

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82612

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H05764

研究課題名(和文)生殖細胞を介した遺伝子改変霊長類作製技術の開発

研究課題名(英文)Generation of genetically modified primates using cultured germ cells

研究代表者

渡部 聡朗(Watanabe, Toshiaki)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・専門職

研究者番号：40715405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,300,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類生殖細胞発生を研究するために、(遺伝子改変を行った) iPS細胞やES細胞から始原生殖細胞様細胞(PGCLC)を誘導して、そこから生殖細胞発生を進める系を開発した。マウスの幼児生殖巣体細胞とマーモセットPGCLCから異種間再構成精巣を作製して、その再構成精巣をマウスの腎被膜下に他種移植を行い生育させることで、マーモセットPGCLCを前精原細胞まで発生を進めることに成功した。また、マーモセットの新生児精巣とPGCLCをマーモセット腎被膜下へ自家移植し、PGCLCを前精原細胞まで発生させる方法も開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した技術は、細胞ベースの遺伝子改変マーモセット作製技術を確立していくための基盤となる。また、マーモセット(霊長類)の初期生殖細胞発生系を研究するための実験系として役立つ。

研究成果の概要(英文)：I developed two methods for putting forward the development of PGCLCs. The first method involves the generation of xenogenic reconstituted testes under the kidney capsule of immunodeficient mice. In the reconstituted testes, marmoset PGCLCs are differentiated into late PGCs 30 days after the transplantation, and then they are further differentiated into gonocytes in 90 days. The second method is auto-transplantation of marmoset PGCLCs and marmoset newborn testes cells under the kidney capsule of marmosets to form the reconstituted testes. In the reconstituted testes, PGCLCs similarly differentiated into early gonocytes. We are now working on long term experiment to achieve further development.

研究分野：生殖生物学

キーワード：マーモセット 生殖細胞 始原生殖細胞様細胞 mRNA transfection iPS細胞 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

霊長類に特異的な現象・分子機構・遺伝子機能を理解するために遺伝子改変霊長類が必要である。しかし現在の受精卵ベースの方法は多大なコストが必要だけでなく、複雑な遺伝子改変を持つ動物を作ることは難しい。他方、細胞ベースの方法であれば細胞培養の段階で選抜のプロセスを経ることができるので、確実に目的の遺伝子改変を持った個体を作製することができる。さらには、細胞ベースの方法は受精卵ベースの方法では難しかった巨大領域の欠損のような低頻度で起こる遺伝子改変を可能にする。しかしながら、そのような細胞ベースの方法はこれまで霊長類において開発されていない。

マウスにおいては ES/iPS 細胞から始原生殖細胞様細胞(PGCLC)を作製して、それをマウス精巣に移植することで精子を作製する系が確立している。ヒトや霊長類においても ES/iPS 細胞から PGCLC を作製が報告されている。研究代表者も SOX17 mRNA の transfection によってマーマセット iPS 細胞から PGCLC を効率的に誘導する系を確立している。

2. 研究の目的

様々なタイプの遺伝子改変マーマセット作製を可能にするために、あらかじめ目的の改変を持ったものを選抜できる細胞ベースの方法を開発する。そこで、本研究では遺伝子改変した ES/iPS 細胞から PGCLC を作製して生殖細胞まで分化させることで遺伝子改変を作製する方法の開発を目指す。また、そのような系は生殖細胞発生系を遺伝子改変を行って研究を行うのにも役立てられる。

3. 研究の方法

研究1 :免疫不全マウスへの再構成精巣の移植

Sox17 mRNA を用いてマーマセット iPS 細胞から誘導した PGCLC とマウスの精巣体細胞の間で細胞塊を作製した。NOG マウス腎被膜下へ移植して再構成精巣を作製した。PGCLC からの発生を免疫染色、シングルセル Bisulfite-seq、RNA-seq を用いて評価を行った。

