBSS (Fujifilm Wako)
- NBC (gibco)
- ニトロセルロースメンブレン (Pall)

#### 2-4-2 使用した機器

- パラフィン溶解・包埋装置 (Leica)
- スウィング型遠心機 (KOKUSAN)

- 固定角型遠心機 (トミー精工)
- ホットプレート (Omron)
- 光学カメラ (Canon)
- セルソーター (Beckman Coulter)
- ルミノイメージアナライザー (GE Healthcare)
- TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (TaKaRa)
- ミクロトーム (Leica)
- 光学顕微鏡 (Carl Zeiss)
- CO2 インキュベーター (SANYO)
- 超音波発生機 (トミー精工)

#### 2-4-3 使用したソフトウェア

- Excel (Microsoft)
- KALUZA (Beckman Coulter)
- photoshop (Adobe)
- R (R Development Core Team、 Ver.3.6.3)
- ImageJ (NIH)

#### 2-4-4 使用した primer

表 5 使用した primer の詳細

使用した Primer	
<i>Dnd1</i> -wild アリル	Fw : AAGGCCCTGGTAGAAGGTAG
	Rv : GAGTTTGACACCAGCCTAAT
<i>Dnd1-Δ</i> アリル	Fw : GGAAGCCTTCTCAAACCTCAC
	Rv : GAGTTTGACACCAGCCTAAT
<i>Dnd1-Ter</i> アリル	Fw : GCCTAATGATGACCTTCAGTGGTTT
	Rv : CAGCCTGGGCTATTACAAAG

2-4-5 使用した抗体

表 6 使用した抗体の詳細

使用した1次抗体		
抗体名	免疫動物種	メーカー
anti-PLZF 抗体	Rabbit	SANTA CRUZ
anti-FLAG 抗体	Mouse	Sigma
anti-DND1 抗体	Rabbit	
使用した2次抗体		
Alexa488 conjugated anti-rabbit IgG 抗体	Donkey	Abcam
AP conjugated anti-mouse IgG 抗体	Goat	DAKO
HRP conjugated anti-mouse IgG 抗体	Goat	MBL
HRP conjugated anti-rabbit IgG 抗体	Goat	SANTA CRUZ

2-4-6 使用したバッファーの組成

表 7 PCR に用いたバッファーの組成

PCR に用いたバッファー組成	
試薬	使用量
テンプレート DNA	1 $\mu$ L
10x PCR buffer	1 $\mu$ L
dNTP	0.8 $\mu$ L
プライマー (Fw)	0.25 $\mu$ L
プライマー (Rv)	0.25 $\mu$ L
蒸留水	6.65 $\mu$ L
Taq DNA ポリメラーゼ	0.05 $\mu$ L
計	10 $\mu$ L

表 8 タモキシフェン溶液の組成

タモキシフェン溶液	
試薬	使用量
タモキシフェン	0.2mg
Sesame Oil	1mL
計	1mL

表 9 1x TE バッファ어의組成

1x TE バッファ어	
試薬	使用量
1.0M Tris-HCl バッファ어	5mL
0.5M EDTA (pH=8.0)	1mL
イオン交換水	494mL
計	500mL

表 10 10x Loading dye の組成

10x Loading dye	
試薬	使用量
100% グリセロール	5mL
ブロモフェノールブルー	適量
キシレンシアノール	適量
0.5M EDTA (pH8.0)	100 $\mu$ L
蒸留水	4.9mL
計	10mL

表 11 50x TAE バッファ어의組成

50x TAE バッファ어	
試薬	使用量
Tris	121g
酢酸	28.55mL
EDTA	50mL
イオン交換水	Up to 500mL
計	500mL



表 12 1.5%アガロースゲルの組成

1.5% アガロースゲル	
試薬	使用量
アガロース粉	2.7g
1x TAE バッファー	180mL
EtBr	1.8 $\mu$ L
計	180mL

表 13 2x TBE バッファーの組成

2x TBE バッファー	
試薬	使用量
Tris	10.8g
ホウ酸	5.5g
0.5M EDTA (pH=8.0)	4mL
イオン交換水	Up to 500mL
計	500mL

表 14 10%ポリアクリルアミドゲルの組成

10% ポリアクリルアミドゲル	
試薬	使用量
30%アクリルアミド	4.67mL
2x TBE	1.12mL
蒸留水	6.376mL
APS	140 $\mu$ l
TEMED	14 $\mu$ l
計	14mL

表 15 ブアン固定液の組成

ブアン固定液	
試薬	使用量
飽和ピクリン酸溶液	15mL
ホルマリン	5mL
酢酸	1mL
計	21mL

表 16 10x PBS の組成

10x PBS	
試薬	使用量
NaCl	80g
KCl	2g
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	35.8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4g
NaOH	Adjust to pH7.4
イオン交換水	Up to 1000mL
計	1000mL

表 17 PBS-T の組成

PBS-T	
試薬	使用量
1x PBS	600mL
Tween20	600μL
計	600mL

表 18 5% skim milk in 1x PBS の組成

5% skim milk in 1x PBS	
試薬	使用量
1x PBS	1mL
Skim milk	0.05g
計	1mL

表 19 中性緩衝ホルマリンの組成

中性緩衝ホルマリン	
試薬	使用量
ホルマリン	10mL
NaCl	0.8g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.4g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.6g
蒸留水	90mL
計	100mL

表 20 2x LSB の組成

2x LSB	
試薬	使用量
1M Tris (pH6.8)	1.5mL
10% SDS	1.2mL
グリセロール	3mL
2-メルカプトエタノール	1.5mL
ブロモフェノールブルー	0.18mg
蒸留水	2.8mL
計	10mL

表 21 SDS-PAGE separation gel の組成

12.5% (12%) SDS-PAGE separation gel	
試薬	使用量
30% アクリルアミド	5mL (4.8mL)
1.5M Tris pH8.8	3mL
10% SDS	0.12mL
10% APS	0.12mL
TEMED	8μL
蒸留水	3.76mL (3.96mL)
計	12mL

表 22 SDS-PAGE stacking gel の組成

SDS-PAGE stacking gel	
試薬	使用量
30% アクリルアミド	0.296mL
1M Tris pH6.8	0.3mL
10% SDS	25 $\mu$ L
10% APS	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L
蒸留水	1.829mL
計	2.5mL

表 23 20x TBS の組成

20x TBS	
試薬	使用量
Tris	121g
NaCl	175.2g
HCl	adjust to pH=7.5
蒸留水	Up to 1000mL
計	1000mL

表 24 TBS-T の組成

TBS-T	
試薬	使用量
1x TBS	600mL
Tween20	600 $\mu$ L
計	600mL

表 25 3% skim milkin TBS-T の組成

3%スキムミルク in TBS-T	
試薬	使用量
TBS-T	50mL
Skim milk	1.5g
計	50mL

表 26 コラゲナーゼ in 1x HBSS の組成

コラゲナーゼ in 1x HBSS	
試薬	使用量
1x HBSS	1mL
コラゲナーゼ	1mg
計	1mL

表 27 トリプシン/EDTA in 1x HBSS の組成

トリプシン/EDTA in 1x HBSS	
試薬	使用量
10x HBSS	10mL
トリプシン	0.25g
EDTA-2Na	37.224mg
蒸留水	90mL
計	100mL

#### 2-4-7 使用したマウス

動物を使用した全ての実験は、本学の動物実験専門委員会により承認されており、動物実験専門委員会の規定に従って行った。

*Dnd1*<sup>+Ter</sup> マウスは、静岡大学の徳元俊伸教授より分与いただいた。なお、*Dnd1*<sup>+Ter</sup> マウスは、静岡大学の徳元俊伸教授と野口基子博士により、精巣テラトーマを高確率で発症する 129<sup>ter</sup>Sv 系統において維持されてきた<sup>9,11</sup>。

*Dnd1*<sup>-Δ</sup> マウスの作成にあたって、まず、当研究室で作製された *Dnd1*<sup>flox/flox</sup> マウスに、当研究室で作成された全身で CreER<sup>T2</sup> を発現するノックインマウス *Rosa26*<sup>+CreERT2</sup> をかけ合わせ、*Dnd1*<sup>flox/flox</sup>; *Rosa26*<sup>+CreERT2</sup> マウスを得た。さらに、このマウスに野生型マウスを掛け合わせ、*Dnd1*<sup>+flox</sup>; *Rosa26*<sup>+CreERT2</sup> 雌マウスを得た。この雌マウスに 75mg/Kg の濃度で Sesame Oil に溶解したタモキシフェンを投与した後、野生型マウスを掛け合わせることで *Dnd1*<sup>+Δ</sup> マウスを得た。さらに、*Dnd1*<sup>+Δ</sup> マウスを日本クレアから購入した C57BL/6J (BL6)、129<sup>ter</sup>/SvJcl (129)、MCH (ICR) /Jcl (MCH) 系統に 8 回以上戻し交配した。なお 129 系統は、以前、野口基子博士が 129<sup>ter</sup>Sv 系

統を日本クレアに分与し、日本クレアで維持されてきたマウス系統である。

B6C3F1/Jcl 系統は、日本クレアから購入した。

## 2-5 実験方法

### 2-5-1 ジェノタイピング

① DNA 抽出：マウスの尾を採取し、PCR チューブに入れ、TE バッファーを 10 $\mu$ l 加えて、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、DNase を失活させた。そこに TE 4.75 $\mu$ l と Protainase K 0.25 $\mu$ l を加え、生後マウスに関しては 55 $^{\circ}$ C で 2 時間反応させ、胎仔マウスに関しては 55 $^{\circ}$ C で 15 分反応させてゲノムを抽出した。その後、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、Protainase K を失活させ、45 $\mu$ l の蒸留水を加えて希釈した。

② PCR 反応、結果の取得：①で抽出した DNA をテンプレートとし、以下のバッファー、温度条件、primer で PCR を行い、10x Loading dye を 1 $\mu$ l 加え、1x TAE バッファーに浸した 1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動した。

*Dnd1-Ter* アリルのジェノタイピングのために、まず、*Dnd1-Ter* アリルを検出するための primer で PCR を行った。その後、制限酵素 DdeI を PCR 溶液に 0.25 $\mu$ L 加えて 2 時間、37 $^{\circ}$ C 恒温槽内で静置した。この溶液に 10x Loading dye を 1 $\mu$ l 加え、1x TBE バッファーに浸した 10% ポリアクリルアミドゲルを用いて定電圧 230V で 60 分間電気泳動を行った。

表 28 PCR の温度条件

PCR の温度条件		
温度	時間	特記事項
90 $^{\circ}$ C	2 分	33 回繰り返した。
90 $^{\circ}$ C	30 秒	
60 $^{\circ}$ C	30 秒	
72 $^{\circ}$ C	45 秒	
90 $^{\circ}$ C	4 分	

### 2-5-2 遺伝子型の分離比の解析

BL6、MCH、129 系統それぞれにおける  $Dnd1^{+/Δ}$  の雄マウスと雌マウスを交配させて産仔を得た。生後 10 日目以降において 2-5-1 の通りジェノタイピングを行い、それぞれの遺伝型における産仔の累計を計算し、Excel で  $\chi^2$  検定を行うことで分離比と理論値 ( $Dnd1^{+/+} : Dnd1^{+/Δ} : Dnd1^{Δ/Δ} = 1 : 2 : 1$ ) に差があるかを判定した。

### 2-5-3 精巣テラトーマ発症有無の判定

4 週齢においてマウスを安楽死させて解剖を行い、精巣を摘出した。その後、精巣の外観と精巣の内部を観察することで、精巣テラトーマの有無を判定した。各遺伝子型間の発症率の有意差は、R ソフトウェアで Fischer の正確性検定を行い計算した。

### 2-5-4 精巣重量と体重の比の測定

マウスを安楽死させて体重を測定した後、精巣を解剖により取り出して精巣重量を測定した。精巣重量と体重の比を計算した。各遺伝子型間の有意差は、Excel で Student の t 検定を行い計算した。

### 2-5-5 HE 染色

マウスの精巣または卵巣を以下の手順でサンプル化して染色した。

- ① 組織固定：ブアン固定液に 24 時間浸し、PBS で 3 回洗浄を行った。
- ② 包埋：ブアン固定サンプルの包埋は、以下の手順で行った。

表 29 ブアン固定サンプルの包埋の実験手順

ブアン固定サンプルの包埋の実験手順		
操作	時間	特記事項
70% エタノール 浸漬	30 分	
90% エタノール 浸漬	30 分	
100% エタノール 浸漬	60 分	
100% エタノール 浸漬	60 分	
エタノール・ブタノール	30 分	
100% ブタノール 浸漬	60 分	
100% ブタノール 浸漬	60 分	
ブタノール・パラフィン	30 分	65°C パラフィン溶解・包埋装置内。
パラフィン 浸漬	60 分	65°C パラフィン溶解・包埋装置内。
パラフィン 浸漬	O/N	65°C パラフィン溶解・包埋装置内。
パラフィン包埋		

- ③ 切片作成：包埋したサンプルをマイクロトームで 6 $\mu$ m に薄切し、水をのせたスライドガラス上にのせた。このスライドガラスを 43°C にセットしたホットプレートで 12 時間温めることにより、組織を伸展させ、水分を蒸発させた。
- ④ HE 染色：HE 染色は、以下の手順で行った。



表 30 HE 染色の実験手順

HE 染色の実験手順		
操作	時間	特記事項
キシレン浸漬	30 分	
キシレン浸漬	30 分	
100% エタノール浸漬	5 分	
100% エタノール浸漬	5 分	
90% エタノール浸漬	5 分	
70% エタノール浸漬	5 分	
イオン交換水浸漬	3 分	
ヘマトキシリン	10 分	
流水	13 分	水道水をゆっくりと流した。
エオシン	4 分	
70% エタノール浸漬	30 秒	
90% エタノール浸漬	1 分	
100% エタノール浸漬	5 分	
100% エタノール浸漬	5 分	
キシレン浸漬	5 分	
キシレン浸漬	5 分	
封入		VectaMount Permanent Mounting Medium を使用。

⑤ 観察：光学顕微鏡と光学カメラを用いて顕微鏡観察と写真撮影を行った。

#### 2-5-6 異常な精細管の割合計測

精巣の HE 染色を行い、1 個体あたり 3 切片について全精細管に占める異常な精細管の割合を調べた。異常な精細管の割合の有意差は、Excel で Student の t 検定を行い計算した。

#### 2-5-7 産仔数計測

*Dnd1*<sup>4/4</sup>雌マウスの産仔数計測にあたっては、BL6、MCH、129 系統の *Dnd1*<sup>4/4</sup>雌マウスと MCH の雄マウスを、雌が 6 週齢から 30 週齢の期間にわたって交配した。そして、出産一回当たりの産仔数を計算した。

*Dnd1*<sup>+/-</sup>雄マウスの産仔数計測にあたっては、BL6、MCH、129 系統の *Dnd1*<sup>+/-</sup>雄マウス及び 129 系統の *Dnd1*<sup>+/+</sup>雄マウスと MCH の雌マウスを、雄が 10 週齢から 24 週齢にわたって交配した。雌の膣プラグを毎日確認し、膣プラグ一回あたりの産仔数を計算した。

*Dnd1*<sup>+Ter</sup>雄マウスの産仔数計測にあたっては、129 系統の *Dnd1*<sup>+Ter</sup>雄マウスと MCH の雌マウスを、雄が 10 週齢から 24 週齢に至るまで交配した。雌の膣プラグを毎日確認し、膣プラグ一回あたりの産仔数を計算した。

#### 2-5-8 精子数計測

マウスを安楽死させ、精巣上体頭部から精巣上体尾部までを解剖により摘出し、1mL の温めた PBS 内で解剖鉗により組織をバラバラになるまで切断した。30 分間、37°C でインキュベートした後、組織を PBS ごと中性緩衝ホルマリン溶液に全量移して固定した。その後、精子数を血球計算盤により計測した。精子数の有意差は、Excel で student の t 検定を行い計算した。

#### 2-5-9 体外受精

以下の手順で、体外受精を行った。

- ① 過排卵処理：B6C3F1/Jcl 系統の 3 週齢雌マウスに、CARD HyperOva を 100 $\mu$ L/匹投与し、48h 後に 50units/mL の hCG を 100 $\mu$ L/匹投与した。
- ② 採卵：hCG 投与から 16~17h 経過後、3cm ディッシュ内の流動パラフィンで覆った 200 $\mu$ L の CARD MEDIUM ドロップ内に卵を回収した。その後、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30~60 分間インキュベートした。
- ③ 採精：12 週齢において 129 系統の *Dnd1*<sup>+/-</sup>の雄マウスから精巣上体尾部を摘出し、精子塊を取り出し、流動パラフィンで覆った 100 $\mu$ L の CARD FERTIUP ドロップに回収した。その後、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30~60 分間インキュベートして精子に受精能を獲得させた。
- ④ 媒精：キャパシテーションした精子 3 $\mu$ L を、卵の入った drop に加え、180 分インキュベートした。
- ⑤ 培養：卵を 80 $\mu$ L の KSOM ドロップで洗浄した後、100 $\mu$ L の KSOM ドロップに回収してインキュベーター内で培養開始した。

⑥ 定量：培養から4日経過後、ブラストシストまで到達した胚の割合を測定した。

#### 2-5-10 フローサイトメトリー解析

① 細胞懸濁液の作成：精巣を解剖により取り出し、白膜を剥がした後に、以下の手順で細胞懸濁液を作成した。

表 31 細胞懸濁液の作成法

細胞懸濁液の作成		
操作	時間	特記事項
コラゲナーゼ in 1x HBSS 反応	15 分	37°C 恒温槽内で rotate させながら行った。
1x HBSS 洗浄 & 遠心分離・上清除去		3 回繰り返した。
トリプシン/EDTA in 1x HBSS 反応	5 分	37°C 恒温槽内で rotate させながら行った。
NBC 反応		10% 容量を反応させた。
セルストレーナーによる懸濁液のろ過	5 分	スウィング型遠心機を使用した

② 蛍光免疫染色：以下の手順で、細胞懸濁液の免疫染色を行った。

表 32 細胞懸濁液の蛍光免疫染色の実験法

細胞懸濁液の蛍光免疫染色		
操作	時間	特記事項
0.1% BSA/5% NBC in 1x HBSS 懸濁	30 分	4°C で rotate させながら行った。
遠心分離・上清除去	5 分	スウィング型遠心機 (1800rpm、5 分間) 使用。
細胞固定	30 分	FOXP3 Transcriptome Factor Staining Buffer Kit
1 次抗体 添加	30 分	4°C で rotate させながら行った。
遠心分離・上清除去	5 分	スウィング型遠心機 (1800rpm、5 分間) 使用。
0.1% BSA in 1x HBSS 懸濁		洗浄のため。軽くピペッティングを行った。
遠心分離・上清除去	5 分	スウィング型遠心機 (1800rpm、5 分間) 使用。
0.1% BSA in 1x HBSS 懸濁		洗浄のため。軽くピペッティングを行った。
2 次抗体 添加	30 分	4°C で rotate させながら行った。
DAPI	10 分	4°C で rotate させながら行った。
遠心分離・上清除去	5 分	スウィング型遠心機 (1800rpm、5 分間) 使用。
0.1% BSA in 1x HBSS 懸濁		洗浄のため。軽くピペッティングを行った。
遠心分離・上清除去	5 分	スウィング型遠心機 (1800rpm、5 分間) 使用。
DMEM 懸濁		

