

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16013

研究課題名（和文）カニクイザルES細胞を用いた成熟卵子の試験管内誘導

研究課題名（英文）Reconstitution of oocyte development from cynomolgus embryonic stem cells in vitro

研究代表者

茂谷 小百合（Motani, Sayuri）

京都大学・高等研究院・特定研究員

研究者番号：30792428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、カニクイザルES細胞を起点とした成熟卵子試験管内誘導系の樹立を目標として研究を行った。ES細胞をPGCLCへ誘導した後、再構成卵巣法で卵原細胞様細胞、卵母細胞様細胞へ2段階に分けて誘導する培養系「2ステップ再構成卵巣法」を確立した。得られた卵母細胞様細胞では生体の減数分裂初期卵母細胞と類似の遺伝子発現プロファイルを示した。また、ゲノムワイドなDNA脱メチル化も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

試験管内再構成系を用いて成熟卵子を得ることができれば、カニクイザルのような寿命や成長周期の長い動物において、新たな生殖工学技術を提供することになり、霊長類や大型動物を用いた遺伝子工学技術の大きな発展にも寄与すると期待される。課題申請当初の目標であった成熟卵子誘導系の樹立には至らなかったが、本研究成果はその初期段階に相当し、学術的意義は高いと考える。今後は、2ステップ再構成卵巣法の確立に付随した成果を基に、培養系を改善し当初の目標達成を目指したい。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was aimed to establish the in vitro culture system to induce mature oocytes from cynomolgus (*Macaca fascicularis*) embryonic stem cells. We developed culture method named “stepwise xenogenic reconstituted ovary (xrOvary) culture system” to induce differentiation to oocyte-like cells in stepwise manner. Germ cells derived from female ES cells were aggregated with mouse gonadal somatic cells to obtain oogonia-like cells, and then oocyte-like cells. By transcriptomic analysis, oocyte-like cells showed the gene expression profiles similar to the oocyte at prophase in vivo. In addition, genome-wide DNA demethylation was observed in the oocyte-like cells.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：カニクイザル ES細胞 再構成卵巣

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞系譜は、発生初期に形成される Primordial germ cells (PGC) に由来する。PGC はその後、増殖しながら将来卵巣、精巣になる生殖巣へと移行する。この間、ゲノムを次世代に継承する準備としてゲノムワイドな DNA 脱メチル化やヒストン修飾の変化が起こる(エピゲノムリプログラミング)。PGC が生殖巣に到達すると、雌性生殖巣では卵原細胞へ分化し、卵原細胞は卵母細胞となり原始卵胞内に局在する。出生後、卵巣において一次卵胞、二次卵胞を経て成熟卵子となる。ヒト卵母細胞までの発生については、胎児卵巣内における形態的観察の報告がわずかながら存在する (Konishi et al, 1986, J. Anat.)。しかし、ヒト胎児の組織は得にくく、分子生物学的解析をするためには、倫理的な問題等に縛られずに試料を得る方法が必要である。当研究室ではこれまで、ヒト iPS 細胞を起点とした試験管内再構成系の構築を目指し、ヒト iPS 細胞から PGC-like cells (PGCLC) へ、さらにヒト PGCLC から「卵原細胞様細胞」へ誘導する培養系を樹立した(Sasaki et al. 2015, Cell Stem Cell, Yamashiro et al. 2018, Science)。

次の目標は、ヒト iPS 細胞由来の卵原細胞様細胞から成熟卵子まで誘導することである。しかし、成熟卵子への誘導系を樹立した暁には、卵子の機能検証、つまり受精能とその後の個体発生の検証が必要であるが、ヒトの細胞を使用している限り倫理的に不可能である。すなわち、ヒト由来の細胞を用いた研究には限界がある。

