

令和元年6月25日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05636

研究課題名(和文)ES細胞由来始原生殖細胞の増殖・分化機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of proliferation and differentiation of primordial germ cell-like cells derived from ES cells

研究代表者

大田 浩(Ohta, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50391892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,500,000円

研究成果の概要(和文)：始原生殖細胞は精子や卵子の起源となる細胞である。本研究計画ではES細胞から誘導した始原生殖細胞様細胞を用いて、試験管内において始原生殖細胞の増殖・分化誘導系の確立を行った。その結果、forskolinとPDE4 inhibitor (rolipram)を始原生殖細胞に作用させることにより増殖が促進され、retinoic acid (ビタミンA)とBMP4を作用させると雌の生殖細胞へ分化誘導可能なことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

始原生殖細胞を解析する上でこれまでの大きな問題点は、試験管内において適切な培養系が存在しないことであった。本研究計画の成果により、試験管内において始原生殖細胞を一定期間増殖させることが可能となり、また、雌の生殖細胞へ分化させるための因子の同定に成功した。今後、本研究により確立された培養系は、雄性生殖細胞の決定機構および減数分裂機構の解明など生殖細胞分化に関わる解析や他の種への応用など幅広い分野に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Sperm and oocytes are originated from primordial germ cells (PGC), which arise at early embryonic development. In this research, we attempted to establish in vitro culture system of PGC by using PGC-like cells (PGCLC) derived from ES cells. We found that forskolin and PDE4 inhibitor (rolipram) synergistically enhance the proliferation of PGCLC, and addition of retinoic acid (vitamin A) and BMP2 is enough to induce female germ cell pathway in vitro.

研究分野：生殖生物学

キーワード：始原生殖細胞 ES細胞 配偶子形成 増殖 分化 細胞培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖細胞は、始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) を起源とし、マウスでは胎生 7 日 (embryonic day 7; E7) 頃出現する。その後、増殖しながら生殖巣へ向けて移動し、E10 頃、生殖巣に到達する。E12 頃、雌雄の性決定が行われ、それに従い、雄の PGC は細胞増殖を停止し、雌の PGC は減数分裂へと移行する。出生後、性成熟に伴い、精子および卵子へと分化し、配偶子形成が完成する。このように生殖細胞は、非常に複雑な細胞分化過程を経ることにより、次世代にその遺伝情報を継承する能力を獲得することができる。生殖細胞は生命現象の基盤を担う細胞であり、それを理解することは生命科学において非常に重要な研究課題である。しかしながら、PGC を研究する上での最大の障壁は、その増殖・分化を試験管内で操作可能な実験系が存在しないことであった。特に PGC は少数の細胞であり、遺伝学・生化学的解析を行う上で非常に大きな問題となっていた。

2. 研究の目的

研究代表者らは ES 細胞から機能的な始原生殖細胞様細胞 (PGC-like cell; PGCLC) を分化誘導することに成功した。この分化誘導系により多数の PGCLC を得ることが可能となり、これまで不可能であった実験系が可能となってきた。その一例として、研究代表者は PGCLC を用いた high-throughput ケミカルライブラリースクリーニングを実施しており、試験管内で PGCLC の増殖を一定期間支持する化合物として forskolin と PDE4 inhibitor (rolipram) を同定している。本研究課題の目標は、この実験系をさらに発展させる事により、PGCLC を試験管内で自在に増殖・分化させることを可能にする培養系を確立する事である。本研究計画が達成されることにより、PGCLC および PGC の増殖・分化の制御機構が明らかになると共に、新規の発生工学技術の開発に繋がると考えている。

3. 研究の方法

研究代表者はこれまで PGCLC を用いた high-throughput ケミカルライブラリースクリーニングを行っており、PGCLC の増殖を促進する小分子化合物を見出してきた。これらの小分子化合物のうち forskolin と rolipram を PGCLC に作用させて培養すると、1 週間で約 20-30 倍程度に増殖し、それらは PGC マーカーである Blimp1 をはじめ、移動期 PGC のマーカーを発現していた。培養した PGCLC を不妊マウスである 7 日齢の WBB6F1-W/W^v マウスへ移植すると正常な精子形成が認められ、さらに移植したマウスは妊孕性を回復する事が確認された。このように、現時点では一時的にはあるが PGCLC を始原生殖細胞の性質を保ったまま増殖させることが可能であることが明らかとなっている。本研究計画では試験管内で増殖した PGCLC の詳細な性状解析を行うとともに、現在の培養系を改良し、試験管内で PGCLC の増殖・分化を自由に操作できる培養系の確立を試みる。

