

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860222

研究課題名(和文) マウスES細胞の分化誘導および体細胞からの直接誘導によるin vitro卵胞形成

研究課題名(英文) In vitro derivation of follicles from mouse ES cells and somatic cells

研究代表者

今村 公紀 (Imamura, Masanori)

京都大学・霊長類研究所・助教

研究者番号：80567743

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)：卵胞高誘導ES細胞では低誘導ES細胞に比べ、卵胞形成に重要な転写因子が高発現していることが判明した。そこで、iPS細胞にこれら転写因子の強制発現を行ったところ、NoboxとFiglaを導入した場合に生殖細胞マーカー陽性の細胞が観察された。この誘導効果はNobox単独でも認められるものの、Figlaとの共発現によって効果が増強された。ところが、分化条件では生殖細胞マーカー陽性細胞は認められず、体細胞分化が観察された。従って、これら因子の強制発現では生殖細胞マーカー陽性細胞の出現頻度が上がるものの、生殖細胞へと運命決定されていない準安定状態にあり、分化条件下では体細胞に分化すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Folliculogenesis-competent ES cells highly expressed transcription factors which are important for folliculogenesis. Based on this finding, we transduced transcription factors essential for folliculogenesis into mouse iPS cells with germ cell-specific reporter gene. Among genes transduced, overexpression of Nobox and Figla induced derivation of germ cell-specific reporter+ cells. The induction was observed even when only Nobox was transduced; however, the efficiency was improved by a combination with Figla. Unexpectedly, overexpression of Nobox and Figla did not induce germ cell-specific reporter+ cells under cell differentiation culture conditions. Taken all together, we speculate that Nobox and Figla would bring pluripotent stem cells to 'metastable state' between pluripotency and germ cells, therefore the cells could turn to somatic cells under somatic cell differentiation cultures.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ES細胞 iPS細胞 生殖細胞 卵胞形成 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

世界における不妊治療大国である我が国にとって、生殖補助技術の新たな展開として再生医学によるアプローチが期待されており、とりわけ培養下における卵子の作成・成熟は我が国にとって重要な命題の一つである。これまでに、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞の*in vitro*分化によっても卵子様細胞が誘導されることが知られていたが、いずれも二次卵胞に相当の発生段階で成長を停止してしまい、成熟卵胞および正常に受精・胚発生する卵胞は得られていない。また、卵胞様構造を分化誘導する確かな手法が確立されていないことから、そもそも特性解析自体が十分に行われておらず、正常な卵胞形成の進行を妨げている具体的な分子実体は不明であった。

そこで、申請者らは高効率に卵胞様構造の分化誘導が可能マウスES細胞株を樹立し、分子特性解析を行ってきた。このES細胞系をモデルとして用いることで、ES細胞由来の卵胞様構造と卵巣由来の卵胞を分かつ分子実体について詳細解析を行い、得られた知見を基に繊維芽細胞などの体細胞から卵胞様構造への直接誘導も可能になると考えた。本研究の成果は、卵胞形成の基本的な理解を深めるにのみならず、将来的には遺伝的素因によるヒト卵胞発育不良の病態解析や薬効評価への応用も期待された。

2. 研究の目的

本研究計画では、マウスES細胞の分化誘導および体細胞のDirect reprogrammingによって、培養下で人工的に卵胞形成を誘導することを旨とした。具体的な目的として、以下の3つを設定した。

- (1) マウスES細胞の卵胞分化誘導系を利用し、人工的な卵胞形成過程の動態解析を行う。
- (2) 上記ES細胞系を用い、卵胞誘導作用を有する遺伝子の発現・機能的スクリーニングを行う。
- (3) 絞り込んだ候補遺伝子を用い、体細胞のDirect reprogrammingによる卵胞誘導系を構築する。

3. 研究の方法

<マウスES細胞の*in vitro*分化誘導による卵胞形成>

- (1) ES細胞由来の卵胞様構造における遺伝子発現・DNAメチル化状態の詳細解析
 - (2) マウス卵巣由来の卵胞の成熟培養と分子動態解析
 - (3) ES細胞由来の卵胞様構造と卵巣由来の卵胞を区分する分子プロファイルの同定
- <マウス体細胞のDirect reprogrammingによる卵胞形成誘導>
- (1) 卵胞形成を誘導する候補因子の発現スクリーニング
 - (2) 卵胞形成を誘導する候補因子の機能的スクリーニング

