

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15380

研究課題名（和文）カニクイザルES細胞を用いた減数分裂期卵母細胞の試験管内誘導

研究課題名（英文）Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys

研究代表者

茂谷 小百合（Motani, Sayuri）

京都大学・高等研究院・助教

研究者番号：30792428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに「2ステップ再構成卵巣法」により、第一減数分裂期初期のカニクイザル卵母細胞様細胞(OC(1)LC)を試験管内で誘導すること成功した。本研究ではまず、シングルセルRNA-seqによる性状解析を実施したところ、誘導されたOC(1)LCはサル胎児の卵母細胞と類似の性質を持つことが明らかになった。次に、全ゲノムDNAメチル化解析により、霊長類の卵母細胞発生過程でのゲノムワイドなDNA脱メチル化を示唆するデータが得られた。第一減数分裂期を試験管内で完遂するため、培養条件検討を試みたが、いずれも効果が得られなかった。今後さらなる培養方法改善が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サル成熟卵子発生過程を忠実に再現することができれば、ヒトの雌性生殖細胞の発生過程を再現できると期待される。また、これまで困難であった減数分裂時のエピゲノムリプログラミングの様相が解析可能になり、ヒトの発生過程のより深い理解につながる。そして、各段階の生殖細胞を用いた分子生物学的、生化学的解析によりヒト生殖細胞発生機構が完全に理解された暁には、新たな不妊治療技術の開発にも寄与すると期待される。

研究成果の概要（英文）：In previous study, I have established “2-step xenogenic reconstituted ovary (xrOvary) culture system” which enabled to induce cynomolgus monkey oocyte-like cells at meiosis I (OC(1)LCs) in vitro. According to single cell RNA-seq analysis, it was revealed that OC(1)LCs showed the similar gene expression patterns to cynomolgus oocytes in vivo. Also, from genome-wide DNA methylome analysis, it was indicated that genomic DNA was demethylated in fetal oocyte development in primate species. To complete meiosis I in vitro, xrOvary was cultured in several, modified conditions. However, any of them did not lead to further progression of meiosis I. In the future study, the completion of meiosis I will be accompanied by finding optimal culture conditions referring to transcriptome data of OC(1)LC.

研究分野：分子生物学

キーワード：試験管内再構成 ES細胞 卵母細胞 減数分裂 カニクイザル

### 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始原生殖細胞 (Primordial germ cell, PGC) に由来する。PGC はその後増殖しながら将来卵巣、または精巣と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エピゲノムリプログラミングが起きる。PGC が雌性生殖巣に到達すると卵原細胞 (Oogonia, OG) を経て卵母細胞 (Oocyte, OC) となり、ゲノムの多様性をもたすために重要とされる、第一減数分裂期へ移行する (図 1)。そして、出生直前までに染色体の凝集・対合を起こし、一度目の分裂直前の状態で休止する。性成熟後、生理周期に合わせて OC の成熟と共に第二減数分裂期に移行し、成熟卵子となる。このように卵子の発生過程は非常にダイナミックかつ綿密な制御機構が存在するにも拘わらず、**哺乳類では該当時期が胎児期であるため、ヒトではほぼ未解明である。**
- これを解決するには、ヒトもしくは非ヒト霊長類における生殖細胞発生過程を試験管内にて再構築することが必須である。申請者所属研究室では、これまでにヒト iPS 細胞から PGC 様細胞 (PGC-like cell, PGCLC)、さらに PGCLC から OG 様細胞 (OG-like cell, OGLC) を誘導することに成功している (図 1, Sasaki et al, 2015, Cell Stem Cell, Yamashiro et al, 2018, Science)。またこれまでに、ヒトと進化的に最も近縁である非ヒト霊長類モデルのカニクイザル (Macaca fascicularis, 以下サル) PGCLC を OGLC へ、さらに一段階進んだ第一減数分裂初期の OC 様細胞 (OC(I)-like cell, OC(I)LC) まで誘導できている (図 1)。しかし、マウスでは in vitro において全ての発生過程を再現できているが、**霊長類においては第一減数分裂特有の染色体の凝集や対合が再現されていない。**以上から、試験管内で霊長類生殖細胞発生過程を再構築するには、**まず、第一減数分裂の完遂が当面の課題である。**