③ フローサイトメトリー：免疫染色した細胞について、セルソーターを用いて解析した。データの可視化のために KALUZA を用いた。解析は、DAPI のシグナルを元に 2N と 4N の細胞に限定して行った。

#### 2-5-11 Western blotting

a) 培養細胞を用いた DND1<sup>Ter</sup> の検出は以下の通り行った。

- ① トランスフェクション：pcDNA<sup>TM</sup>3.1(+)に 3x *Flag-Dnd1* と 3x *Flag-Dnd1<sup>Ter</sup>* を導入したプラスミドを PEI 法により HeLa 細胞にトランスフェクションし、48h 後に 1x LSB に細胞を回収した。
- ② 電気泳動、タンパク質の転写：回収した細胞を 100°C でボイルした後、12% SDS - PAGE ゲルを用いて電気泳動を行い、ニトロセルロースメンブレンにタンパク質を転写した。
- ③ 抗体反応：以下の手順で抗体と反応させた。

表 33 抗体反応の実験法

抗体反応		
操作	時間	特記事項
3% スキムミルク in TBS-T でブロッッキング	30 分	
1 次抗体 反応	O/N	Canget Signal Solution1 使用。25°C。
TBS-T で洗浄	10 分	3 回繰り返した。
2 次抗体 反応	60 分	Canget Signal Solution2 使用。
TBS-T で洗浄	10 分	3 回繰り返した。

④ 検出：BCIP/NBT phosphatase substrate kit を用いて抗原抗体反応を検出した。

b) 胎生 15 日目精巣を用いた DND1<sup>Ter</sup> の検出は以下の通り行った。

- ① サンプルング：*Dnd1<sup>+Ter</sup>* の雌マウスを野生型の 129<sup>+ter</sup>/SvJcl 系統の雄マウスと掛け合わせ、胎生 15 日目で解剖して胎仔から精巣を取り出した。その後、1x LSB を加え、超音波発生機で精巣を真空破砕した。

- ② 電気泳動、タンパク質の転写:真空破碎したサンプルを 100°Cでボイルした後、12% SDS - PAGE ゲルを用いて電気泳動を行い、ニトロセルロースメンブレンにタンパク質を転写した。
- ③ 抗体反応: 上述の手順で抗体と反応させた。
- ③ 検出: Western BLoT Chemifluorescence HRP Substrate とルミノイメージアナライザーを用いて抗原抗体反応を検出した。

## 第三章 *Nanos2* と *Nanos3* は *Dnd1* と協調的に精巣テラトーマの発症を制御する

### 3-1 緒言

序論で述べた通り、RNA 結合タンパク質 NANOS2 と NANOS3 は DND1 と相互作用することにより、生殖細胞の発生に必要不可欠な役割を持つことが知られている。さらに、NANOS2 や NANOS3 の欠損マウスは 129 系統において精巣テラトーマを発症することも明らかとなっている。しかしながら、*Nanos2* や *Nanos3* が *Dnd1* と協調して精巣テラトーマの発症を制御するかは不明である。

本章においては、*Nanos2* や *Nanos3* と *Dnd1* のダブル欠損マウスを作製し、精巣テラトーマの発症率が相乗的に上昇することを明らかにする。これにより、*Nanos2* や *Nanos3* は、精巣テラトーマの発症において *Dnd1* と遺伝的に相互作用することを明らかにする。

### 3-2 実験結果

#### 3-2-1 *Dnd1* は精巣テラトーマの発症において *Nanos2* や *Nanos3* と遺伝学的な相互作用を持つ

当研究室は、以前、NANOS2 や NANOS3 が DND1 と相互作用し、これらの複合体が生殖細胞の発生に必要不可欠であることを示している<sup>3,18</sup>。そこで、NANOS2 と NANOS3 が DND1 と協調して精巣テラトーマの発症を制御しているのではないかと仮説を立てた。そこで、*Dnd1* と *Nanos2* や *Nanos3* の遺伝学的相互作用の解析を行った。

まず、*Nanos2* 変異について解析を行った。その結果、*Nanos2* の変異をヘテロで導入したところ、精巣テラトーマの発症率は野生型の 2.9%から 8.8%まで上昇し、*Nanos2* の変異をホモで導入したところ、発症率は 11.8%まで上昇した（図 10A, 図 12A）。したがって、以前の報告通り、*Nanos2* は精巣テラトーマの発症に関与する遺伝子であることが確認された<sup>20</sup>。そこで、*Dnd1*<sup>+/-</sup>を *Nanos2* 変異体に導入した。その結果、精巣テラトーマの発症率は、*Nanos2* のヘテロ変異に導入したとこ

ろ 38.8%に、ホモ変異では 80.0%まで相乗的に上昇した (図 12A)。続いて、*Nanos3* 変異について解析を行った。その結果、*Nanos3* の変異をヘテロで導入したところ、精巣テラトーマの発症率は野生型の 4.4%から 24.2%まで上昇した (図 12B)。したがって、以前の報告通り、*Nanos3* もまた精巣テラトーマの発症に関与する遺伝子であることが確認された<sup>21</sup>。そこで、*Dnd1*<sup>+/ $\Delta$</sup>  を *Nanos3* 変異体に導入した。すると、精巣テラトーマの発症率は、*Nanos3* とのダブルヘテロ変異により 84.3%に上昇した (図 11A, 図 12B)。以上から、*Nanos2* や *Nanos3* が *Dnd1* と協調して精巣テラトーマの発症を制御すると結論付けた。

一方で、精巣テラトーマの発症は、*Nanos3* ホモ欠損では観察されなかった (図 12B)。この原因を明らかにするために、胎生 11 日目において *Nanos3* 変異体を用いて生殖細胞数の計測を行った。その結果、*Nanos3* ホモ欠損においては、生殖細胞を観察することができなかった (図 12C)。一方、*Dnd1* ホモ欠損においては、野生型やヘテロ欠損より少ないものの生殖細胞が残っていた (図 12D)。この結果から、*Dnd1* ホモ欠損では消失しなかった生殖細胞が精巣テラトーマを形成し、*Nanos3* ホモ欠損では生殖細胞が消失するために精巣テラトーマを発症しないことが示唆された。

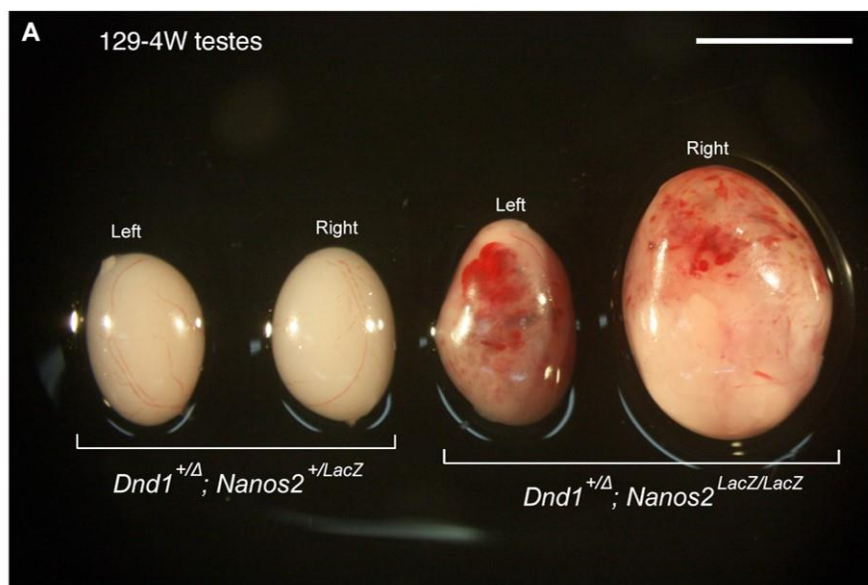


図 10 *Dnd1* と *Nanos2* のダブル欠損マウスにおける精巣テラトーマの発症例  
(A) 129 系統における *Dnd1*<sup>+/ $\Delta$</sup> ; *Nanos2*<sup>+/ $LacZ$</sup>  マウスの精巣、*Dnd1*<sup>+/ $\Delta$</sup> ; *Nanos2* <sup>$LacZ/LacZ$</sup>  マウスにおける精巣テラトーマの写真。スケールバー：5mm。

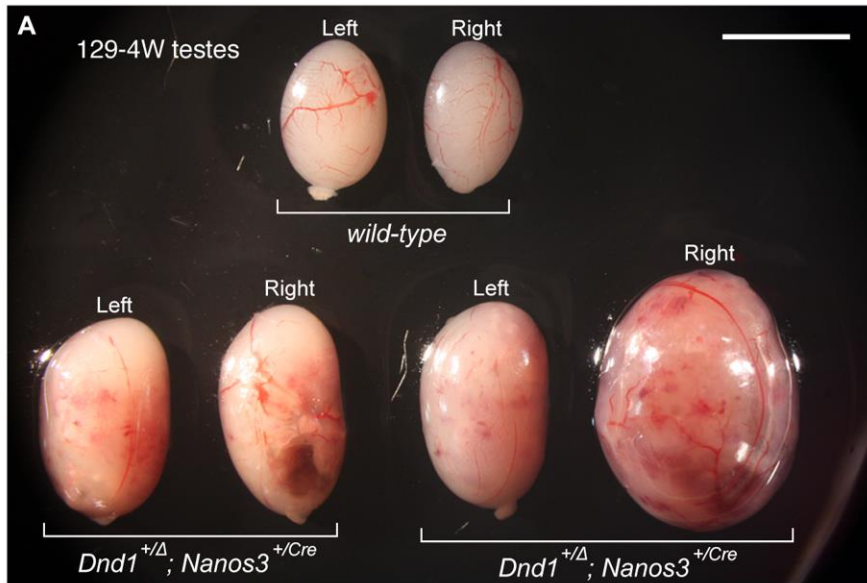


図 11 *Dnd1* と *Nanos3* のダブル欠損マウスにおける精巣テラトーマの発症例  
 (A) 129 系統における野生型マウスの精巣、*Dnd1*<sup>+/ $\Delta$</sup> ; *Nanos3*<sup>+/ $\Delta$</sup> /*Cre* マウスにおける精巣テラトーマの写真。スケールバー：5mm。

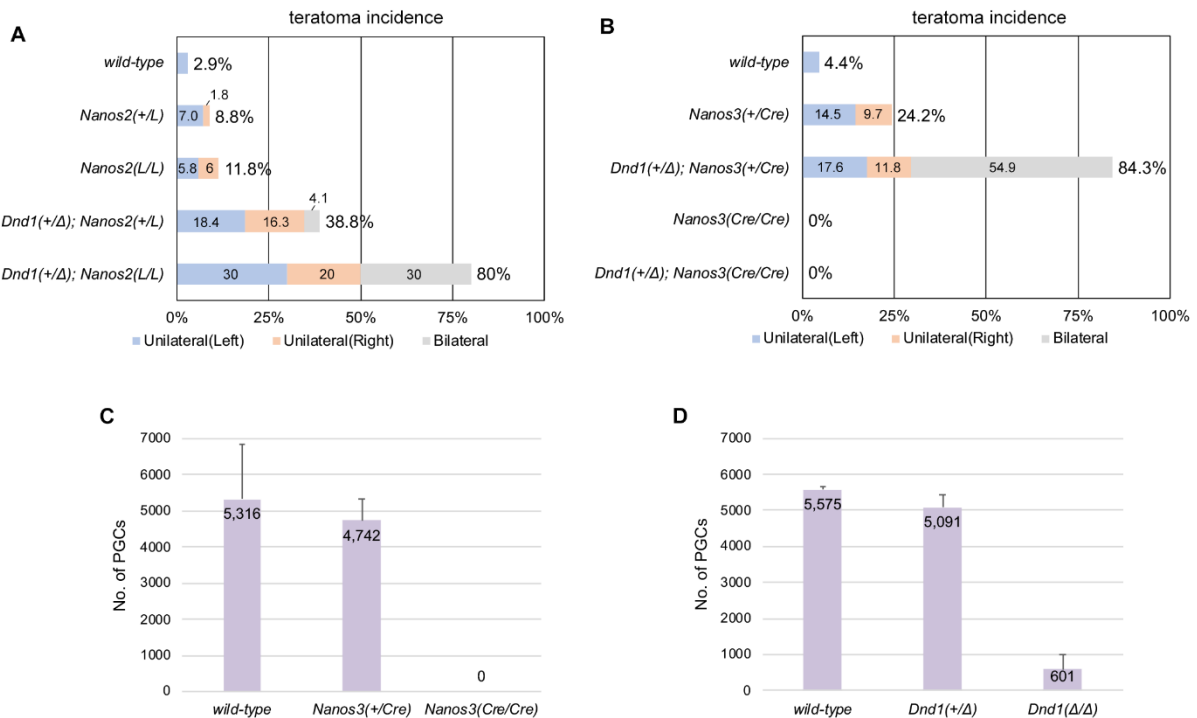


図 12 *Dnd1* と *Nanos3* 欠損マウスにおける生殖細胞数

(A, B) 縦軸に遺伝子型、横軸に精巣テラトーマの発症率を示した棒グラフ。青色：左側精巣のみの発症率、オレンジ色：右側精巣のみの発症率、灰色：両側精巣における発症率を示す。*Dnd1* と *Nanos2* のダブル欠損マウスにおける発症率(C)、*Dnd1* と *Nanos3* のダブル欠損マウスにおける発



症率を示す(D)。(C, D) 縦軸に生殖細胞数、横軸に遺伝子型を示した棒グラフ。*Nanos3* 欠損マウス (C)、*Dnd1* 欠損マウス(D)における結果。黒色のバーは、平均値+標準誤差を示す。

### 3-3 考察

*Dnd1* と *Nanos2* や *Nanos3* のダブル欠損マウスにおける精巣テラトーマ発症率が、相加的ではなく相乗的に上昇したことから、DND1-NANOS2 や DND1-NANOS3 複合体が精巣テラトーマの発症において機能することが強く示唆された。今後は、DND1-NANOS2 と DND1-NANOS3 の標的 mRNA について解析することで、精巣テラトーマ発症メカニズムの解明に貢献できると考えられる。

### 3-4 実験で使用した物品等

#### 3-4-1 使用した試薬・製品

- PCR チューブ (理科研)
- Tris (Fujifilm Wako)
- HCl (Fujifilm Wako)
- グリセロール (Fujifilm Wako)
- キシレンシアノール (Fujifilm Wako)
- 10x PCR バッファー (Toyobo)
- Taq DNA ポリメラーゼ (Takara)
- アガロース粉 (理科研)
- NaOH (Fujifilm Wako)
- ピクリン酸 (Fujifilm Wako)
- KCl (Fujifilm Wako)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Fujifilm Wako)
- EtBr (Nippon Gene)
- Protainase K (Fujifilm Wako)
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Fujifilm Wako)
- EDTA (Dojindo)
- ブロモフェノールブルー (Fujifilm Wako)
- 蒸留水 (大塚製薬)
- dNTP (QIAGEN)
- 酢酸 (Fujifilm Wako)
- パラホルムアルデヒド (Fujifilm Wako)
- 10x Dulbeccos' PBS (Fujifilm Wako)
- NaCl (Fujifilm Wako)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Fujifilm Wako)
- tween20 (Sigma)
- エタノール (Fujifilm Wako)

- ブタノール (Fujifilm Wako)
- パラフィン包埋容器 (硝英製作所)
- カバーガラス (松浪)
- ヘマトキシリン (武藤化学)
- VectaMount Permanent Mounting Medium (Vector Laboratories)
- Fluolomount (DBS)
- Untigen unmasking solution (Vector Laboratories)
- Canget Signal Immunoreaction Enhancer Solution (Toyobo)
- パラフィン (Sigma)
- スライドガラス (松浪)
- キシレン (Fujifilm Wako)
- エオシン (武藤化学)
- スキムミルク (Fujifilm Wako)

#### 3-4-2 使用した機器

- パラフィン溶解・包埋装置 (Leica)
- ミクロトーム (Leica)
- 光学顕微鏡 (Carl Zeiss)
- CCD カメラ (Carl Zeiss)
- TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (TaKaRa)
- 高圧蒸気滅菌機 (トミー精工)
- ホットプレート (Omron)
- 光学カメラ (Canon)

#### 3-4-3 使用したソフトウェア

- Excel (Microsoft)
- AxioImage (Carl Zeiss)
- ImageJ (NIH)
- photoshop (Adobe)

### 3-4-4 使用した primer

表 34 使用した primer の詳細

使用した Primer	
<i>Dnd1</i> -wild アリル	Fw : AAGGCCCTGGTAGAAGGTAG
	Rv : GAGTTTGACACCAGCCTAAT
<i>Dnd1-Δ</i> アリル	Fw : GGAAGCCTTCTCAAACCTCAC
	Rv : GAGTTTGACACCAGCCTAAT
<i>Nanos3</i> -wild アリル	Fw : CCAGCCATGGGGACTTTC
	Rv : GGGACTGATAGATGGCAC
<i>Nanos3-Cre</i> アリル	Fw : CAAAGAAGCCTGAGCTTCAG
	Rv : GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG
<i>Nanos2</i> -wild アリル	Fw : GGCAGAGAAGAATGCCAGTT
	Rv : TGTTCACAGTCAGACGACTT
<i>Nanos2-LacZ</i> アリル	Fw : GGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATT
	Rv : TCCAGTCAGACGACTTG

### 3-4-5 使用した抗体

表 35 使用した抗体の詳細

使用した 1 次抗体		
抗体名	免疫動物種	メーカー
anti-NANOG 抗体	Rabbit	Bethyl Laboratories
anti-DAZL 抗体	Guinea Pig	
使用した 2 次抗体		
Alexa488 conjugated anti-rabbit IgG 抗体	Donkey	Abcam
Alexa594 conjugated anti-Guinea Pig IgG 抗体	Donkey	In vitrogen

### 3-4-6 使用したバッファーの組成

- ・ PCR に用いたバッファーの組成 (表 7)
- ・ 1x TE バッファーの組成 (表 9)
- ・ 10x Loading dye の組成 (表 10)
- ・ 50x TAE バッファーの組成 (表 11)

- 1.5%アガロースゲルの組成 (表 12)
- ブアン固定液の組成 (表 15)
- 10x PBS の組成 (表 16)
- PBS-T の組成 (表 17)
- 5% skim milk in 1x PBS 組成 (表 18)

表 36 4% PFA 固定液の組成

4% PFA 固定液	
試薬	使用量
パラホルムアルデヒド	8g
5M NaOH	66.8 $\mu$ L
10x Dulbeccos' PBS	20mL
蒸留水	180mL
計	200mL

