

平成 30 年 6 月 20 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：16K18820

研究課題名(和文) 多能性幹細胞からの卵子産生系の再構築

研究課題名(英文) Reconstitution of oocyte production system from pluripotent stem cells

研究代表者

吉野 剛史 (Takashi, Yoshino)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10749328

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)：本研究では多能性幹細胞から卵子産生系を再構築するために必須である生殖巣細胞をも誘導する方法の確立を行った。条件検討のため、生殖巣細胞までの各分化を示すレポーターマウスES細胞を樹立、利用し、以下の様に初期発生を模倣する方法を確立した。(i) 生殖巣の各分化段階(中胚葉、前駆細胞など)を胚発生と同じ速度で経る。(ii) Hhシグナルなど各過程で働く機構を利用する。(iii) 初期胚様のパターンで分化し、胎児生殖巣と同レベルの分化レポーター活性を示す。成果は様々な動物の多能性幹細胞からの卵母細胞を誘導に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：I established a method to direct mouse embryonic stem cells (ESCs) to gonadal cells essential to reconstruct oogenesis. Optimal protocol was determined after preparation of several types of mouse reporter ESCs, which visualize the gonadal cell lineage differentiation. It is strongly expected that our induction method mimicked the process of embryonic gonadogenesis as following reasons. (i) mouse ESCs undergo differentiating steps (e.g. mesoderm and progenitor cells) in vitro in a similar developmental rate with gonadogenesis in vivo. (ii) Induction is led with molecules working for gonadogenesis. (iii) Cells in embryoid body differentiate in a similar spatial pattern and show almost same reporter activity with that in mouse embryo. These results must be an important help to the oocyte induction from a variety of animals.

研究分野：発生生物学

キーワード：卵巣 再構築 マウスES細胞 パターン形成 側板中胚葉 卵母細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、マウス多能性幹細胞から *in vitro* で機能的な卵子を作出する技術が確立された。この技術により、ヒト iPS 細胞から卵母細胞を誘導し、不妊治療に用いるという画期的な方法の開発が期待されている。また、ヒト卵子が生み出される過程を *in vitro* で再現、解析することも可能になる。さらに、絶滅危惧種の iPS 細胞から卵子を誘導し、種の維持を図る可能性も期待される。

しかし、この技術をマウス以外のモデル生物に応用する道は未だ閉ざされている。なぜなら、多くの動物で取得が困難な胎児卵巣細胞を必要とするからである。そこで考えられる解決法が胎児卵巣細胞をも多能性幹細胞から誘導することである。

多能性幹細胞から様々な細胞を誘導する上で重要になるのが、初期発生を模倣することである。初期胚で生殖巣が形成される際には前駆細胞が腸間膜と隣接する領域の体腔を覆う上皮(体腔上皮)に出現する。この細胞が細胞分化や上皮間充織転換(EMT: Epithelial-to-mesenchymal transition)を行う一方、生殖細胞の保持能を獲得して雌雄同体の生殖巣の原基を形成する。

一般的に器官形成するもととなる前駆細胞は初期胚に作られるパターン(位置情報)に従い誘導される。しかし、これまで生殖巣の前駆細胞がどのような初期胚のパターンを元に生み出されるのかは全くわかっておらず、生殖巣細胞を誘導する上で大きな課題として残っていた。

私はトリ胚を用いて、世界に先駆けてこの機構を明らかにした。生殖巣の前駆細胞を含む体腔をおおう上皮は、より初期の胚では側板中胚(LPM: Lateral Plate Mesoderm)と呼ばれる。私はラベル実験によりこの時期の中央側の側板中胚葉(M-LPM: Medial-LPM)のうち、腹側の細胞が EMT を起こして生殖巣を形成することを見出し、この細胞が生殖巣の前駆細胞であることを示した。さらに、M-LPM の背側の細胞は EMT を起こさず、生殖巣を形成することもないことから M-LPM での背腹のパターンに従い、前駆細胞が誘導され、生殖巣の形成が開始されることを見出した。さらに私はこの分子実態として Hh シグナルやその下流の BMP4 が M-LPM の腹側で活性化される一方背側では活性化されないことで形成される背腹のパターンであることを見出した。このため、M-LPM の背側でこれらのシグナルを異所的に活性化させると細胞は生殖巣を形成する一方、腹側細胞は生殖巣を形成できなくなってしまう。