4. 研究成果

Forskolin と rolipram により増殖した PGCLC の性状解析を行うため、次世代シーケンサーを用いた 3' RNA-sequence により遺伝子発現解析を行った。その結果、試験管内で増殖した PGCLC は生体の E9.5-11.5 相当の性決定前の PGC と類似した遺伝子発現を示すことが明らかとなった (図 1A)。次に、パイサルファイトシーケンスによりエピゲノム解析を行ったところ、試験

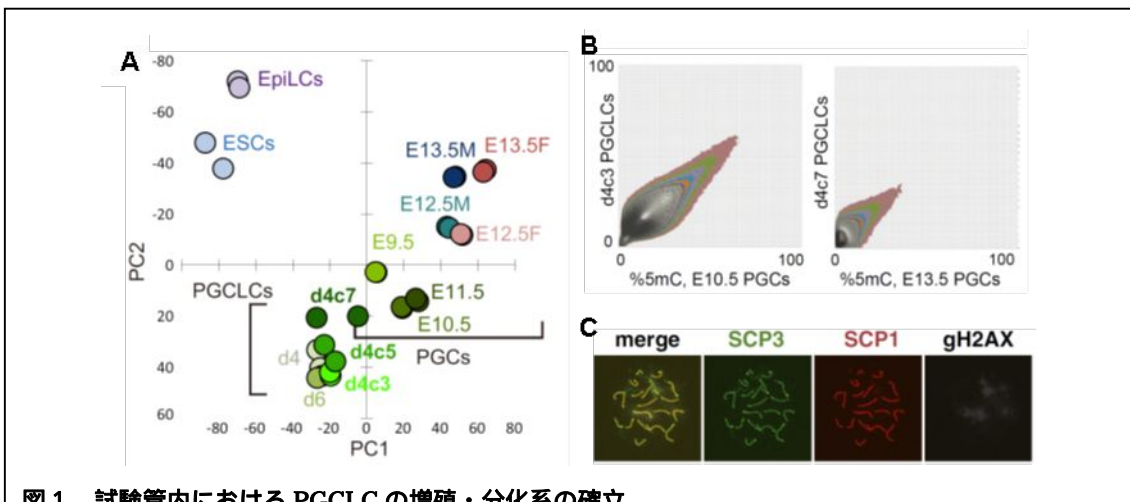


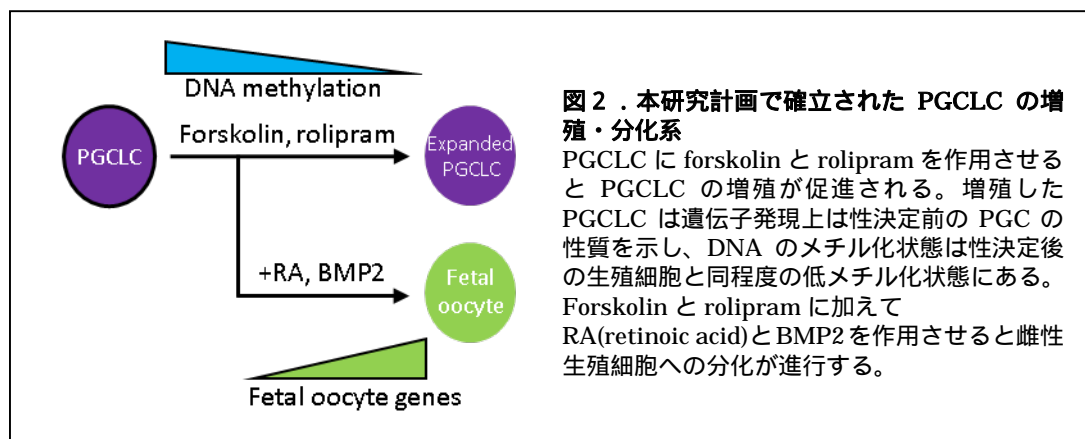
図 1. 試験管内における PGCLC の増殖・分化系の確立

(A) Forskolin と rolipram により増殖した PGCLC の遺伝子発現。PCA を示す。試験管内で増殖した PGCLC は生体の E9.5-11.5 の PGC と類似した遺伝子発現を示す。(B) パイサルファイトシーケンスによるエピゲノム解析。試験管内で増殖した PGCLC のゲノムのメチル化レベルを生体の PGC と比較。培養 3 日後 (左図) および 7 日後 (右図) の PGCLC はそれぞれ E10.5 および E13.5 の PGC と同程度のメチル化レベルを示す。(C) RA (retinoic acid) と BMP2 の添加による雌性生殖細胞への分化誘導。RA と BMP2 を添加することにより減数分裂マーカー (SCP3, SCP1) を発現する PGCLC を確認することができる。発表論文 4, 6 から抜粋・改変。

管内で増殖した PGCLC のゲノムは生体の性決定後の PGC (E13.5) と同程度の低メチル化状態にあることが示された (図 1B)。これらの結果から、PGC の性決定には生殖巣体細胞などからのシグナルが必要であるが、ゲノムの脱メチル化は培養下の増殖中に起こることが示された。

Forskolin と rolipram で増殖した PGCLC は遺伝子発現上、性決定前の性質を示すことから、本培養系に適切な因子を加えることにより性決定因子を同定できると考え、既知の情報および遺伝子発現解析結果をもとに探索を行った。その結果、雌性生殖細胞への性決定には retinoic acid (RA) と BMP2 が十分条件であることが明らかとなった (図 1C)。

本研究により試験管内で一定期間 PGCLC を増殖させることが可能な培養系が確立でき、さらに雌性生殖細胞の性決定に関わる因子の同定に成功した (図 2)。今後、本研究により確立された培養系は、雄性生殖細胞の決定機構および減数分裂機構の解明など生殖細胞分化に関わる解析や他の種への応用など幅広い分野に貢献できると考えられる。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Sakamoto S, Thumkeo D, Ohta H, Zhang Z, Huang S, Kanchanawong P, Fuu T, Watanabe S, Shimada K, Fujihara Y, Yoshida S, Ikawa M, Watanabe N, Saitou M, Narumiya S. mDia1/3 generate cortical F-actin meshwork in Sertoli cells that is continuous with contractile F-actin bundles and indispensable for spermatogenesis and male fertility. *PLoS Biol.* 2018;16:e2004874.