### 3-4-7 使用したマウス

動物を使用した全ての実験は、本学の動物実験専門委員会により承認されており、動物実験専門委員会の規定に従って行った。

*Nanos2<sup>+lacZ</sup>* マウスと *Nanos3<sup>+Cre</sup>*-マウスは、国立遺伝学研究所の相賀裕美子教授より分与いただいた<sup>19</sup>。これらの変異体を、129 系統に 8 回以上戻し交配した。

## 3-5 実験方法

### 3-5-1 ジェノタイプピング

2-5-1 の通り行った。

### 3-5-2 精巣テラトーマ発症有無の判定

2-5-3 の通り行った。

### 3-5-3 HE 染色

2-5-5 の通り行った。

### 3-5-4 生殖細胞数の計測

① サンプルング：129 系統における *Dnd1<sup>+/-</sup>* および *Nanos3<sup>+/-Cre</sup>* のマウス同士を交配し、胎生 11 日目において母体を解剖して胎仔を取り出した。そして、図 13 のようにトリミングを行った。さらに、ジェノタイピングを行い、遺伝子型を判定した。

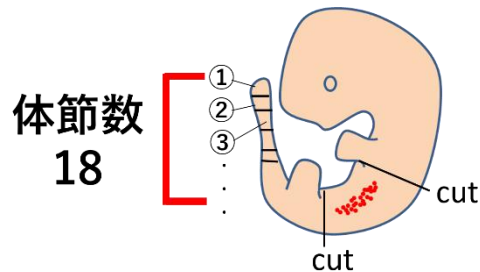


図 13 生殖細胞の計測に用いる胎仔のサンプルングについて

発生ステージを揃えるために、尻尾の先端から生殖隆起の先端までの体節数が 18 の胎仔のみをサンプルング対象とした。生殖巣を残すように”cut”の部分で胎仔のトリミングを行った。

② 組織固定：4% PFA 固定液に 24 時間浸し、PBS で 3 回 wash した。

③ 包埋：以下の手順で、PFA 固定サンプルのパラフィン包埋を行った。

表 37 PFA 固定サンプルのパラフィン包埋法

PFA 固定サンプルのパラフィン包埋		
操作	時間	特記事項
70% エタノール 浸漬	30 分	
90% エタノール 浸漬	30 分	
100% エタノール 浸漬	60 分	
100% エタノール 浸漬	60 分	
エタノール・ブタノール	30 分	
100% ブタノール 浸漬	60 分	
100% ブタノール 浸漬	60 分	
ブタノール・パラフィン 1 : 1 溶液 浸漬	30 分	65°C パラフィン溶解・包埋装置内
パラフィン 浸漬	60 分	65°C パラフィン溶解・包埋装置内
パラフィン 浸漬	60 分	65°C パラフィン溶解・包埋装置内
包埋		

④ 切片作成：包埋したサンプルについて、サンプルを余すことなく 6μm で薄切し、水を張った

スライドガラスに乗せた。スライドガラスを over night で風乾した。

⑤ 蛍光免疫染色：以下の手順で蛍光免疫染色を行った。

表 38 蛍光免疫染色の実験手順

蛍光免疫染色の実験手順		
操作	時間	特記事項
キシレン浸漬	30分	
キシレン浸漬	30分	
100% エタノール浸漬	5分	
100% エタノール浸漬	5分	
90% エタノール浸漬	5分	
70% エタノール浸漬	5分	
イオン交換水浸漬	3分	
抗原賦活化	15分	Untigen Unmasking Solution 使用。 105°C 高圧蒸気滅菌機内で行った。
1x PBS 浸漬	5分	
5% skim milk in PBS でブロッキング	30分	25°C で振盪しながら行った。
1次抗体	O/N	Canget Signal Immunoreaction Enhancer Solution。
PBS-T	10分	3回繰り返した。
2次抗体	60分	25°C で振盪しながら行った。
PBS-T	10分	3回繰り返した。
DAPI	7分	
封入		

⑥ 観察、細胞数計測：蛍光観察は、光学顕微鏡と CCD カメラで行った。画像の補正は、AxioImage と Photoshop を用いて行った。細胞数計測は、ImageJ を用いて行った。

## 第四章 *Dnd1* 条件付き欠損マウスを利用した精巣テラトーマ発症機構の解析

### 4-1 緒言

第三章においては、129 系統に *Dnd1-A* アリルを戻し交配し、DND1 が精巣テラトーマの発症を制御するメカニズムについて解析した。しかし、上述の通り、*Dnd1<sup>ΔΔ</sup>* マウスや *Ter* 変異体は 129 系統以外では精巣テラトーマを発症しないことが明らかとなっている<sup>11</sup> (表 3)。このように、精巣テラトーマの発症には 129 系統の遺伝的な要因が強く作用するにも関わらず、その実体は未だに不明である。そして、*Ter* や *Dnd1-A* アリルをホモで持つと生殖細胞が劇的に減少するため、精巣テラトーマを発症する前の生殖細胞を解析に十分な量確保することが困難である。このように、129 系統を利用した精巣テラトーマ発症機構の解析は難しいと考えられる。

DND1 は生殖細胞の発生直後から発現し、その後も各発生ステージにおいて生殖細胞に発現することが知られている (図 14)。一方で、NANOS2 は生殖細胞の雄性分化が開始する頃に発現し始めるタンパク質であり、生殖細胞の雄性分化において重要な役割を持つことが知られている。これまでの当研究室の研究により、DND1 と NANOS2 は生体内で結合するとともに、この複合体が生殖細胞の雄性分化に必須であることを明らかにしている。しかし、NANOS2 が発現する以前の発生ステージにおける DND1 の機能は不明である。

本研究においては、E10.5 において *Dnd1* を条件付き欠損させたマウスは、精巣テラトーマをほぼ 100% の確率で発症することを示す。このマウスは、混合型の遺伝的背景においても精巣テラトーマを発症するため、129 系統を用いない解析が可能である。そして、本実験系においては、移動期において生殖細胞の劇的な減少が起こらないため、解析に十分量の生殖細胞が確保できることが明らかになった。

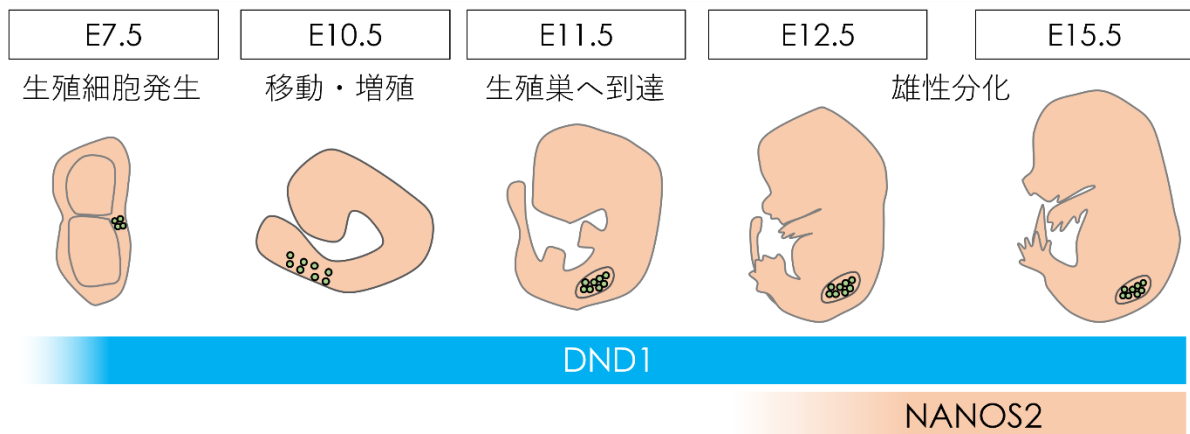


図 14 DND1 と NANOS2 タンパク質の発現時期

DND1 タンパク質は、生殖細胞の発生直後から発現し始め、その後は各発生ステージにおいて広く発現することが知られている。一方で、NANOS2 は雄性分化の開始初期から発現し、雄性分化に重要な役割を持つことが知られている。

## 4-2 実験結果

### 4-2-1 移動期の生殖細胞において *Dnd1* を欠損させると精巣テラトーマを発症する

上述の通り、生殖細胞が雄性分化する前の時期における DND1 の機能は不明であるため、これを明らかにするために *Dnd1<sup>flax/flax</sup>* マウスに *Oct4APE-CreER<sup>T2</sup>* トランスジーンを導入し、E9.5 にタモキシフェン投与を行った (図 15A)。4 週齢において *Dnd1-cKO* の雄マウスを解剖したところ、control に比べて精巣が大きく肥大していた (図 15B)。HE 染色を行うと、control 精巣においては通常の精子形成が起こっていたが、*Dnd1-cKO* の肥大化した精巣においては様々な組織や細胞種が混在する様子が観察された (図 15C, D)。その中には、外胚葉由来の毛根、中胚葉由来の骨格筋、内胚葉由来の腸上皮細胞様細胞が観察された (図 15E-G)。このことから、大きく肥大した精巣は精巣テラトーマであることが明らかとなった。

上述の通り、精巣テラトーマの発症に先立って胎生期精巣内に TP 細胞が発生することが明らかとなっている。そこで、TP 細胞の存在を確認することで精巣テラトーマの発症有無が胎生期において判定できるのではないかと考え、TP 細胞をラベリングすることを試みた。そのために、*Dnd1-cKO* マウスに *Nanog-EGFP* トランスジーンを導入した。*Nanog* は発生初期の生殖細胞や TP



細胞で発現することが報告されている遺伝子である<sup>25,26</sup>。E16.5において胎仔精巣の蛍光観察を行うと、*Dnd1*-cKO 精巣の中に GFP の強い蛍光が観察される箇所が観察された (図 15H, I)。*Dnd1*-cKO 胎仔精巣の蛍光免疫染色を行うと、NANOG、OCT3/4 といった多能性細胞マーカーと共に、TP 細胞マーカー OTX2<sup>20</sup> を強く発現する細胞集団が観察された (図 15J-R)。一方で、GFP の発現が低い生殖細胞は、多能性細胞マーカーの発現が検出されなかった。このことから、*Nanog*-EGFP トランスジーンにより精巣テラトーマの発症を観察できることが明らかとなった。

そこで、タモキシフェン投与のタイミングによって、このような細胞集団の発生確率が変化するか調べることにした。なぜなら、E13.5において *Dnd1* を欠損させたマウスは精巣テラトーマを発症しないためである<sup>3</sup>。そのために、E10.5 から E12.5 にかけてタモキシフェン投与を行い、胎仔精巣の蛍光観察や胎仔精巣の免疫染色により細胞集団の有無を確かめた。その結果、E10.5 にタモキシフェン投与を行った場合は 95.8%の確率で細胞集団が発生したのに対し、E11.5 においては 46.2%、E12.5 においては 0%と減少した (図 15S)。

移動期において DND1 を欠損することが精巣テラトーマの発症に重要であることに加え、NANOS2 は雄性分化が開始する E12.5 から発現することから<sup>27</sup>、DND1 は NANOS2 との相互作用に依存せず精巣テラトーマの発症を抑制することが明らかとなった。

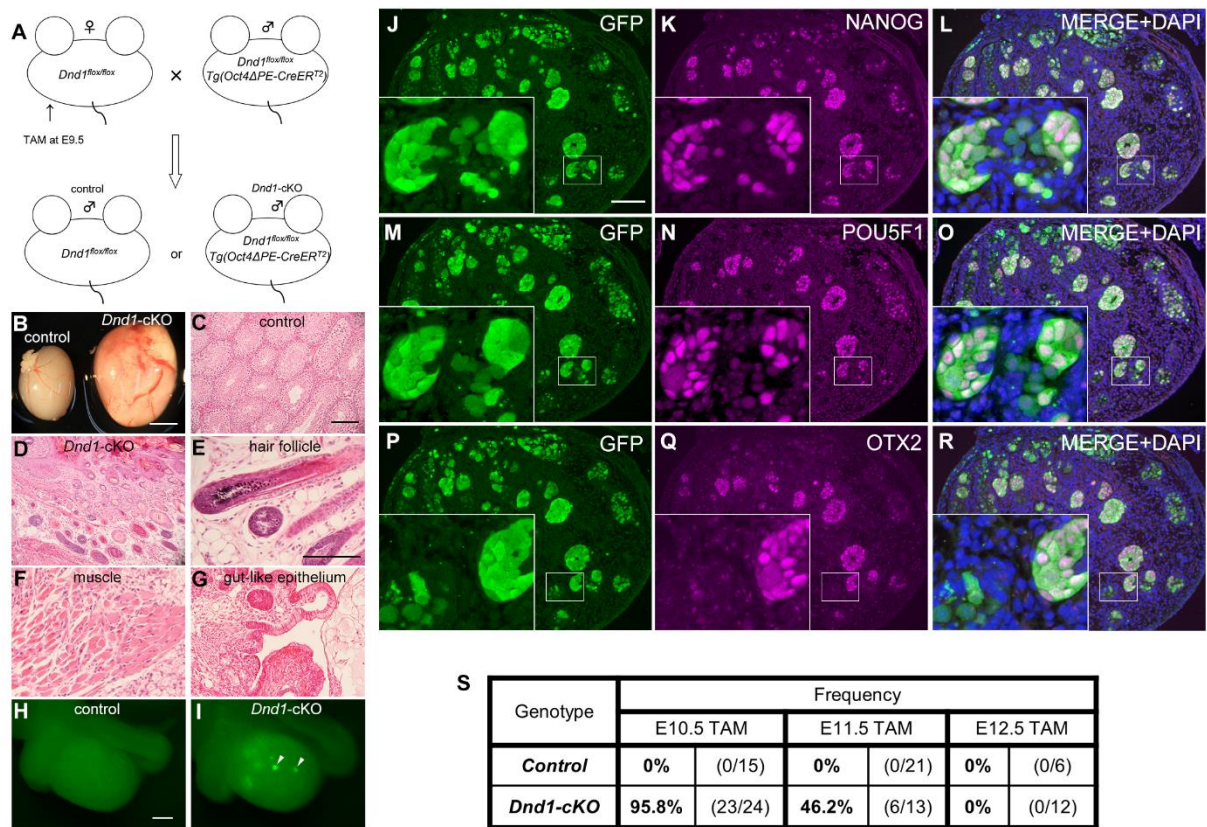


図 15 移動期の生殖細胞において *Dnd1* を欠損させると精巣テラトーマを発症する

(A) *Dnd1* を条件付き欠損させる実験系の概略図。

(B) control (*Dnd1<sup>fllox/fllox</sup>; Nanog-EGFP*) (左側) と *Dnd1-cKO* (*Dnd1<sup>fllox/fllox</sup>; Nanog-EGFP; Oct4ΔPE-CreERT<sup>2</sup>*) (右側) の精巣写真。

(C–G) control (C) と *Dnd1-cKO* (D–G) 精巣切片の Haematoxylin and eosin (HE) 染色写真。

(H, I) control (E) と *Dnd1-cKO* (F) 精巣の *Nanog-EGFP* による蛍光写真。スケールバーは 200 $\mu$ m。

(J–R) E16.5 における *Dnd1-cKO* (F) 精巣の蛍光免疫染色写真。GFP (J, M, P)、NANOG (K)、POU5F1 (N)、OTX2 (Q)、DAPI とのマージ (L, O, R)。

(P) control と *Dnd1-cKO* における *Nanog-EGFP* のコロニーが 1 個以上観察される個体が現れる確率を示した表。タモキシフェン投与を E10.5, E11.5, E12.5 について行った。

スケールバー：5mm (B)、100 $\mu$ m (C) は D と共通、200 $\mu$ m (H) は I と共通、100 $\mu$ m (J) は K–R と共通。

#### 4-2-2 TP 細胞は *Dnd1* を失った生殖細胞から生じる

TP 細胞は、生殖巣に到達した生殖細胞から生じると考えられている<sup>28,29</sup>。*Nanog-EGFP* 陽性の細胞集団が TP 細胞であることを確かめるために、この細胞集団が *Dnd1-cKO* 生殖細胞に由来するかを調べることにした。そこで、*CAG-CAT-EGFP* トランスジーンを *Dnd1<sup>fllox/fllox</sup>; Oct4ΔPE-CreERT<sup>2</sup>*

マウスに導入し、タモキシフェンを E10.5 に投与して細胞系譜解析を行った (図 16A)。TP 細胞は、多能性細胞マーカー NANOG の発現が高く生殖細胞マーカー DAZL の発現が陰性という特徴を持つため<sup>20</sup>、GFP、NANOG、DAZL について、E17.5 における胎仔精巣の蛍光免疫染色を行った。その結果、control 精巣において GFP は DAZL 陽性細胞の 70% 程度を標識していた (図 16B-E)。一方、*Dnd1*-cKO においては DAZL 陽性の生殖細胞が顕著に減少していたことに加え、NANOG 陽性かつ DAZL 陰性の細胞集団が観察された (図 16F-M)。このような細胞集団は GFP で標識されていたことから、NANOG 陽性かつ DAZL 陰性の細胞集団は、生殖細胞に由来する TP 細胞であると結論付けた。さらに、これらのデータは、DND1 非存在下において、E17.5 までに多くの生殖細胞が失われる一方で、残存した一部の生殖細胞が TP 細胞へと転換することを示唆していた。