この、謎であった生殖巣の前駆細胞の出現を担う初期胚のパターン形成機構を利用することで多能性幹細胞から生殖巣細胞を誘導できるようになる可能性が期待された。

2. 研究の目的

本研究では、様々な動物の多能性幹細胞か

ら、卵母細胞を作出する道を開くために、初期発生をよく模倣して多能性幹細胞から生殖巣細胞を分化誘導するプロトコルを確立することを目指した。そこで遺伝子改変及び初期胚の入手が容易なマウスの多能性幹細胞を生殖巣細胞へと分化誘導し、誘導生殖細胞と共培養することで卵子産生系を再構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では発生過程を模倣して生殖巣細胞を誘導するために、(i) 生殖巣までの各分化段階を示すレポーター細胞を作成、(ii) 生体内の各分化段階の細胞でのレポーター活性の評価を行い、その後(iii) 発生過程で働く機構を利用した分化誘導の検討及び(iv) 誘導生殖細胞との共培養による卵胞構造の再構築の試みを行なった。

(i) 各分化レポーター-ES 細胞の樹立

生殖細胞の支持細胞までの各分化を示すレポーター-ES 細胞を樹立するために、それぞれ T-GFP、Osr1-GFP、Ad4BP basal プロモーター-mRFP (Ad4BP-mRFP) レポーターマウスを共同研究により供与いただき、これらから、ES 細胞を樹立した。さらに Osr1-GFP ES 細胞の Foxf1 の遺伝子座に tdTomato 遺伝子を挿入する一方、Osr1-GFP/Ad4BP-mRFP ES 細胞の Gata4 の遺伝子座に CFP を挿入した。レポーター遺伝子の挿入は Crispr-Cas9 法を用いて効率よく行なった。

(ii) 初期胚での各分化レポーター-遺伝子の発現解析

各種レポーター-遺伝子を持つ雄マウスを雌マウスと交配し、注目時期(E7.5-13.5)の胎児を得てレポーター-遺伝子の活性化の様子を蛍光実体顕微鏡により観察した。その後、生殖巣の前駆組織を回収し、FACS 解析によりレポーター活性を定量した。同時に、中胚葉のサブタイプや生殖巣の幹細胞で発現する膜タンパクである PDGFRα の発現量も免疫染色、FACS 解析により定量した。

また、ES 細胞からキメラマウス胚を作出し、生殖巣の前駆組織を回収し蛍光顕微鏡下でレポーター-遺伝子の発現を観察したのち、FACS 解析を行なった。

(iii) 誘導法の検討

生殖巣の分化までの各段階をエピプラスト、中胚葉細胞、前駆細胞、生殖巣細胞にわけ、それぞれ、マウスの発生時間に合わせ分化処理条件を変化させ誘導を行なった。具体的にはマウス ES 細胞に相当する 3.5 日目(E3.5)の内部細胞塊の細胞は、E5.5 にエピプラストに分化するがマウス ES 細胞も既存の方法により(bFGF と Activin 処理)2 日間のエピプラスト分化処理を行った。初期胚の細胞はその後 Wnt シグナル及び BMP4 シグナルの活性化により E7.5 までに中胚葉に分化することから、本誘導系でも同様のシグナルを活性化させる条件を検討した。この際には T-GFP ES 細胞を用い、誘導二日目

(E7.5 日目相当)に FACS 解析により GFP の蛍光活性を指標に評価した。さらに、中胚葉へのサブタイプへの分化についても表面膜抗原である PDGFRa の発現を免疫染色後の FACS 解析により調べた。

次に誘導中胚葉細胞を生殖巣の前駆細胞 (M-LPM 細胞)へと分化させる条件を Osr-GFP/Foxf1-tdTomato ES 細胞を用いて検討した。E7.5 までに出現した中胚葉細胞はその E9.5 までに生殖巣の前駆細胞である M-LPM 細胞に分化するためこの時期に相当する誘導 4 日目までに分化させる条件を検討した。検討は分化マーカーである Osr1-GFP 及び Foxf1-tdTomato の活性を指標に FACS 解析により行なった。同時に胚様体での分化の様子を蛍光顕微鏡により詳細に観察した。

生殖巣細胞へと分化させる条件の検討には、Osr1-GFP/Gata4-CFP /Ad4BP-mRFP ES 細胞を用いた。E9.5 に現れる生殖巣の前駆細胞は E10.5 に生殖巣細胞 (Gata4+) にその E11.5 には支持細胞 (Ad4BP-mRFP+) に分化する。この分化を再構築するために、初期発生過程で働くシグナル分子を処理後、各レポーター遺伝子の発現を FACS 解析により定量し、生殖巣細胞へと分化させる条件を決定した。

