

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06678

研究課題名(和文) 誘導卵巣構築ユニットを用いたマウスES細胞のみからの卵子産生

研究課題名(英文) Oocyte production with the set of ovarian follicle progenitors induced from mouse ESCs

研究代表者

吉野 剛史 (Yoshino, Takashi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10749328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣の体細胞をマウスES細胞から誘導した。誘導細胞が、胎児卵巣の全ての体細胞サブポピュレーションに分化していることもシングルセルRNA-seq解析によりを確認した。さらに誘導細胞を誘導始原生殖細胞(雌)と凝集して生殖巣を再構築し、体外で培養すると生体の卵巣形成過程を模倣して発生することを分化レポーターを利用し確認した。すなわち、生殖細胞は減数分裂を起こし、卵へと分化し、これをFoxl2陽性の雌性支持細胞とNr5a1強陽性の莢膜細胞を覆う卵巣構造が再構築された。さらに、この卵巣を成長・成熟培養に供し、MII卵を得て、体外受精により産仔をえた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により初めて卵巣オルガノイドが多能性幹細胞から再構築された。卵巣と精巣の原基である未分化生殖巣を構成する細胞は始原生殖細胞(PGC)と体細胞に分けられ、発生は体細胞に主導される。これまでにPGC様細胞はマウス、ヒトなどの多能性肝細胞から誘導されたが、体細胞の誘導研究は進んでいなかった。本研究は、マウスES細胞から生殖巣体細胞を誘導しPGC様細胞と生殖巣(卵巣)を構築し卵子を作出できた点で学術的及び社会的に意義が大きい。本研究の成果をもとに、ヒトなど多くの動物の生殖巣オルガノイドを利用してのヒトなどの種特異的な生殖細胞/生殖巣の形成に関する研究が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：I induced ovarian somatic cells from female mouse ESCs by the appropriate treatment with molecules that function in vivo. Single-cell RNA-seq analysis showed that cells differentiated into all ovarian somatic cell subpopulations. We named these cells FOSLCs (Fetal Ovarian Somatic cell-Like Cells).

Subsequently, we reconstructed ovarioids by reagggregating Primordial Germ Cell Like Cells (PGCLCs) and FOSLCs. In ovarioids, cells recapitulated ovarian development. On day 23, ovarioid forms numerous follicles where oocytes were surrounded by multilayered granulosa cells and theca cells, both of which are known to play central roles in female hormone secretion. Then, oocytes developed into MII oocytes, by in vitro growth and in vitro maturation culture. We also confirmed the functionality of MII oocytes by in vitro fertilization. Fertilized embryos at the 2-cell stage were transplanted into pseudopregnant mice, pups were obtained.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウスES細胞 卵巣オルガノイド 卵巣サブポピュレーション 再構築卵巣

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年ミニ臓器 (オルガノイド) を利用して器官の形成過程を理解し、医療に応用する試みがなされている。その出発点となる ES/iPS 細胞は Crispr-Cas9 法などにより高効率に遺伝子操作を行える。加えてオルガノイドはレポーター遺伝子を利用することで形成過程を体外で可視化して観察できる。一方で、オルガノイドを構築できる器官は限られており、より多くの器官のオルガノイド構築が重要な課題の一つと言える。

生殖巣 (卵巣と精巣) は生殖細胞を産生しつつ性ホルモンを分泌して個体の性特異的な体を作る。生殖巣オルガノイドを多能性幹細胞から構築できれば、様々な波及効果が得られる。ヒトの生殖巣オルガノイドは、不妊、性分化疾患などの原因究明や治療薬スクリーニングのための解析モデル系になる。また、ヒト生殖巣オルガノイドから得られた生殖細胞を利用できれば新規の不妊治療法が確立される。一方、絶滅危惧種の生殖巣オルガノイドを構築して生殖細胞を産生できれば、種の保存の道も開かれる。

機能的なオルガノイドを構築するには、器官の形成機構を理解し、再現する必要がある。生殖巣は発生中期に見られる雌雄同体の未分化生殖巣が性分化をすることで形成される。未分化生殖巣を構成する細胞は、生殖細胞の前駆細胞である始原生殖細胞 (PGCs: Primordial Germ Cells) と体細胞に分けられ、その発生は体細胞に主導される。体細胞性の支持細胞は周辺の細胞の性分化を促すのに加え、生殖細胞の発生を支持する。また間質の体細胞の一部は性ホルモン分泌細胞へと分化する。

研究開始当初、マウスやヒトの PGC 様細胞 (PGCLCs) が多能性幹細胞から誘導されていた。マウスのメス PGCLCs はマウス胎児卵巣体細胞により作られる卵胞環境内で卵へと発生し、得られた卵子は受精させると産仔が作出された。一方、ヒトのメス PGCLCs はマウス胎児卵巣体細胞により作られた環境下でも卵原細胞まで分化するが、これ以上発生を進めることはなかった。このため、各々の動物種の胎児の卵巣体細胞を取得することが重要な課題として残されていた。