研究2 :マーマセットへの再構成精巣の自家移植

マーマセット新生精巣から再構成精巣の作製が可能かを検討した。新生児マーマセットから片側精巣を採取し、細胞を分散して凍結保存を行った。同時に、同じ新生児個体より繊維芽細胞を樹立しそれから iPS 細胞を誘導した。iPS 細胞から PGCLC を作製した。PGCLC と凍結保存していた精巣から細胞塊を作製し、マーマセットの腎臓や精巣に自家移植を行った(精巣は現在実験中)。免疫染色により発生段階の評価を行った。

4. 研究成果

研究1 :免疫不全マウスへの再構成精巣の移植

マウス胎児精巣とマーマセット PGCLC から細胞塊を作製し免疫不全マウスの腎被膜下に移植した。移植後 28 日目には、腎被膜下において成長した細胞塊が見られ、PGCLC に由来する EGFP が観察された。また、切片を作製したところ精細管構造が見られ、EGFP を発現する PGCLC は精細管内に取り込まれている

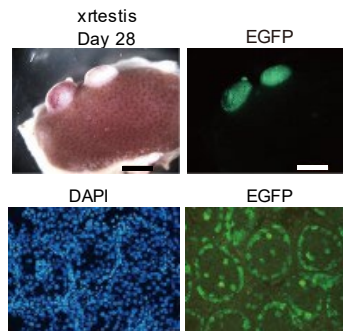


図1. マウス腎被膜下に形成された再構成精巣

ことが観察された(図 1)。

再構成精巣内でマーマセット PGCLC の発生が進行するのかを調べるために、腎被膜下に細胞塊を移植した。その後、経時的に再構成精巣を回収し、PGC のマーカーである TFAP2C と Gonocyte のマーカーである MAGEA4 で免疫染色を行った(図2)。移植後 28 日目の PGCLC 由来細胞(EGFP 陽性細胞)においてはまだ PGC マーカーである TFAP2C が発現して MAGEA4 の発現は見られなかった。56 日目になると半分近くの細胞で MAGEA4 の発現が観察され、PGC から Gonocyte への分化が起こっていると考えられた。81 日目においては全ての細胞で MAGEA4 の発現が見られ、Gonocyte へと分化していると考えられた。生殖細胞発生の分化の指標としてゲノムワイドな DNA メチル化の消去がある。生体内では PGC の前期から後期にかけて脱メチル化が進み、PGC 後期から Gonocyte 前期にかけてはほぼ完全に消去された状態で維持される。腎被膜下の PGCLC の発生系においては、移植後 25 日目にはほぼ消去されており、移植後 105 日目においても DNA メチル化レベルが低いままであることが分かった(図3)(より長期の培養は、がん化するため難しい)。また、day105 の細胞の遺伝子発現を RNA-seq によって調べたところ Gonocyte のマーカー遺伝子の発現が検出された。本培養系によって初期の Gonocyte まで分化が実現した。結果を論文にまとめ、現在 revise の最終段階である(BioRxiv で閲覧可能)。