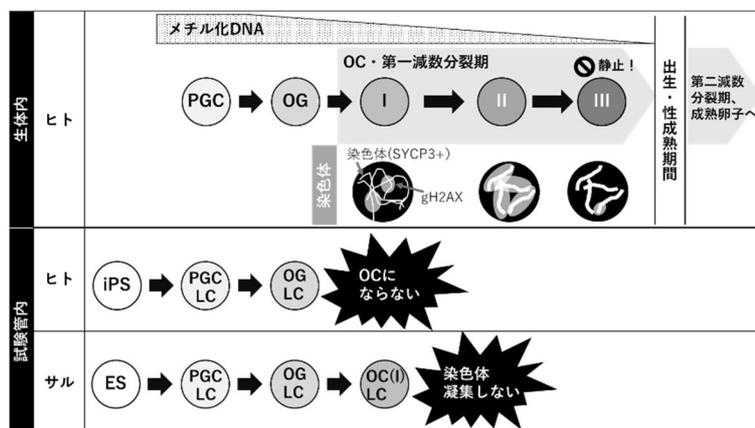


図 1. ヒト卵発生及び試験管内再構成系の現状。胎児卵巣内で、PGCはOG、OCへ分化し第一減数分裂が開始する。第一段階目(I)では、染色体が凝集し始めSYCP3やgH2AX陽性となる。DNA複製後、姉妹染色体が対合する(II)。出産直前までに、対合の形成が完了し、静止状態となる(III)。試験管内再構成系では、ヒト、サルでそれぞれOG様細胞、OC(I)様細胞(OGLC, OC(I)LC)まで誘導されていると考えられるが、いずれも第一減数分裂期へ移行しないことが問題である。

### 2. 研究の目的

- 本研究課題は、サル ES 細胞を起点とした雌性生殖細胞の**出生直前の第一減数分裂状態を再現すること**を目標とした。
- これまでに、段階的にサル OC(I)LC を誘導する培養法「2ステップ再構成卵巣法」を樹立している。しかし、OC(I)LC の卵母細胞としての妥当性は確認できていない。
- そこで、2022 年度は、OC(I)LC の性状解析により、生体のサル OC と類似した性質を持つ細胞であることを確認した。
- 2023 年度は、得られた OC(I)LC の減数分裂期を推し進めるための培養条件検討を行った。

### 3. 研究の方法

2ステップ再構成卵巣法の概要は以下のとおりである。第一段階では、サル PGCLC と Embryonic day 12.5 (E12.5) マウス胎児卵巣体細胞を凝集させ (以下、再構成卵巣) 気相液相培養することでサル OGLC を誘導する。第二段階で、サル OGLC をより発生段階が進んだマウス胎児卵巣体細胞 (E13.5-E15.5) と凝集させた再構成卵巣を気相液相培養すると、OC(I)LC が得られる。この 2ステップ再構成卵巣法と得られた細胞を用いて、下記のとおり研究を実施した。

#### 2022 年度

(1) **トランスクリプトーム解析**: 2ステップ再構成卵巣法で培養後約 100 日の再構成卵巣からサル ES 細胞由来生殖細胞を単離し、シングルセル RNA-seq 解析を行った。各細胞種のトランスクリプトームを生体サル胎児 OC と比較した。

(2) **全ゲノムメチローム解析**: サル ES 細胞、PGCLC、OGLC、OC(I)LC の細胞のゲノム DNA を用いて、EM-seq 法により DNA のメチル化パターンを網羅的に解析した。

#### 2023 年度

(1) 3ステップ目の再構成卵巣培養の導入：OC(1)LCを単離し、E15.5またはE16.5のマウス胎児卵巣体細胞と再凝集させた。気相液相培養もしくはアルギン酸ゲルに包埋後三次元培養して28日後、免疫染色法により減数分裂マーカー（SYCP3, SYCP1, H2AX, DMC1）の発現パターンおよび染色パターンを観察した。

