

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290033

研究課題名(和文) 体外培養における多能性幹細胞からの機能的な原始卵胞の作製

研究課題名(英文) Understanding of mechanism underlying primordial follicle formation using a pluripotent stem cell-based model

研究代表者

林 克彦 (HAYASHI, Katsuhiko)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20287486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は卵巣中の卵母細胞/卵子の源である原始卵胞の成立・維持機構を体外培養系を用いて明らかにすることである。特に本研究ではまず多能性幹細胞からの卵母細胞系列の分化誘導形を開発し、その過程において原始卵胞がどのように確立されていくかを解析する。多能性幹細胞は遺伝子改変が容易であり、それらから原始卵胞が作られる培養系を開発できれば、これまで不明な点が多い原始卵胞の成立・維持機構の解明に貢献し、不妊症の解明にも大きく貢献すると思われる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project is to establish a culture system that reproduce formation and maintenance of primordial follicles. This project is particularly unique in the point of using pluripotent stem cells, such as embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs), as a starting material. Reconstitution of primordial follicle formation/maintenance from pluripotent stem cells would be quite beneficial, as genetic manipulations in the cells are quite feasible. The culture system in this project will contribute to understanding of mechanisms underlying primordial follicle formation/maintenance, which will eventually elucidate causes of infertility.

研究分野：生殖生物学 幹細胞学

キーワード：卵母細胞 多能性幹細胞 生殖細胞 原始卵胞

1. 研究開始当初の背景

卵母細胞系列は個体の発生において中心的な働きをする細胞系列であり、その分化過程を解明することは、発生の根幹を理解するために重要なほか、不妊原因の究明にも貢献する。卵母細胞系列は胎仔期に胎仔卵巣に移動した始生殖細胞 (Primordial Germ Cells; PGCs) を起源とする。PGCs は胎仔卵巣の中で減数分裂に移行するため、これ以降は増殖することがない。つまり出生時における卵母細胞が一生涯に使える数ということになる。この最も未熟な卵母細胞は扁平な顆粒膜細胞に囲まれた原始卵胞として、静止した状態で卵巣の中で卵母細胞の蓄えとして機能する。原始卵胞は性成熟後に周期的に活性化して成長を開始することにより、徐々に失われる。原始卵胞の静止と活性化のバランスは重要であり、それが損なわれると早期閉経などの不妊の原因にもなる。ところが、原始卵胞の成立は胎仔期から出生にかけておこることや数的な制限も、これまで解明されていない点が多くのごされていた。原始卵胞の成立・維持機構の解明は不妊原因の究明という観点からも社会的要求の生の高い課題であるとも考えられる。

2. 研究の目的

卵母細胞系列は胎仔期から分化を開始し、数的にも限られていることから、本研究ではまずマウスの多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞) から PGCs を経て卵子までの発生過程を忠実に再現する完全体外培養系の開発を目指す。その後、開発した培養系を用いて、原始卵胞に特異的な遺伝子の単離と機能解析を進める。

3. 研究の方法

3-1 完全体外培養系の開発

本研究の開始までに申請者らにより開発された培養方法により、ES/iPS 細胞から PGC 様細胞 (PGCLCs) を分化誘導する。PGCLCs を胎仔の体細胞と凝集し、様々な培養試験に供する。PGCLCs の増殖や減数分裂、卵胞構造の形成を指標に培養条件を検討する。

3-2 培養により得られた卵母細胞の機能解析
培養により得られた卵母細胞の機能性を検証するために受精および胚発生試験に供する。また得られた初期胚は仮親に移植することにより個体までの発生の能を検討する。

3-3 体内との比較

培養により得られた卵母細胞系列の遺伝子発現を時系列的に体内のものと比較する。遺伝子発現解析には RNA-seq を用いる。

3-4 原始卵胞特異的遺伝子の単離と機能解析
遺伝子発現解析により原始卵胞特異的な遺伝子を単離する。またこれにより単離された遺伝子の機能を、ノックアウトや強制発現系により、解析する。

4. 研究成果

本研究では PGCLCs から卵子形成までの培養期間 (全体で約 5 週間) を 3 つの培養期間に区切り、各期間について培養条件を検討した結果、多能性幹細胞から卵子への分化過程を再現できる培養システムを開発した。検討過程では様々な基礎培地、血清濃度、成長因子、有機化合物などの組み合わせを変えることにより、卵子を育てる卵胞構造を効率良く構築できる培養条件を探索した。開発した卵子産生培養システムを用いることにより、ES 細胞、胎仔の細胞由来の iPS 細胞、さらには成体の尻尾由来の iPS 細胞のいずれの細胞からも卵子を産生することができた。また得られる卵子数も極めて多量であり、一回の培養実験で約 600 個から 1,000 個の卵子を産生することができた。卵子産生培養システム内における卵子形成過程の遺伝子発現の変動は体内の卵子形成過程と極めて良く似ていた。この培養システムで得られた卵子は、野生型の雄マウスの精子と受精させると、健全なマウスに発生した。これらのことから本研究により世界で初めて機能的な卵子を産み出す卵子産生培養システムの構築に成功した。さらに遺伝子発現の解析や詳しい観察を行うとこの培養システムにおける卵母細胞系列は原始卵胞で停止することなく一過性に卵母細胞の成長が行われることが明らかとなった。そこで体内の卵母細胞系列との遺伝子発現の比較により、原始卵胞に特異的に発現する遺伝子を多数同定することができた。今後はこれらの遺伝子の機能解析を進める予定である。