解決策として、胎児の卵巣体細胞も多能性幹細胞から誘導することが有効であることが期待されていた。生殖巣の体細胞はマウス胚では胎齢 10 日目 (E10.0) 頃、ニワトリ胚では E3.0 頃に中腎の腹側の体腔を覆う上皮に認められる。しかし、この細胞がどのように初期の胚に出現するかは分かっていなかった。応募者はトリ胚を用いその一端を見出していた。すなわち、E2.0 頃に体腔上皮の前駆組織である側板中胚葉 (LPM) と中間中胚葉 (IMM) の境界に生殖巣体細胞と中腎の被膜の共通の前駆細胞が存在する。この腹側に内胚葉から分泌された SHH が到達して Hh-BMP4 シグナルを活性化することで生殖巣の細胞へと運命づけるのである。

続いて我々は上記成果を元に生殖巣体細胞の主要マーカー (Nr5a1 など) を発現する細胞をマウス ES 細胞から誘導する方法を確立した。しかし、この細胞を PGCLCs との共培養に用いても、形成される卵胞の数は胎児卵巣体細胞を用いたときに比べ 1%程度だった (凝集塊あたりの卵胞数; 胎児卵巣体細胞: 200 個程度/誘導細胞: 1-2 個)。

誘導細胞が卵胞形成能を持たない理由として、適切に胎児卵巣体細胞のサブポピュレーション分化を起こせていない可能性も予想された。研究開始当初、シングルセル RNA-seq 解析の技術が確立され、胚発生過程での生殖巣体細胞の分化様式の理解が深まりつつあった。その結果、雌雄ともに E10.5 までに Nr5a1 陽性の細胞として現れた胎児生殖巣の体細胞はすぐに支持細胞と間質細胞に分かれることが示された。その後、支持細胞は性決定を経る一方、間質の細胞の一部は徐々に性ホルモン分泌細胞へと発生を進めることが分かりつつあった。

2. 研究の目的

応募者の誘導法を進展させ、生体の胎児卵巣体細胞と同等のサブポピュレーション分化能及び卵胞形成能を持つ細胞をマウス ES 細胞から誘導することである。さらに、この誘導細胞と PGCLCs の共培養により再構築した胚性の雌性生殖巣オルガノイドを卵巣オルガノイドへと発生させ機能的な卵子を作出することである。その結果、多くの動物の多能性幹細胞から卵巣オルガノイドを作出しての卵子産生の基盤がつけられる。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために、生殖巣体細胞マーカー (Nr5a1-hCD271) に加え雌性支持細胞レポーター (Foxl2-tdTomato) を持つ ES 細胞を樹立した。加えて CD140a を間質細胞/前駆細胞マーカーとしサブポピュレーション分化を FACS 解析により 1 細胞レベルで評価した。評価する時期は、胎児生殖巣細胞が現れる時期 (E9.5) から PGCLCs 発生支持能を持つ時期 (E12.5) に相当する時期とした (誘導 6-10 日目: 応募者の誘導法により ES 細胞は胚発生速度を模倣して分化を進める)。さらにより詳細にサブポピュレーション分化を評価するためにシングルセル RNA-seq 解析も行った。

一方で、PGCLCs の卵発生を支持しうる細胞を誘導するために、誘導条件の微修正を行った。具体的には、分化誘導培地に添加する代替血清濃度や培養用の低吸着プレートの種類などである。

また、培養期間（誘導細胞の分化ステージ）も評価した。これらの条件により誘導された細胞と PGCLCs を凝集させ、生殖巣オルガノイドを再構築し、培養し、卵巣オルガノイドへの発生を以下の通り評価した。

培養 3 日目：体細胞との相互作用により生殖細胞で活性化される MVH の PGCLCs での発現

培養 7 日目：誘導体細胞での Foxl2-tdTomato の発現と PGCLCs での減数分裂マーカー（SCP3）の発現

培養 14 日目：PGCLCs の卵分化（Stella-CFP の発現の活性化と細胞の成長）と初期卵胞形成（Foxl2 陽性の顆粒膜細胞が卵を覆う構造）

培養 23 日目：卵胞での顆粒膜細胞（Foxl2-tdTomato+）の重層化と莢膜細胞（Nr5a1-hCD271 強陽性）分化。

続いて、卵巣オルガノイドの卵胞の機能性を調べるために、各卵胞を単離し、卵胞刺激ホルモンを添加した成長培養により培養した。成長培養 12 日目に顆粒膜細胞に由来する卵丘細胞と卵母細胞による Cumulus Oocyte Complex (COC) が形成されているかを実体顕微鏡で観察した。さらに、Phalloidin により F-アクチンを染色し、卵丘細胞と卵母細胞間での物質のやりとりを担う TZP (Transzonal Projection) が形成されているのかも観察した。続いて、COC を EGF やゴナトロピンを添加した成熟培養に供することで膨潤化が起きるのかを観察した。また、卵母細胞のうち極体を放出した卵子へと発生する割合を測定した。得られた卵子は ICR マウスの精子と人工受精させて、体外で KSOM 培地内において培養した。また人工受精により得られた 2 細胞を偽妊娠マウスの卵管に移植した。さらに得られた産仔を 1 年以上飼育し成長を観察した。また雌雄のマウス同士で交配させその妊孕性を確認した。