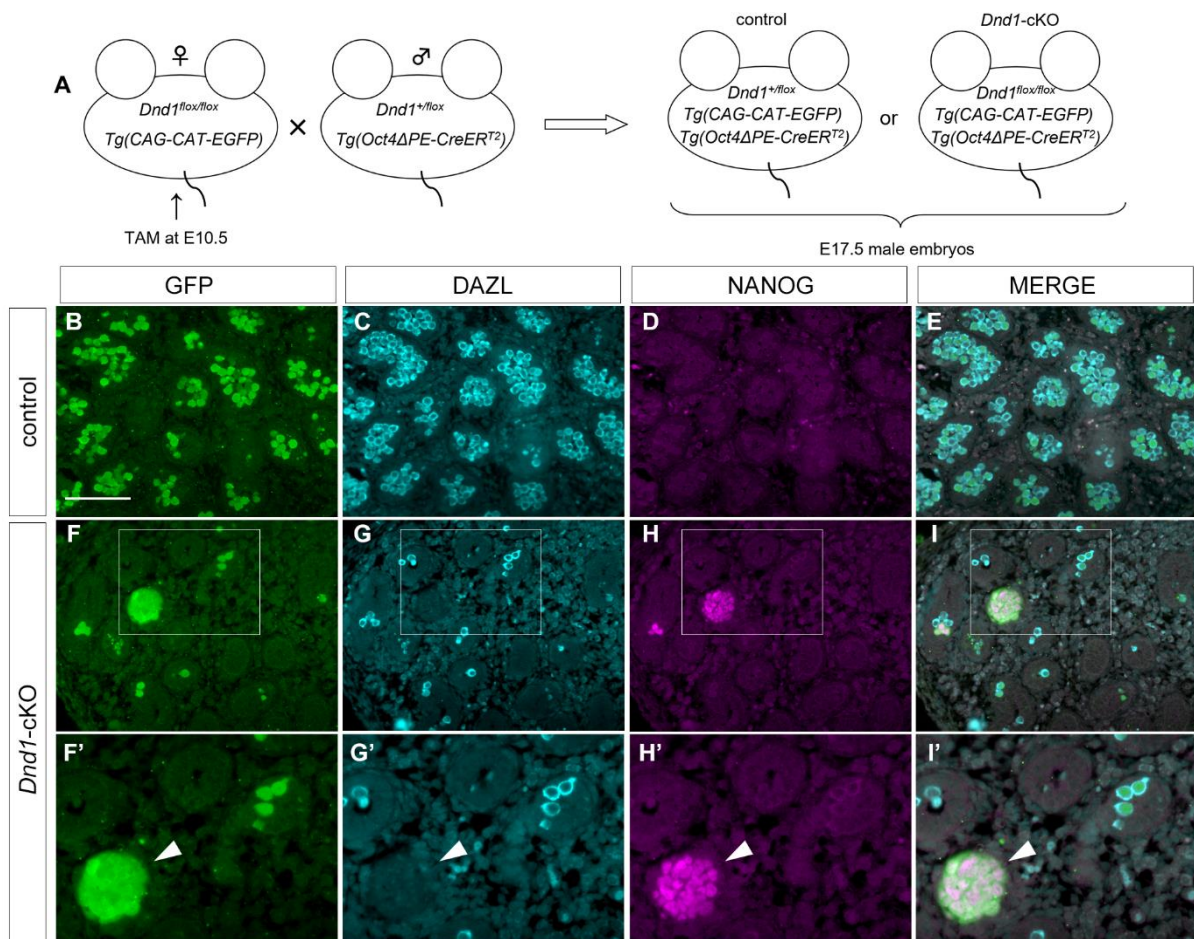


図 16 *Dnd1*-cKO において TP 細胞は生殖細胞から生じる

(A) control と *Dnd1*-cKO 生殖細胞の細胞系譜解析を行うための実験系の概略図。

(B - M) 胎生 17 日目における control (*Dnd1*<sup>lox/lox</sup>; CAG-CAT-EGFP) (B - E) と *Dnd1*-cKO

(*Dnd1*<sup>fllox/fllox</sup>; *CAG-CAT-EGFP*; *Oct4APE-CreER*<sup>T2</sup>) (F-I) 精巣の蛍光免疫染色写真。GFP (B, F)、DAZL (C, G)、NANOG (D, H)、merge (E, I)。より良い可視化のため、F-I の四角形で囲まれた領域の拡大写真を F'-I' に示す。スケールバー：100 $\mu$ m (B) は C-I と共通。

#### 4-2-3 TP 細胞は E16.5 以降に NANOG<sup>High</sup>、DAZL<sup>Low</sup> の細胞集団として発生する

続いて、TP 細胞がどのタイミングで発生するかを確認することにした。解析にあたって、*Dnd1* のノックアウト効率を向上させるために、*Oct4APE-CreER*<sup>T2</sup> トランスジーンの代わりに *Rosa26-CreER*<sup>T2</sup> を導入した。そして、control と *Dnd1*-cKO に *Nanog-EGFP* トランスジーンを導入し、E14.5 ~E17.5 にわたって GFP、NANOG、DAZL について胎仔精巣の免疫染色を行った。その結果、control では、どの発生ステージにおいても DAZL が生殖細胞で発現していたが、NANOG の発現は E14.5 以降、徐々に低下していた (図 17A-P)。一方、GFP の発現は NANOG の発現が観察されない E17.5 においても維持されていた。これは、GFP と NANOG の安定性に差があるためであると考えられる。

*Dnd1*-cKO の生殖細胞は、control とは大きな差があった。DAZL の免疫染色結果から、E14.5 においては control と *Dnd1*-cKO で組織学的な差は観察されなかったが、E15.5 になると *Dnd1*-cKO において生殖細胞数が減少し始め、E17.5 になると大部分が失われる様子が観察された (図 17a-d, 図 18A)。E15.5 では、*Dnd1*-cKO において NANOG の発現は一部の生殖細胞で高く維持されていたが、これらの細胞は DAZL を発現していて細胞集団を形成していなかった (図 17e-l, 図 18B)。E16.5 では、*Dnd1*-cKO 精巣内で NANOG<sup>High</sup>、DAZL<sup>Low</sup> の細胞集団が形成されていることが明らかとなった。さらに、E17.5 になると、NANOG<sup>High</sup>、DAZL<sup>Low</sup> の細胞数は多くなっていた (図 17h,l, 図 18C)。一方で、GFP の発現は、生殖細胞と TP 細胞の両方で観察された (図 17m-p)。

TP 細胞が生殖細胞に由来するデータと合わせると、*Dnd1*-cKO の生殖細胞は E16.5 において一部が NANOG<sup>High</sup>、DAZL<sup>Low</sup> の TP 細胞へと転換することが明らかとなった。一方で、TP 細胞に転換しない生殖細胞は、E15.5 から減少し始めて E17.5 には大部分が消失することが明らかとなった。

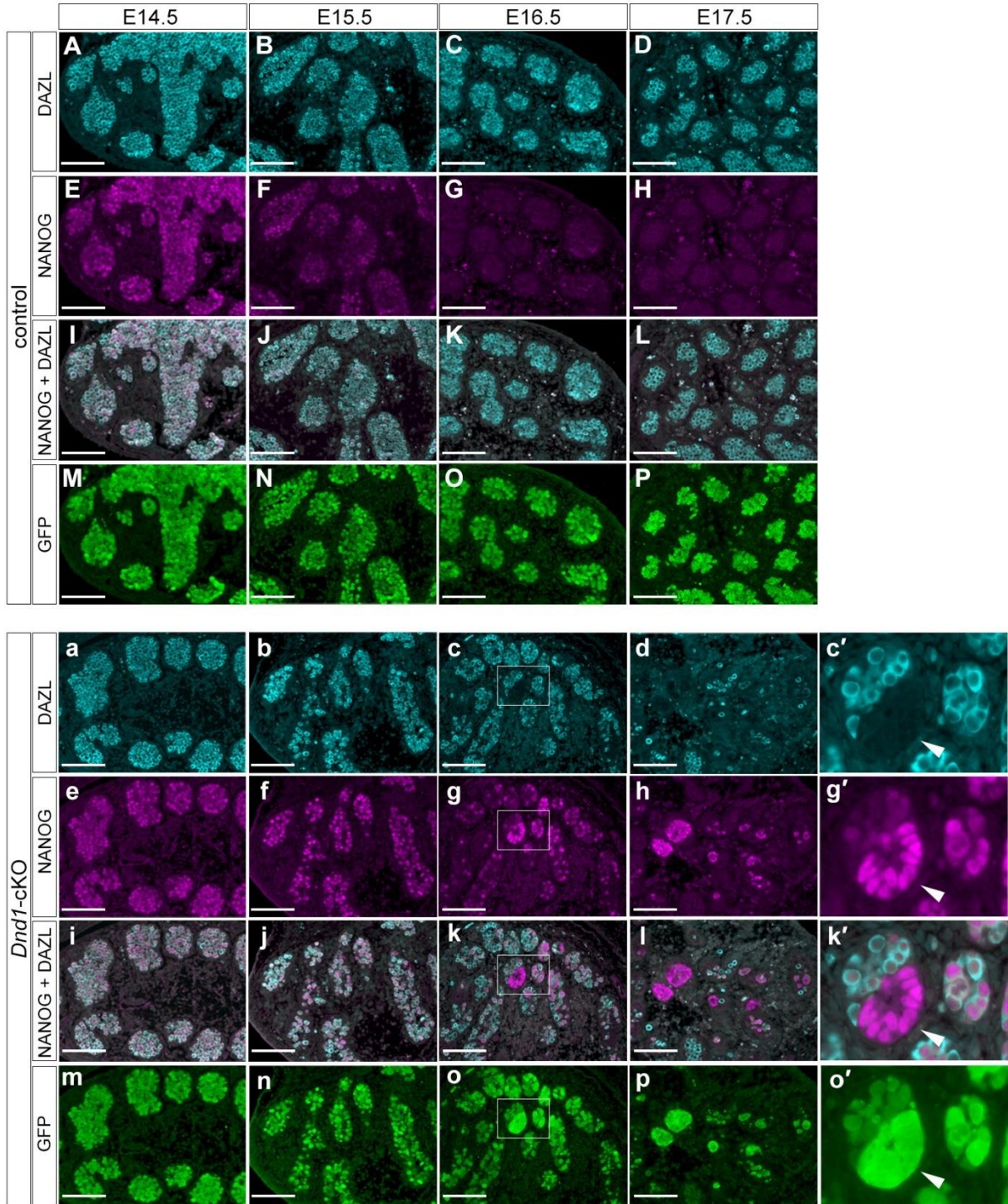


図 17 *Dnd1*-cKO において TP 細胞は E16.5 に一部の生殖細胞から生じる  
 (A–p) E17.5 における control (*Dnd1*<sup>lox/lox</sup>; *Nanog*-EGFP) (A–P) と *Dnd1*-cKO (*Dnd1*<sup>lox/lox</sup>; *Nanog*-EGFP; *Rosa26*-CreER<sup>T2</sup>) (a–p) 精巢の蛍光免疫染色写真。DAZL (A–D, a–d)、NANOG (E–H, e–h)、GFP (M–P, m–p)、NANOG と DAZL のマージ (I–L, i–l)。より良い可視化のため、c, g, k, o の四角形で囲まれた領域の拡大写真を c', g', k', o' に示す。スケールバー：100μm。

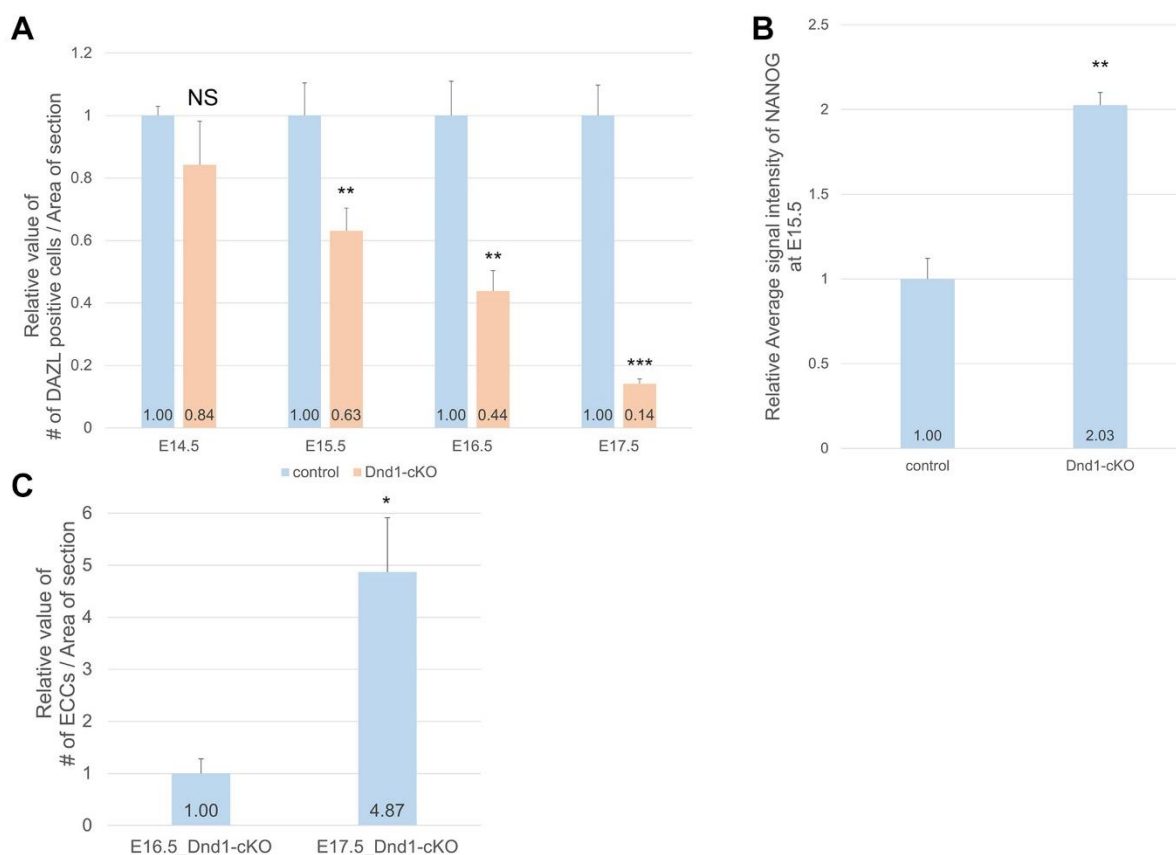


図 18 E14.5, E15.5, E16.5, E17.5 において *Dnd1*-cKO 生殖細胞に現れる表現型の定量

(A) 縦軸に DAZL 陽性細胞の数を精巣切片面積で割った後に、各発生ステージの control で正規化した値、横軸に発生ステージを示したグラフ。(B) 縦軸に E15.5 における 1 細胞当たりの NANOG 蛍光強度の平均値、横軸に遺伝子型を示したグラフ。(C) 縦軸に TP 細胞の数を精巣切片面積で割った後に、E16.5 の *Dnd1*-cKO の値で正規化を行ったグラフ。 $n=3$  の biological replicate かつ 1 個体当たり 3 切片以上のデータについてカウントした。黒色のバーは、平均値+標準誤差を示す。\* :  $p<0.05$ 、\*\* :  $p<0.01$ 、\*\*\* :  $p<0.001$  (Student の t 検定)。

#### 4-2-4 DND1 を欠損すると雄性分化不全となる生殖細胞が出現する

E10.5 においてタモキシフェンを投与すると、E16.5 頃に TP 細胞が発生することが明らかとなったため、それよりも前の発生ステージにおいて、*Dnd1* を欠損したことによって生殖細胞にどのような影響が現れるかを解析することにした。これまでの研究から、TP 細胞は、「多能性関連遺伝子の発現維持」、「雄性分化関連遺伝子の発現遅延」、「細胞周期停止不全」、「減数分裂関連遺伝子の上昇」といった雄性分化不全となった生殖細胞から出現するという報告がある<sup>8,20</sup>。そこで、*Dnd1*-cKO の生殖細胞において、雄性分化が正常に起こっているかを E15.5 における胎仔精巣の蛍光免疫染色を行うことで解析した。「多能性関連遺伝子の発現維持」は、NANOG についての免疫

染色により確認した (図 17E-G, e-g)。続いて、NANOS2 について解析を行うことにした。これまでの研究から、NANOS2 を欠損すると、生殖細胞が雄性分化不全となってアポトーシスを引き起こすことが知られている<sup>3</sup>。その結果、control においては、中腎に存在する生殖細胞以外は、ほぼ全て NANOS2 が発現していた (図 19A-C)。一方で、*Dnd1-cKO* においては、ごく一部が NANOS2 を発現していたが、大部分の生殖細胞において NANOS2 の発現が検出されなかった (図 19D-F)。一部存在する NANOS2 発現細胞は、Cre による相同組み換えの効率が 100%でないために生じた DND1 を欠損していない生殖細胞だと予想されたため、DND1、NANOS2 について免疫染色を行った。その結果、NANOS2 発現細胞の中には DND1 を発現するものもあったが、大部分は DND1 が検出されず、このような細胞において NANOS2 の発現は低いレベルに留まっていた (図 20A-L)。したがって、NANOS2 の発現に DND1 は必須ではないものの、十分に発現するためには DND1 が必要であることが示唆された。また、NANOS2 が低いレベルながら発現しているものの、以前の研究から、DND1 を失った生殖細胞は NANOS2 がうまく機能せずに雄性分化不全になると考えられる<sup>3</sup>。

上述の表現型に加え、雄性分化不全となった生殖細胞の表現型も観察された。まず、KI67 陽性細胞の割合は、control の 24.0%から *Dnd1-cKO* で 71.6%まで上昇したことから、*Dnd1-cKO* の生殖細胞は細胞周期の停止不全となることが明らかとなった (図 19G-M)。それに加え、SYCP3 陽性の生殖細胞や (図 19N-S)、精細管外に脱出した生殖細胞も観察された (図 19T-Y)。さらに、cleaved-CASPASE3 陽性細胞の割合は、control の 2.97%から *Dnd1-cKO* で 15.7%まで増加した (図 19Z-f)。Cleaved-CASPASE3 陽性細胞の増加は、E15.5 以降に細胞数が減少することの原因であると考えられる。

これらの表現型は *Nanos2-KO* においても観察されたことから<sup>6</sup>、*Dnd1* を失った生殖細胞は雄性分化不全となることが強く示唆された。