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 18 件)

Endoh M, Endo TA, Shinga J, Havashi K, Farcas A, Ma KW, Ito S, Sharif J, Endoh T, Onaga N, Nakayama M, Ishikura T, Masui O, Kessler BM, Suda T, Ohara O, Okuda A, Klose R, Koseki H. PCGF6-PRC1 suppresses premature differentiation of mouse embryonic stem cells by regulating germ cell-related genes. *Elife*. 2017 Mar 17;6. doi: 10.7554/eLife.21064.

Toh H, Shirane K, Miura F, Kubo N, Ichyanagi K, Havashi K, Saitou M, Suyama M, Ito T, Sasaki H. Software updates in the Illumina HiSeq platform affect whole-genome bisulfite sequencing. *BMC Genomics*. 2017 Jan 5;18(1):31. doi: 10.1186/s12864-016-3392-9.

Ishikura Y, Yabuta Y, Ohta H, Havashi K, Nakamura T, Okamoto I, Yamamoto T, Kurimoto K, Shirane K, Sasaki H, Saitou M. In Vitro Derivation and Propagation of Spermatogonial Stem Cell Activity from Mouse Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep*. 2016 Dec 6;17(10):2789-2804. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.026.

Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, **Havashi K**. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*. 2016 Nov 10;539(7628):299-303. doi: 10.1038/nature20104.

Shirane K, Kurimoto K, Yabuta Y, Yamaji M, Satoh J, Ito S, Watanabe A, **Havashi K**, Saitou M, Sasaki H. Global Landscape and Regulatory Principles of DNA Methylation Reprogramming for Germ Cell Specification by Mouse Pluripotent Stem Cells. *Dev Cell*. 2016 Oct 10;39(1):87-103. doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.008.

Morohaku K, Tanimoto R, Sasaki K, Kawahara-Miki R, Kono T, **Havashi K**, Hirao Y, Obata Y. Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 9;113(32):9021-6. doi: 10.1073/pnas.1603817113.

Saragusty J, Diecke S, Drukker M, Durrant B, Friedrich Ben-Nun I, Galli C, Göritz F, **Havashi K**, Hermes R, Holtze S, Johnson S, Lazzari G, Loi P, Loring JF, Okita K, Renfree MB, Seet S, Voracek T, Stejskal J, Ryder OA, Hildebrandt TB. Rewinding the process of mammalian extinction. *Zoo Biol*. 2016 Jul;35(4):280-92. doi: 10.1002/zoo.21284.

Esfandiari F, Mashinchian O, Ashtiani MK, Ghaniyan MH, **Havashi K**, Saei AA, Mahmoudi M, Baharvand H. Possibilities in Germ Cell Research: An Engineering Insight. *Trends Biotechnol*. 2015 Dec;33(12):735-46. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.004.

Kurimoto K, Yabuta Y, **Havashi K**, Ohta H, Kiyonari H, Mitani T, Moritoki Y, Kohri K, Kimura H, Yamamoto T, Katou Y, Shirahige K, Saitou M. Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2015 May 7;16(5):517-32. doi: 10.1016/j.stem.2015.03.002.

Havashi K. Current advances in mammalian germ cell research. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2014 Oct;105(10):196-203.

Kimura T, Kaga Y, Ohta H, Odamoto M, Sekita Y, Li K, Yamano N, Fujikawa K, Isotani A, Sasaki N, Toyoda M, **Havashi K**, Okabe M, Shinohara T, Saitou M, Nakano T. Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition. *Stem Cells*. 2014 Oct;32(10):2668-78. doi: 10.1002/stem.1781.

Havashi K, Saitou M. Perspectives of germ cell development in vitro in mammals. *Anim Sci J*. 2014 Jun;85(6):617-26. doi: 10.1111/asj.12199.

Aramaki S, **Havashi K**, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Kato Y, Shirahige K, Saitou M. A mesodermal factor, T, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell*. 2013 Dec 9;27(5):516-29. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.001.

Mizuta R, Araki S, Furukawa M, Furukawa Y, Ebara S, Shiokawa D, **Havashi K**, Tanuma S, Kitamura D. DNase γ is the effector endonuclease for internucleosomal DNA fragmentation in necrosis. *PLoS One*. 2013 Dec 2;8(12):e80223. doi: 10.1371/journal.pone.0080223. eCollection 2013.

