

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔令和2（2020）年度 研究進捗評価用〕

平成29年度採択分
令和2年3月31日現在

ヒト生殖細胞発生機構の解明とその試験管内再構成

Mechanism and Reconstitution In Vitro of Human
Germ Cell Development

課題番号：17H06098

齋藤 通紀 (SAITOU, MITINORI)

京都大学・高等研究院・教授



研究の概要（4行以内）

本研究では、マウス・カニクイザルをモデル生物とし、またヒト細胞を用いて、ヒト生殖細胞発生過程の試験管内再構成を進展させ、ヒト生殖細胞の発生機構とその異常に関する知見を得る基盤を形成することを目的とする。

研究分野：医歯薬学

キーワード：生殖細胞、発生医学、ゲノム、発現制御、進化

1. 研究開始当初の背景

精子・卵子・その前駆細胞を総称して生殖細胞と呼ぶ。生殖細胞の発生機構の解明は、遺伝情報継承機構・エピゲノム制御機構の解明や、その異常に起因する病態の発症機序解明につながる。

我々は、始原生殖細胞（primordial germ cells: PGCs）の形成機構を解明し、マウス胚性幹細胞（embryonic stem cells: ESCs）や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells: iPSCs）から始原生殖細胞様細胞（PGC-like cells: PGCLCs）を誘導し、それらから精子・卵子・健全な産仔を作成することに成功した。また、ヒト iPSCs からヒト PGCLCs を誘導し、それらが形成直後のヒト PGCs の特性を有することを示した。

2. 研究の目的

本研究では、マウス・カニクイザルをモデル生物とし、またヒト細胞を用いて、ヒト生殖細胞発生過程の試験管内再構成を進展させ、ヒト生殖細胞の発生機構とその異常に関する知見を得る基盤を形成する。

3. 研究の方法

本研究では、1)規定条件に基づくマウス PGCLCs の雌雄生殖細胞への分化制御法の開発、2)カニクイザル PGCLCs のエピゲノムリプログラミング誘導法・雌雄生殖細胞への分化制御法の開発、3) ヒト PGCLCs のエピゲノムリプログラミング誘導法・雌雄生殖細胞への分化制御法の開発、4)ヒト iPSCs からのヒト生殖細胞系譜の誘導法の開発、の4つの研究を統合的に推進する。

4. これまでの成果

1) 規定条件に基づくマウス PGCLCs の雌雄生殖細胞への分化制御法の開発

マウス PGCLCs の培養法を開発し、それらに bone morphogenetic protein (BMP) とレチノイン酸を加えることで、PGCLCs を卵母細胞様細胞に誘導出来ることを証明した (*EMBO J.*, **36**, 1888-1907, 2017; *EMBO J.*, **36**, 3100-3119, 2017)。

PGCLCs に ZGLP1 (Zinc-finger, GATA-like protein 1) を発現することで卵母細胞様細胞を誘導出来ることを証明した。Zglp1 ノックアウトマウスは雌雄ともに不妊で、特にメスにおいて減数分裂への導入が完全に障害されること、ZGLP1 は BMP 下流で機能し、生殖細胞の雌性化・減数分裂への導入に中心的な役割を果たすことを証明した (*Science*, **367**, eaaw4115, 2020)。

PGCLCs の雄性化を誘導するサイトカインや化合物のスクリーニング、再構成精巣法の改善研究を推進中である。

2) カニクイザル PGCLCs のエピゲノムリプログラミング誘導法・雌雄生殖細胞への分化制御法の開発

feeder 細胞上で、検討したすべてのカニクイザル ESCs 株を安定培養出来る方法論を開発し、それらから PGCLCs を誘導、サル PGCLCs がサル初期 PGCs に相当する細胞であることを証明、ヒト・サル・マウスにおける PGC(LC)誘導過程の共通点と相違点を明らかにした (*Biol. Reprod.*, **102**, 620-638, 2020)。

カニクイザル着床前・後胚、生殖細胞系列における X 染色体の詳細な動態を解析し、X 染色体不活化・再活性化、X 染色体発現上昇

が起こる時期、そのエピジェネティックな状態などを同定した（発表準備中）。

カニクイザル雌 PGCLCs をマウス胎児卵巣体細胞と凝集培養（サル・マウス異種間再構成卵巣）し、カニクイザル PGCLCs が分化・成熟するかを検証する研究を推進中である。

3) ヒト PGCLCs のエピゲノムリプログラミング誘導法・雌雄生殖細胞への分化制御法の開発

高効率でヒト PGCLCs に分化する雌雄ヒト iPSCs を選定、clonal variance の原因の一端を解明した (*Biol. Reprod.*, **96**, 1154-1166, 2017)。