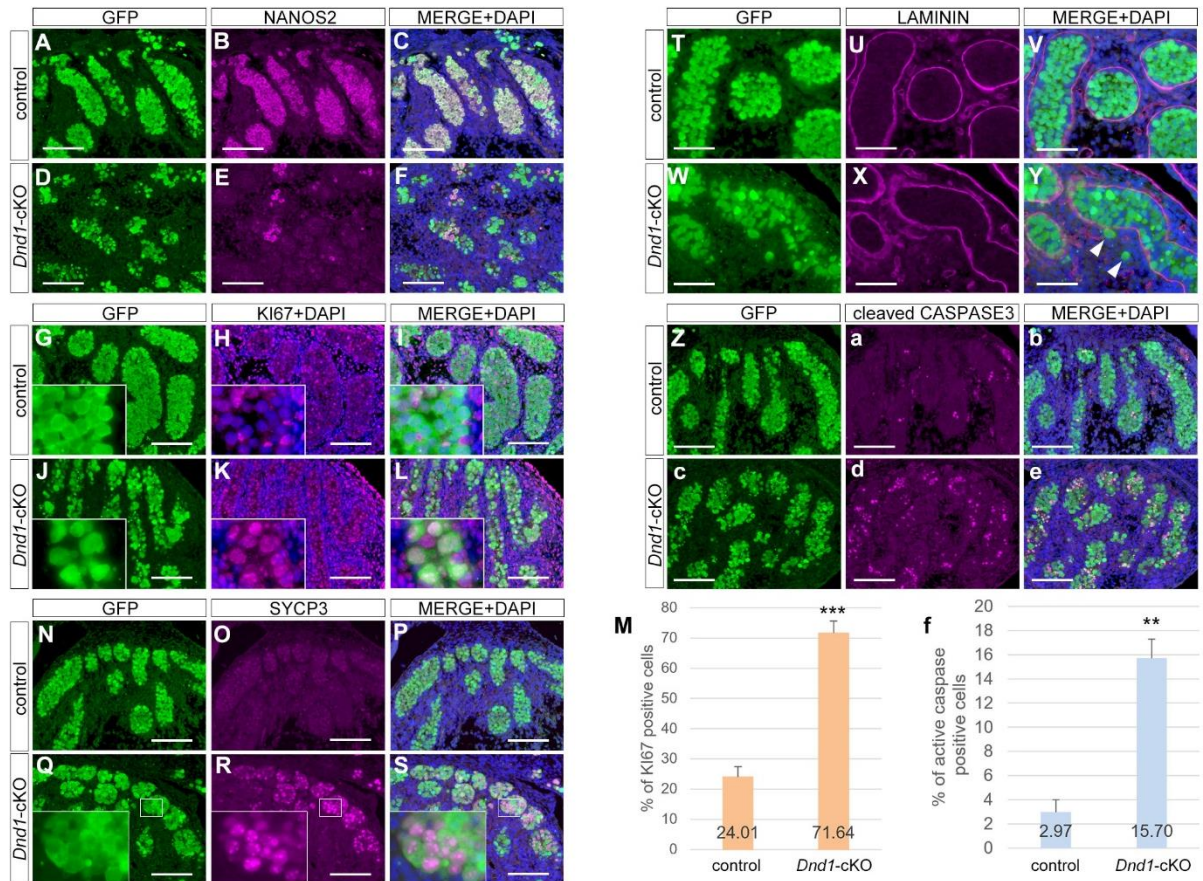


図 19 *Dnd1* を失った生殖細胞は雄性分化不全となる

(A–F) E15.5 における control (*Dnd1*<sup>fl<sup>ox</sup>/fl<sup>ox</sup>; *Nanog-EGFP* (A–C) と *Dnd1*-cKO (*Dnd1*<sup>fl<sup>ox</sup>/fl<sup>ox</sup>; *Nanog-EGFP*; *Rosa26-CreER*<sup>T2</sup>) (D–F) 精巣の蛍光免疫染色写真。GFP (A, D)、NANOS2 (B, E)、DAPI とのマージ (C, F)。(G–L) E15.5 における control (G–I) と *Dnd1*-cKO (J–L) 精巣の蛍光免疫染色写真。GFP (G, J)、KI67 (H, K)、KI67 と GFP のマージ (I, L)。より良い可視化のため、拡大図が各々の写真に埋め込まれている。(N–S) E15.5 における control (N–P) と *Dnd1*-cKO (Q–S) 精巣の蛍光免疫染色写真。GFP (N, Q)、SYCP3 (O, R)、DAPI とのマージ (P, S)。(T–Y) E15.5 における control (T–V) と *Dnd1*-cKO (W–Y) 精巣の蛍光免疫染色写真。GFP (T, W)、LAMININ (U, X)、DAPI とのマージ (V, Y)。矢頭は精細管外に観察された生殖細胞を示す。(Z–e) E15.5 における control (Z–b) と *Dnd1*-cKO (c–e) 精巣の蛍光免疫染色写真。GFP (Z, c)、cleaved-CASPASE3 (a, d)、DAPI とのマージ (b, e)。矢頭は精細管外に観察された生殖細胞を示す。スケールバー：100 $\mu$ m (A–F, N–S, Z–e)、50 $\mu$ m (G–L, T–Y)。(M, f) 横軸に遺伝子型、縦軸に GFP 陽性細胞に占める KI67 陽性細胞の割合 (M)、もしくは cleaved-CASPASE3 陽性細胞の割合 (f)を示した棒グラフ。各々の遺伝子型について、3 匹の胎仔を使用した。\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$  (Student の t 検定)。黒色のバーは平均値  $\pm$  SD を示す。</sup></sup>



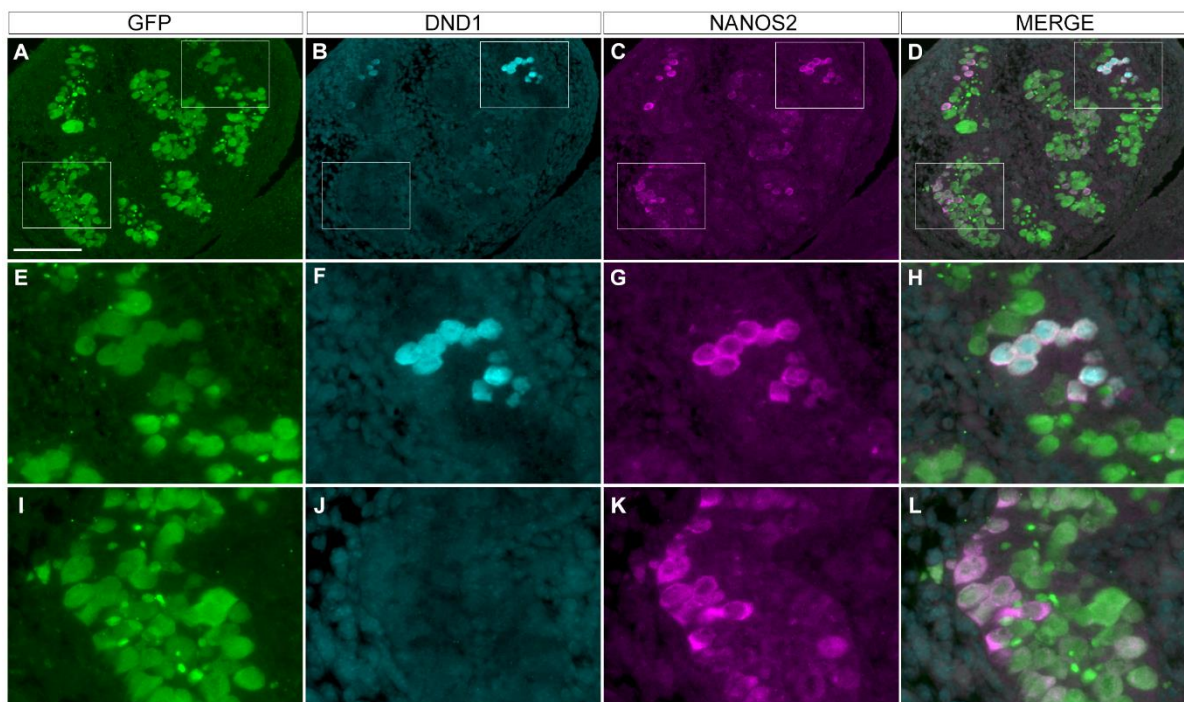


図 20 E15.5 における NANOS2 の発現

(A–F) E15.5 における *Dnd1*-cKO (*Dnd1<sup>lox/lox</sup>*; *Nanog*-EGFP; *Rosa26*-CreER<sup>T2</sup>) 精巣の蛍光免疫染色写真。GFP (A)、DND1 (B)、NANOS2 (C)、マージ (D)。(A–D)中の上側の囲われた領域の拡大図は(E–H)に、(A–D)中の下側の囲われた領域の拡大図を(I–L)に示す。スケールバー：100 $\mu$ m。

#### 4-2-5 *Dnd1* 非存在下において EG 細胞の形成率が上昇する

生殖細胞は、LIF、bFGF 存在下で SCF を発現するフィーダー細胞上で培養すると、EG 細胞と呼ばれる多能性細胞に転換することが明らかとなっている<sup>30,31</sup>。EG 細胞の樹立効率は、生殖細胞の発生直後が最も高く、発生ステージの進行と共に低下して E15.5 にはほぼ樹立できなくなる<sup>32,33</sup>。一方で、*Dazl* 欠損マウス生殖細胞は、生殖細胞が雄性分化不全になると共に、E15.5 でも野生型に比べて高効率に EG 細胞を樹立することができる<sup>34</sup>。したがって、雄性分化不全となった生殖細胞は多能性細胞に転換しやすいと考えられる。

*Dnd1*-cKO の生殖細胞は *Dazl* 欠損と同様に雄性分化不全となることから、*Dnd1*-cKO 生殖細胞は多能性細胞への転換が起こりやすいと考えられる。そこで、control と *Dnd1*-cKO の生殖細胞から FACS により生殖細胞を分取し (図 21A–N)、EG 細胞を誘導した (図 22A)。control では、E13.5 における EG 細胞の樹立効率は  $7.99 \pm 1.37\%$ であったが、E14.5 においては  $0.44 \pm 0.13\%$ と減少し、E15.5 においては  $0.13 \pm 0.02\%$ と大きく減少した (図 22B–D, H)。この結果は、生殖細胞が

EG 細胞へと転換する効率が、胎仔の発生ステージの進行と共に減少して E15.5 以降に樹立ができなくなる、という過去の報告と一致していた<sup>35</sup>。一方で、*Dnd1*-cKO では EG 細胞の樹立効率が E13.5 においては、 $7.90 \pm 1.11\%$ と control に比べて有意差がなかったのに対し、E14.5 と E15.5 においては、 $1.62 \pm 0.41\%$ 、 $0.50 \pm 0.06\%$ と control よりも有意に高かった (図 22E-G, H)。一方、雌においてはどの発生ステージにおいても EG 細胞の樹立効率に有意な差はなかった (図 23A-G)。

これらの結果から、DND1 は E14.5 以降に生殖細胞の多能性を抑制し、DND1 非存在下において生殖細胞が多能性細胞へと転換する現象を促進すると考えられる。

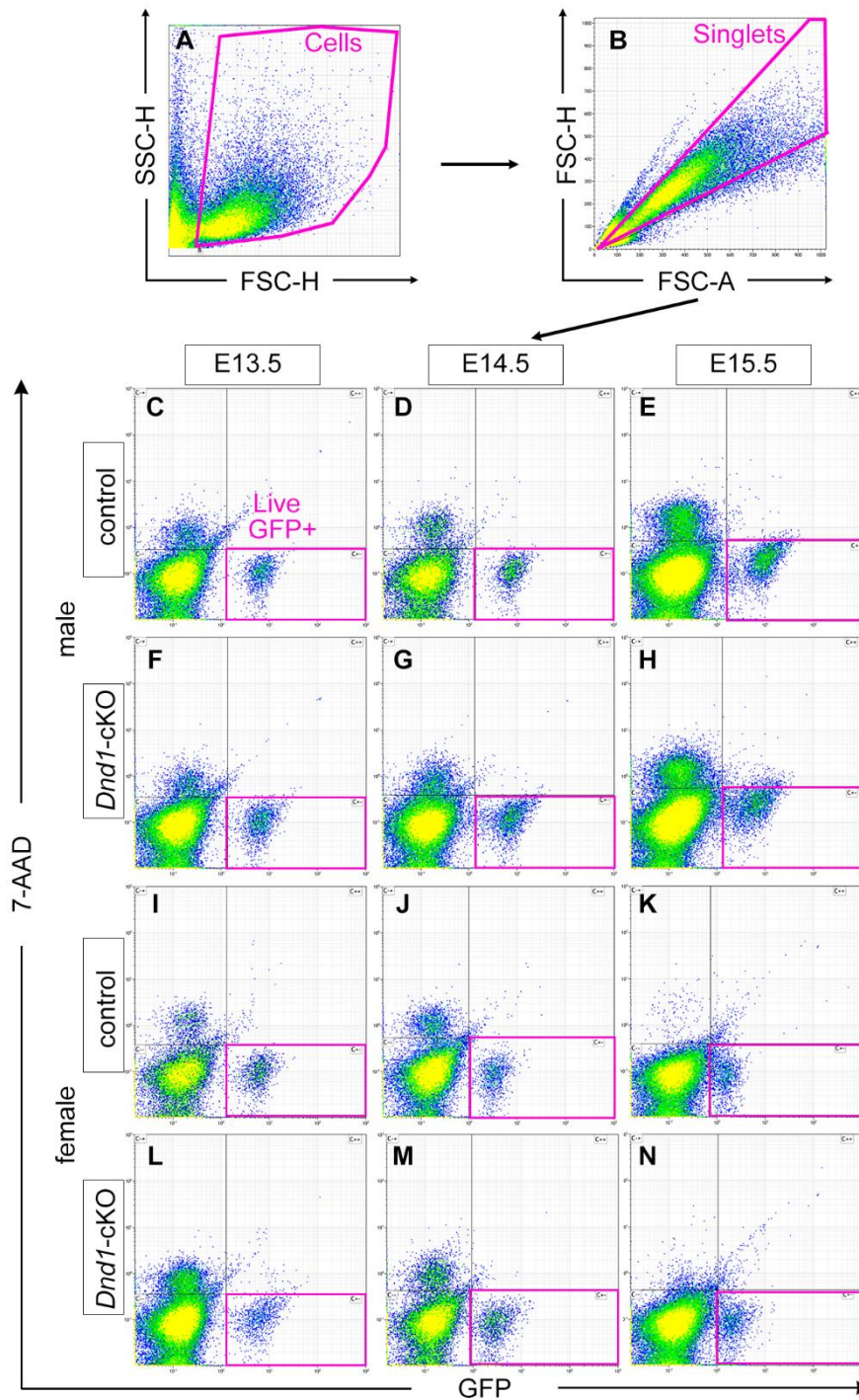


図 21 FACS のゲーティングストラテジー

(A–N) control ( $Dnd1^{flox/flox}; Nanog-EGFP$ ) (C–E, I–K) と  $Dnd1$ -cKO ( $Dnd1^{flox/flox}; Nanog-EGFP; Rosa26-CreER^{T2}$ ) (F–H, L–N) の精巣 (C–H) と卵巣 (I–N) から、大きさ (FSC-H vs SSC-H) (A)、シングレット (FSC-A vs FSC-H) (B)、GFP シグナルと生細胞 (GFP vs 7-AAD) (C–N) に応じて生殖細胞を分取した。

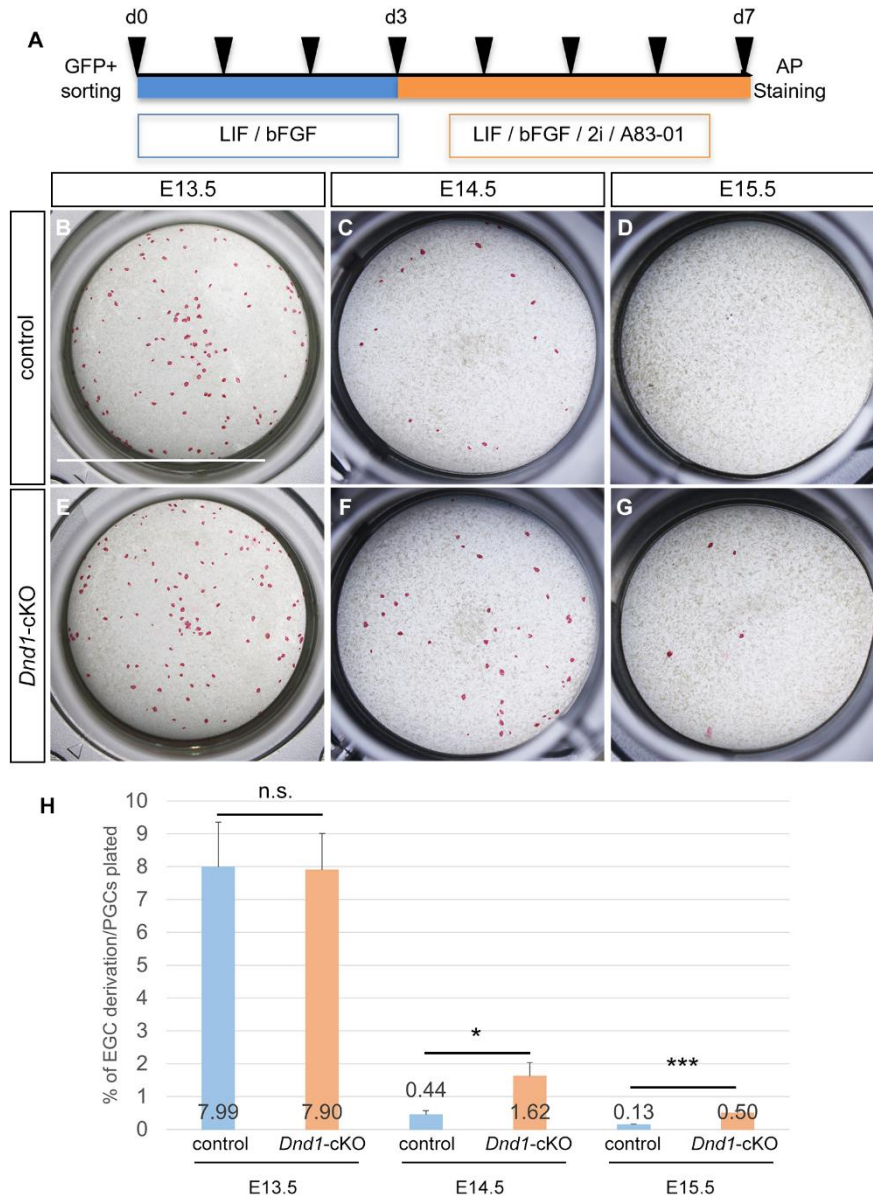


図 22 *Dnd1-cKO* 生殖細胞において EG 細胞樹立効率は上昇する

(A) EG 細胞樹立実験の実験条件の概略図。(B–G) E13.5 (B, E)、E14.5 (C, F)、E15.5 (D, G) における control (*Dnd1<sup>fllox/fllox</sup>; Nanog-EGFP*) (B–D) と *Dnd1-cKO* (*Dnd1<sup>fllox/fllox</sup> Tg(Nanog-EGFP) Rosa26-CreER<sup>T2</sup>*) (E–G) から EG 細胞の樹立実験を行い、AP 染色により染色されたコロニーの代表的な写真。スケールバー：10mm (B) は C–G と共通。(H) 横軸に遺伝子型、発生ステージを、縦軸に EG 細胞の樹立効率(播種した生殖細胞 100 細胞当たりのコロニー数)を示した棒グラフ。\*: $p<0.05$ 、\*\* :  $p<0.01$ 、\*\*\* :  $p<0.001$  (Student の t 検定)。黒色のバーは、平均値±SD を示す。

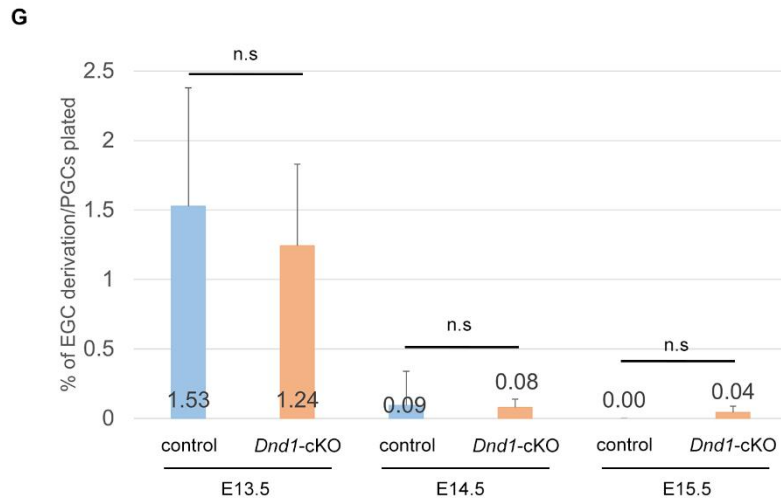
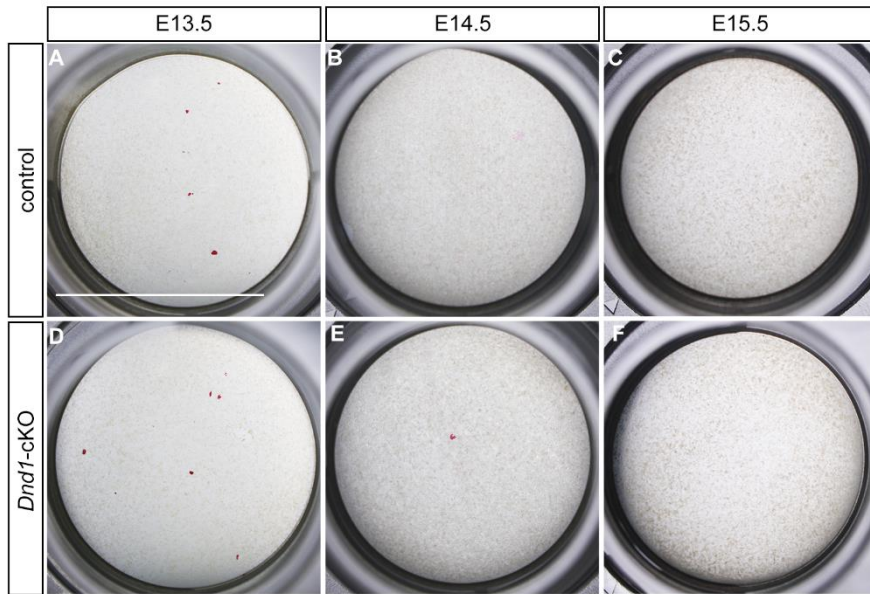


