

令和元年6月13日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06802

研究課題名(和文) 多能性幹細胞を起点とする雄性生殖細胞発生過程の試験管内再構成

研究課題名(英文) In vitro reconstitution of male germ cell development from pluripotent stem cells

研究代表者

石蔵 友紀子 (Ishikura, Yukiko)

京都大学・医学研究科・特定研究員

研究者番号：00807943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の生殖細胞系譜は、受精卵に始まり雌雄分化能を持つPGCsを経て、配偶子へと分化する。その過程で、エピゲノムリプログラミング、性分化、減数分裂などの重要な制御が行われる。近年、マウス多能性幹細胞を起点とし、PGC様細胞(PGC-like cells; PGCLCs)を経て、卵母細胞様細胞および精原幹細胞様細胞を誘導する体外培養系が報告された。一方で、これら体外培養系により誘導された細胞は、エピゲノム異常などに起因する様々な異常を呈していた。本研究では再構成精巣法をより生体の条件に則したものに改善することで、多能性幹細胞から高い精子形成効率を有するGSCLCsを誘導する方法論を開発する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験系が確立すれば、雄性生殖細胞分化機構、雄性エピゲノム獲得・制御機構、精原幹細胞の分化機構などの、雄性生殖細胞発生過程に附随する、生物学的に重要な様々な事象が、多能性幹細胞を用いたゲノム編集技術と組み合わせ、全て試験管内で解析可能となると期待される。また、本実験系は、医学生物学的に重要な、サルやヒト、もしくは他の希少哺乳類の多能性幹細胞を起点とした、雄性生殖細胞系譜の誘導研究とその応用の基盤となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The mammalian germline lineage begins at the fertilized egg and differentiates into gametes via PGCs capable of differentiating male and female. In the process, important controls such as epigenome reprogramming, sexual differentiation and meiosis are performed.

In recent years, an extracorporeal culture system has been reported in which oocyte-like cells and spermatogonia stem cell-like cells are induced from mouse pluripotent stem cells via PGC-like cells (PGC-like cells; PGCLCs). On the other hand, cells induced by these in vitro culture systems exhibited various abnormalities caused by epigenome abnormalities and the like.

In this study, we will develop a methodology to induce GSCLCs with high spermatogenic efficiency from pluripotent stem cells by improving the reconstructed testis method to one more compliant with the conditions of the living body.

研究分野：分子生物学

キーワード：精原幹細胞 多能性幹細胞

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

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の発生機構の解明及びその試験管内再構成は、発生学や生殖医学の発展に貢献する。生殖細胞系譜は、始原生殖細胞 (Primordial germ cells; PGCs) を起点として、複雑な発生過程を経て配偶子の形成に至る。その過程で、エピゲノムリプログラミングや、性分化、減数分裂などの重要な制御が行われる[1]。近年、マウス多能性幹細胞を起点とし、PGC 様細胞(PGC-like cells; PGCLCs)を経て、卵母細胞様細胞および精原幹細胞様細胞を誘導する体外培養系が報告された[1][2][3]。一方で、これら体外培養系は、生体内の発生過程を完全には再現しておらず、産生された細胞及びそれらに由来する産仔は、エピゲノム異常などに起因する様々な異常を呈し、その培養系の改善は喫緊の課題である。本研究では、雄性生殖細胞の発生過程に注目し、その試験管内再構成系の改善と、それをを用いた応用研究の基盤を形成することを目標とする。

2. 研究の目的

本研究では、起点として使用する PGCLCs の状態を改善すること、再構成精巣の培養法をより生体の条件に則したものに改善することで、多能性幹細胞から高い精子形成効率を有する GSCLCs を誘導する方法論を開発することを目的とする。その目的を達成するために、雄性生殖細胞分化過程を可視化するレポーター-ESCs の作製、胎児精巣を様々な条件で培養し、その結果を評価することで、生殖細胞と体細胞両者の分化に至適な培養条件を同定、様々な培養条件の PGCLCs を起点として再構成精巣培養を行い、最適な起点材料を選択、とにて検証した至適条件を用いて、で作製したレポーター-ESCs を起点に GSCLCs を作製、その機能解析と特性解明を行う。これらの研究にて至適な方法論が開発されれば、それらを基盤に、適切な雄性エピゲノム獲得機構の解明、再構成精巣形成過程の imaging 解析、雄性生殖細胞分化動態解明の研究などを展開したい。

3. 研究の方法

本研究では、多能性幹細胞から高い精子形成効率を有する GSCLCs を誘導する方法論を開発するために、起点として使用する PGCLCs の状態の改善、再構成精巣培養のより生体の条件に則した方法への改善を行う。これら目的を達成するために、1. 雄性生殖細胞分化過程を可視化するレポーター-ESCs の作製、2. 胎児精巣を様々な条件で培養し、その結果を多角的に検証することで、生殖細胞と体細胞、両者の分化に至適な培養条件を同定、3. 様々な培養条件の PGCLCs を起点として再構成精巣培養を行い、最適な起点材料を選択、4. 1 で得た材料を用い 2 と 3 から得られた条件にて GSCLCs を作製、移植による機能の確認と様々な分子生物学的特性解析を行う。

4. 研究成果

(1)Nanos2-tdTomato レポーターマウスの作製

初期生殖細胞のマーカータンパク質 Blimp1 および Stella のレポーターを両方持つ BVSC BDF1-2-1 ES 細胞株を用い、CRISPR/Cas9n を用いた遺伝子ターゲティングを行った。ターゲティングベクターは Nanos2 のエクソンから終止コドンを除き (Nanos2 は 1 つのエクソンによりコードされる) 下流に蛍光タンパク質 tdTomato と薬剤耐性遺伝子 Pgk-Neo を挿入したものをを用いた。作成した Nanos2 レポーターは生体内において、E13.5 で生殖巣の一部で蛍光が認められ、E15.5 で最も明るい蛍光が観察された。先行研究の結果と合わせ、レポーターは Nanos2 遺伝子の発現を正確に表していると考えられた。tdTomato の半減期は 1 時間と報告されており、Nanos2 の増減と大きな時間差なく蛍光強度が変わるため、生体内での発現を解析するには有用なレポーターとなると考えられる。

