

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14365

研究課題名(和文)試験管内におけるES細胞から始原生殖細胞の効率的な分化誘導方法の開発

研究課題名(英文) Establishment of efficient induction system for primordial germ cells from ES cells in vitro

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はマウスにおいてES細胞から機能的な始原生殖細胞様細胞(primordial germ cell-like cell;以下、PGCLC)を誘導することに成功している。本研究計画はPGCLCの分化誘導効率の大幅な上昇を目指す事を目的とし、そのため、PGCLCの形成過程を詳細に解析した。その結果、PGCLCの分化誘導効率はマウスの遺伝的背景に大きく影響され、また、PGCLCの前駆細胞であるEpiLC(epiblast-like cell)にはheterogeneityが存在することが明らかとなった。これらの結果は今後のPGCLCの誘導効率の更なる向上に繋がるものと考えられる。

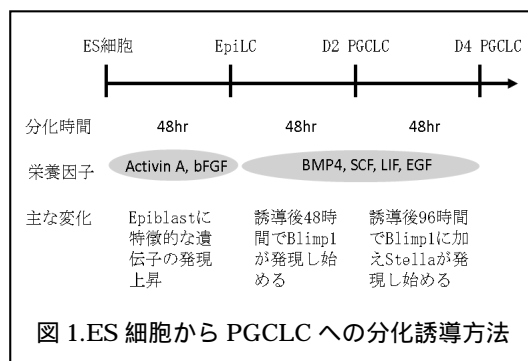
研究成果の概要(英文)：We have succeeded in inducing functional PGCLCs (primordial germ cell-like cells) from ESCs in vitro. In this research, we analyzed the procedure of PGCLC formation to enhance the induction rate of PGCLCs. We identified heterogeneity in EpiLCs (epiblast-like cells), a precursor of PGCLCs, and found that the induction rate of PGCLCs was affected by mouse genetic background. Our findings will provide an improved procedure for inducing PGCLCs from ESCs 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 EpiLC 分化誘導

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らはマウスにおいて ES 細胞から機能的な始生殖細胞様細胞 (primordial germ cell like cell; 以下、PGCLC) を誘導することに成功している。この分化誘導系では ES 細胞を Activin A および bFGF の添加により Epiblast 様細胞 (Epiblast like cell; 以下、EpiLC) に分化させることから始まる (図 1)。次いで EpiLC に BMP4, SCF, LIF, EGF を作用させることにより PGCLC へと分化誘導させる (図 1)。PGCLC への分化誘導後、48 時間で生殖細胞特異的遺伝子である Blimp1 が発現し始め (図 1; D2 PGCLC)、さらにその 48 時間後に同じく生殖細胞特異的遺伝子である Stella が発現し始める (図 1; D4 PGCLC)。これまで研究代表者らは D4 PGCLC を精巣もしくは卵巣に移植することにより産仔能を有する精子もしくは卵子に分化誘導することに成功している。このように PGCLC の分化誘導系は基礎生物学のみならず、発生工学、ヒトの不妊症の解明など、幅広い応用が期待されるが、その詳細な試験管内分化機構は未だ不明であった。特に、この分化誘導系では PGCLC の分化誘導効率は 10 - 20% 程度であり、その他の細胞はテラトーマ形成能を有する細胞であることが示されていた。PGCLC の試験管内分化機構を解析することにより、PGCLC をより効率良く分化誘導することが可能となり、また、テラトーマ形成能を有する細胞の特性が明らかになると考えられた。



### 2. 研究の目的

本研究計画では PGCLC の分化誘導系を詳細に検討する事により、ES 細胞から PGCLC の分化機構の解明を試みるとともに、その分化誘導効率の大幅な上昇を目指す事を目的とする。

