

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14740

研究課題名(和文) 卵子形成における生殖細胞自律的な性差の制御機構の解明

研究課題名(英文) Germ cell-intrinsic function of sex chromosome in oogenesis

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵母細胞の分化における性染色体の必要性について詳細に解析した。まず様々な性染色体のセット(XX、XYおよびX0)をもつES細胞を用いて卵母細胞への誘導を試みた。その結果、XXをもつES細胞と比較して、X0やXYをもつES細胞から得られる卵母細胞の数は1/10程度であった。またX0とXYを比較した場合、XYの方が少数であった。詳細な解析の結果、このこれらの原因は、減数分裂の相同染色体の対合異常、X染色体上の遺伝子の発現低下、およびY染色体上の遺伝子が卵母細胞の分化を阻害していることが明らかとなった。これらの知見は、性染色体異常の個体の不妊の原因を追求する上で極めて有用な知見となった。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed at understanding molecular mechanisms of sex chromosomes on oogenesis. Using an oocyte differentiation system, oocytes were produced from embryonic stem (ES) cells harboring XX, XY or X0 chromosomes. The number of oocytes from XY and X0 ES cells was much fewer than those from XX ES cells. Detail analyses demonstrated that the reasons of attenuated oocyte production from X0 and XY ES cells were (1) mispairing of the sex chromosome during meiotic prophase I, (2) lower dosage of X chromosome, (3) a negative impact of a gene on Y chromosome. We identified a novel function of the Y-linked gene on meiotic progression. These results contribute to understanding of reasons why oocyte production is attenuated in patients with sex chromosome disorder.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵母細胞 性染色体

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞系列は性差を認めない始原生殖細胞から始まり、最終的に雌雄差の顕著な配偶子に分化する。これまで性に応じた生殖細胞の分化は生殖器官(卵巣または精巣)の体細胞の性分化に先導されると考えられてきた。しかし性転換雄(遺伝的にはXXであるが表現型は雄)の精巣において精子形成が阻害されていること、同様に性転換雌(遺伝的にはXYであるが表現型は雌)の卵巣において卵子形成が阻害されていることから、生殖細胞自身の性が細胞自律的に精子もしくは卵子形成に寄与している可能性が示唆される。これらの知見に加え、X染色体を1本欠損した個体では卵子形成が軽微に阻害されていることから、卵子形成には性のみならずX染色体の量的制御も重要であることも示唆される。

しかしながら、性転換個体や染色体欠損個体を用いた解析では生殖細胞と体細胞ともに変異をもつために、生殖細胞自律的な寄与を解析するのは困難な状況であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、卵子形成における生殖細胞の性特異的な制御を解明することである。それにより、これまで盲点とされてきた卵子形成における生殖細胞自律的な制御に焦点をあて、卵母細胞のみで双方ともに活性化しているX染色体の卵子形成における生物学的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

研究の目的を達成するために以下の研究を行った。

1. 染色体組換えによる卵母細胞レポーター XO-ES 細胞の作製

XX-ES細胞から1本のX染色体を人為的に欠損させることによりXO-ES細胞を作製する。具体的にはXX-ES細胞のX染色体上の任意の位置に向かい合ったloxP配列に挟まれたDsRedを挿入する(Matsumura et al. 2007 *Nat Method*)。その後、Cre蛋白の発現によりX染色体間の組換えを誘起する。X染色体の欠失をDsRedの発現消失により検出し、それらの細胞をFACSにより単離する。

2. XX-, XY-, XO-ES細胞からの始原生殖細胞の誘導と疑似卵巣培養

XX-, XY-, XO-ES細胞から始原生殖細胞を分化誘導したのち、それらを胚齢12日目の雌の生殖巣の体細胞と凝集培養することにより疑似卵巣を形成させる。その後、卵母細胞に分化させ、それぞれの性染色体構成をもつ細胞における卵子の形成過程の違いを観察する。

3. RNA-seq解析と各性染色体構成における特異的発現遺伝子の単離

各性染色体構成をもつ卵母細胞を用いて

RNA-seq解析を行う。XX卵母細胞とXOまたはXY卵母細胞性における遺伝子発現を経時的に詳細に比較することにより、各染色体構成における発現プロファイルの作成と性染色体の転写活性化状態を解析する。