(2) 2ステップ目の再構成卵巣培養条件の最適化：培地に含まれるウシ血清（FBS）の濃度を10%から1%に変更し気相液相培養、レチノイン酸含有培地に変更し、気相液相培養、の2条件を試みた。に関しては、さらに3ステップ目の再構成卵巣培養でも検討した。気相液相培養28日後、免疫染色法により減数分裂マーカー（SYCP3, SYCP1, H2AX, DMC1）の発現パターンおよび染色パターンを観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 2ステップ再構成卵巣法由来生殖細胞の性状解析：シングルセルRNA-seq

サル胎児卵巣では、有糸分裂期(M1-3)にあるOGがOCへと分化すると、減数分裂期へ移行し、前細糸期(PL1-4) 細糸期(L2) 合糸期(Z) 太糸期(P) 複糸期(D)の順に分化する(図2A, B)。再構成卵巣由来のOC(1)LCにおいても、OGLCが有糸分裂期を脱却し、一部の細胞は合糸期まで移行していることが確認できた(図2A, B)。主要な減数分裂マーカー遺伝子の発現パターンを比較したところ、再構成卵巣由来OGLC, OC(1)LCは、生体サル胎児卵巣由来OG、各減数分裂段階のOCと類似のパターンを示した(図2C)。従来のヒト再構成卵巣法では、初期の卵母細胞が誘導されたが減数分裂期への移行は確認できなかった(Yamashiro et al, 2018, Science)。本研究により、試験管内で減数分裂期の霊長類卵母細胞を誘導できたことは、本研究分野の大きな前進である。

一方、2ステップ再構成卵巣法の課題も見つかった。再構成卵巣では大半のOC(1)LCが前細糸期で停滞している(図2B)。また、再構成卵巣の細糸期OC(1)LCは、生体サル胎児の細糸期OC(L1)と異なる細胞集団(L2)としてUMAP図上でプロットされる傾向にあった(図2A, B)。L1とL2細胞の発現変動遺伝子を比較したところ、L2細胞では減数分裂マーカー遺伝子の発現が弱く、上皮細胞分化やBone morphogenetic protein (BMP)シグナル関連遺伝子の発現が顕著であった。さらに、再構成卵巣では、有糸分裂期、減数分裂期とは異なるトランスクリプトームを持つその他(U1-2)の細胞も出現している(図2A)。減数分裂期の卵母細胞をより効率よく誘導するには、これらの問題を解決することが必要不可欠であると結論付けた。