### 3. 研究の方法

ES細胞から PGCLC の分化誘導効率を大幅に上昇させることを最終目標とし、そのために下記の実験を試み目標を達成させる。

(1) PGCLC 分化誘導過程における EpiLC の細胞特性の解析

(2) 増殖維持可能な EpiLC 細胞株の樹立

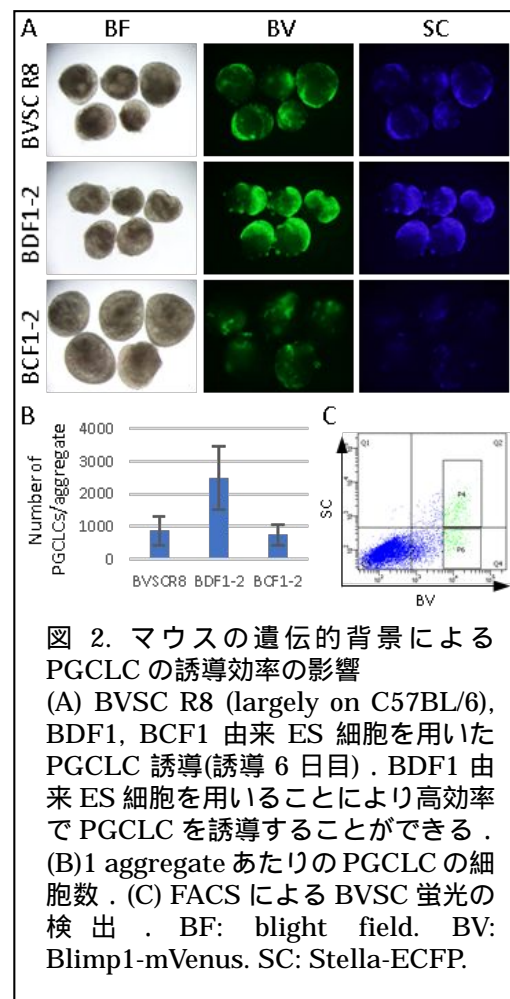
(1) の実験では EpiLC に heterogeneity が存在し、一部の細胞集団が PGCLC に分

化し得ると仮説を立て、PGCLC へ分化し得る EpiLC の細胞集団の同定と精製を試みた。この実験は主に各種細胞マーカーの発現を FACS により解析することにより行う。また、PGCLC の分化誘導の際に認められる PGCLC 以外の細胞について、遺伝子発現等の性状解析を行う。(2) の実験では各種培養方法、サイトカイン、small molecule を組み合わせることにより、PGCLC への分化能を有する新規細胞株の樹立を試みた。

### 4. 研究成果

(1) PGCLC 分化誘導過程における EpiLC の細胞特性の解析

これまで研究代表者が PGCLC の分化誘導に用いていた ES 細胞は主に C57BL/6 の遺伝的背景を有する ES 細胞 (BVSC R8) であった。一般的に、細胞培養を行うにあたり、近交系由来の細胞は弱いことが知られているため、雑種第一代 (F1) 由来の ES 細胞の樹立を試み、PGCLC の分化誘導効率を解析した。具体的には、BDF1 (C57BL/6 x DBA/2) および BCF1 (C57BL/6 x C3H) の胚盤胞より ES 細胞を樹立し、従来と同様の方法で PGCLC の分化誘導を行った。その結果、BDF1 由来の ES 細胞 (BDF1-2) を用いた場合に PGCLC の誘導効率が最も良いことが明らかとなった (図 2)。



また、BDF1-2 由来の PGCLC を幼弱期不妊マウスの精巣に移植すると正常な産仔能を有する精子を得ることに成功した。以上の結果から、上記 (1) および (2) の実験には主に BDF1 由来の ES 細胞 (BDF1-2) を使用することとした。

次に研究代表者は、PGCLC の誘導過程に観察される PGCLC 以外の細胞について、その細胞周期解析を行った。PGCLC 誘導 6 日目の細胞凝集塊を BrdU でラベルし、FACS により解析したところ、PGCLC では S 期が約 60% 程度と非常に高く、一方、PGCLC 以外の細胞では S 期の割合が 45% と低下を認められた (図 3)。特に、PGCLC 以外の細胞では G1 期の割合の増加が認められた (図 3)。また、同様の結果が Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) ES 細胞を用いた PGCLC 誘導でも認められた。以上の結果から、PGCLC 誘導の際に認められる PGCLC 以外の細胞はテラトーマ形成能を有するが、その細胞周期は PGCLC と比較して遅いことが明らかとなった。現在、どの細胞集団がテラトーマを引き起こすのかを解析中であり、各細胞集団の性質を明らかにした後、RNA sequence 等により遺伝子発現解析を行う予定である。