(2)性分化期の胎児精巣の培養に最適な培地の同定

これまで、再構成精巣の培養は、小川らが、新生仔/成体精巣の培養にて減数分裂への移行を指標として選択した条件に基づき[4]

], αMEM に 10% KSR (KnockOut™ Serum Replacement) を添加した培地(αMEM-10%KSR) を用いてきた。一方で、KSR を含む培地を胎児精巣の培養に用いると、雄性生殖細胞の発生に鍵となる複数の遺伝子の発現が抑制される傾向にあることが近年報告された[5]。そこで、本研究では、Ddx4-RFP マウスの胎児精巣(E12.5)を単離し、基礎培地(DMEM, GMEM, DMEM/F12, RPMI1640, StemPro®-34, MesenPro RS™など)、血清・KSR 濃度、酸素濃度などの条件を組み合わせ、短期間培養を行った。単離した胎児精巣を、各培地において 7 日間培養したところ、精巣全体の大きさが約 1.3 倍程度大きくなり、大きく生体の精原細胞分化時期に相当する)、MVH レポーターの蛍光強度は生体の E12.5 から E15.5 以降相当まで増強する条件を見出した。またこの条件にて培養した胎児精巣から採取した MVH 陽性細胞では、精原細胞にて発現が確認される Zbtb16 や Nanos2 の発現が認められた。

(3)再構成精巣に最適な起点材料の同定

これまで、本研究における再構成精巣の起点として、EpiLCs から誘導 4 日目の PGCLCs (d4PGCLCs)を用いてきた。この d4PGCLC は、生体における移動期(E8.5~9.5)PGCs に相当

する。この時期 PGCs はゲノムワイドな脱メチル化途上であり、~50-60%のメチル化を有する。所属研究室では、BVSC 陽性 PGCLCs の増殖活性を指標に~2,000 化合物をスクリーニングし、d4PGCLCs を、その特性を維持したまま、7 日間平面培養し、最大 50 倍に増殖させる方法論を開発した[6]。本培養中、PGCLCs はゲノムワイドな DNA 脱メチル化を進行し、培養 7 日目までに、雌雄分化直前の状態に相当するメチル化状態(ゲノムワイドに~5%)を獲得する。また、3 日、5 日、7 日と培養した PGCLCs の遺伝子発現解析から、後期 PGCs および、雌雄生殖細胞分化マーカーの発現は上昇しておらず、雄性生殖細胞分化の起点として最適な開始材料であると考えられる。この細胞を起点とすることで、PGCLCs の不十分な脱メチル化に起因する、精子形成異常の可能性を排除出来ると考察される。

本実験では、当研究室で樹立した BVSCVR および BVSCNT の ESCs を用い、(2)で決定した培養条件にて、培養 3 日、5 日、7 日と振った培養 PGCLCs を起点として再構成精巣培養を行い、雄性生殖細胞マーカーが生体に則したタイミングで上昇する適切な起点材料を選定した。

(4)改善した再構成精巣培養法による PGCLCs の分化

(1),(2),(3)から選定した、至適条件にて培養 PGCLCs と胎児精巣からなる再構成精巣を培養したところ、培養開始 3 日ごろから、培養 PGCLCs では発現のなかった後期 PGC マーカーが上昇することが、蛍光顕微鏡と FACS 解析から確認された。さらに 7 日間の培養にて、精原細胞マーカーでもある NANOS2 の発現も蛍光顕微鏡と FACS 解析から確認された。

以上の結果、至適な方法論が開発できた。これらを基盤に、今後適切な雄性エピゲノム獲得機構の解明、再構成精巣形成過程の imaging 解析、雄性生殖細胞分化動態の解明研究などを行う予定である。

[1] Saitou, M. and Miyauchi, H., Cell stem cell, 18(6), 721-735 (2016)

[2] Ishikura, Y. et al., Cell Reports, 17, 2789-2804 (2016).

[3] Hikabe, O. et al., Nature, 539, 299-303 (2016).

[4] Sato, T. et al., Nature, 471(7339), 504-507 (2011)

[5] Hogg, K. et al., Stem cells and development, 24(24), 2899-2911(2015)

[6] Ohta, H. et al., vol. 36, p.1888-1907, (2017)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Chika Yamashiro, Kotaro Sasaki, Yukihiro Yabuta, Yoji Kojima, Tomonori Nakamura, Ikuhiro Okamoto, Shihori Yokobayashi, Yusuke Murase, Yukiko Ishikura, Kenjiro Shirane, Hiroyuki Sasaki, Takuya Yamamoto, Mitinori Saitou. "Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro." *Science* 362.6412 (2018): 356-360.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 1 件)

Ishikura, Yukiko, and Mitinori Saitou. "In Vitro Spermatogenesis." (2018): 134-143.

Author: Ishikura, Yukiko

Book: Encyclopedia of Reproduction

ISBN : 0-12-815145-5, 978-0-12-815145-7

Date: 2018

Start Page 134-143

DOI : 10.1016/B978-0-12-801238-3.64441-0

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

出願番号 : 特願 2017-113054

出願日 : 2017年6月7日

発明の名称 : 多能性幹細胞から生殖系列幹細胞様細胞への分化誘導方法

国内外の別 : 国内

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。