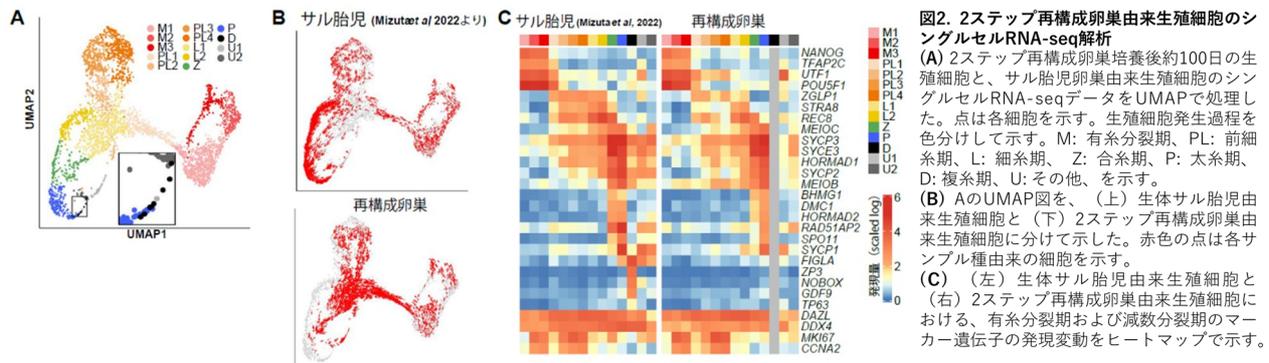


図2. 2ステップ再構成卵巣由来生殖細胞のシングルセルRNA-seq解析  
 (A) 2ステップ再構成卵巣培養後約100日の生殖細胞と、サル胎児卵巣由来生殖細胞のシングルセルRNA-seqデータをUMAPで処理した。点は各細胞を示す。生殖細胞発生過程を色分けして示す。M: 有糸分裂期、PL: 前細糸期、L: 細糸期、Z: 合糸期、P: 太糸期、D: 複糸期、U: その他、を示す。  
 (B) AのUMAP図を、(上) 生体サル胎児由来生殖細胞と(下) 2ステップ再構成卵巣由来生殖細胞に分けて示した。赤色の点は各サンプル種由来の細胞を示す。  
 (C) (左) 生体サル胎児由来生殖細胞と(右) 2ステップ再構成卵巣由来生殖細胞における、有糸分裂期および減数分裂期のマーカー遺伝子の発現変動をヒートマップで示す。

##### (2) 2ステップ再構成卵巣法由来生殖細胞の性状解析：EM-seq法による全ゲノムメチル化解析

生体内において、多能性幹細胞からPGC, OGへと分化する過程で、DNAのシトシンがゲノム全体で脱メチル化される(Yamashiro et al, 2020, Nat Protocol)。OCでは脱メチル化状態が維持される。2ステップ再構成卵巣法でも、同様の傾向が見られるのか検証するために、EM-seq法による全ゲノムメチル化解析を実施した。

まず、常染色体のDNAメチル化傾向を確認した。ES細胞、PGCLCでは75%以上のシトシンがメチル化されているが、PGCLCの常染色体メチル化率は再構成卵巣培養開始後、速やかに減少した(図3A左)。脱メチル化はOGLC, OC(1)LCにおいてなお進行し、6%程度まで減少した(図3A左)。少なくとも、OGLCのメチル化率は生体サルOGと同等であった。これらのことから、2ステップ再構成卵巣法により、生殖細胞のゲノムワイドなDNA脱メチル化が誘導されることが確認できた。

女性の場合、2本のX染色体のうち片方を不活化することで、遺伝子発現量を調節している。しかし、生殖細胞発生過程において、一次的に不活化されたX染色体が再活性化し、遺伝子発現量が増加する。そこで、X染色体の再活性化と脱メチル化の関連を検証するため、X染色体のメチル化傾向を解析した。まず、本研究で用いたES細胞についてDNAメチル化パターンを確認した。母方X染色体が不活化されることがわかっているが、不活化傾向と相関するように、母方X染色体では父方に比してメチル化率が高いことが確認された(図3B)。常染色体については父方、母方のメチル化率に差がなかった(図3A中、右)。

次に、生殖細胞分化に伴う脱メチル化の進行を検証した。PGCLC, OGLC, OC(1)LC への分化に伴い、父方母方双方で X 染色体の脱メチル化が進行し、メチル化率は 10%以下まで減少した(図 3B)。さらに、OC(1)LC における、一部の X 染色体上の遺伝子発現量を定量したところ、父方母方 X 染色体からの発現量が共に増加傾向にあることが確認できた。以上から、X 染色体の再活性化には脱メチル化が関連していることが示唆された。なお、脱メチル化に抵抗性を持つ領域も存在しており、これらの生殖細胞発生における意義は非常に興味深い。