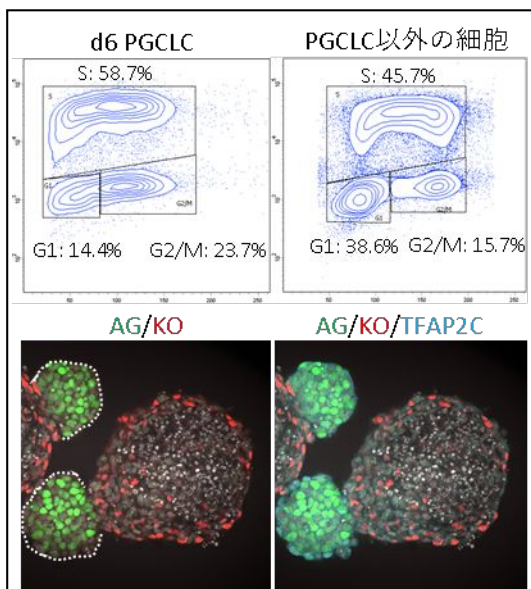


図 3 . PGCLC と PGCLC 以外の細胞の細胞周期解析

(上段)誘導 6 日目における PGCLC (上段:左)とそれ以外の細胞(上段:右)の細胞周期解析。BrdU ラベル後 FACS により解析した。縦軸: BrdU.横軸: DNA 染色 (7AAD)。(下段)FUCCI レポーターを有する ES 細胞からの PGCLC 誘導。誘導 6 日目の共焦点写真。AG: Azami green (S/G2/M 期を示す)。KO: Kusabira orange (G1 期を示す)。TFAP2C: 生殖細胞特異的のマーカ。破線は PGCLC が凝集している領域を示している。

PGCLC の分化誘導効率とその前駆細胞である EpiLC の heterogeneity に起因するのかを解析するため、EpiLC の細胞表面抗原の発現を FACS により解析した。その結果、多くの細胞表面抗原は均一な発現を示すが、一部の抗体において heterogeneity が存在することが示された (図 4)。現在、これらの抗体を組み合わせることにより PGCLC へ高効率で分化することが可能な細胞集団の同定を試みている。

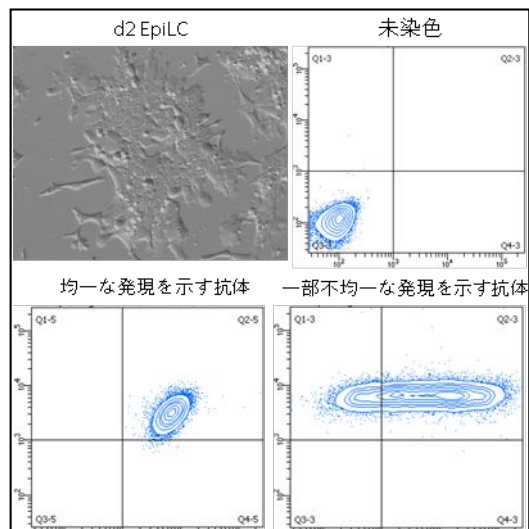


図 4 . EpiLC における各種細胞表面マーカーの発現解析

(左上)EpiLC 誘導 2 日目 (d2 EpiLC) の写真。(右上) d2 EpiLC の未染色サンプルの FACS プロット。(左下) 均一な発現を示す抗体の FACS プロット。(右下) 一部不均一な発現を示す抗体の FACS プロット。横軸で示した抗体において陰性、陽性の細胞が確認できる。

## (2) 増殖維持可能な EpiLC 細胞株の樹立

EpiLC の性質を維持した状態で細胞株の樹立が可能かどうか、各種培養方法、サイトカイン、small molecule を組み合わせることにより試みた。現在のところ、増殖性の細胞を得ることに成功しているが、その PGCLC の誘導効率は低く、更なる改善が必要と考えられた。引き続き条件検討を試みることにより、高効率で PGCLC へと分化し得る細胞株の樹立を試みたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Hiroshi Ohta, Kazuki Kurimoto<sup>1</sup>, Ikuhiro Okamoto, Tomonori Nakamura, Yukihiro Yabuta, Hidetaka Miyauchi, Takuya Yamamoto, Yukiko Okuno, Masatoshi Hagiwara, Kenjiro Shirane, Hiroyuki Sasaki, Mitinori Saitou\*. (2017). Expansion of

mouse primordial germ cell-like cells in culture reconstitutes an epigenetic blank slate. **The EMBO Journal** (in press). DOI 10.15252/embj.201695862

Yukiko Ishikura, Yukihiko Yabuta, **Hiroshi Ohta**, Katsuhiko Hayashi, Tomonori Nakamura, Ikuhiro Okamoto, Takuya Yamamoto, Kazuki Kurimoto, Kenjiro Shirane, Hiroyuki Sasaki, Mitinori Saitou. (2016). In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells. **Cell Reports** 17:2789-2804.

Chika Yamashiro, Takayuki Hirota, Kazuki Kurimoto, Tomonori Nakamura, Yukihiko Yabuta, So I. Nagaoka, **Hiroshi Ohta**, Takuya Yamamoto, Mitinori Saitou. (2016). Persistent Requirement and Alteration of the Key Targets of PRDM1 During Primordial Germ Cell Development in Mice. **Biology of Reproduction** 94:1-14.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大田 浩 (OHTA Hiroshi)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：50391892

### (2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者