

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18816

研究課題名(和文) 全能性獲得機構の解明と再構築に向けたin vitro卵細胞産生系の確立

研究課題名(英文) Establishment of an in vitro oocyte production system toward understanding a totipotency

研究代表者

浜崎 伸彦 (HAMAZAKI, NOBUHIKO)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10757008

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)：我々は、卵細胞というたった一つの細胞から私達のような人間が生じた、と学校で教わってきた。もう一つ、我々は数十兆の体細胞からできているとも教わった。では、いま私達が持っているその数十兆の細胞から一つを取り出してきて、そこから別の私達を改めて生み出すことは可能だろうか？答えはNoである。では卵細胞と体細胞の違いはなにか？この問に答えるために、本研究は、謎が多い卵細胞形成過程をすべて体外で再現することを目的として研究を始めた。種々の条件検討の末に、ES細胞を出発点として、卵子(MII卵母細胞)をつくる培養条件の確立に成功した。これは卵細胞のもつ能力の謎を解き明かす上で大きな第一歩となる。

研究成果の概要(英文)：In multicellular organisms, oocytes possess an incredible ability to complete the development from a single cell. The ability is supported in part by unique features of oocytes such as a large cell size, specialized organelles and stored maternal factors. These features must be orchestrated by oocyte-specific transcriptional networks. However, due to the lack of an experimental system that enables the evaluation of multiple gene functions in oogenesis, there is no comprehensive and systematic study to identify the transcriptional networks. Hence, we recently developed an in vitro oocyte differentiation system from mouse pluripotent stem cells. This system has a great potential to clarify the basis of totipotency in oocytes.

研究分野：卵母細胞

キーワード：in vitro 卵母細胞分化誘導 トランスクリプトーム RNA-seq ES・iPS細胞 全能性 生殖細胞

1. 研究開始当初の背景

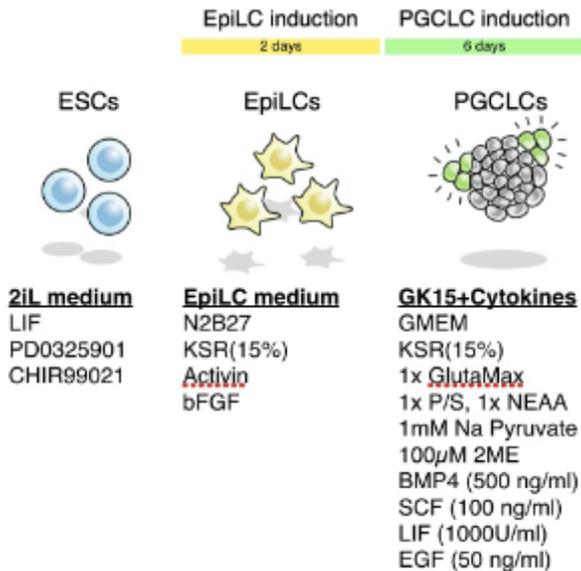
哺乳類において、一細胞からの個体発生能として定義される全能性は卵細胞に備わる特別な性質である。しかしながら、こうした全能性を形成するメカニズムは、不妊治療など社会的要望が強い分野にも関わらず、難航している。その主な原因は、胎児卵巣で進行する卵形成過程を体外で再現できないことにあった。

2. 研究の目的

そこで本研究では多能性細胞である ES・iPS 細胞を出発点とし、全能性細胞である卵細胞を生み出せる体外培養系を確立することを目的とした。

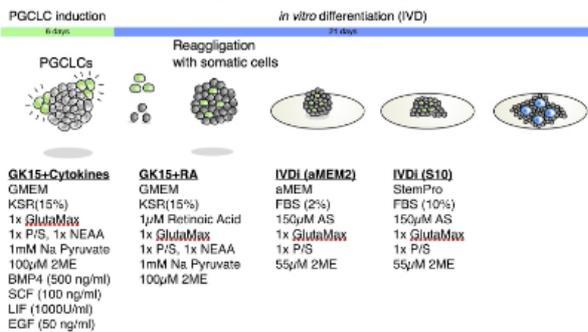
3. 研究の方法

これまでに申請者らは ES 細胞から BMP4 などの液性因子を加えることで始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)を *in vitro* で誘導できることを報告してきた (図 1)。



(図 1) ES 細胞から PGCLCs の誘導

この培養系をさらに延長することで卵細胞まで到達できないかを検証した。特に胎児卵巣細胞と共培養することが重要であることはすでにわかっていたので、胎児卵巣細胞との培養を持続できる培養条件を検討した (図 2)。