Payer B, Rosenberg M, Yamaji M, Yabuta Y, Koyanagi-Aoi M, **Havashi K**, Yamanaka S, Saitou M, Lee JT. Tsix RNA and the germline factor, PRDM14, link X reactivation and stem cell reprogramming. *Mol Cell*. 2013 Dec 26;52(6):805-18. doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.023.

Havashi K, Saitou M. Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. *Methods Mol Biol*. 2013;1074:175-83. doi: 10.1007/978-1-62703-628-3_13.

Nakaki F, **Havashi K**, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M. Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature*. 2013 Sep 12;501(7466):222-6. doi: 10.1038/nature12417.

Havashi K, Saitou M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2013 Aug;8(8):1513-24. doi: 10.1038/nprot.2013.090.

〔学会発表〕(計 29 件)

林克彦：生殖細胞系列の体外培養による再構築
第 25 回高遠分子細胞生物学シンポジウム 滋賀
2013 年 8 月 29-30 日

Hayashi K: Germ cell differentiation from stem cells in mice Tunis 17th ISIVF 2013.9.4-7

林克彦：始原生殖細胞の分化を体外で再現する培養系の確立と利用 横浜 第 85 回日本遺伝学会

林克彦：生殖細胞系列の再構築培養系の確立と生殖巣の役割 大阪 第 21 回日本ステロイドホルモン学会

K. Hayashi Making oocyte and babies from stem cells. The congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction. Brisbane 2014.4.4

K. Hayashi Prospects of gamete production from pluripotent stem cells Leeuwarden The 45th meeting of the Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology, May

23 2014.

K. Hayashi Generation of eggs from mouse embryonic stem cells. Edingborough Society of Reproduction and Fertility, Sep. 21. 2014.

K. Hayashi Propagating generations of healthy mice using manufactured oocytes. Hong Kong Ovarian club V. Feb. 1. 2015

林克彦：生殖系列細胞のエピジェネティック制御と体外再構築 第 14 回再生医療学会 東京 2015 年 3 月 21 日

林克彦：Artificial Gamete の現状と今後の展開～技術開発とその意義～ 第 29 回日本医学会総会 京都 2015 年 4 月 11 日

K.Hayashi: Directed differentiation of germ cell lineage from pluripotent stem cells JSRM
Yokohama 4/27/2015

K.Hayashi: Reconstitution of the Female Germline in a Dish Gordon Research Conference
2015.7.19

林克彦：雄から卵子？：体外卵子産生系で見えてくるもの 第 86 回日本動物学会 新潟 2015 年 9 月 17 日

林克彦：雌性生殖細胞系列サイクルの試験管内再構成 第 108 回日本繁殖生物学会 宮崎 2015 年 9 月 19 日

林克彦：人工配偶子の最前線と課題 日本 IVF 学会 福岡 2015 年 9 月 26 日

Hayashi K: Derivation of Germ Cells from Stem Cells Copenhagen 17th ISIVF 2015.9.30

林克彦：体外卵子産生系の構築と卵母細胞分化メカニズムの解明九州実験動物研究会 福岡 2015 年 11 月 07 日

Hayashi K: Reconstitution of mouse oogenesis in vitro BMB2015 Kobe 2015.12.3

林克彦：試験管内生殖細胞の最前線と課題 日本生殖内分泌学会 神戸 2016 年 1 月 9 日

Hayashi K: Artificial oocyte production from pluripotent stem cells in mice. Epigenetic Penetrance of Reproductive Technologies Teramo, Jun 9-10, 2016

林克彦：生殖細胞系列分化培養系におけるサイトメトリー技術の適用 第 26 回日本サイトメトリー学会、福岡 2016 年 7 月 22 日

Hayashi K: Artificial gametes derived from pluripotent stem cells. @ AAAP Animal Science Congress Aug

24 2016 Fukuoka

林克彦：マウスの卵母細胞系列の再構築系とその応用 第 88 回日本遺伝学会、三島 2016 年 9 月 7 日

Hayashi K: Derivation of Germ Cells from Stem Cells. IFFS2016 Delhi, India Jun 21, 2016

林克彦：人工配偶子の作製技術の最前線 日本 IVF 学会 神戸 2016 年 10 月 1 日

林克彦：マウス多能性幹細胞を用いた体外培養による卵子形成過程の再構築 第 29 回日本動物実験代替法学会 福岡 2016 年 11 月 17 日

Hayashi K: A model of functional egg production in a dish KOSAR Seoul, Feb 26, 2016

林克彦：生殖細胞系列の体外再構築とその利用について 関西生殖医学集談会 大阪 2017 年 3 月 4 日

林克彦：試験管内で機能的な生殖細胞をつくる～試験管内で世代交代はできるのか？～ 日本動物学会第 69 回関東支部大会 2017 年 3 月 20 日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：始原生殖細胞を機能的に成熟した卵母細胞へと分化させる培養方法

発明者：尾畑やよい、平尾雄二、林克彦

権利者：東京農業大学、農研機構、九州大学
種類：国際特許

番号：PCT/JP2016/077574

出願年月日：2016.9.16

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林克彦 (HAYASHI, Katsuhiko)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20287486