(iv) 誘導生殖細胞との共培養による卵分化支持能の検討

誘導された生殖巣細胞の卵分化保持能を検討するため ES 細胞から誘導された生殖細胞の前駆細胞 (始原生殖細胞)との凝集培養実験を行なった。始原生殖細胞の誘導には、卵分化を示す Blimp1-Venous (BV)/Stella-CFP (SC)ES 細胞を用いた。この細胞をエピプラスト様細胞を経て始原生殖細胞へと分化させ、分化マーカーである BV のシグナルを指標にフローサイトメーターを用い、回収した。この細胞誘導生殖細胞との共培養に供した。誘導生殖巣細胞は Osr1-GFP/Gata4-CFP の発現を指標に回収した。その後の培養は胎児卵巣細胞を用いて誘導生殖細胞を卵子へと分化させる方法を用いた。はじめに回収した誘導生殖細胞と生殖巣細胞を、U 底プレートで 5000:50000 の細胞数で培養し、凝集塊を形成させた。二日後からこの凝集塊をコラーゲンコートされた transwell 上で気液界面培養法で培養した。培養には aMEM や StemPro を基礎培地とする培地を用い、二日ごとに培地交換を行なった。

その後、誘導生殖細胞が卵胞構造を形成し卵母細胞へと分化する 21 日後に評価を行なったこのために卵分化を評価するために蛍光実体顕微鏡下で生殖細胞のマーカーである SC の発現を観察した。また、支持細胞 (顆粒膜細胞) のマーカーである Foxl2 に対する免疫組織化学的染色を行ない、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(i) 各分化レポーター-ES 細胞の樹立
生殖細胞の支持細胞までの各分化 (中胚葉:

T-GFP+ M-LPM : Osr1-GFP/Foxf1-tdTomato+ 生殖巣細胞: Gata4-CFP+ 支持細胞: Ad4BP-mRFP+) を示すレポーター-ES 細胞を樹立した。これにより、レポーター-活性を指標に各分化を定量化することが可能になった。また、フローサイトメーターを用い、各分化細胞を分取できるようになった。さらに誘導体での分化の様子を経時的に観察することも可能になった。

(ii) 胚発生過程での各分化レポーター-遺伝子の活性の変遷の解明

E7.5-9.5 の T-GFP マウス胎児の蛍光顕微鏡下での観察により、このレポーター-遺伝子がこれまでの知見通り E7.5 の初期中胚葉で発現し、発生の進行に伴い、発現が抑制されることが確認された。さらに、生殖巣の前駆細胞が現れる時期である E8.5 以降の Osr-GFP マウス胎児を観察し、このレポーター-遺伝子が生殖巣の前駆細胞である M-LPM において発現し、そのレポーター-活性のパターンは胎児背側から観察すると二本の筋状に認められるようになることを確認した。また、E9.5 の胎児を用いて FACS 解析を行い、この時期の前駆細胞でのレポーター-遺伝子の活性を定量化できた。

さらに Osr1-GFP/Gata4-CFP/Ad4BP-mRFP ES 細胞を用いて作出したキメラマウスを利用し生殖巣原基が発生する E10.5-12.5 での分化レポーター-活性の変化も明らかにした。蛍光顕微鏡下での観察により、生殖巣の分化マーカーである Gata4-CFP は E11.5 より生殖巣で特異的に発現することが、支持細胞マーカーである Ad4BP-mRFP の発現は E12.5 より期待通りの部位で発現することも確認した。また FACS 解析により生殖巣の形成に伴い、前駆細胞マーカーである Osr1-GFP 低下し、生殖巣マーカーである Gata4-CFP や Ad4BP-mRFP の活性が上昇することが確認した。またこのキメラ卵巣を気液界面培養法で培養し、ES 細胞由来の細胞が支持細胞に分化し、卵胞構造を形成できること、この際には Gata4-CFP を発現することも確認された。

(iii) 生殖巣様細胞の誘導法の確立

初期中胚葉への誘導条件は T-GFP ES 細胞を用いて確立した。この際には ES 細胞から分化させたエピプラスト様細胞 (E5.5 相当)に、初期胚の中胚葉分化を担う Wnt シグナルを活性化させるための薬剤の処理濃度を GFP の発現を指標に FACS 解析により検討した。その結果、初期胚で中胚葉が出現する E6.5-7.5 に相当する誘導 1-2 日目に中胚葉細胞へと分化させるための至適濃度を得た。さらに、初期胚の細胞と同様、誘導 3 日目以降に T-GFP の発現は低下する一方、中胚葉のサブタイプのマーカーである PDGFRa の発現が上昇することも確認された。

