

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25114006

研究課題名(和文) in vitroにおけるPGC産生および分化のための新規培養系開発

研究課題名(英文) Reconstitution in culture of germ cell differentiation in mice

研究代表者

林 克彦(Hayashi, Katsuhiko)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：20287486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 77,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵子のもつ生物学的・医学的価値は極めて大きく、体外培養で卵子を産生する手法の開発は長い間望まれていました。本研究では種々の培養条件を検討することにより世界で初めて、多能性幹細胞(ES細胞およびiPS細胞)から卵子までのすべての過程を培養皿上で行う卵子産生培養システムを構築しました。この培養システムで得られた卵子は、受精により個体にまで発生しました。この方法では成体のマウスの尻尾の組織由来のiPS細胞からも機能的な卵子を得ることができました。体外培養下で多能性幹細胞から卵子に至る過程は、生体内の卵子の形成過程を概ね踏襲しており、改善点はあるものの、培養モデルとして十分に有用と考えられます。

研究成果の概要(英文)：The female germline undergoes a unique sequence of differentiation processes that endows totipotency to the egg. The reconstitution of these events in vitro using pluripotent stem cells is a key achievement in reproductive biology and regenerative medicine. Here, this study achieved successful reconstitution in vitro of the entire process of oogenesis from pluripotent stem cells. Fully potent mature oocytes were generated in culture from embryonic stem cells as well as induced pluripotent stem cells derived from both embryonic fibroblasts and adult tail tip fibroblasts. Moreover, pluripotent stem cell lines were re-derived from the in vitro-generated eggs, thereby reconstituting a female germline cycle in a dish. This culture system will provide a unique platform for elucidating the molecular mechanisms underlying totipotency and clues to the production of oocytes of other mammalian species in culture.

研究分野：生殖生物学

キーワード：多能性幹細胞 卵母細胞

1. 研究開始当初の背景

始原生殖細胞(Primordial Germ cells: PGCs)はすべての配偶子の源であり、減数分裂を介して卵と精子に分化した後、受精により次世代の個体を作り出す。世代を超えて遺伝情報を繋ぐ生殖の担い手としてのPGCsは、胚発生の初期に体細胞系列と分岐するが、その分化機構や性に応じた配偶子への成熟機構は不明な点が多い。

初期のPGCsは少数の細胞集団であることから十分な実験材料の取得が困難であった。これに対し、申請者らは多能性幹細胞(ES細胞およびiPS細胞)からPGCsを分化させる体外培養系の開発を行い、発生初期のPGCsと同等の細胞を体外で作出することに成功した(Hayashi et al. 2011 Cell, Hayashi et al. 2012 Science)。この成果は、PGCsの初期分化を体外培養系で再現したばかりでなく、ES細胞から機能的な配偶子を体外培養系で産生する実現性を増加させた。しかしながら移植を行わずに体外培養を継続すると、ES細胞由来のPGCsは発生段階の早い段階で発生を停止することから、さらなる体外培養系の改良が求められていた。

2. 研究の目的

本研究はマウスの多能性幹細胞(ES細胞)から始原生殖細胞(PGCs)を作出する体外培養技術を発展させ、ES細胞から卵原細胞、精原細胞を分化させる体外培養系の確立を目指す。さらに、領域内の計画研究班と連携して、ES細胞由来の卵原/精原細胞を受精可能な配偶子まで分化させる体外培養系の確立を目指す。またこれらの培養系を用いてマウスやショウジョウバエのPGCsの形成に必須な遺伝子の機能について解析する。これにより配偶子研究の発展に貢献する培養系の開発とともに、種間で保存された生殖細胞の分化を制御する遺伝子ネットワークの解明を目指す。

3. 研究の方法

ES/iPS細胞由来のPGCs(生体内のPGCsと区別するためPGC-like cells: PGCLCsとする)を卵原細胞または精原細胞に分化させる体外培養系の確立のために、雌雄それぞれの生殖巣の体細胞と長期間共培養(凝集培養)する。ES/iPS細胞に組み込んだ遺伝子から発現する蛍光蛋白質を指標に卵原細胞または精原細胞を単離し、遺伝子発現およびインプリント遺伝子の解析を行う。その後、領域内の計画研究班と連携して配偶子産生のための培養を行う。形態的变化や遺伝子発現変化を指標に培養条件を検討し、機能的な精子または卵子に至る培養系を開発する。得られる精子や卵子は受精および受精卵の移植により機能性を検証する。また雌雄それぞれの生殖細胞系列の遺伝子発現を、生体内のものと比較して、その分化過程を検証する。