図 23 卵巣における control と *Dnd1-cKO* 生殖細胞からの EG 細胞樹立

(A–F) E13.5 (A, D)、E14.5 (B, E)、E15.5 (C, F) における control (*Dnd1<sup>lox/lox</sup>; Nanog-EGFP*) (A–C) と *Dnd1-cKO* (*Dnd1<sup>lox/lox</sup>; Tg(Nanog-EGFP)\_Rosa26-CreER<sup>T2</sup>*) (D–F) から EG 細胞の樹立実験を行い、AP 染色されたコロニーの代表的な写真。スケールバー：10mm (A) は B–F と共通。(G) 横軸に遺伝子型、発生ステージを、縦軸に EG 細胞の樹立効率（播種した生殖細胞 100 細胞当たりのコロニー数）を示した棒グラフ。ns：not significantly changed (Student の t 検定)。黒色のバーは、平均値±SD を示す。

#### 4-2-6 *Dnd1-cKO* 生殖細胞のトランスクリプトーム解析

生殖細胞が TP 細胞へと転換する原因を解析するために、control と *Dnd1-cKO* の生殖細胞における遺伝子発現の違いを明らかにしようと考えた。まず、*Nanog-EGFP* の発現をもとに FACS を行

い、E11.5においてRNAシーケンス解析を行った。*Dnd1*の発現は、*Dnd1*-cKOにおいて大きく減少しており、180の発現上昇する遺伝子と140の発現減少する遺伝子を検出した(図24A,B)。しかし、それらの遺伝子についてGO解析を行ってもGO termの濃縮はみられず、PCA解析を行ってもcontrolと*Dnd1*-cKOは上手く分離されなかった(図24C)。以上の結果から、E11.5において、controlと*Dnd1*-cKOのトランスクリプトームに大きな差はないと考えられる。

そこで、E12.5とE13.5において、controlと*Dnd1*-cKO生殖細胞のマイクロアレイ解析を行った。まず、PCA解析を行うと、それぞれのサンプルは明確に分離されていた(図24D)。さらに、PC1は発生ステージの差を、PC2は遺伝子型の差を反映していた。また、*Dnd1*-cKOの生殖細胞は、controlとはPC2に沿って別の方向へと進むことから、正常な生殖細胞の発生経路から逸脱することが示唆された。controlと*Dnd1*-cKO生殖細胞の差を更に解析するために、*Dnd1*-cKO生殖細胞のDEGsを計算してクラスタリング解析を行った。クラスター1と2は*Dnd1*-cKOで発現上昇するDEGsで構成されており、クラスター1はE12.5からE13.5にかけて発現減少する遺伝子で、クラスター2はE12.5よりもE13.5で発現上昇する遺伝子であった(図24E)。クラスター1のDEGについてGene Ontology (GO)解析を行うと、ChemotaxisのGO termが濃縮することから、*Dnd1*-cKOの生殖細胞においてE12.5においても移動期の遺伝子発現の特徴が維持され、その特徴が減衰するタイミングが遅延することが示唆された。クラスター2のGOには、*Otx2*、*Sox3*、*Lefty1*、*Fgf5*、*Fgf15*に代表されるMulticellular organism developmentやCell differentiationのGO termが濃縮していた。これらの遺伝子は、プライム型多能性細胞のマーカー遺伝子であることから<sup>36-38</sup>、*Dnd1*非存在下においてTP細胞への転換が進行しているのではないかと考えられる。

一方、発現減少するDEGsは2つのクラスターに分けられた(図24F)。GO解析を行うと、クラスター3にはMeiotic Cell CycleやpiRNA Metabolic Processが濃縮していたが、クラスター4においては有意な濃縮が見られなかった。生殖細胞の発生において、*Sycp3*、*Syce2*、*Spo11*、*Meiob*、*Meikin*のような減数分裂関連遺伝子の発現は、雌においてE14.5以降に特に大きく上昇するが、雄においてもE12.5以降に比較的低いレベルで発現上昇が見られる(図25A,B)。さらに、*Piwill*や*Nanos2*のようなpiRNA metabolic processやSpermatogenesisに代表される遺伝子の発現も、雄性生殖細胞

において発現上昇することも知られている<sup>5</sup>。したがって、これらのデータは、*Dnd1*-cKO 生殖細胞が雄性分化不全となることを示唆している。

これらの解析から、*Dnd1* 非存在下において生殖細胞は雄性分化不全となり、移動期の生殖細胞の特徴を維持するとともに、TP 細胞へと転換する経路に入ると結論付けた。

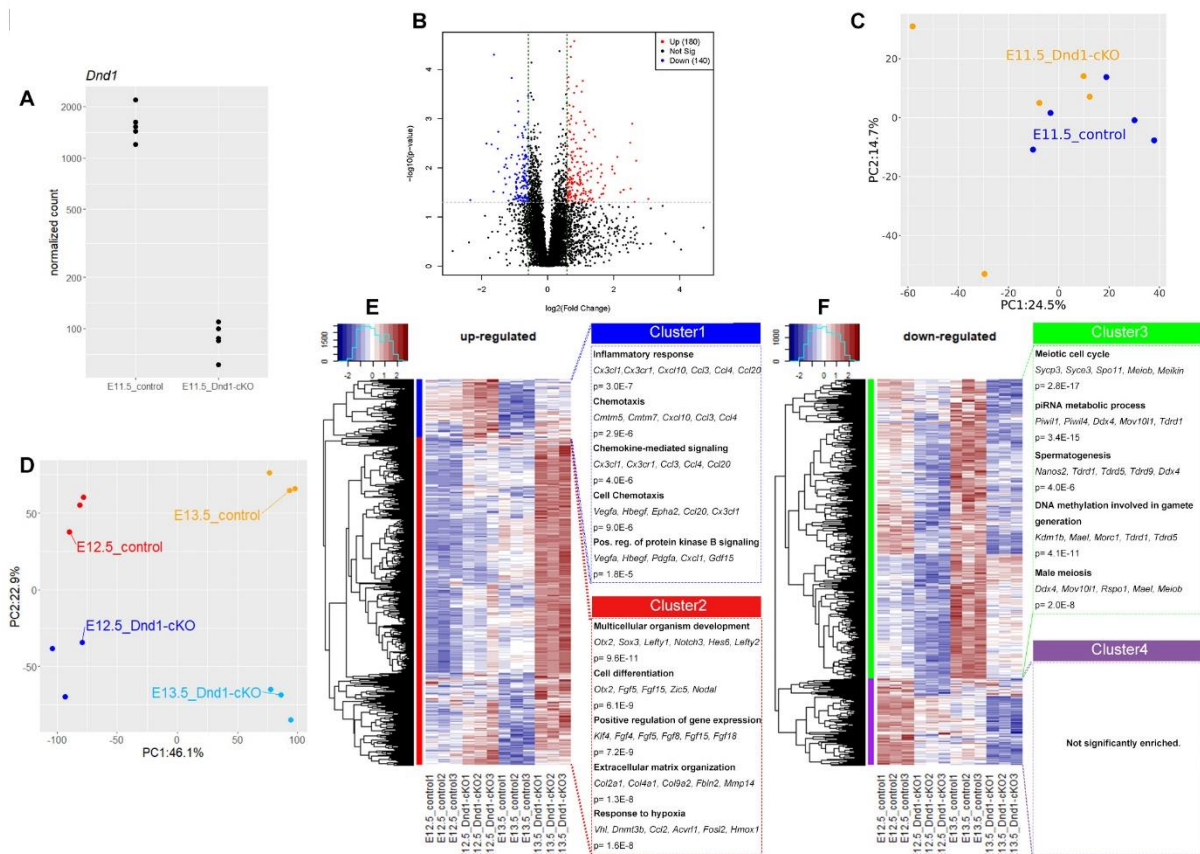


図 24 E11.5, E12.5, E13.5 生殖細胞におけるトランスクリプトーム解析

(A) *Dnd1*-cKO と control における *Dnd1* の発現。各々5つの replicate を示した。(B) E11.5 における、control (*Dnd1*<sup>lox/lox</sup>; *Nanog*-EGFP) と *Dnd1*-cKO (*Dnd1*<sup>lox/lox</sup>; *Nanog*-EGFP; *Rosa26*-CreER<sup>T2</sup>) 生殖細胞のトランスクリプトームデータに関する Volcano プロット。赤色の点 : p<0.05、fold change>1.5 の遺伝子。青色の点 : p<0.05、fold change<1.5 の遺伝子。(C) E11.5 における *Dnd1*<sup>lox/lox</sup>\_Tg(*Nanog*-EGFP) と *Dnd1*<sup>lox/lox</sup>\_Tg(*Nanog*-EGFP)\_*Rosa26*-CreER<sup>T2</sup> 生殖細胞トランスクリプトームの主成分解析。一つの点はそのトランスクリプトームと対応している。各々5つの replicate を取っている。(D) E12.5、E13.5 における control と *Dnd1*-cKO 生殖細胞トランスクリプトームの主成分解析。一つの点は一サンプルのトランスクリプトームと対応している。各々3つの replicate を取っている。(E, F) E12.5、E13.5 において、*Dnd1*-cKO 生殖細胞で発現の高い遺伝子 (E)、もしくは低い遺伝子 (F) についてのヒートマッププロットと、GO 解析結果。

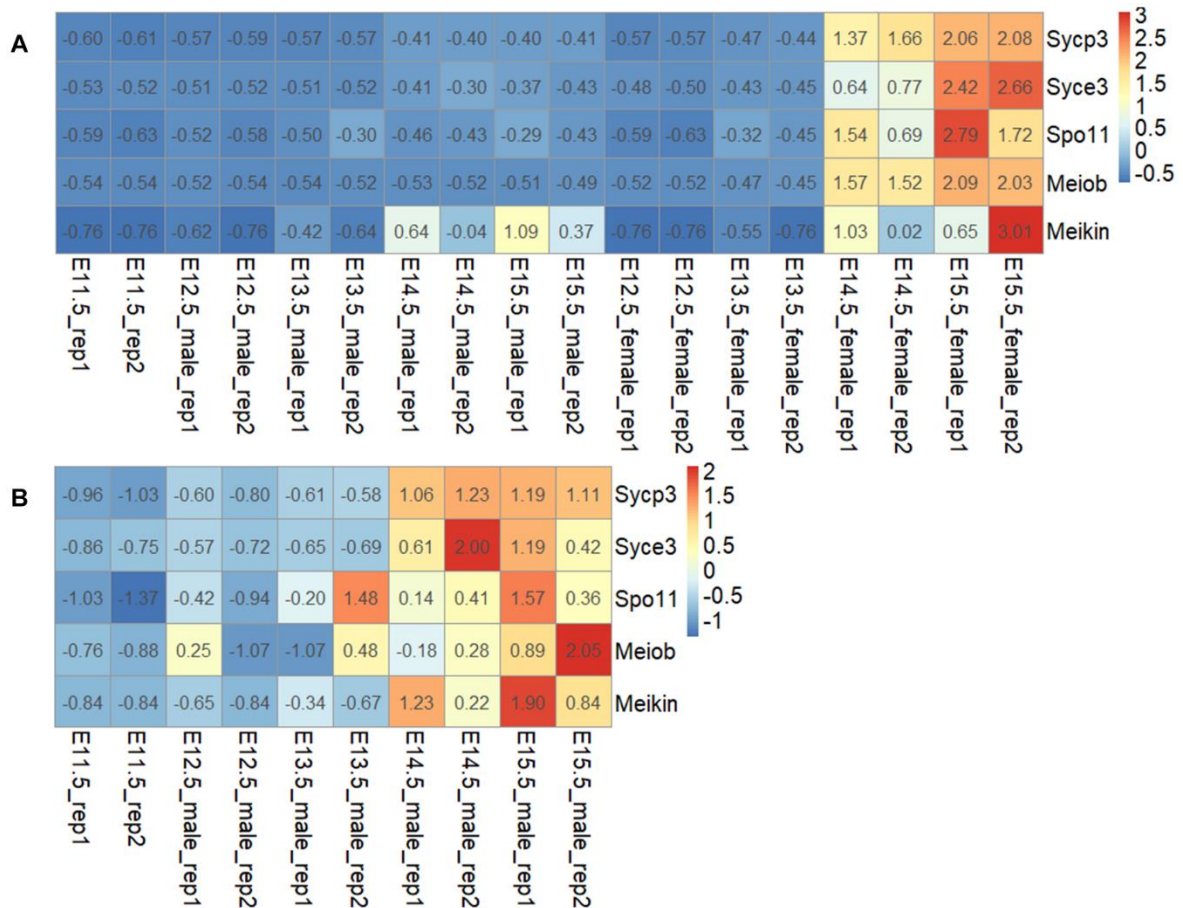


図 25 E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, E15.5 生殖細胞における減数分裂関連遺伝子の発現 (A, B) 雄・雌生殖細胞における *Sycp3*, *Syce2*, *Spo11*, *MeioB*, *Meikin* の発現量 (A)、雄のみの発現量 (B)。前処理された雄と雌生殖細胞におけるトランスクリプトームデータを再解析した。

#### 4-2-7 *Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* と *Dnd1-cKO* において発現変動する遺伝子の比較

生殖細胞が TP 細胞へと転換する分子メカニズムの更なる解析のために、*Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* と *Dnd1-cKO* のトランスクリプトーム比較を行うことにした。そのために、まず、E12.5 と E13.5 の *Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* の生殖細胞において 1.5 倍以上発現変動する遺伝子を以前の研究結果から取得し、*Dnd1-cKO* 生殖細胞において発現変動する遺伝子と比較した。その結果、それぞれ 384・228 個の共通して発現上昇・発現減少する遺伝子が検出された (図 26A, B)。共通して発現減少する遺伝子群に関して Gene ontology 解析を行うと、Meiotic process、piRNA metabolic process、Spermatogenesis の GO term が濃縮していた (図 26C)。これは、*Dnd1-cKO* において発現減少する遺伝子群の GO term と一致していたことから、雄性分化不全となることは共通のイベントであることが明らかとなった。一方で、



共通して発現上昇する遺伝子群について GO 解析を行うと、apoptosis に関連する GO term が濃縮していた (図 26D)。このことから、*Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* と *Dnd1-cKO* の生殖細胞は、細胞死を起こしやすい状況にあることが示唆された。それだけではなく、SMAD protein signal transduction の GO term の濃縮も見られた。このことから、TP 細胞への転換直前に、*Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* と *Dnd1-cKO* の生殖細胞において TGF- $\beta$  経路の活性化が起こることが示唆された。TP 細胞において、TGF- $\beta$  経路の活性化が起こることが報告されているため、この経路が TP 細胞への転換を促進することが示唆された。

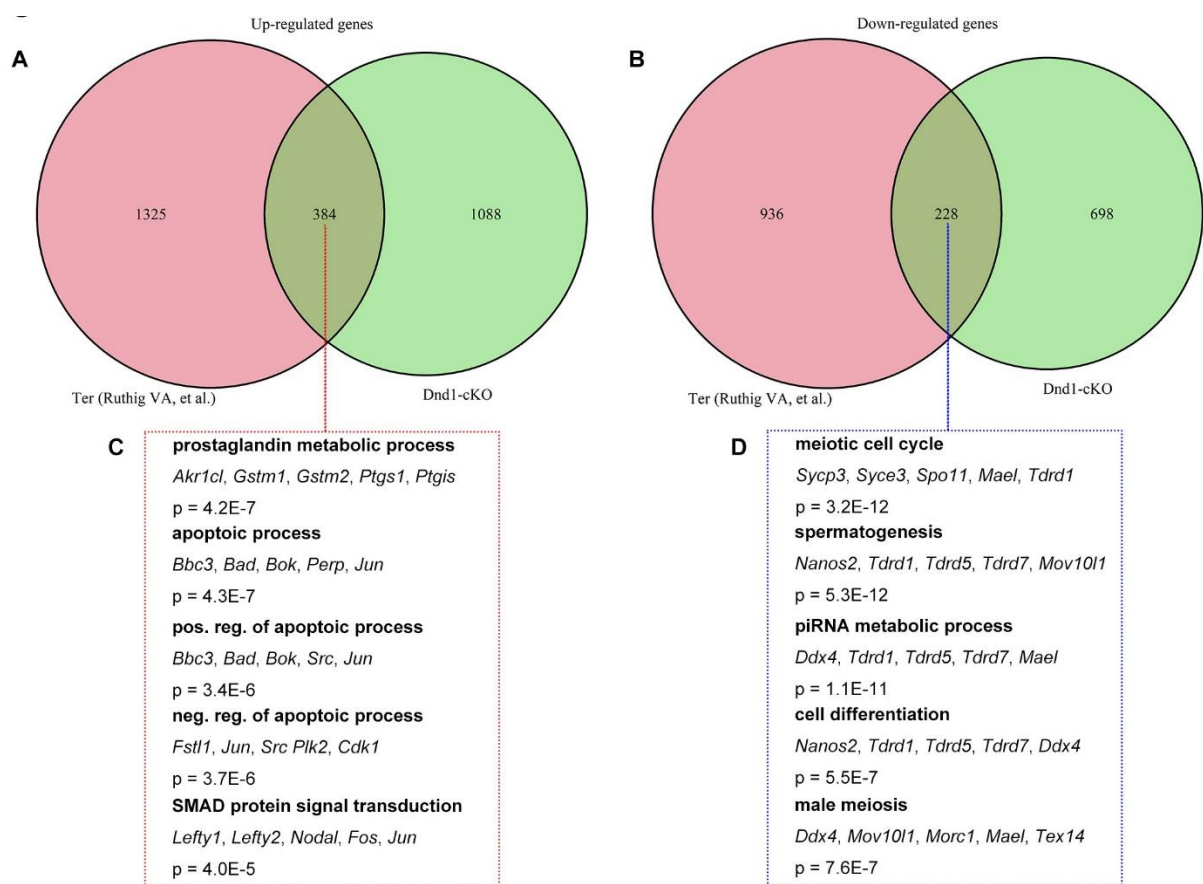


図 26 *Dnd1-cKO* 生殖細胞と *Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* 生殖細胞のトランスクリプトーム比較