ヒト PGCLC 形成過程では、マウスと異なる転写因子が機能し、マウスと保存された転写因子もその作用の階層性が異なることを証明、生殖細胞形成機構の進化的多様性を明らかにした (*Cell Stem Cell*, **21**, 517-532, 2017)。

ヒト PGCLCs を少なくとも 120 日間培養し 100 万倍まで増殖させる方法論を開発した。本方法論にて増殖させた細胞は、ヒト初期 PGCs のトランスクリプトームを維持し、また、増殖培養したマウス PGCLCs と異なり、DNA メチロームを維持することがわかった。本研究は、転写制御機構のみならず、増殖能力・エピゲノムリプログラミング誘導機構のヒト・マウス間における差異を明らかにした成果である（投稿中）。

ヒト PGCLCs をマウス胎児卵巣体細胞と凝集培養（ヒト・マウス異種間再構成卵巣）することで、ヒト PGCLCs が分化・成熟するかを検証した。その結果、異種間再構成卵巣内で、ヒト PGCLC 由来細胞は少なくとも 120 日間生存し、ゲノムワイドな DNA 脱メチル化・インプリントの消去を含むエピゲノムリプログラミングを起こし、ヒト卵原細胞・前精原細胞に類似する細胞に分化することを証明した。特に雌性ヒト iPSCs を異種間再構成卵巣内で 120 日目培養すると、減数分裂を開始する直前の細胞に分化することを示した (*Science*, **362**, 356-360, 2018; *Nat. Protoc.*, in press, 2020)。この成果は、ヒト PGCLCs が生殖細胞として分化可能なことを初めて示した成果である。

4) ヒト iPSCs からのヒト生殖巣体細胞系譜の誘導法の開発

胚体外胚葉から生殖巣体細胞が誘導される過程で鍵となる機能的な転写因子の発現を検証した。

1)、2)、3)で得られた成果を鑑み、ヒト及びカニクイザル PSCs から雌性生殖巣体細胞を誘導する方法論の開発に焦点を絞り、ゲノム編集技術を用いて適切なレポーターを有するヒト及びカニクイザル雌性 PSCs の作成を推進した。カニクイザル、ヒトにおいて初期後方中胚葉、中間中胚葉、体腔上皮、生殖原器の順に誘導を進める研究を推進中である。

5 . 今後の計画

今後も上記 4 つの研究テーマに基づき、ヒト生殖細胞発生過程の試験管内再構成を進展させ、ヒト生殖細胞の発生機構を解明する研究を推進する。

6 .これまでの発表論文等(受賞等も含む)

Nagaoka, S. I., Nakaki, F., Miyauchi, H., Nosaka, Y., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Hayashi, K., Nakamura, T., Yamamoto T., and Saitou, M. ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice, *Science*, **367**, eaaw4115, 2020.

Yamashiro, C., Sasaki, K., Kojima, Y., Yokobayashi, S., and Saitou, M. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture, *Nature Protocols*, in press, 2020.

Sakai, Y., Nakamura, T., Okamoto, I., Gyobu-Motani, S., Ohta, H., Yabuta, Y., Tsukiyama, T., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Ema, M., Morizane, A., Takahashi, J., Yamamoto, T., and Saitou, M. Induction of the Germ-Cell Fate from Pluripotent Stem Cells in Cynomolgus Monkeys, *Biology of Reproduction*, **102**, 620-638, 2020.

Yamashiro, C., Sasaki, K., Yabuta, Y., Kojima, Y., Nakamura, T., Okamoto, I., Yokobayashi, S., Murase, Y., Ishikura, Y., Shirane, K., Sasaki, H., Yamamoto, T., and Saitou, M. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro, *Science*, **362**, 356-360, 2018.

Ishii, T. and Saitou, M. Promoting in vitro Gametogenesis Research with a Social Understanding, *Trends in Molecular Medicine*, **23**, 985-988, 2017.

Kojima, Y., Sasaki, K., Yokobayashi, S., Sakai, Y., Nakamura, T., Yabuta, Y., Nakaki, F., Nagaoka, S., Woltjen, K., Hotta, A., Yamamoto, T., and Saitou, M. Evolutionarily Distinctive Transcriptional and Signaling Programs Drive Human Germ Cell Lineage Specification from Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, **21**, 517-532, 2017.

持田記念学術賞 2018 年 11 月

朝日賞 2020 年 1 月

上原賞 2020 年 3 月

ISSCR Momentum Award 2020 年 1 月公表

7 . ホームページ等

<http://anat.cell.med.kyoto-u.ac.jp/index.html>

<https://ashbi.kyoto-u.ac.jp/en/>