4. 卵子形成過程の観察と減数分裂時における性染色体の動態解析

減数分裂時における染色体の対合状態を明らかにする。そのために、それぞれの性染色体構成をもつ卵母細胞において免疫染色(SYCP1, SYCP3, gH2AX)を行う。

5. 卵母細胞形成における遺伝子機能の解析
遺伝子発現解析で選定されたXX卵母細胞特異的な遺伝子群を誘導的発現ベクターに組み込み、XO-またはXY-ES細胞に導入する。またはY染色体から発現する遺伝子をXX-ES細胞に導入する。それぞれのES細胞から卵母細胞を分化誘導することにより、これらの遺伝子の卵母細胞形成における機能を解析する。

4. 研究成果

XX-ES細胞のX染色体上へのloxP配列の組み込みとCreの発現による組み換えにより、XO-ES細胞を効率的に樹立することができた。これとXX-, XY-ES細胞を用いて、卵母細胞への分化誘導を行った。

その結果XX-ES細胞から誘導した卵母細胞の数は、一つの再構成卵巣当たり約200個であるのに対して、XO-, XY-ES細胞から誘導した場合はその数がそれぞれ約20個、約5個と有意に少ない。またXOとXYの間にも有意差が見られた。これにより個体での解析で不明であった卵子形成過程において生殖細胞自身の性染色体の役割が必要であるということが初めて明らかとなった。次に性染色体異常個体での卵子形成能の低下の原因と思われる、X染色体の量的不足、減数分裂異常、Y連鎖遺伝子の阻害作用について検討した。

まず減数分裂の進行を検証するために、減数分裂マーカーのSYCP3の抗体と体細胞分裂マーカーのEdUを用いて、XX-, XO-, XY-ES細胞から誘導した生殖細胞の免疫染色を行った。するとXXと比べ、XOやXYでは減数分裂の開始が遅延していた。XOでもXYでも同様の遅延が認められることから、生殖細胞自身のX染色体の量的不足により減数分裂の開始が遅延していると考えられた。これと同時に、染色体の対合状態をそれぞれの性染色体構成をもつ卵母細胞において免疫染色(SYCP1, SYCP3, gH2AX)により明らかにした。その結果、XX-ES細胞から誘導した卵母細胞では約半数が対合しているのに対して、XOでは約5%のみが対合し、XYでは対合している細胞は観察されなかった。従って、卵母細胞数の減少に対する対合異常の影響が大きいと考えられた。

これらの分化過程における遺伝子発現を解析した。X染色体上の遺伝子の発現量の総和について比較すると、XXをもつ卵母細胞はXOやXYをもつ卵母細胞の1.5倍程度であった。このことは、X染色体上の遺伝子の発現量は単純に染色体の本数とは比例せず、何らかの特殊な制御を受けていることが示唆された。またY染色体上にある遺伝子のうち、この時期に特異的に発現する遺伝子を単離した。

Y連鎖遺伝子の阻害作用の原因遺伝子を特定するために、Y連鎖遺伝子Aについて解析した。遺伝子AをXX卵母細胞に発現させたところ、体外培養系で得られる卵母細胞の数が有意に減少することが明らかとなった。このことから遺伝子Aが卵子形成過程を阻害している可能性が示唆された。

本研究によって、性染色体異常個体で卵子形成能が低下する原因として考えられていたX染色体の量的制御、減数分裂異常、Y連鎖遺伝子の阻害作用の詳細が明らかになった。

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8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, Ichiyanagi 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

[学会発表](計10件)

1. 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
2. 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
3. Hayashi K: A model of functional egg production in a dish KOSAR Seoul, Feb 26, 2016
4. 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
5. Hayashi K: Derivation of Germ Cells from Stem Cells. IFFS2016 Delhi, India Jun 21, 2016
6. 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
7. 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
8. Hayashi K: Artificial gametes derived from pluripotent stem cells. @ AAAP Animal Science

Congress Aug 24 2016 Fukuoka

9. 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

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

〔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

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

()

研究者番号:

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()