2. 研究の目的

そこで本申請課題では、ヒトに最も近縁で実験可能な霊長類であるカニクイザル (*Macaca fascicularis*) を使用することとした。当研究室では、これまでにヒト・サル間における初期胚の形態、着床前後胚の多能性幹細胞の相同性、更には霊長類における生殖系譜の発生過程の類似性などを明らかにしてきた(Nakamura et al. 2016, Nature, Sasaki et al. 2016, Dev. Cell)。またヒト PGCLC 誘導系と相同な方法で、サル PGCLC の誘導系も確立できている (Sakai et al, 2019, Biol. Reprod.)。したがって、サル ES 細胞を用いた成熟卵子までの誘導系の確立と産仔能の検証ができれば、ヒト成熟卵子誘導系の機能も保証できる可能性が高いと考えられた。以上より、本申請課題ではカニクイザルを用いた成熟卵子の試験管内誘導系の確立を目的とした。

3. 研究の方法

上述の通り、ヒト iPS 細胞を起点として卵原細胞様細胞へ誘導する培養系(以下、再構成卵巣法)が、カニクイザルでは ES 細胞より PGCLC を誘導する培養系がすでに確立されている(Yamashiro et al. 2018, Science, Sakai et al, 2019, Biol. Reprod.)。申請者は、これらを基に以下の方法でカニクイザル成熟卵子誘導系の確立を試みた。

(1) 雌性生殖細胞を誘導するにあたり適切な ES 細胞株を選定し、レポーター細胞株を樹立した。具体的には、PGCLC を誘導したのち分化誘導効率が高い株を FACS にて評価した。選ばれた細胞株を用いて、TFAP2C および VASA(DDX4) 遺伝子プロモーターの下流で EGFP および tdTomato を発現するレポーター細胞株 (*TFAP2C-EGFP*, *VASA-tdTomato*, 以下 AGVT とする) を樹立した。

(2) ヒトの再構成卵巣法に倣い、カニクイザル PGCLC より卵原細胞様細胞が誘導されるのか検討した。分化誘導効率を免疫染色により評価した。次に、現状の培養法は卵母細胞誘導実績がないため、カニクイザルにおいてさらに発生段階を進めるための培養系確立を試みた。誘導効率を FACS 及び免疫染色により評価した。

(3) (2) で得られた生殖細胞の性状解析を行った。トランスクリプトームを SC3-seq 法を用いた bulk RNA シーケンス法および GEM ビーズを用いたシングルセル RNA シーケンス法により解析した。また、EM-seq 法を用いた全ゲノムメチル化解析を行った。これらのデータを生体のカニクイザル生殖細胞及びヒト iPS 細胞由来生殖細胞と比較した。また、カニクイザルを用いる利点の一つは、親由来のゲノム情報を用いた解析が可能であることである。ES 細胞及び ES 細胞株の父親にあたる個体のゲノム DNA 配列をシーケンス解析し、父方、母方由来の塩基配列を特定した。この情報を基に、父方母方由来 X 染色体の動態を解析した。

4. 研究成果

(1) 2ステップ再構成卵巣法の確立

まず、ヒト再構成卵巣法を踏襲し、カニクイザル雌性生殖細胞の誘導を試みた(図1A、Motani et al. 未発表)。カニクイザル PGCLC (AG+VT-細胞) を embryonic day (E)12.5 のマウス胎児卵巣体細胞と凝集培養したところ、ヒトと同様に卵原細胞様細胞 (AG+VT+細胞) まで誘導することができた。しかし、これらの細胞について減数分裂マーカーの発現が認められず、卵母細胞を得られていないことがわかった(図1B、Motani et al. 未発表)。この結果より、カニクイザル成熟卵子を誘導するためには、培養系の改良が必須であると結論付けた。様々な培養条件検討を行った結果、AG+VT+細胞を単離した後、E13.5 以降のマウス胎児卵巣体細胞と再凝集することで、AG+VT+細胞を効率よく誘導できることがわかった(図1A、Motani et al. 未発表)。また、再構成卵巣の免疫染色を行ったところ、VASA+細胞において減数分裂マーカーの発現が認められ、減数分裂期へ移行している細胞の存在が示唆された(図1C、Motani et al. 未発表)。この培養法を「2ステップ再構成卵巣法」とする。

