

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 - 2012

課題番号：22580323

研究課題名（和文） 胚性幹細胞由来の卵子様細胞の生産と特性解析

研究課題名（英文） Production and analysis of oocyte-like cells derived from embryonic stem cells.

研究代表者

細井美彦 (HOSOI YOSHIHIKO)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：70192739

研究成果の概要（和文）：ES 細胞からの分化誘導研究では、効率を左右する因子として ES 細胞の株差や培養環境の違いが考えられる。本実験から、ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導では、分化を誘導する因子のみでなく、分化誘導に供試する ES 細胞自体の培養環境も重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The difference in the stock line of embryonic stem cells or an incubation atmosphere can be considered as a factor which influences an efficiency of a differentiation induction from an embryonic stem cell line. In our results, it was suggested that a status of embryonic stem cells for differentiation to primordial germ cells in vitro was also important, not only other secreted substances.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：胚性幹細胞、卵子様細胞、始源生殖細胞、生殖細胞分化

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞からの分化誘導研究では、効率を左右する因子として ES 細胞の株差や培養環境の違いが考えられる。我々は、そのような因子に影響を受ける要因として、**ES 細胞の有する不均一なポピュレーション**に注目した。ES 細胞は同一コロニー内において、様々な遺伝子発現を有する細胞がモザイクな状態で混在している。このポピュレーションの中には、発現の有無により ES 細胞の分化能に影響を

与える遺伝子が報告されており、生殖細胞の分化能に影響する遺伝子も確認されている。例えば、Nanog 陽性細胞は未分化なコロニーを形成すると共に、生殖細胞系譜の細胞に分化することが可能である。一方、Nanog 陰性細胞は初期内胚葉系譜の遺伝子マーカーである Gata6 の発現を有しており三胚葉系譜の細胞に高い分化能を示す (Chambers et al., 2007)。このような ES 細胞の有する不均一な

ポピュレーションは、細胞株間および培養環境に左右され変化する(Enver et al., 2009)。そのため、生殖細胞の分化誘導時における不安定な誘導効率の一因となっている可能性が考えられる(Graf and Stadtfeld., 2008)。

2. 研究の目的

ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導研究が確立されれば、(1)生殖細胞の形成過程を研究する上で有効なツールとなる。(2). 不妊症における病態メカニズムの解明や、新規創薬研究に応用できる可能性がある。このような背景より、現在まで様々な検討がなされてきているが、報告間での誘導効率には差が生じており、誘導効率の不安定さが課題として挙げられる。体外モデルとしての応用を視野に入れた場合、誘導系の汎用性が必要となるため、このような問題を解決することを試みた。

3. 研究の方法

マウス ES 細胞ではコロニー内の不均一性を是正する培養環境として、MEK/Erk 阻害剤および GSK3 β 阻害剤(以下 2i)の添加が報告されている(Ying et al., 2008)。この阻害剤を添加することで、マウス ES 細胞は基底状態で安定的に培養することが可能であり、同時に不均一な遺伝子発現が是正される(Marks et al., 2012)。そこで我々は、基底状態で安定的に培養したマウス ES 細胞から生殖細胞の分化誘導を行うことで、不安定な誘導効率が改善されるか検討を行った。

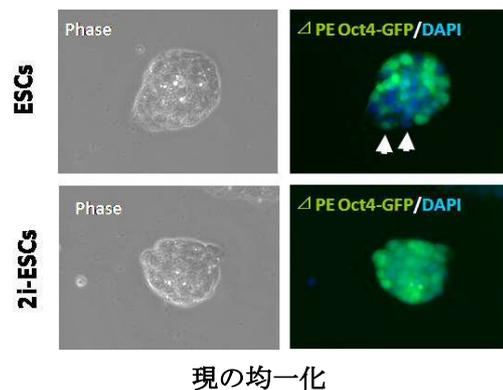
4. 研究成果

検討の結果、2i を添加して得られた基底状態 ES 細胞は分化に関連した遺伝子発現が有意に減少し、モザイクな遺伝子発現を示すポピュレーションが是正されることが明らかとなった(図 1)。例えば、ES 細胞中には Nanog 陽性細胞と陰性細胞のポピュレーションが

確認されるが、Nanog 陰性細胞では Gata6 の発現が確認される(Chambers et al., 2007)。

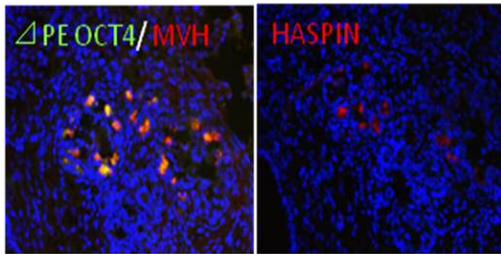
この Gata6 は内胚葉系譜への初期分化時に作用し、MEK/Erk シグナルにより活性化される遺伝子であり、Nanog は MEK/Erk シグナルにより抑制される(Yoshida-Koide et al., 2004)。そのため MEK/Erk シグナルを阻害することで、初期分化に関連する Gata6 などの遺伝子の発現が抑制されるとともに、Nanog の発現が安定、結果ポピュレーションの安定化および未分化性の向上などに繋がった可能性が考えられる。