(3) 体細胞への遺伝子導入による卵胞形成のDirect reprogramming

4. 研究成果

申請者らが樹立した、高効率に卵胞様構造を産生するマウスES細胞と通常のES細胞間の遺伝子発現比較により、卵胞形成に重要な転写因子であるFiglaが前者で高発現していることが判明した。そこで、Oct4-GFP/Vasa-RFP iPS細胞に対する卵胞形成関連の転写因子の強制発現を行ったところ、NoboxとFiglaの2遺伝子を導入した場合に、Vasa-RFP陽性細胞の出現が観察された。Vasa-RFP陽性細胞の大部分はOct4-GFPと共陽性であったが、Oct4-GFP陰性/Vasa-RFP陽性の細胞も一部で観察された。これらのiPS細胞の8株中5株でNoboxとFiglaの強制発現が確認されたのに対し、残り3株ではNoboxのみが強制発現されていたこと、Nobox単独強制発現iPS細胞よりもNobox/Figla共発現iPS細胞においてVasa-RFP陽性細胞コロニーの出現割合が高いことから、Noboxの単独強制発現でもVasa-RFP陽性細胞の誘導効果はあるものの、Figlaとの共発現によって効果が増強されることが示唆された。一方、NoboxおよびNobox/Figlaの強制発現iPS細胞の分化誘導条件下での培養と遺伝子発現解析を行ったところ、未分化条件下では観察されていたVasa-RFP陽性細胞は分化条件では逆に消失し、体細胞系譜への分化が観察された。また、減数分裂マーカー遺伝子等の発現上昇も認められなかった。従って、NoboxおよびNobox/Figlaの強制発現iPS細胞ではVasa-RFP陽性細胞の出現頻度が上昇するものの、生殖細胞系譜へと完全には運命決定されていない準安定状態にあり、分化条件下では体細胞へと分化すると考えられた。

本研究で得られた知見は全てマウスにおける結果であるが、ヒトを含む霊長類の生殖再生研究への適用を目指し、チンパンジーやマーモセットのiPS細胞の樹立についても並行して実施した。また、霊長類の生殖発生に関する知見自体が非常に乏しいことから、マーモセットをモデルとして生殖巣試料を用いた発生・分化における遺伝子発現解析についても取り組んだ。本研究は、マウスで実施した詳細解析の結果を霊長類へとつなぐ、トランスレーショナルスタディの一例として有用であると考えられる。

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7件)

- (1) Zachary Yu-Ching Lin, Takamasa Hirano, Shinsuke Shibata, Naomi M. Seki, Ryunosuke Kitajima, Ayako Sedohara, Mikiko C. Siomi, Erika Sasaki, Haruhiko

Siomi, Masanori Imamura, Hideyuki Okano, Gene expression ontogeny of spermatogenesis in the marmoset uncovers primate characteristics during testicular development. *Developmental Biology*, 400: 43-58, 2015, doi: 10.1016/j.ydbio.2015.01.014 (査読あり)

(2) Takamasa Hirano, Yuka W. Iwasaki, Zachary Yu-Ching Lin, Masanori Imamura, Naomi M. Seki, Erika Sasaki, Kuniaki Saito, Hideyuki Okano, Mikiko C. Siomi, Haruhiko Siomi. Small RNA profiling and characterization of piRNA clusters in the adult testes of the common marmoset, a model primate. *RNA*, 20: 1223-1237, 2014, doi: 10.1261/rna.045310.114 (査読あり)

(3) Masanori Imamura, Orié Hikabe, Zachary Yu-Ching Lin, Hideyuki Okano. Generation of Germ Cells In Vitro in the Era of Induced Pluripotent Stem Cells. *Molecular Reproduction and Development*, 81: 2-19, 2014, doi: 10.1002/mrd.22259 (査読あり)

(4) Mai Nitta, Masanori Imamura, Yu Inoue, Yasuo Kunitomo, Zachary Yu-Ching Lin, Takuya Ogawa, Keiichiro Yogo, Norihiro Ishida-Kitagawa, Noritaka Fukunaga, Hideyuki Okano, Eimei Sato, *Tatsuo Takeya, Jun Miyoshi. Aberrant Gene Expression and Sexually Incompatible Genomic Imprinting in Oocytes Derived from XY Mouse Embryonic Stem Cells In Vitro. *PLoS One*, 8: e58555, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0058555 (査読あり)

(5) 今村公紀, 日下部央里絵, 岡野栄之. シリーズで学ぶ最新知識・再生医学と産婦人科「生殖細胞を培養下で作成する」産婦人科の実際, 62 巻 5 号, p707-713, 2013 年 (査読なし)

(6) 今村公紀, 中島龍介, 岡野栄之. シリーズで学ぶ最新知識・再生医学と産婦人科「多能性幹細胞の培養と作出」産婦人科の実際, 62 巻 4 号, p559-565, 2013 年 (査読なし)