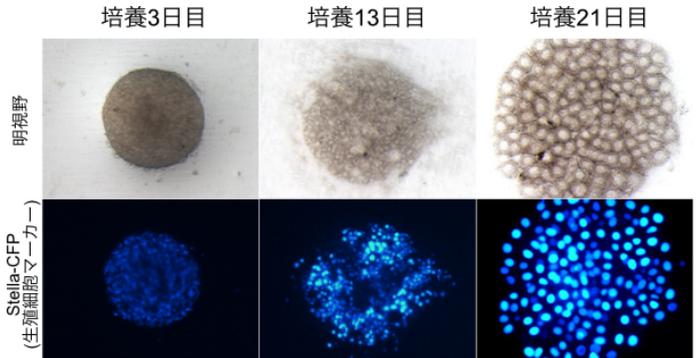


(図 2) PGCLC と胎児卵巣細胞との凝集培養

4. 研究成果

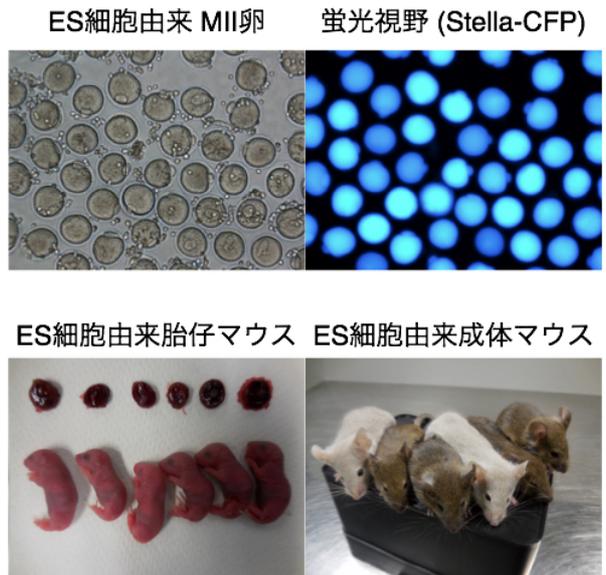
(1) 体外卵母細胞誘導系の確立

胎齢 12.5 日胚の胎児卵巣と PGCLCs を混ぜることで凝集塊を作り、コラーゲン膜上で培養を継続することで PGCLCs を卵母細胞に分化させることに成功した (図 3)。



(図 3) 凝集培養による卵母細胞誘導

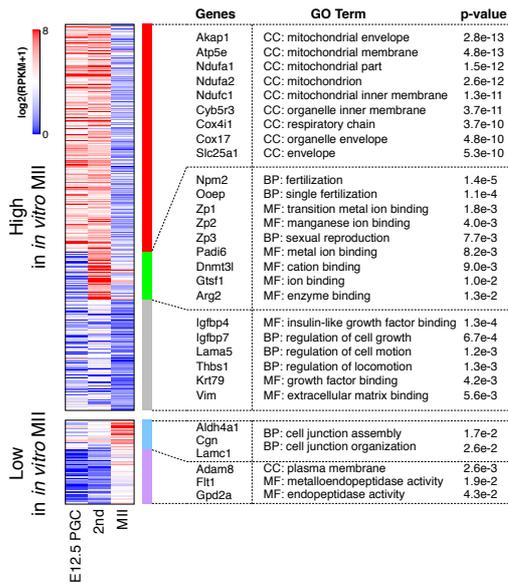
この卵母細胞は受精させると、3.5%と低率ながら健康な個体になることができたことから、機能的な卵母細胞を体外で作成できることが証明された (図 4)。



(図 4) 体外培養卵母細胞由来マウス個体

(2) 生体由来卵母細胞との比較

これら、体外培養系にて作成された卵母細胞のクオリティを調べるために、遺伝子発現プロファイルを RNA-seq により解析したところ、二次卵母細胞までは生体卵母細胞とほぼ同じであること、一方でそこからさらに発生が進んだ成熟 MII 卵では、424 遺伝子が生体卵母細胞と異なる発現レベルを示すことを明らかにした。異常発現パターンを示す遺伝子の多くはミトコンドリア遺伝子、卵形成関連遺伝子であった (図 5)。



(図5) 遺伝子発現異常を示す遺伝子群

これらの遺伝子発現の違いは培養後期から見られたことから、今後は、卵成熟過程における培養条件、特に培養後期の条件のさらなる改善が望まれる。

本研究により、体外で卵母細胞を作出することができる技術基盤が確立された。これにより、卵細胞の持つ、個体発生能という驚異的な能力の分子基盤を明らかにするための強力なツールが完成したと言える。

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 1 件)

1. O Hikabe, N Hamazaki, G Nagamatsu, Y Obata, Y Hirao, N Hamada, S Shimamoto, T Imamura, K Nakashima, M Saitou, K Hayashi, “Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line”, Nature, 査読有 volume 539, pages 299–303 (10 November 2016), doi:10.1038/nature20104

[学会発表] (計 4 件)

1. Nobuhiko Hamazaki, So Shimamoto, Orié Hikabe, Yohei Nishimura, Norio Hamada, Katsuhiko Hayashi, “Transcriptional regulatory networks controlling the oocyte

identity”, CDB symposium, Kobe, Japan, Mar. 2018

2. Nobuhiko Hamazaki, So Shimamoto, Orié Hikabe, Yohei Nishimura, Norio Hamada, Katsuhiko Hayashi, “Uncovering the gene-networks regulating oogenesis”, World Congress of Reproductive Biology, Okinawa, Japan, Sep. 2017
3. Nobuhiko Hamazaki, So Shimamoto, Orié Hikabe, Yohei Nishimura, Norio Hamada, Katsuhiko Hayashi, “Uncovering the gene-networks regulating oogenesis”, The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro, Fukuoka, July, 2017
4. Nobuhiko Hamazaki, So Shimamoto, Orié Hikabe, Yohei Nishimura, Norio Hamada, Katsuhiko Hayashi, “Uncovering the gene-networks sculpting oocyte transcriptome”, Gordon Research Conference, Hong Kong, Jun. 2017

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 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

浜崎 伸彦 (Hamazaki, Nobuhiko)
九州大学 医学研究院 応用幹細胞医科学講座
ヒトゲノム幹細胞医学分野 助教
研究者番号：10757008

(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 ()