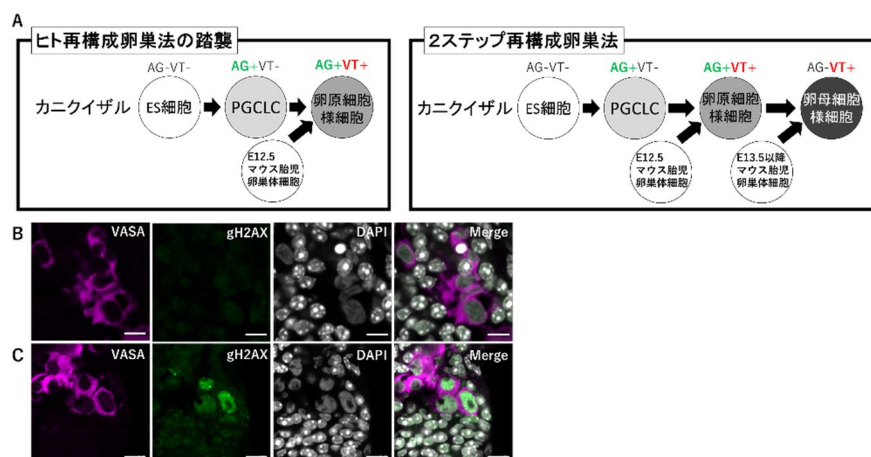


図1. ヒト再構成卵巣法によるカニクイザル雌性生殖細胞誘導。
A.培養系模式図。
B.ヒト再構成卵巣法で培養後のカニクイザル再構成卵巣の免疫染色。スケールバー=200 μ m
C.2ステップ再構成卵巣法による培養後の再構成卵巣の免疫染色。スケールバー=200 μ m

(2) カニクイザル AG-VT+細胞の性状解析

次に、AG-VT+細胞の性状解析を行った。トランスクリプトーム解析を行ったところ、bulk RNA シーケンスでは、カニクイザル卵原細胞に比して AG-VT+細胞で減数分裂期特有のマーカー遺伝子を強く発現することが確認された。さらに、シングルセル RNA シーケンス解析によりカニクイザル胎児卵巣生殖細胞と比較したところ、AG-VT+の一部は Zygotene 期の卵母細胞まで誘導されていた(図2A、Motani et al. 未発表)。減数分裂期へ移行すると、不活性化された X 染色体が再活性化し、X 染色体からの遺伝子発現レベルが高くなる傾向が知られているが、同様の現象が AG-VT+細胞においても確認できた。

さらに、ES 細胞から AG-VT+細胞に至るまでのエピゲノムの変化を確認するために、EM-seq 法で全ゲノムメチル化解析を行った。ES 細胞、PGCLC ではメチル化率が高いのに対し、AG+VT+細胞および AG-VT+細胞ではメチル化率が顕著に低下していた(図2B、Motani et al. 未発表)。AG+VT+細胞、AG-VT+細胞の結果は、サル胎児卵巣卵原細胞のメチル化率と同等であったことから、分化に伴うゲノムワイドな DNA 脱メチル化を再現できていると考えられた。

本申請課題で用いた ES 細胞とその父親にあたる個体のゲノム DNA 情報を基に、DNA メチル化解析データをそれぞれ父方及び母方由来のデータに分けて解析した。ES 細胞において母方 X 染色体のプロモーター領域が高メチル化状態にある一方で、父方 X 染色体では脱メチル化傾向が強かった。さらに分化に伴って母方 X 染色体ではプロモーターの脱メチル化が進行していた(図2C、Motani et al. 未発表)。ことから、少なくとも本課題に用いた ES 細胞においては、X 染色体再活性化は母方ゲノムの脱メチル化に起因する現象であることが示唆された。