(7) 今村公紀, 岡野栄之. シリーズで学ぶ最新知識・再生医学と産婦人科「配偶子の幹細胞」産婦人科の実際, 62 巻 3 号, p399-404, 2013 年 (査読なし)

[学会発表] (計 9 件)

(1) 今村公紀, 「霊長類生殖細胞の *Developmental Biology* と iPS 細胞を用いた進化生物学/進化医学」, 第 3 回霊長類認知ゲノミクスプロジェクト ワークショップ,

東京大学医学部, 東京, 2015/3/25

(2) 今村公紀, 「チンパンジー iPS 細胞を用いたヒトの進化生物学/進化医学」, 第 4 回超異分野学会, アステラス製薬旧本社ビル, 東京, 2015/3/8

(3) Zachary YC Lin, Masanori Imamura, Takamasa Hirano, Eiji Matsunaga, Miki Taoka, Hiroo Imai, Hirotaka J. Okano, Atsushi Iriki, Mikiko C. Siomi, Haruhiko Siomi, Erika Sasaki, Hirohisa Hirai, Hideyuki Okano. Developmental dynamics and Culture of Testicular Germ Cells in Common Marmoset *Callithrix jacchus*. Cryopreservation Conference 2014, 岡崎コンファレンスセンター, 岡崎, 2014/10/23

(4) 今村公紀, 「霊長類精子形成の発生・分化と培養」, 京都大学霊長類研究所共同利用研究会「霊長類への展開に向けた幹細胞・生殖細胞・エピゲノム研究 Stem Cells, Germ Cells, and Epigenetics for Primate Research」, 京都大学霊長類研究所, 愛知, 2014/8/26

(5) Masanori Imamura, “iPS Cells as a Reproductive Tool for Investigating Germ Cell Development and Engineering”, Korean Association for Laboratory Animal Science 2014 International Symposium, The Ocean Resort, Yeosu, Korea, 2014/8/21

(6) 今村公紀, リンユーチン, 西原浩司, 日下部央里絵, 岡野 James 洋尚, 今井啓雄, 平井啓久, 岡野栄之. ヒト特異性を探るツールとしてのチンパンジー iPS 細胞. 第 30 回日本霊長類学会大会, 大阪科学技術センタービル, 大阪, 2014/7/6

(7) 今村公紀. ヒト特異性を探るツールとしてのチンパンジー iPS 細胞. 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 伊藤国際学術研究センター, 東京, 2014/5/26

(8) 今村公紀, 「哺乳動物の生殖細胞を理解し、培養し、作り出す」, 第 6 回京都大学霊長類研究所談話会, 京都大学霊長類研究所, 愛知, 2013/8/19

(9) Masanori Imamura, Mai Nitta, Rieko Ikeda, Keiichiro Yogo, Noritaka Fukunaga, Eimei Sato, Tatsuo Takeya, Jun Miyoshi, Takashi Shinohara, Yasuhisa Matsui, Kuniya Abe, Shinya Yamanaka, Toshiaki Noce, Hideyuki Okano. Molecular characterization of proliferative germ-like cells derived from pluripotent stem cells in vitro. The 11th Stem cell Research Symposium, 伊藤国際学術研究センター,

東京, 2013/5/17

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

アウトリーチ活動

(1) 今村公紀. 「霊長類から切り拓く iPS 細胞研究の未来」. NEXT FORUM 2014. ニコファーレ, 東京, 2014/10/24 (ニコニコ生放送にて配信)

(2) 今村公紀. 「iPS 細胞を染色する」. 平成 26 年度 京都大学霊長類研究所 犬山公開講座にて遺伝実習. 京都大学霊長類研究所 (2014/7/26-27)

(3) 岩崎佐和, 今村公紀, 中村彰宏, 矢野十織. 「アカデミックトーク!」. 第 12 回赤坂ライフサイエンスバー講演. オーガニックワイン専門店マヴィ 赤坂店 (2013/12/21)

(4) 「中高生の科学部活動振興プログラム」(群馬県立沼田女子高等学校). 高校生の研究体験サマースクールの実施. 慶應義塾大学医学部 (2013/8/22)

(5) 今村公紀. 「iPS 細胞誕生の舞台裏」. 第 3 回赤坂ライフサイエンスバー講演. オーガニックワイン専門店マヴィ 赤坂店 (2013/3/23).

(6) 今村公紀. 「iPS 細胞誕生の舞台裏!」. サイエンスチャンネル ニュースミニ. JST (2013/4/23 配信), URL : <http://sciencechannel.jst.go.jp/M130011/detail/M130011002.html>

研究室ホームページ URL :

http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/molecular_biology/member/imamura.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

今村 公紀 (IMAMURA, Masanori)

京都大学霊長類研究所

研究者番号 : 80567743

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者