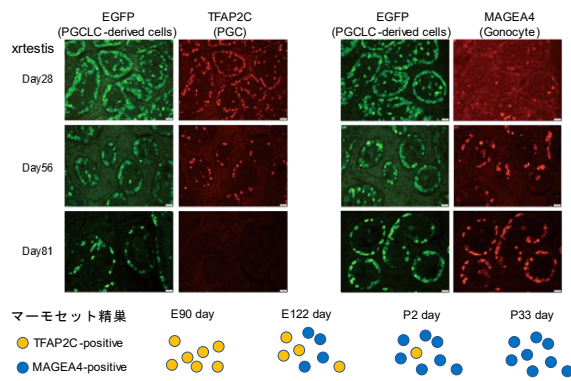


図 2. 再構成精巣中における PGCLC の分化
下のチャートは生体精巣において各マーカーを発現する細胞の割合を示す。

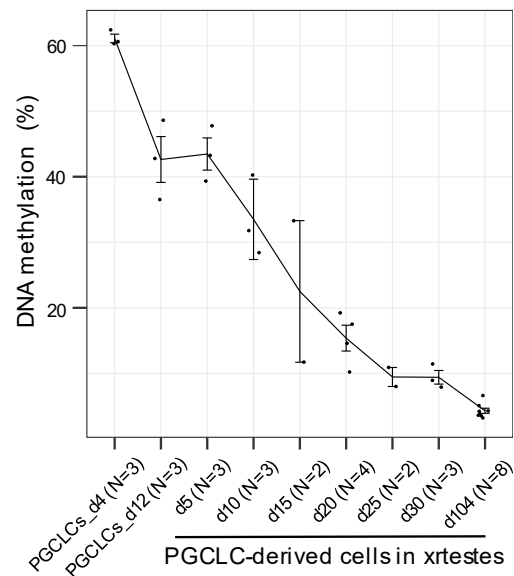


図 3. PGCLC の DNA メチル化レベルの変化

研究 2 : マーマセットへの再構成精巣の自家移植

始めに、凍結保存したマーマセット新生児精巣から *in vitro* において再構成精巣が作製できることが明らかにした。次にマーマセットの体内で再構成精巣を作製するために、新生児個体から iPS 細胞を樹立して CAG-EGFP をレンチウイルスで導入して細胞をラベリングした。それを PGCLC へと分化させ、凍結保存していた新生児精巣と細胞塊を作製し、成長したマーマセットの腎被膜下に移植した。移植 105 日目に観察を行ったところ、移植した細胞塊が成長しており、PGCLC に由来する EGFP の蛍光が観察された(図4A)。細胞塊を回収し、HE 染色をおこなったところ明確な精細管構造が形成されていることが明らかになった(図4B)。採取した 105 日目再構成精巣の免疫染色の結果、ほとんどの PGCLC 由来細胞において PGC マーカーの TFAP2C の発現が消失して Gonocyte マーカーである MAGEA4 の発現が確認された(図4C,D)。マウス腎臓に移植した場合は違いがん化している様子がまったくなかったため、