次に、Osr1-GFP (中央マーカー)/Foxf1-tdTomato (側方マーカー) ES 細胞を用いて

生殖巣の前駆細胞である M-LPM 細胞の誘導条件を検討した。M-LPM は初期胚の中央から側方の軸に沿った一部に現れることから、濃度依存的にこの位置情報を与える BMP4 やその発現制御に関わる Wnt シグナルの活性条件を検討した。その結果、M-LPM が誘導される時期である E8.5-9.5 に相当する誘導 3-4 日目までに M-LPM (Osr1-GFP+/Foxf1-tdTomato+) を出現させる条件を決定できた。この条件により選択的に M-LPM 様細胞を濃縮できた。さらに興味深いことに、誘導体ではあたかも初期胚の様に中央側に二本の筋状に Osr1-GFP 陽性細胞がその側方に Foxf1-tdTomato 陽性細胞が現れる。また初期胚で側方化を促す BMP の処理濃度依存的にこのパターンも調節できた。このことから、初期胚のパターン形成を模倣して M-LPM 様細胞を誘導する条件も確立できた。

この前駆細胞を生殖巣様の細胞へと分化させる条件も決定した。このために、生殖巣の分化レポーター ES 細胞である Osr1-GFP/Gata4-CFP/Ad4BP-mRFP ES 細胞を用い M-LPM の腹側化を担う Shh や BMP4 処理条件等を検討した。この方法では初期胚の発生をよく模倣し、Osr1 の発現が低下し Gata4 が発現する時期である E10.5 に相当する誘導 5 日目までに Osr1-GFP の発現低下と Gata4-CFP の発現上昇が起き、その翌日には Ad4BP-mRFP の発現が誘導された。さらに、誘導 6 日目の各レポーター活性はこの時期に相当する E11.5 のキメラ胚の生殖巣での活性と非常に近いこともフローサイトメーターを用いた定量解析により確認された。以上により、初期発生をよく模倣して生殖巣細胞を誘導する方法が確立された。

(iv) 誘導生殖巣細胞の卵分化保持能の解明

次に、この誘導生殖巣細胞の卵分化支持能も同じく多能性幹細胞に由来する誘導 6 日目の始原生殖細胞との凝集培養により明らかにした。その結果、凝集培養 2 日目までは始原生殖細胞は増殖しており、誘導生殖巣細胞は生殖細胞の初期の増殖を支持できることも明らかにした。さらにこの細胞は培養 14 日目には支持細胞マーカーである Foxl2 を発現することも確認された。しかし誘導生殖細胞は培養 14 日目までに消失してしまうことから、卵分化支持や長期の生殖細胞の保持能は持たない可能性が示唆された。

一方より未分化な細胞である誘導 4 日目の始原生殖細胞と凝集培養したところ卵分化が完了する 21 日目まで生殖細胞は保持されており、誘導生殖巣細胞はより未分化な生殖細胞であれば保持しうることも明らかになった。今後はこの際卵胞構造を形成するのかといったことを明らかにすることが重要な課題である。

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)

Yoshino T*, Murai H. & Saito D.*

Hedgehog-BMP signaling establishes dorsoventral patterning in lateral plate mesoderm to trigger gonadogenesis in chicken embryos.

Nat. Commun. 7: 12561 (2016) 査読有

[学会発表](計 1 件)

Yoshino T. Hedgehog-BMP4 signaling orchestrates the onset of gonadogenesis associated with embryonic patterning in vertebrates.

The 32nd International Kumamoto Medical Bioscience Symposium (2016)

The Ovary

[図書](計 1 件)

Cell Biology of the Ovary: Stem Cells, Development, and Clinical Aspects eds., Katabuchi H., Ohba T. & Motohara T., Springer Nature (2018)

Yoshino T.

The role of Hedgehog-BMP4 signaling in the patterning of coelomic mesoderm and the onset of gonadogenesis. Pages 21-33

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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：吉野剛史

(Takashi Yoshino)

九州大学大学院 医学研究院

応用幹細胞医科学部門 統合的組織修復

医学

助教

研究者番号：10749328

(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

()