一方種間に保存された遺伝子ネットワー

クの同定について、以下のように行う。まずショウジョウバエのPGCsの形成に必須な転写因子Ovoに注目する。マウスES細胞を用いて、ショウジョウバエOvoのマウスホモログであるOvo1、Ovo2、Ovo3遺伝子を単独またはすべてノックアウトする。それぞれのES細胞からPGCLCsを誘導して、Ovo遺伝子群のPGC形成における必要性を確認する。その後、それらのノックアウトES細胞からのPGCLCsの分化過程における遺伝子の発現変化を解析する。得られた結果をショウジョウバエのOvoを欠損した生殖細胞系列と比較することにより、種間で保存されたPGCsの形成に必要な遺伝子ネットワークを明らかにする。

4. 研究成果

本研究では始原生殖細胞から卵子ができるまでの5週間を3つの培養期間に区切り、各期間について基礎的な培養条件の検討を行った。具体的には、PGCLCsを胚齢12日目の雌の生殖巣の体細胞と凝集培養し、これらを様々な基礎培地、血清濃度、成長因子、有機化合物などの組み合わせを変えた培地で培養することにより、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。その結果、多くの卵母細胞が得られる培養系を開発することができた(図1、表1)。

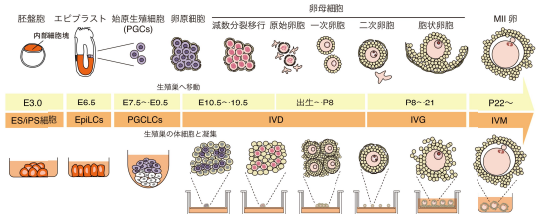


図1. 体内の卵母細胞を再現する体外培養系の概略
生体内での卵子形成過程(上)とそれに対応する体外培養系の各段階(下)を示す。PGCLC, 始原生殖細胞様細胞; EpiLC, エピブラスト様細胞; IVDi, 体外分化培養; IVG, 体外成長培養; IVM, 体外成熟培養; P, 出生後

培養日数と培地	操作と培地組成の詳細
1	再構成卵巣をインサートに移動
2	IVD-s αMEM, Nucleosides (基礎培地), 血清 2%, アスコルビン酸 150 μM, 2-メルカプトエタノール 55 μM, GlutaMAX 2mM, ペニシリン 50U/ml, ストレプトマイシン 50 μg/ml
4	IVD-s
5	IVD-s StemPro 34 SFM (基礎培地), 血清 10%, アスコルビン酸 150 μM, 2-メルカプトエタノール 55 μM, GlutaMAX 2mM, ペニシリン 50U/ml, ストレプトマイシン 50 μg/ml
7	IVD-s
9	+Cl
11	IVD-s 培地 +Cl IVD-s 培地, KCl 182.7mM 500mM
15	IVD-s (卵巣培地) αMEM (基礎培地), 血清 5%, HEPES 20mM, ペニシリン 50U/ml, ストレプトマイシン 50 μg/ml
21	二次卵巣を単離
1	IVG 培地 αMEM (基礎培地), 血清 5%, アスコルビン酸 150 μM, 2-メルカプトエタノール 100 μM, ペニシリン 50U/ml, ストレプトマイシン 50 μg/ml, PVF 2%, フォリスチム 0.1IU/ml (用事添加) ヒルビン酸ナトリウム 55 μg/ml (用事添加), (成長因子添加時は GDF9 15ng/ml, BMP15 15ng/ml を用事添加)
2	コラゲナーゼ処理 卵巣へインサートを移動する (コラゲナーゼ添加) (用事添加) αMEM, 血清 30%, ペニシリン 50U/ml, ストレプトマイシン 50 μg/ml, コラゲナーゼタイプ IV 0.1% (洗浄培地)
3	IVG αMEM, 血清 5%, ペニシリン 50U/ml, ストレプトマイシン 50 μg/ml
11	IVG 培地をインサート上部へ添加
1	IVM 培地 (IVM 培地) αMEM, 血清 5%, ヒルビン酸ナトリウム溶液 25 μg/ml, ペニシリン 50U/ml, ストレプトマイシン 50 μg/ml, EGF 4ng/ml (用事添加), フォリスチム 0.1IU/ml (用事添加), コナドロピン 1.2IU/ml (用事添加)
1	IVM
評価	Cell RT + ISA 培地 Modified HTF, ISA 0.4%

表1. 卵母細胞の体外培養系の培養条件

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

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を調べると、体内の卵子形成過程と極めて良く似ていた。重要なことに、卵子産生培養システムで得られた卵子は、その由来に関わらず、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(図2)。