(A, B) *Dnd1-cKO* および *Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* 生殖細胞で発現上昇 (A) および発現減少 (B) する遺伝子に関するベン図。(C, D) *Dnd1-cKO* および *Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* 生殖細胞で共通して発現上昇 (C) および発現減少 (D) する遺伝子の GO 解析結果。

#### 4-3 考察

本章においては、生殖細胞の移動期に DND1 を欠損すると生殖細胞は雄性分化不全となり、

E16.5になると一部の生殖細胞が TP 細胞へと転換することが明らかとなった。トランスクリプトーム解析の結果からも、雄性分化関連遺伝子の発現低下が検出された。また、多能性細胞関連遺伝子の発現上昇も観察されたことから、生殖細胞が多能性細胞に転換しやすい状況にあることが示唆された。さらに、*Dnd1<sup>Ter/Ter</sup>* と *Dnd1-cKO* のトランスクリプトーム比較から、SMAD シグナル経路の活性化が共通して検出された。このことから、TGF- $\beta$  経路が TP 細胞への転換に寄与することが示唆された。一方で、一部の生殖細胞のみが TP 細胞へと転換する原因については明らかにすることができなかった。原因の一つとして、精細管の基底膜や中腎などからパラクラインシグナルが分泌され、それらを受け取った生殖細胞のみが TP 細胞へと転換するということが考えられる。一方で、iPS 細胞への転換のように、確率論的に TP 細胞へと転換する生殖細胞が選択されるという可能性も考えられる<sup>39</sup>。この点を明らかにするためにも、TP 細胞へと転換する生殖細胞とそうでない生殖細胞の違いを比較するような解析が必要である。*Dnd1-cKO* は *Ter* 変異体に比べて多くの生殖細胞が生き残るため、シングルセル RNA-seq/ATAC-seq 解析に有用なツールになると考えられる。

以前の研究から、E13.5において DND1 を欠損させると、NANOS2 を control と変わらないレベルで発現するにも関わらず、生殖細胞は雄性分化不全となり細胞死が引き起こされることが明らかとなっている<sup>3</sup>。これは、DND1 が存在しないことにより NANOS2 が機能不全に陥っているためだと考えられる。このことから、移動期に DND1 を欠損させても E13.5 における欠損と同様に精巣が矮小化するのみだと考えていた。しかしながら、予想に反して精巣にはテラトーマが発症していた。このことから、移動期に DND1 を欠損させると E13.5 で欠損させたときに比べて、生殖細胞は TP 細胞へと転換しやすくなることが明らかとなった。トランスクリプトーム解析から、DND1 非存在下において生殖細胞は移動期の性質を維持して雄性分化がうまく起こっていないと考えられるが、E13.5 における欠損においては既に雄性分化が起こっているために精巣テラトーマを発症しないと考えられる。また、移動期における DND1 の機能は、生殖巣に入った生殖細胞における機能とは異なる可能性がある。移動期においては NANOS2 ではなく NANOS3 が発現するため、移動期における DND1 のパートナーは NANOS3 であるのかもしれない。そのため、DND1-

NANOS2 複合体と DND1-NANOS3 複合体のターゲットの違いを明らかにすることで、TP 細胞への転換メカニズムが明らかになる可能性がある。しかし、DND1 は miRNA 依存的な RNA 分解を抑制するとの報告もあるため、NANOS を介さずに精巣テラトーマの発症を抑制する機能を持つ可能性もある。そのため、生殖細胞が TP 細胞へと転換する現象を明らかにするために、移動期における DND1 や DND1-NANOS 複合体の結合 RNA を同定する必要があると考えられる。

これまでに、遺伝子変異により精巣テラトーマを発症する例がいくつか知られているが、その全てが 129 系統マウスに変異アリルの戻し交配を行った結果生じたものである<sup>20,21,34,40</sup>。つまり、精巣テラトーマの発症には 129 系統の遺伝的背景が強く作用する。しかし、その実体は不明であることが TP 細胞への転換メカニズムを解明するための研究を複雑にしていた。一方で、*Dnd1*-cKO マウスは 129 系統を含まない実験系であるため、マウスにおいては移動期に DND1 を欠損させることにより精巣テラトーマを発症させることができるのかもしれない。しかし、一方で、KI67 陽性細胞の割合や EG 細胞の樹立効率は以前の報告よりも高い値を示した<sup>32,33</sup>。このことは、このマウス系統が精巣奇形腫瘍の発症を促進する遺伝的背景を持つことを示唆している。実際に、このマウス系統に *Dnd1*-Δ アリルを導入して *Dnd1* のホモ欠損マウスを作成すると 60%もの確率で精巣テラトーマを発症することが明らかとなった (図 27)。B6 や MCH 系統においては、*Dnd1* のホモ欠損マウスであっても殆ど精巣テラトーマを発症しないので、このマウス系統の遺伝的背景は精巣テラトーマの発症を促進すると考えられる。DND1 を欠損することによる精巣テラトーマ発症への影響をより詳細に調べるために、B6 や MCH 系統における *Dnd1* 条件付き欠損による解析、順遺伝学的解析や全ゲノムシーケンスによる精巣テラトーマ発症の責任領域の同定が必要だと考えられる。

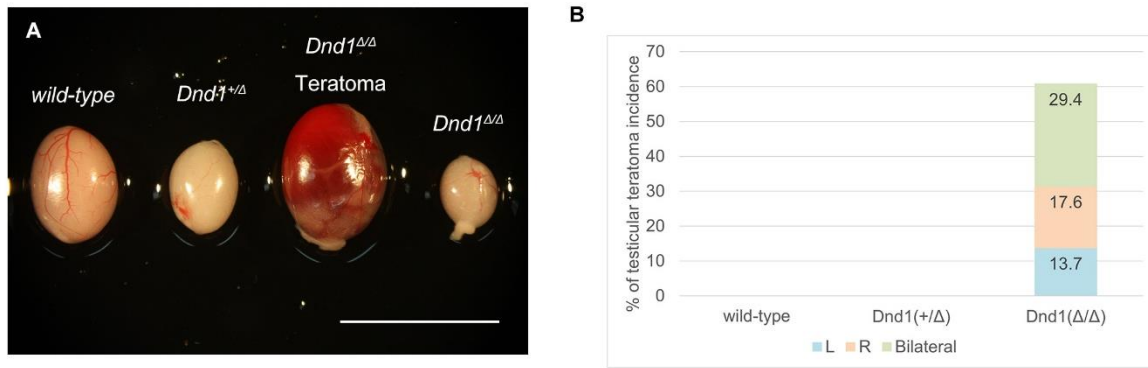


図 27 *Dnd1*-cKO と同じ系統において *Dnd1* の欠損は精巣テラトーマを引き起こす

(A) *Dnd1<sup>fllox/fllox</sup>; Nanog-EGFP; Rosa26-CreER<sup>T2</sup>* と同じマウス系統における、野生型、*Dnd1<sup>+/Δ</sup>*、*Dnd1<sup>Δ/Δ</sup>* の精巣写真。以前の報告と同様に、*Dnd1<sup>+/Δ</sup>* の精巣は野生型よりも小さかった。また、*Dnd1<sup>Δ/Δ</sup>* の左側精巣は精巣テラトーマを発症していた。スケールバー：10mm。 (B) *Dnd1<sup>fllox/fllox</sup>; Nanog-EGFP; Rosa26-CreER<sup>T2</sup>* と同じマウス系統における、野生型、*Dnd1<sup>+/Δ</sup>*、*Dnd1<sup>Δ/Δ</sup>* の精巣テラトーマ発症率。サンプル数は、野生型 (n=47)、*Dnd1<sup>+/Δ</sup>* (n=96)、*Dnd1<sup>Δ/Δ</sup>* (n=51)。青色、オレンジ色、緑色のボックスは、それぞれ左側、右側、両側における発症率を示す。

#### 4-4 実験で使用した物品等

##### 4-4-1 使用した試薬・製品

- Canget Signal Immunoreaction Enhancer Solution (Toyobo)
- ProteinaseK (Fujifilm Wako)
- 酢酸 (Fujifilm Wako)
- EtBr (Nippon Gene)
- ホルマリソ (Fujifilm Wako)
- 10x Dulbeccos' PBS (Fujifilm Wako)
- NaCl (Fujifilm Wako)
- Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (Fujifilm Wako)
- Tween-20 (Fujifilm Wako)
- EDTA (DOJINDO)
- ブタノール (Fujifilm Wako)
- スライドガラス (松浪)
- Tris (Fujifilm Wako)
- アガロース粉 (理科研)
- 飽和ピクリン酸 (Fujifilm Wako)
- パラホルムアルデヒド (Fujifilm Wako)
- NaOH (Fujifilm Wako)
- KCl (Fujifilm Wako)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fujifilm Wako)
- Skim milk (Fujifilm Wako)
- エタノール (Fujifilm Wako)
- パラフィン (Fujifilm Wako)
- キシレン (Fujifilm Wako)

- ヘマトキシリン (武藤化学)
- SI/S14 m220 フィーダー細胞<sup>30</sup>
- NBC (Cytiva)
- KSR (Thermo Fischer Scientific)
- NEAA (Thermo Fischer Scientific)
- mLIF (Merck)
- A83-01 (Fujifilm Wako)
- MEK1/2 阻害剤 (REPROCELL)
- N,N-ジメチルホルムアミド (Fujifilm Wako)
- MgCl<sub>2</sub> (Fujifilm Wako)
- FAST Red TR (Sigma)
- Super ScriptIII (Thermo Fischer Scientific)
- エキソヌクレアーゼ (Takara Bio)
- MightyAmp DNA polymerase (Takara Bio)
- Low Input Quick Amp Labeling Kit (One-color) (Agilent Technologies)
- エオシン (武藤化学)
- Accutase (Merck Millipore)
- 7-AAD (Beckman Coulter)
- Glutamax (Thermo Fischer Scientific)
- 2-メルカプトエタノール (Fujifilm Wako)
- bFGF (PeproTech)
- GSK3β 阻害剤 (REPROCELL)
- ナフトール AS-MX リン酸 (nacalai tesque)
- HCl (Fujifilm Wako)
- 蒸留水 (大塚製薬)
- DMEM (Sigma)
- AMPure XP (Beckman Coulter)
- ターミナルトランスフェラーゼ (Roche)
- MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)

#### 4-4-2 使用した機器

- 実体顕微鏡 (Olympus)
- 光学顕微鏡 (Carl Zeiss)
- ホットプレート (Omron)
- パラフィン溶解・包埋装置 (Leica)
- Agilent2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)
- TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Gradient (TaKaRa)
- HiSeq1500 (Illumina)
- CCD カメラ (Carl Zeiss)
- 光学カメラ (Canon)
- ミクロトーム (Leica)
- CO<sub>2</sub> インキュベーター (SANYO)

#### 4-4-3 使用したソフトウェア

- Miniconda3 (Anaconda, Inc. released on 2022/2/15)
- R (R development Core Team, ver.4.2.1.)
- AxioImage (Carl Zeiss)
- Photoshop (Adobe)
- ImageJ (NIH)

#### 4-4-4 使用したパッケージ等

- STAR (ver.2.7.9a)
- Rsubread (ver.2.8.2)
- ENSEMBL GTF ファイル (release98)
- mouse reference genome ファイル
- limma (ver.3.5.0.)
- dplyr (ver.1.0.7)
- ggplot2 (ver.3.3.5)
- gplots (ver.3.1.3)

#### 4-4-5 使用した抗体

使用した抗体を以下に示す。

表 39 使用した抗体の詳細

使用した 1 次抗体		
抗体名	免疫動物種	メーカー
anti-cleaved CASPASE3 抗体	Rabbit	Cell Signaling
anti-LAMININ	Rat	ICN Biomedicals
anti-KI67	Rabbit	Thermo Fischer Scientific
anti-OTX2	Rabbit	Abcam
anti-NANOG	Rabbit	Bethyl Laboratories
anti-GFP	Goat	Novus Biologicals
anti-NANOS2	Rabbit	Suzuki A, et.al. 2016.
anti-DND1	Rabbit	Suzuki A, et.al. 2016.
anti-DAZL	Guinea Pig	Suzuki A, et.al. 2016.
anti-SYCP3	Rabbit	A gift from Dr. Chuma.
使用した 2 次抗体		
Aquamarine conjugated anti-Guinea pig IgG 抗体	Donkey	Jackson ImmunoResearch
Alexa488 conjugated anti-goat IgG 抗体	Donkey	Jackson ImmunoResearch
Alexa594 conjugated anti-rabbit IgG 抗体	Donkey	Jackson ImmunoResearch
Alexa594 conjugated anti-mouse Pig IgG 抗体	Donkey	Jackson ImmunoResearch
Alexa594 conjugated anti-rat IgG 抗体	Donkey	Invitrogen

#### 4-4-6 使用した primer

表 40 使用した primer の詳細

使用した Primer	
<i>Dnd1-A</i> アリル	Fw : GGAAGCCTTCTCAAACCTCAC
	Rv : GAGTTTGACACCAGCCTAAT
<i>Dnd1-flox, Dnd1-wild</i> アリル	Fw : AAGGCCCTGGTAGAAGGTAG
	Rv : GAGTTTGACACCAGCCTAAT
<i>Tg (Oct4ΔPE-CreER<sup>T2</sup>)</i> アリル	Fw : GATAGCGCTCGCCTCAGTTT
	Rv : GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG
<i>Rosa26-CreER<sup>T2</sup></i> アリル	Fw : TGTTGCAATACCTTTCTGGGAGTTC
	Rv : GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG

#### 4-4-7 使用したバッファー

- ・タモキシフェン溶液 (表 8)
- ・1x TE バッファー (表 9)
- ・10x Loading dye (表 10)
- ・50x TAE バッファー (表 11)
- ・1.5% アガロースゲル (表 12)
- ・ブアン固定 (表 15)
- ・10x PBS (表 16)
- ・PBS-T (表 17)
- ・5% skim milk in 1x PBS (表 18)
- ・4% PFA 固定液 (表 36)

表 41 ソーティングメディウムの組成

ソーティングメディウム	
試薬	使用量
NBC	100 $\mu$ L
Glutamax	50 $\mu$ L
Non-essential amino acids	50 $\mu$ L
DMEM	5mL
計	500mL

表 42 EG 細胞培養培地 A の組成

EG 細胞培養培地 A	
試薬	使用量
KSR	0.15 $\mu$ L
Glutamax	50 $\mu$ L
Non-essential amino acids	50 $\mu$ L
10mM 2-メルカプトエタノール	5 $\mu$ L
1 x 10 <sup>7</sup> unit/ mL mLIF	0.1 $\mu$ L
250 $\mu$ g/mL bFGF	0.1 $\mu$ L
DMEM	0.99mL
Amphotericin B	10 $\mu$ L
計	1mL



表 43 EG 細胞培養培地 B の組成

EG 細胞培養培地 B	
試薬	使用量
KSR	0.15 $\mu$ L
Glutamax	50 $\mu$ L
Non-essential amino acids	50 $\mu$ L
10mM 2-メルカプトエタノール	5 $\mu$ L
1 x 10 <sup>7</sup> unit/ mL mLIF	0.1 $\mu$ L
250 $\mu$ g/mL bFGF	0.1 $\mu$ L
2.5mM A83-01	0.1 $\mu$ L
10mM Mek1/2 inhibitor	0.1 $\mu$ L
10mM GSK3 $\beta$ inhibitor	0.1 $\mu$ L
DMEM	1mL
Amphotericin B	10 $\mu$ L
計	1mL

表 44 AP 反応溶液の組成

AP 反応溶液	
試薬	使用量
ナフトール AS-MX リン酸	5mg
1M Tris HCl (pH8.8)	5mL
N,N-ジメチルホルムアミド	250 $\mu$ L
1M MgCl <sub>2</sub>	100 $\mu$ L
蒸留水	Up to 50mL
計	50mL

表 45 AP 発色基質溶液

AP 発色基質溶液	
試薬	使用量
FAST Red TR	6mg
蒸留水	240 $\mu$ L
計	240 $\mu$ L

表 46 AP 発色試薬溶液

AP 発色試薬溶液	
試薬	使用量
AP 反応溶液	1mL
AP 発色基質溶液	24 $\mu$ L
計	1mL

#### 4-4-8 使用したマウス

2-4-7 の通り行った。

#### 4-5 実験方法

##### 4-5-1 ジェノタイピング

ジェノタイピングは、2-5-1 の通り行った。

##### 4-5-2 タモキシフェン投与

雌マウスと雄マウスを交配した。膈プラグを確認した日を E0 とし、各ステージで妊娠雌マウスにタモキシフェン溶液を 150 $\mu$ L 投与した。

##### 4-5-3 精巣の観察

胎仔精巣の蛍光観察においては、タモキシフェン投与を行い、E16.5 に解剖により精巣を摘出した後に、ジェノタイピングを行った。観察は、実体顕微鏡と CCD カメラを用いて行った。

成体精巣の観察においては、タモキシフェン投与を行い、E10.5 においてジェノタイピングを行った。そして、生後 4 週齢において解剖により精巣を摘出した。観察は、実体顕微鏡と光学カメラを用いて行った。

##### 4-5-4 HE 染色

マウスの精巣・精巣テラトーマのサンプル化と HE 染色は、2-3-5 の通り行った。

#### 4-5-5 胎仔精巣の蛍光免疫染色

① サンプリング：タモキシフェン投与を行った後、各ステージで解剖により胎仔から精巣を摘出した。さらに、ジェノタイピングを行うことで遺伝子型を判定した。

以下の実験操作は、2-5-12 の通り行った。

#### 4-5-6 細胞系譜解析

*Dnd1<sup>fllox/fllox</sup> ; Tg(CAG-CAT-EGFP)*の雌マウスと、*Dnd1<sup>fllox/fllox</sup> ; Tg(CAG-CAT-EGFP) ; Tg(Oct4ΔPE-CreER<sup>T2</sup>)*の雄マウスを掛け合わせ、E10.5 においてタモキシフェン投与を行った。そして、E17.5 において、雌マウスを解剖して胎仔から精巣を摘出し、胎仔精巣の蛍光免疫染色を行った。

#### 4-5-7 FACS

① 細胞懸濁液の作成：タモキシフェン投与を行い、胎仔精巣を解剖により取り出した後に、以下の手順で細胞懸濁液を作成した。

表 47 細胞懸濁液の作成

細胞懸濁液の作成		
操作	時間	特記事項
Accutase 反応	20 分	37°C 恒温水槽内で行った。
ピペッティング		3 回繰り返した。
Accutase 反応	10 分	37°C 恒温水槽内で行った。
ピペッティング		
Accutase 反応	5 分	
ピペッティング		
NBC 反応		10% 容量を反応させた。
遠心分離・上清除去		スウィング型遠心機を使用した (1800rpm、5 分間)。
ソーティングメEDIUMへの懸濁		
7-AAD の反応	5 分	0.5% 容量を添加した。

