

知識天地

從幹細胞到人類生殖細胞的了解

林依瑩、郭紘志、林國儀（基因體研究中心）

摘要

生殖細胞特化於胚胎發育早期，是個體繁衍後代及物種延續之重要關鍵。因此瞭解生殖細胞如何於個體形成的課題，一直是生物學研究之重要課題。基於倫理考量及早期胚胎的研究檢體取得不易等因素，有關人類生殖細胞分化機制之研究變得十分困難。因此使用人類胚胎幹細胞建立研究生殖細胞分化的模式，可提供一研究平台來進一步探討生殖細胞分化的決定因子，以及分化過程中相關的調控機制。本篇文章說明PRDM1於人類生殖細胞的早期分化扮演一個重要角色，藉由抑制神經細胞分化的相關基因表現，而達到促進人類生殖細胞分化的結果。

前言

在胚胎發育的過程中，受精卵來自於生殖細胞的結合，經過數次的細胞分裂形成多細胞聚合體，稱為囊胚。而早期囊胚的內細胞團（Inner Cell Mass）則是胚胎幹細胞（Embryonic Stem Cells）的來源，在囊胚的階段，部分處於內細胞團的細胞接收到來自初始外胚層（Primitive Ectoderm）的訊號，將會朝向初始生殖細胞（Primordial Germ Cells）分化。胚胎內的初始生殖母細胞是生殖細胞的前驅細胞，可依性別經周遭之體細胞之調控而分化為卵原細胞或精原細胞，出生後會在青春期末時繼續發育進行分化為成熟生殖細胞，生殖細胞的結合可再形成新的胚胎。研究人員一直致力於研究人類初始生殖母細胞分化的機制，並試圖在實驗室利用胚胎幹細胞建立原始生殖母細胞，期待能進一步得到成熟的生殖細胞。而結合2006年日本京都大學的山中伸彌教授所發展出，可將已分化的皮膚纖維母細胞轉變為具有多重分化能力之誘導多能幹細胞（Induced Pluripotent Stem Cells）技術，未來人類於實驗室將已分化的體細胞轉變為生殖細胞也可能成真。

生殖細胞的分化

初始生殖細胞的特化於胚胎發育早期發生，而其分化過程也和一般體細胞有所差異，可分為三個階段：特化，遷移，及成熟[1]。原始生殖細胞的特化可分為二種模式：在低等生物是預成（Preformation）模式，是透過卵子中存在的特殊物質，稱為母源生殖細胞質（Germ Plasm）所決定，當卵子受精後會開始不對稱細胞分裂，而分裂後細胞得到母源生殖細胞質將會分化為生殖細胞。另一種則是後生（Epigenesis）模式，主要存在於高等脊椎生物，如老鼠和人類，一開始在胚胎的內細胞團中所有的細胞構造和遺傳物質都是一樣的，而生殖細胞的特化主要是藉由鄰近細胞所釋放的誘導訊息來驅動。以老鼠為例，目前已知細胞膜上帶有Wnt3a訊息傳遞路徑接收器的上胚層細胞，會受到初始外胚層所分泌的骨形成蛋白第四型（Bone Morphogenetic Protein 4, BMP4）誘導，雖然詳細的調控機制還不清楚，受到刺激的細胞則會表現B淋巴球誘導成熟蛋白第一型（B Lymphocyte-induced Maturation Protein-1, Blimp-1），又稱為PRDM1。PRDM1會抑制一般體細胞的分化，使細胞朝向生殖細胞分化[2]。

先前研究顯示在人類胚胎發育第22天可以於胚胎尿囊的底部發現初始生殖細胞。隨著胚胎發育，初始生殖母細胞將沿著後腸的腸繫膜移動，進入生殖脊上的發育中性腺，之後初始生殖細胞開始進行減數分裂，形成初級卵細胞後進入休眠，直到青春期末完成第一次減數分裂後產生卵子。或者是成為精原細胞，爾後經兩次的減數分裂後生成精子。生殖細胞分化過程中，細胞將在不同階段表現出特定的標誌基因。而分化完成後，生殖細胞的形態會發生明顯的改變，生殖細胞的遺傳物質—染色體數目也減為正常細胞的一半，即成為成熟的生殖細胞。

人類胚胎幹細胞—研究細胞分化的模式

胚胎幹細胞是來自於未分化的著床前囊胚的內細胞團，具有分化多種組織細胞的能力。許多研究室試圖利用不同的培養方式分化胚胎幹細胞，以得到初始生殖母細胞，例如Reijo Pera實驗室將人類胚胎幹細胞經由懸浮培養於分化培養液中，細胞可表現出生殖細胞的標誌基因。而額外加入其他的生長因子於培養液中，如BMP4及WNT3A，亦可有效幫助人類生殖細胞的分化[3]。我們的研究則是探討，是否可經由表現決定人類生殖細胞分化的重要因子，進而促進人類胚胎幹細胞分化為生殖細胞。先前研究已知PRDM1是決定老鼠生殖細胞分化的重要因子，但是目前對於人類的生殖細胞分化的起因與分化相關的機制仍有許多未知。因此，我們研究的目的是在探討PRDM1於人類生殖細胞分化中所扮演之角色。