doi: 10.1371/journal.pbio.2004874.

Miyauchi H, Ohta H, Saitou M. Induction of fetal primary oocytes and the meiotic prophase from mouse pluripotent stem cells. *Methods Cell Biol.* 2018;144:409-429.

doi: 10.1016/bs.mcb.2018.03.035.

Mitani T, Yabuta Y, Ohta H, Nakamura T, Yamashiro C, Yamamoto T, Saitou M, Kurimoto K. Principles for the regulation of multiple developmental pathways by a versatile transcriptional factor, BLIMP1. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:12152-12169.

doi: 10.1093/nar/gkx798.

Miyauchi H, Ohta H, Nagaoka S, Nakaki F, Sasaki K, Hayashi K, Yabuta Y, Nakamura T, Yamamoto T, Saitou M. Bone morphogenetic protein and retinoic acid synergistically specify female germ-cell fate in mice. *EMBO J.* 2017;36:3100-3119.

doi: 10.15252/embj.201796875.

Hirota T, Ohta H, Powell BE, Mahadevaiah SK, Ojarikre OA, Saitou M, Turner JMA. Fertile offspring from sterile sex chromosome trisomic mice. *Science.* 2017;357:932-935.

doi: 10.1126/science.aam9046.

Ohta H, Kurimoto K, Okamoto I, Nakamura T, Yabuta Y, Miyauchi H, Yamamoto T, Okuno Y, Hagiwara M, Shirane K, Sasaki H, Saitou M. In vitro expansion of mouse primordial germ cell-like cells recapitulates an epigenetic blank slate. *EMBO J.* 2017;36:1888-1907.

doi: 10.15252/embj.201695862.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：始原生殖細胞/始原生殖細胞様細胞の維持増幅及び分化誘導方法

発明者：斎藤通紀、大田 浩、宮内英孝

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2018/045011

出願年：2018 年

国内外の別：PCT 出願

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。