② FACS：セルソーターを用いてソーティングを行った。

#### 4-5-8 EG 細胞の培養

FACS を行い、雄と雌の生殖細胞をフィーダー細胞上に分取した。培養開始日を培養開始 0 日目とし、3 日目まで EG 細胞培養培地 A で培養した。3 日目以降、EG 細胞培養培地 B で培養した。また、培地交換は 2 日に一回の頻度で行った。さらに、培養は 5% CO<sub>2</sub>・37°C の条件で、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行った。

#### 4-5-9 AP 染色

以下の手順で AP 染色を行った。

表 48 AP 染色の実験手順

AP 染色の実験手順		
操作	時間	特記事項
PBS で洗淨		2 回繰り返した。
4% PFA 固定液で細胞固定	3 分	室温。
PBS で洗淨		2 回繰り返した。
発色試薬と反応	10 分	37°C 恒温槽内で反応させた。
PBS で洗淨		1 回行った。
4% PFA 固定液で再固定	5 分	
PBS に置換		

#### 4-5-10 RNA シーケンス解析

① RNA シーケンス解析は表 49 の通り行った。

表 49 RNA シーケンス解析の手順

RNA シーケンス解析		
操作	時間	特記事項
生殖細胞分取		E11.5 から 100 細胞ずつ。
逆転写		Super ScriptIIIを使用
逆転写プライマー除去		AMPure XP
cDNA への 3'末端の付加		トランスフェラーゼ
二本鎖 DNA 合成		MightyAmp DNA ポリメラーゼ
DNA 精製		MinElute PCR Purification Kit
シーケンス解析用のライブラリー作成		LIMprep <sup>41</sup>
シーケンス解析		HiSeq1500

② リードファイルは、STAR ソフトウェアを用いてリファレンスゲノム (mm10) にマッピングした。

③ RNA シーケンスデータの情報解析

表 50 RNA シーケンスデータの情報解析

RNA シーケンスデータの情報解析	
処理内容	使用した関数
遺伝子のリードカウント集計	featureCounts (Rsubread パッケージ)
リードカウントを $\log_2(\text{RPM}+1)$ に変換	
$\log_2(\text{RPM}+1)$ の値が 4 より大きいサンプルが 1	
スケーリング	scale

④ PCA 解析は表 51 の通り行った。

表 51 PCA 解析

PCA 解析	
処理内容	使用した関数
遺伝子発現行列のスケーリング	scale
PCA 解析	prcomp
PCA プロットの描画	ggplot

④ Gene ontology 解析は、DAVID により行った<sup>42</sup>。

#### 4-5-11 マイクロアレイ解析

① マイクロアレイデータの取得を以下の通り行った。

表 52 マイクロアレイデータの取得

マイクロアレイデータの取得		
操作	時間	特記事項
生殖細胞分取		E12.5, E13.5 から 120000 細胞
RNA 精製		RNeasy Plus Micro kit
RNA 品質チェック		Agilent2100 バイオアナライザー
cDNA 逆転写、ラベリング(cyanine3)		Low Input Quick Amp Labeling Kit (One-Color)
cDNA ハイブリダイズ	17h	SurePrint G3 Mouse GE 8×60K v2 Microarray,
洗浄		Gene Expression Hybridization Kit
スキャン		Agilent SureScan G2600D
イメージデータ処理		Feature Extraction ソフトウェア (11.5.1.1)

② 取得したマイクロアレイデータの処理は、R の limma パッケージを利用して以下の通り行った。

表 53 遺伝子発現生データの処理

遺伝子発現生データの処理	
処理内容	使用した関数
生データの読み込み	read.maimages
バックグラウンド補正	backgroundCorrect
log <sub>2</sub> 値への変換	normalizeBetweenArrays
control プローブの除去	
遺伝子シンボルのないプローブの除去	
4 サンプル以上でバックグラウンドよりも低いプローブの除去	
プローブ名の遺伝子シンボルへの変換	
遺伝子シンボルの重複を除去 (最も蛍光強度が高いものを残した)	distinct

③ PCA 解析は表 51 の手順で行った。

④ 発現変動遺伝子のクラスタリングは以下の手順で行った。

表 54 発現変動遺伝子のクラスタリング

発現変動遺伝子のクラスタリング	
処理内容	使用した関数
遺伝子発現変動の平均値の計算	apply, mean
遺伝子発現変動の有意差の計算 (control vs <i>Dnd1-cKO</i> )	lmfit, eBayes
発現変動遺伝子の抽出 ( $\log_2FC > 1.5$ , $p\text{-value} < 0.05$ )	
発現変動遺伝子発現行列のスケーリング	scale
PCA 解析	prcomp
発現変動遺伝子のクラスタリング	dist, hclust, cutree
ヒートマップの描画	heatmap.2

⑤ Gene ontology 解析は DAVID により行った<sup>42</sup>。

## 第五章 総括

第二章においては、*Ter* 変異体が *Dnd1* の null 変異体であることを示した。そして、*Dnd1*<sup>+/-</sup>マウスは 129 系統マウスにおいて不妊となるが、*Dnd1*<sup>+/*Ter*</sup> においてはそのような表現型は観察されなかった。これは、*Dnd1*-Δ アリルの導入により、*Dnd1* 遺伝子近傍の遺伝子発現に影響を与えるからではないかと考察した。そして、以前の報告において *Dnd1* 欠損マウスが胚性致死となった原因も、同様の現象が起こっているからなのではないかと考察した。

第三章においては、*Dnd1* と *Nanos2*・*Nanos3* は精巣テラトーマの発症において遺伝的に相互作用することを示した。将来的に、DND1-NANOS2 や DND1-NANOS3 複合体と相互作用する RNA を同定することで、精巣テラトーマ発症メカニズムを解明できる可能性を示した。

第四章においては、生殖細胞の移動期において DND1 を欠損させることが、精巣テラトーマの発症に重要であることを示した。そして、DND1 を失うことにより生殖細胞は雄性分化不全となり、TP 細胞への転換が促進されることを明らかにした。また、本実験系は 129 系統を用いない方法であるとともに、*Ter* 変異体や DND1 欠損マウスとは異なり、TP 細胞へと転換する以前の生殖細胞を十分量集められることが明らかとなった。そして将来的には、本実験系を用いてシングルセルトランスクリプトーム解析を行うことで、より詳細な精巣テラトーマ発症メカニズムの解明に繋がる可能性を示した。

本研究においては、DND1 に着目して精巣テラトーマ発症メカニズム解明のための研究を行った。今後、DND1 を失った生殖細胞が TP 細胞へと転換するメカニズムの全容を解明することにより、分子メカニズムに基づいた精巣テラトーマの予防・治療法に結び付けられると考える。



付記

- ・ 本論文を構成する学術論文

本論文の内容は、以下に示す学術論文に基づく。

- ・ [Atsuki Imai](#), Yoshihiko Hagiwara, Yuki Niimi, Toshinobu Tokumoto, Yumiko Saga, Atsushi Suzuki, Mouse Dead end1 acts with NANOS2 and NANOS3 to regulate testicular teratoma incidence. *PLoS One*. 15(4), e0232047, pp1-18, 2020.

- ・ [Atsuki Imai](#), Kazuya Matsuda, Yuki Niimi, Atsushi Suzuki, Loss of Dead end1 induces testicular teratomas from primordial germ cells that failed to undergo sexual differentiation in embryonic testes. *Scientific Reports*. 15(4), e0232047, pp1-18, 2023.

## 謝辞

本研究にあたり、終始熱心なご指導とご鞭撻を賜り、本稿作成においても多大なるご教示、ご援助を頂戴しました横浜国立大学 工学研究院 鈴木 敦 准教授に深甚なる感謝の意を表します。

本稿作成にあたり多大なるご指導、ご校閲を賜りました横浜国立大学 工学研究院 栗原 靖之 教授、環境情報研究院 平塚 和之 教授、工学研究院 福田 淳二 教授、飯島 一智 准教授に深く感謝いたします。

また本研究に際し、多大なるご協力をいただきました国立遺伝学研究所 相賀 裕美子 先生、静岡大学 徳元 俊伸 先生に心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、日々御協力いただき、公私共々お世話になりました横浜国立大学 鈴木 研究室、栗原研究室の方々に心から感謝いたします。ありがとうございました。

今井 淳稀

## 参考文献

1. Katanoda, K., Shibata, A., Matsuda, T., Hori, M., Nakata, K., Narita, Y., Ogawa, C., Munakata, W., Kawai, A., and Nishimoto, H. (2017). Childhood, adolescent and young adult cancer incidence in Japan in 2009-2011. *Jpn J Clin Oncol* *47*, 762-771. 10.1093/jjco/hyx070.
2. Yudai Goto and Kouji Masumoto and Toko Shinkai and Fumiko Chiba and Kentaro Ono and Naoya Sakamoto and Chikashi Gotoh and Yasuhisa Urita and Hajime, T. (2017). Clinical Evaluation of Nine Patients With Pediatric Testicular Tumors. *Journal of the Japanese Society of Pediatric Surgeons* *53*, 1155-1160. 10.11164/jjsps.53.6\_1155.
3. Suzuki, A., Niimi, Y., Shinmyozu, K., Zhou, Z., Kiso, M., and Saga, Y. (2016). Dead end1 is an essential partner of NANOS2 for selective binding of target RNAs in male germ cell development. *EMBO Rep* *17*, 37-46. 10.15252/embr.201540828.
4. Nikolic, A., Volarevic, V., Armstrong, L., Lako, M., and Stojkovic, M. (2016). Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives. *Stem Cells Int* *2016*, 1741072. 10.1155/2016/1741072.
5. Saga, Y. (2022). How Germ Cells Determine Their Own Sexual Fate in Mice. *Sex Dev*, 1-13. 10.1159/000520976.
6. Suzuki, A., and Saga, Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes Dev* *22*, 430-435. 10.1101/gad.1612708.
7. Saba, R., Kato, Y., and Saga, Y. (2014). NANOS2 promotes male germ cell development independent of meiosis suppression. *Dev Biol* *385*, 32-40. 10.1016/j.ydbio.2013.10.018.
8. Webster, N.J., Maywald, R.L., Benton, S.M., Dawson, E.P., Murillo, O.D., LaPlante, E.L., Milosavljevic, A., Lanza, D.G., and Heaney, J.D. (2021). Testicular germ cell tumors arise in the absence of sex-specific differentiation. *Development* *148*. 10.1242/dev.197111.
9. Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *40*, 1080-1087. 10.1073/pnas.40.11.1080.
10. Stevens, L.C. (1973). A new inbred subline of mice (129-terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *J Natl Cancer Inst* *50*, 235-242. 10.1093/jnci/50.1.235.
11. Noguchi, T., and Noguchi, M. (1985). A recessive mutation (ter) causing germ cell deficiency and a high incidence of congenital testicular teratomas in 129/Sv-ter mice. *J Natl Cancer Inst* *75*, 385-392.
12. Sakurai, T., Iguchi, T., Moriwaki, K., and Noguchi, M. (1995). The ter mutation first causes primordial germ cell deficiency in ter/ter mouse embryos at 8 days of gestation. *Dev Growth Differ* *37*, 293-302. 10.1046/j.1440-169X.1995.t01-2-00007.x.
13. Noguchi, M., Watanabe, C., Kobayashi, T., Kuwashima, M., Sakurai, T., Katoh, H., and

- Moriwaki, K. (1996). The ter mutation responsible for germ cell deficiency but not testicular nor ovarian teratocarcinogenesis in ter / ter congenic mice. *Dev Growth Differ* *38*, 59-69. 10.1046/j.1440-169X.1996.00008.x.
14. Youngren, K.K., Coveney, D., Peng, X., Bhattacharya, C., Schmidt, L.S., Nickerson, M.L., Lamb, B.T., Deng, J.M., Behringer, R.R., Capel, B., et al. (2005). The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* *435*, 360-364. 10.1038/nature03595.
  15. Asada, Y., Varnum, D.S., Frankel, W.N., and Nadeau, J.H. (1994). A mutation in the Ter gene causing increased susceptibility to testicular teratomas maps to mouse chromosome 18. *Nat Genet* *6*, 363-368. 10.1038/ng0494-363.
  16. Sakurai, T., Katoh, H., Moriwaki, K., Noguchi, T., and Noguchi, M. (1994). The ter primordial germ cell deficiency mutation maps near Grl-1 on mouse chromosome 18. *Mamm Genome* *5*, 333-336. 10.1007/BF00356550.
  17. Zechel, J.L., Doerner, S.K., Lager, A., Tesar, P.J., Heaney, J.D., and Nadeau, J.H. (2013). Contrasting effects of Deadend1 (Dnd1) gain and loss of function mutations on allelic inheritance, testicular cancer, and intestinal polyposis. *BMC Genet* *14*, 54. 10.1186/1471-2156-14-54.
  18. Niimi, Y., Imai, A., Nishimura, H., Yui, K., Kikuchi, A., Koike, H., Saga, Y., and Suzuki, A. (2019). Essential role of mouse Dead end1 in the maintenance of spermatogonia. *Dev Biol* *445*, 103-112. 10.1016/j.ydbio.2018.11.003.
  19. Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kiso, M., Abe, K., Haraguchi, S., Kobayashi, S., and Saga, Y. (2003). Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* *301*, 1239-1241. 10.1126/science.1085222.
  20. Dawson, E.P., Lanza, D.G., Webster, N.J., Benton, S.M., Suetake, I., and Heaney, J.D. (2018). Delayed male germ cell sex-specification permits transition into embryonal carcinoma cells with features of primed pluripotency. *Development* *145*. 10.1242/dev.156612.
  21. Schemmer, J., Araúzo-Bravo, M.J., Haas, N., Schäfer, S., Weber, S.N., Becker, A., Eckert, D., Zimmer, A., Nettersheim, D., and Schorle, H. (2013). Transcription factor TFAP2C regulates major programs required for murine fetal germ cell maintenance and haploinsufficiency predisposes to teratomas in male mice. *PLoS One* *8*, e71113. 10.1371/journal.pone.0071113.
  22. Lam, M.Y., Heaney, J.D., Youngren, K.K., Kawasoe, J.H., and Nadeau, J.H. (2007). Trans-generational epistasis between Dnd1Ter and other modifier genes controls susceptibility to testicular germ cell tumors. *Hum Mol Genet* *16*, 2233-2240. 10.1093/hmg/ddm175.
  23. Liu, S., Yu, H., Liu, Y., Liu, X., Zhang, Y., Bu, C., Yuan, S., Chen, Z., Xie, G., Li, W., et al. (2017). Chromodomain Protein CDYL Acts as a Crotonyl-CoA Hydratase to Regulate Histone Crotonylation and Spermatogenesis. *Mol Cell* *67*, 853-866.e855. 10.1016/j.molcel.2017.07.011.
  24. Ruthig, V.A., Friedersdorf, M.B., Garness, J.A., Munger, S.C., Bunce, C., Keene, J.D., and Capel, B. (2019). The RNA-binding protein DND1 acts sequentially as a negative regulator of

- pluripotency and a positive regulator of epigenetic modifiers required for germ cell reprogramming. *Development* *146*, 10.1242/dev.175950.
25. Chen, Y., Du, Z., and Yao, Z. (2006). Roles of the Nanog protein in murine F9 embryonal carcinoma cells and their endoderm-differentiated counterparts. *Cell Res* *16*, 641-650. 10.1038/sj.cr.7310067.
  26. Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313-317. 10.1038/nature05934.
  27. Suzuki, A., Tsuda, M., and Saga, Y. (2007). Functional redundancy among Nanos proteins and a distinct role of Nanos2 during male germ cell development. *Development* *134*, 77-83. 10.1242/dev.02697.
  28. Stevens, L.C. (1967). Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst* *38*, 549-552.
  29. Bustamante-Marín, X., Garness, J.A., and Capel, B. (2013). Testicular teratomas: an intersection of pluripotency, differentiation and cancer biology. *Int J Dev Biol* *57*, 201-210. 10.1387/ijdb.130136bc.
  30. Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B.L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* *70*, 841-847. 10.1016/0092-8674(92)90317-6.
  31. Resnick, J.L., Bixler, L.S., Cheng, L., and Donovan, P.J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* *359*, 550-551. 10.1038/359550a0.
  32. Matsui, Y., Takehara, A., Tokitake, Y., Ikeda, M., Obara, Y., Morita-Fujimura, Y., Kimura, T., and Nakano, T. (2014). The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by AKT activation. *Development* *141*, 4457-4467. 10.1242/dev.113779.
  33. Matsui, Y., and Tokitake, Y. (2009). Primordial germ cells contain subpopulations that have greater ability to develop into pluripotential stem cells. *Dev Growth Differ* *51*, 657-667. 10.1111/j.1440-169X.2009.01125.x.
  34. Nicholls, P.K., Schorle, H., Naqvi, S., Hu, Y.C., Fan, Y., Carmell, M.A., Dobrinski, I., Watson, A.L., Carlson, D.F., Fahrenkrug, S.C., and Page, D.C. (2019). Mammalian germ cells are determined after PGC colonization of the nascent gonad. *Proc Natl Acad Sci U S A* *116*, 25677-25687. 10.1073/pnas.1910733116.
  35. Kimura, T., Tomooka, M., Yamano, N., Murayama, K., Matoba, S., Umehara, H., Kanai, Y., and Nakano, T. (2008). AKT signaling promotes derivation of embryonic germ cells from primordial germ cells. *Development* *135*, 869-879. 10.1242/dev.013474.
  36. Kurek, D., Neagu, A., Tastemel, M., Tüysüz, N., Lehmann, J., van de Werken, H.J.G., Philipsen, S., van der Linden, R., Maas, A., van IJcken, W.F.J., et al. (2015). Endogenous WNT signals mediate BMP-induced and spontaneous differentiation of epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* *4*, 114-128. 10.1016/j.stemcr.2014.11.007.
  37. Hackett, J.A., and Surani, M.A. (2014). Regulatory principles of pluripotency: from the ground

- state up. *Cell Stem Cell* *15*, 416-430. 10.1016/j.stem.2014.09.015.
38. Boroviak, T., Loos, R., Lombard, P., Okahara, J., Behr, R., Sasaki, E., Nichols, J., Smith, A., and Bertone, P. (2015). Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev Cell* *35*, 366-382. 10.1016/j.devcel.2015.10.011.
  39. Hochedlinger, K., and Jaenisch, R. (2015). Induced Pluripotency and Epigenetic Reprogramming. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*. 10.1101/cshperspect.a019448.
  40. Krentz, A.D., Murphy, M.W., Kim, S., Cook, M.S., Capel, B., Zhu, R., Matin, A., Sarver, A.L., Parker, K.L., Griswold, M.D., et al. (2009). The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 22323-22328. 10.1073/pnas.0905431106.
  41. Sasagawa, Y., Nikaido, I., Hayashi, T., Danno, H., Uno, K.D., Imai, T., and Ueda, H.R. (2013). Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* *14*, R31. 10.1186/gb-2013-14-4-r31.
  42. Huang, d.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* *4*, 44-57. 10.1038/nprot.2008.211.