研究一開始先確定人類的生殖細胞是否會表現PRDM1。因此使用約三個月左右之人類胚胎性腺組織進行免疫組織化學染色分析，發現大部分有PRDM1表現的生殖細胞也同時具有OCT4的表現，而分化到後期的生殖細胞具有明顯的遷移後期的標誌基因VASA和減數分裂的標誌基因SCP3，反而失去了PRDM1的表現，這些結果顯示具有PRDM1表現的生殖細胞可能正處於分化為生殖細胞的早期階段[4]。

由於人類胚胎組織取得不易，我們使用人類胚胎幹細胞作為研究體外人類生殖細胞分化的模式。因此將人類胚胎幹細胞於分化培養液中培養，再利用免疫螢光分析，發現由人類胚胎幹細胞分化而得的生殖細胞也同時有PRDM1和OCT4的表現，而具有VASA表現的細胞也喪失了PRDM1的表現，因此使用人類胚胎幹細胞進行實驗的結果與在人類胚胎性腺組織所觀察到的結果相同，代表使用人類胚胎幹細胞作為研究生殖細胞分化的模式是可行的。

而先前研究已報導BMP4及WNT3A可促使人類生殖細胞的分化，我們的結果顯示額外加入這兩個生長因子的培養條件與沒有加的對照組相比，PRDM1的表現上升了三至四倍，而晚期的生殖細胞標誌基因VASA和SCP3也有顯著上升，顯示PRDM1於BMP4及WNT3A所調控生殖細胞分化中扮演一個重要角色。而在相同的細胞培養環境下，利用基因靜默（Gene Silencing）的方式，降低PRDM1的表現，發現即使有BMP4及WNT3A的刺激，人類胚胎幹細胞所分化的生殖細胞的數目與相關的標誌基因都有明顯下降，顯示失去了PRDM1，BMP4及WNT3A將無法調控人類生殖細胞的分化。

之後藉由病毒載體將PRDM1表現於未分化之人類胚胎幹細胞中，可觀察到數個生殖細胞相關的標誌基因表現上升，而且利用基因微陣列（Microarray）技術研究大量基因表現差異，亦發現相較於對照組，送入PRDM1表現的細胞整體基因表現更接近人類胚胎性腺組織。

至此，我們的研究結果顯示了，PRDM1為自人類胚胎幹細胞分化為胚胎生殖細胞的重要因子。接下來，我們繼續探討PRDM1是透過怎樣之機轉來執行它的功能，同時我們想要了解PRDM1調控的下游基因是什麼。因此，透過基因微陣列分析，我們發現PRDM1表現的細胞會失去SOX2的表現。進一步染色質免疫沈澱分析，亦顯示PRDM1可經由直接與SOX2的啟動子結合，進而抑制SOX2的表達。因為SOX2於胚胎發育過程中主要負責維持神經幹細胞的存活與增殖。我們因此想要了解SOX2的表達，是否會對生殖細胞的形成產生負面的影響。而使用病毒載體將SOX2表現於人類胚胎幹細胞，並將細胞在有BMP4及WNT3A的狀態下培養，發現SOX2會阻礙BMP4及WNT3A誘導人類生殖細胞分化的作用，而促使細胞走向神經細胞的分化命運。

綜合以上結果，我們的研究發現了PRDM1於人類生殖細胞分化扮演了重要角色，藉由抑制SOX2的表現同時抑制神經細胞的分化，進而達到促進人類生殖細胞分化的結果。而2015年，Surani教授團隊首次發現已知與內胚層細胞分化有關的SOX17，也表現在人類生殖細胞，可透過調控PRDM1，參與在人類生殖細胞的分化，是目前已知人類生殖細胞最早的標誌基因[5]。此一發現進一步確認了我們先前之研究結果，證明了PRDM1的確對人類生殖細胞早期之特化扮演了重要的角色。

延伸閱讀

1. Aflatoonian, B. and H. Moore, Germ cells from mouse and human embryonic stem cells. *Reproduction* (Cambridge, England), 2006. 132(5): p. 699-707.
2. Ohinata, Y., et al., Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*, 2005. 436(7048): p. 207-213.
3. Chuang, C.-Y., et al., Meiotic competent human germ cell-like cells derived from human embryonic stem cells induced by BMP4/WNT3A signaling and OCT4/EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) selection. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012. 287(18): p. 14389-14401.
4. Lin, I.-Y., et al., Suppression of the SOX2 neural effector gene by PRDM1 promotes human germ cell fate in embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*, 2014. 2(2): p. 189-204.
5. Irie, N., et al., SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell*, 2015. 160(1-2): p. 253-68.