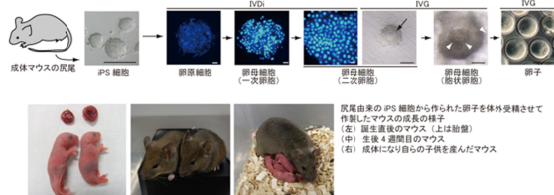


図2. 体外培養系で得られる卵母細胞・卵子およびそれらの受精により得られる個体

つまり性的に十分に成熟した成体の尻尾から得た iPS 細胞からでも培養皿上で機能的な卵子が作られることが証明された。得られたマウスは野生型のマウスと同様に成長し、正常に子供をつくる能力も有していた(図2)。これらのことから本研究が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。

また精原細胞の分化誘導系では PGCLCs を胚齢 12 日目の雄の生殖巣の体細胞と凝集培養し、培養条件を検討した。その結果、再凝集塊には精細管が形成され、その中に PGCLC 由来の精原細胞の分化が認められた。これらを精子幹細胞株(GS 細胞)を樹立する条件で培養すると、ES-PGCLC 由来の複数の GS 細胞株を得ることができた。これらをマウスの精細管に移植すると精子が得られ、これらを受精させると、健全な個体を得られた。

また *Ovol* 遺伝子が PGC 形成過程のどの段階で機能しているかを検証するため、*Ovol* 遺伝子 KO ES 細胞を用いて PGC へ分化誘導した。その結果、*Ovol2* KO 細胞および *Ovol1*, 2, 3 トリプル KO (TKO)細胞で初期の段階において PGC マーカー遺伝子である *Blimp1* の発現が野生型(WT)と比較して低下しており、最終的な PGC 数も減少していた。このことから、*Ovol2* は初期の段階で PGC への分岐を促進することが示唆された。

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 19 件)

1. Havashi K, Hikabe O, Obata Y, Hirao Y. Reconstitution of mouse oogenesis in a dish from pluripotent stem cells. *Nature Protoc.* 12:1733-1744. doi: 10.1038/nprot.2017.070. (2017) 査読：有

2. 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. 査読：有
3. Toh H, Shirane K, Miura F, Kubo N, Ichianagi 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. 査読：有
4. 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. 査読：有
5. 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. 査読：有
6. 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. 査読：有
7. 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. 査読：有
8. 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. 査読：有
9. Esfandiari F, Mashinchian O, Ashtiani MK, Ghanian 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. 査読：有
10. 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. 査読：有
 11. **Havashi K**. Current advances in mammalian germ cell research. Fukuoka Igaku Zasshi. 2014 Oct;105(10):196-203. 査読：有
 12. 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. 査読：有
 13. **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. 査読：有
 14. 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. 査読：有
 15. 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. 査読：有
 16. 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. 査読：有
 17. **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. 査読：有
 18. 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. 査読：有
 19. **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. 査読：有
- 〔学会発表〕(計 29 件)
1. 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
 2. **Havashi K**: Germ cell differentiation from stem cells in mice Tunis 17th ISIVF 2013.9.4-7
 3. 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
 4. 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
 5. **K.Havashi**: Making oocyte and babies from stem cells. The congress of the Asia Pacific Initiative on Reproduction. Brisbane 2014.4.4
 6. **K.Havashi**: Prospects of gamete production from pluripotent stem cells Leeuwarden The 45th meeting of the Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology, May 23 2014.
 7. **K.Havashi**: Generation of eggs from mouse embryonic stem cells. Edingborough Society of Reproduction and Fertility, Sep. 21. 2014.
 8. **K.Havashi**: Propagating generations of healthy mice using manufactured oocytes. Hong Kong Ovarian club V. Feb. 1. 2015
 9. 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
 10. 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
 11. **K.Havashi**: Directed differentiation of germ cell lineage from pluripotent stem cells JSRM 2015 Yokohama 4/27/2015
 12. **K.Havashi**: Reconstitution of the Female Germline

- in a Dish Gordon Research Conference
14. 2015.7.19
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. Hayashi K: Derivation of Germ Cells from Stem Cells Copenhagen 17th ISIVF 2015.9.30
 19. 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
 20. Hayashi K: Reconstitution of mouse oogenesis in vitro BMB2015 Kobe 2015.12.3
 21. 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
 22. Hayashi K: Artificial oocyte production from pluripotent stem cells in mice. Epigenetic Penetrance of Reproductive Technologies Teramo, Jun 9-10, 2016
 23. 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
 24. Hayashi K: Artificial gametes derived from pluripotent stem cells. @ AAAP Animal Science Congress Aug 24 2016 Fukuoka
 25. 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
 26. Hayashi K: Derivation of Germ Cells from Stem Cells. IFFS2016 Delhi, India Jun 21, 2016
 27. 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
 28. 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
 29. Hayashi K: A model of functional egg production in a dish KOSAR Seoul, Feb 26, 2016
 30. 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

31. 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