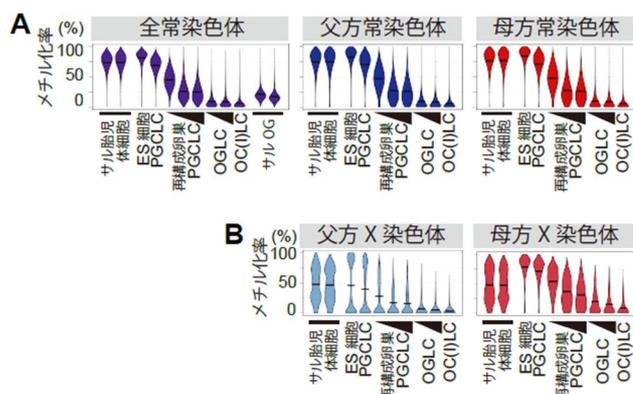


図3. 2ステップ再構成卵巣由来生殖細胞の、EM-seq法による全ゲノムメチル化解析 (A)各細胞種の常染色体メチル化率をバイオリンプロットで示した。(左)全常染色体のデータをさらに(中)父方、(右)母方常染色体に分けてプロットした。メチル化率は、塩基の長さ2kbごとに算出した数値を示す。生体サル体細胞は、胎児線維芽細胞である。黒三角は各細胞種の培養期間の長さを示す。(B)各細胞種における、X染色体上のプロモーター領域メチル化率をバイオリンプロットで示した。(左)全X染色体のデータをさらに(中)父方、(右)母方X染色体に分けてプロットした。メチル化率はプロモーターごとに算出した数値を示す。

2022年度までの成果を、2024年2月にEMBO Journal誌に発表した(Gyobu-Motani et al, 2024, EMBO J)。

### (3) 3ステップ再構成卵巣法の導入

4-(1)で述べたとおり、卵母細胞をより効率よく誘導し、第一減数分裂期を完遂するには、2ステップ再構成卵巣法を改善する必要がある。2ステップ目でより発生が進んだマウス胎児卵巣体細胞を使うことで、OGLCをOC(1)LCに誘導することができた。したがって、減数分裂がさらに進行したマウス胎児卵巣体細胞とさらに再凝集させれば、OC(1)LCの分化を進めることができるのではないかと考えた。

まず、2ステップ目の再構成卵巣培養後28日時点で、OC(1)LCを単離し、減数分裂期の卵母細胞が多くみられるE15.5またはE16.5のマウス胎児卵巣体細胞と再凝集した。再構成卵巣を気相液相培養して28日後、免疫染色法により減数分裂マーカーの発現パターンを確認したが、OC(1)LCの数は減少し、より減数分裂が進行している様子は確認できなかった。次に、アルギン酸ゲルに3ステップ目の再構成卵巣を包埋して、三次元培養を試みたが効果はなかった。

### (4) 2ステップ再構成卵巣培養条件の最適化

卵母細胞は周囲の体細胞に囲まれた「卵胞」と呼ばれる構造を取ること、卵巣内で安定的に生存、分化する。4-(3)でOC(1)LCを単離するため、酵素処理したことで構造を崩したため、生存率・分化能が低下した可能性がある。そこで、次に2ステップ再構成卵巣のまま、培養条件を改善することを試みた。検討した条件は以下のとおりである。

培地に含まれるウシ血清(FBS)の濃度を10%から1%に変更し気相液相培養、  
レチノイン酸含有培地に変更し、気相液相培養、

28日培養後、4-(3)と同様、組織切片を免疫染色したが、いずれも減数分裂促進効果は認められなかった。

### <引用文献>

- Gyobu-Motani S, Yabuta Y, ... Saitou M. Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys. EMBO J. 2023 May 2;42(9):e112962.
- Sasaki K, Yokobayashi S, ... Saitou M. Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell. 2015 Aug 6;17(2):178-94.
- Yamashiro C, Sasaki K, ... Saitou M. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro. Science. 2018 Oct 19;362(6412):356-360.
- Yamashiro C, Sasaki K, Yokobayashi S, Kojima Y, Saitou M. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture. Nat Protoc. 2020 Apr;15(4):1560-1583.

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 Gyobu Motani Sayuri, Yabuta Yukihiro, Mizuta Ken, Katou Yoshitaka, Okamoto Ikuhiro, Kawasaki Masanori, Kitamura Ayaka, Tsukiyama Tomoyuki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Tsujimura Taro, Yamamoto Takuya, Nakamura Tomonori, Saitou Mitinori	4. 巻 42
2. 論文標題 Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	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） 10.15252/embj.2022112962	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
---------	---------