なお、本研究成果については現在論文投稿に向けて準備を進めている。

試験管内再構成系を用いて成熟卵子を得ることができれば、カニクイザルのような寿命や成長周期の長い動物において、新たな生殖工学技術を提供することになり、霊長類や大型動物を用いた遺伝子工学技術の大きな発展にも寄与すると期待される。課題申請当初の目標であった成熟卵子誘導系の樹立には至らなかったが、本研究成果はその初期段階に相当し、学術的意義は高いと考える。今後は、2ステップ再構成卵巣法の確立に付随した成果を基に、培養系を改善し当初の目標達成を目指したい。

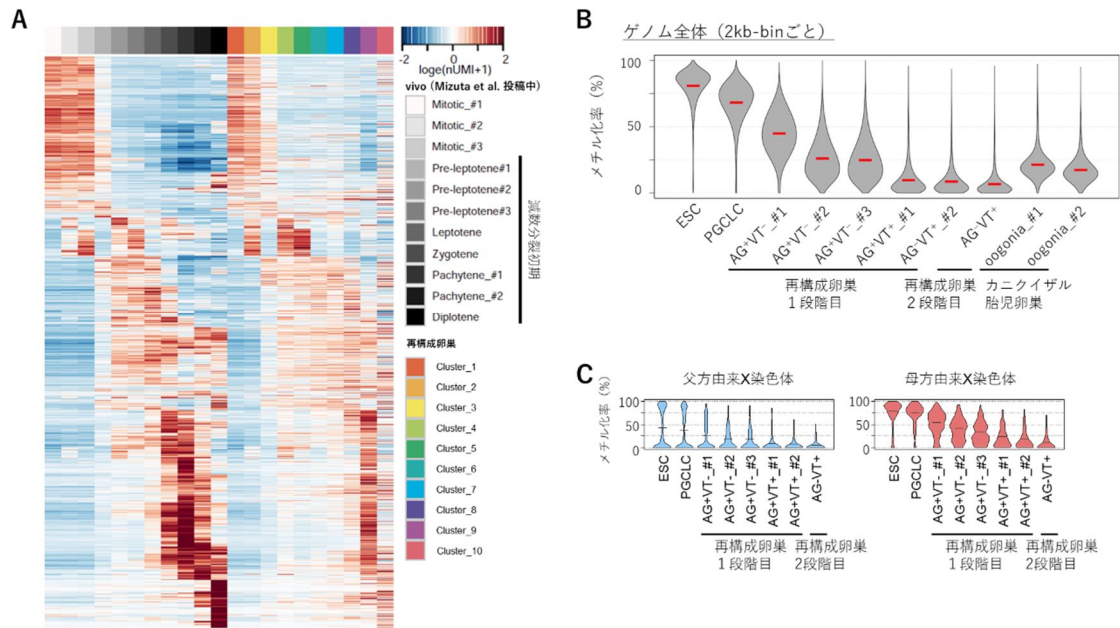


図2. 2ステップ再構成卵巣法の性状解析。
 A. シングルセルRNA seqによるカニクイザル胎児卵巣生殖細胞との比較。
 B. ゲノムワイドDNAメチル化状態の変遷。
 C. 父方母方由来X染色体におけるプロモーター領域のメチル化状態の変遷。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sakai Yoshitake, Nakamura Tomonori, Okamoto Ikuhiro, Gyobu-Motani Sayuri, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Tsukiyama Tomoyuki, Iwatani Chiduru, Tsuchiya Hideaki, Ema Masatsugu, Morizane Asuka, Takahashi Jun, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 102
2. 論文標題 Induction of the germ cell fate from pluripotent stem cells in cynomolgus monkeys†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 620 ~ 638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/ioz205	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
---------	---------