4. 研究成果

本研究により誘導された細胞が胚発生過程を模倣してサブポピュレーション分化を示すことを FACS 解析により 1 細胞レベルで確認した。すなわち、E9.5-10.5 に相当する誘導 6 日目に生殖巣体細胞は Nr5a1+/CD140a+ の細胞として現れ、誘導 7 日目までは Nr5a1 の発現を上昇させた。誘導 8 日目（E11.5-12.5 相当）になると Nr5a1+/CD140a- の支持細胞と Nr5a1+/CD140 陽性の間質細胞に自発的に分かれた。この割合は成体卵巣と同様にほぼ 1:1 であった。さらに誘導細胞は、この時期から徐々に雌性レポーター（Foxl2-tdTomato）を発現し始め、雌性化も生体を模倣することが示唆された。

続いて、シングルセル RNA-seq 解析により誘導 8 日目の細胞は E12.5 の胎児卵巣に認められる全ての細胞に分化していることも確認した。我々の解析では E12.5 の胎児卵巣の細胞は雌性支持細胞（顆粒膜細胞）間質細胞に加え、Snai2 など発現する間質前駆細胞、及び卵巣の表層に位置し、その後も卵巣体細胞を生み出す幹細胞（Upk3b, Lhx9+細胞）に分けられたが、誘導 8 日目の細胞もこれらの細胞に分化していた。以上により、誘導細胞が卵巣体細胞のサブポピュレーションへの分化能も持つことが確認され、この細胞を FOSLCs (Fetal Ovarian Somatic cell Like Cells) と名付けた。

また FOSLCs と PGCLCs の凝集培養により構築された生殖巣オルガノイドは胎児の卵巣発生を模倣して発生を進行することも確認した。培養 3 日目には PGCLCs は体細胞との相互作用により活性化される MVH を発現した。その後、培養 7 日目までに再構築生殖巣は雌性化を起こし、FOSLCs は急速に Foxl2-tdTomato を発現する一方、PGCLCs は減数分裂マーカーである SCP3 を染色体上に蓄積した。培養 14 日目になると PGCLCs は Stella-ECFP の発現を活性化して大きく成長して卵へと分化し、Foxl2td-Tomato 陽性の顆粒膜細胞は卵を取り巻き、卵胞を形成し始めた。その後、培養 23 日目まで卵は成長を続ける一方、卵胞を構成する顆粒膜細胞は重層化するのに加え、間質細胞に由来し雌性ホルモンを分泌する莢膜細胞（Nr5a1 強陽性の扁平な細胞）が取り巻く二次卵胞構造が再構築された。

続いての成長培養により、顆粒膜細胞は、劇的に増殖し、卵の周囲の細胞は卵丘細胞に分化し COC を形成した。また、卵丘細胞は Transzonal projection を形成し卵と結合している様子も確認され、卵発生を適切に支持していることも示唆された。さらに COC の成熟培養により、卵丘細胞は膨潤化する一方、約 30% の卵は極体を放出し卵子へと発生を進めていた。卵子を人工受精させ、体外で培養したところ 30% 程度が胚盤胞まで発生した。一方で、人工受精により得られた 2 細胞期の胚のうち 5% 程度は、偽妊娠マウスの卵管に移植されると雌雄の産仔へと発生した。これらの産仔は、通常のマウスと同様に 1 年以上生存することも確認できた。また雌雄のマウス同士を交配させると 1 腹あたり、産仔が 10 匹以上得られ妊孕性も正常に持っていた。以上により、マウス ES 細胞から胎児卵巣の体細胞を誘導し機能的な卵巣オルガノイドを構築できた。これにより胎児卵巣の取得が困難なヒトなどの iPS 細胞から卵巣オルガノイドを作成し、卵子を得る基盤を確立できた (Yoshino T et al., Science 2021)。成果は多くのハイインパクトジャーナルやマスメディアに紹介された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Yoshino & Daisuke Saito	4. 巻 92
2. 論文標題 Epithelial-to-mesenchymal transition based morphogenesis of dorsal mesentery and gonad	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seminars in Cell & Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 105-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcdb.2018.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshino T., Suzuki T., Nagamatsu G., Yabukami H., Ikegaya M., Kishima M., Kita H., Imamura T., Nakashima K., Nishinakamura R., Tachibana M., Inoue M., Shima Y., Morohashi K. & Hayashi K.	4. 巻 373
2. 論文標題 Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.abe0237.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------