図 1; 2i の添加によるモザイクな遺伝子発



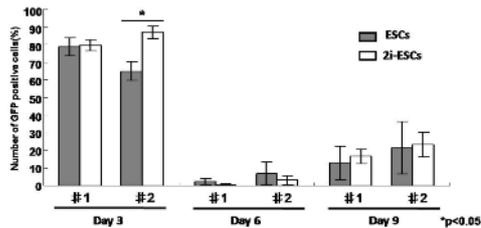
さらに、GFP 蛍光を PGC 様細胞の指標とし、基底状態 ES 細胞から生殖細胞の分化誘導を行うと、誘導効率が安定することを突き止めた。同時に、この結果は株差に影響されることがなく、汎用性が高いことが証明された(図 2)。

現在までの生殖細胞の分化誘導研究における誘導効率は、報告間で差が生じているが、本研究を応用することで誘導効率の標準化が可能となることが考えられる。そのため、本研究より得られた結果は、生殖細胞の分化誘導研究をメカニズム研究へ応用する際に



重要な知見となると考える。

図 2: 2i 添加 ES 細胞からの安定的な生殖



細胞の分化誘導

また本研究で誘導した PGC 様細胞を、不妊マウスである B6WBF1-W/W^m マウス精巣へ移植を行ったところ、MVH 陽性や HASPIN 陽性細胞が存在することが確認され、精子形成過程へ進行する能力を有することが証明された(図 3)。残念ながら、移植精巣の約 30%においてテラトーマの形成が確認されたが、Hyashi らの報告で使用された SSEA-1/Integrin3 β など、従来報告のある PGCs の分離マーカーを組み合わせ、誘導した PGC 様細胞を高純度で単離することでこの問題は回避可能であると考え(Hayashi et al., 2011)。

図 3: 移植後の精巣における MVH および HASPIN 陽性細胞の局在

本研究結果から、ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導では、分化を誘導する因子のみでなく、分化誘導に供試する ES 細胞自体の培養環境も重要であることが示唆された。またこの結果は、異なった細胞株を用いた検討において同様の傾向が得られており、汎用性の高

い知見である。そのため、ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導研究をさらに進展させるとともに、今後創薬研究等、体外モデルとして応用するための重要な知見となるであろう。

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 6 件)

- ① Teramura T, Sugimoto H, Frampton J, Kida Y, Nakano M, Kawakami M, Izumi H, Fukunaga N, Onodera Y, Takehara T, Fukuda K, Hosoi Y: Generation of embryonic stem cell lines from immature rabbit ovarian follicles. Stem Cells Dev. 2013 Mar 15;22(6):928-38. 査読有
- ② Fukunaga N, Kawakami M, Saeki K, Matsumoto K, Hosoi Y: Embryonic Stem Cell: New Resource for Germ Cell Study. JMOR Vo. 29, No. 1, April 2012. 査読有
- ③ 福永直人、細井美彦:再生医療からみた生殖医療の将来展望、産婦人科の実際 60(5), 751-758、(2011) 査読無
- ④ 福永直人、荒田隆志、大野真奈、岸上哲士、細井美彦:マウスエピプラスト幹細胞からの生殖細胞の分化誘導、近畿大学先端技術総合研究所紀要 (2011) 第 16 号 p19-26. 査読有
- ⑤ 矢持隆之、岸上哲士、細井美彦: 目で見る生殖と再生 —体細胞クローン—, Hormone Frontier in Gynecology, 2011, Vol. 18 No. 1. p2-5.
- ⑥ Fukunaga N, Teramura T, Onodera Y, Takehara T, Fukuda K, Hosoi Y: Leukemia inhibitory factor (LIF) enhances germ cell differentiation from primate embryonic stem cells. Cell Reprogram. 2010 ; 12(4): 369-76. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Fukunaga N, Takeshi Teramura, Toshiyuki Takehara, Yuta Onodera, Kanji Fukuda, Yoshihiko Hosoi, Derivation of primordial germ cells from mouse embryonic stem cells in a ground state pluripotency. 2012. 8. 30-9. 2, 4th Congress of the ASPIRE (Asia Pacific Initiative on Reproduction) Osaka International Convention Center (2012)
- ② 福永直人、寺村岳士、竹原俊幸、小野寺勇太、福田寛二、細井美彦、基底状態に

あるマウス ES 細胞からの始原生殖細胞の分化誘導、2012. 6. 12-14、第 11 回 日本再医療学会総会、パシフィコ横浜 (2012)

- ③ 福永直人, 川上真貴子, 矢持隆之, 木田雄大, 岸上哲士, 細井美彦, 生殖細胞の分化誘導に適したマウス ES 細胞の培養環境の検討, 2011. 9. 9-10, 京王プラザホテル, 第 29 回受精着床学会 (2011)

[図書] (計 1 件)

- ① 生殖卵巣学 臨床への進展、2011 年、卵子の発生、細井美彦、福永直人

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細井美彦 (HOSOI YOSHIHIKO)
近畿大学・生物理工学部・教授
研究者番号：70192739

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し