現在はより長期の実験を行っているところである。

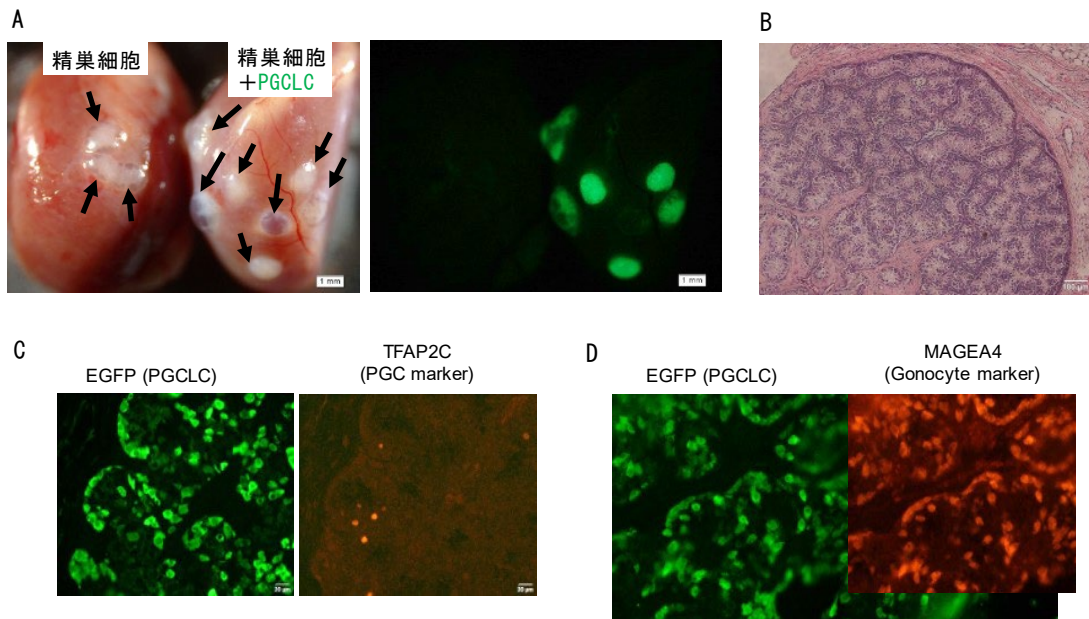


図 4. 自家移植により作製した再構成精巣

A. 精巣細胞のみから作製した再構成精巣（腎臓左）および精巣細胞に PGCLC を加えて作製した再構成精巣（腎臓右）

B. 再構成精巣の HE 像

C, D PGCLC を加えて作製した再構成精巣の免疫染色。EGFP と PGC マーカーの TFAP2C の共染色 (C)、EGFP と MAGEA4 の共染色 (D)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Eto Tomoo, Ueda Hiroki, Ito Ryoji, Takahashi Tsukasa, Watanabe Toshiaki, Goto Motohito, Sotomaru Yusuke, Tanaka Nobuaki, Takahashi Riichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Establishment of an integrated automated embryonic manipulation system for producing genetically modified mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91148-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kubiura-Ichimarū Musashi, Penfold Christopher, Kojima Kazuaki, Dollet Constance, Yabukami Haruka, Semi Katsunori, Takashima Yasuhiro, Boroviak Thorsten, Kawaji Hideya, Woltjen Knut, Minoda Aki, Sasaki Erika, Watanabe Toshiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 mRNA-based generation of marmoset PGCLCs capable of differentiation into gonocyte-like cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	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） 10.1101/2022.09.20.508677	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Toshiaki Watanabe and Erika Sasaki	4. 巻 27 March 2021 on line
2. 論文標題 Efficient Induction of Primate iPS Cells Using a Combination of RNA Transfection and Chemical Compounds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/7651_2021_373	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小島一晃、近藤洋介、小原実穂、Dollet Constance、山海直、仲木竜、渡部聡朗
2. 発表標題 霊長類コモンマーマセット及びカニクイザルの雄性生殖細胞における DNA メチル化確立過程のシングルセル解析
3. 学会等名 日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toshiaki Watanabe
2. 発表標題 Marmoset germ cell differentiation from pluripotent cells
3. 学会等名 55th Society for the Study of Reproduction annual conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部聡朗
2. 発表標題 多能性幹細胞からのマーモセット初期生殖細胞発生系の構築
3. 学会等名 マーモセット研究会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡部聡朗
2. 発表標題 Genomic and epigenomic integrity controls during primate male germ cell development
3. 学会等名 分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部聡朗
2. 発表標題 Primates have a distinct spermatogonial stem cell system to maintain the genomic integrity
3. 学会等名 マーモセット研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小島 一晃, 近藤 洋介, 垺本 晃海, 向笠 圭亮, 井上 貴史, 黒滝 陽子, 佐々木 えりか, 仲木 竜, 渡部 聡朗
2. 発表標題 霊長類マーマセット雄性生殖細胞におけるDNAメチル化確立過程のシングルセル解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡部聡朗, Christopher Penfold, 蟬克憲, 岩崎師壽江, 篠原晴香, 高島康, Thorsten Boroviak, Knut Woltjen, 佐々木えりか
2. 発表標題 マーマセット iPS 細胞からの始原生殖細胞様細胞の誘導
3. 学会等名 日本マーマセット研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島一晃, 藪上春香, 垺本晃海, 峰重隆幸, 井上貴史, 喜多善亮, 黒滝陽子, 下郡智美, 川路英哉, 蓑田亜希子, 佐々木えりか, 渡部聡朗
2. 発表標題 霊長類マーマセット雄性生殖幹細胞におけるPIWI-piRNA機構の解析
3. 学会等名 日本マーマセット研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島一晃, 藪上春香, 垺本晃海, 峰重隆幸, 井上貴史, 喜多善亮, 黒滝陽子, 下郡智美, 川路英哉, 蓑田亜希子, 佐々木えりか, 渡部聡朗
2. 発表標題 Analysis of PIWI-piRNA mechanism in primate marmosets male germline stem cells
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

〔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			
英国	ケンブリッジ大学			