

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03618

研究課題名(和文) ヒト始原生殖細胞様細胞の卵母細胞誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of culture system for inducing oocytes from primordial germ cell-like cells

研究代表者

大田 浩(Ohta, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：50391892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、試験管内においてヒト胎生期雌性生殖細胞の卵母細胞誘導法を確立し、その誘導系を用いてヒトiPS細胞由来PGCLCから卵母細胞を誘導することである。ヒト再構成卵巣の培養条件を検討し、最も良いと考えられる培養条件で15週間の培養を行ったところ、卵原細胞から原始卵胞を誘導することに成功した。さらに、蛍光免疫染色およびトランスクリプトーム解析により、培養後の原始卵胞は生体の原始卵胞と同様の性質を示すことが明らかとなった。今後更なる培養系の改善を試みることでヒトiPS細胞由来PGCLCからの卵子形成誘導が期待できると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生殖細胞は次世代へ遺伝情報を伝えることができる唯一の細胞系譜であり、種の継続性や進化を担う重要な細胞種である。マウスにおいては多能性幹細胞から誘導した始原生殖細胞様細胞を用いて卵子形成を試験管内誘導することが可能となっており、生殖細胞の研究が飛躍的に進んでいる。しかしながら、ヒトにおいては卵子形成を試験管内で誘導する実験系が確立されておらず大きな研究の障壁となっていた。本研究では、あらゆる培養条件を検討することによりヒト卵原細胞から原始卵胞を誘導することに成功した。今後本培養系を用いることにより始原生殖細胞様細胞からの卵子形成誘導が期待できる。

研究成果の概要(英文)：For inducing in vitro oogenesis from human iPS cells via primordial germ cell-like cells (PGCLC), in this study, we attempted to establish the culture system that possible to induce human oogenesis in vitro. We tested and optimized the culture conditions and found that the primordial follicles can be induced from oogonia by culturing reconstituted ovaries for 15 weeks. In vitro induced primordial follicles exhibited the gene expression profiles similar with in vivo primordial follicles. Further improvement will enable us to induce in vitro oogenesis from human PGCLCs.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵原細胞 卵母細胞 卵子形成 再構成卵巣 始原生殖細胞 試験管内誘導 ヒト 多能性幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC)は妊娠 4 週前後に運命決定がなされ、その後、将来の生殖巣へと向けて移動し(妊娠 7 週前後)、妊娠 8 週前後には雌雄の性決定がなされる。性決定後の雌性生殖細胞は卵原細胞へと分化し、減数分裂を開始する。妊娠 22 週前後において卵巣髄質において原始卵胞が形成され、出生前後(妊娠 40 週前後)に卵巣髄質内の一部の卵胞が成熟卵胞へと発達する(性成熟後、通常の性周期に従った卵子形成が開始される)。PGC の運命決定から成熟卵胞に至るまで、多数の重要なイベントが起こる事が知られているが、これらのほとんどは胎児期に起こるため、詳細な解析が非常に困難である。特にヒトにおいては実験系自体が確立しておらず、未解明な点が数多く残されている。

2. 研究の目的

ヒト生殖細胞の発生機構を理解する上で重要な実験系は、試験管内における多能性幹細胞からの PGC 様細胞 (PGC-like cell; PGCLC) の分化誘導系である。現時点でヒト iPS 細胞を用いてヒト PGCLC の誘導系自体は確立されているが、ヒト PGCLC は妊娠 4 週相当の PGC に相当し、ゲノムワイドな脱メチル化やヒストン修飾の変化などの現象が起こる前の段階にある。すなわち、現時点では、配偶子を形成するためにヒト生殖細胞で起こる重要なイベントを解析する事が不可能な状態にある。本研究計画の目的は、試験管内においてヒト胎生期雌性生殖細胞の卵母細胞誘導法を確立し、その誘導系を用いてヒト PGCLC から卵母細胞を誘導可能か検証することである。

3. 研究の方法

ヒト生殖巣を酵素処理により単一細胞まで解離した後、まず、細胞の凍結保存を行う。解凍後の細胞を用いて再構成卵巣を作製し、各種培養条件の検討を行い、卵母細胞が誘導可能な培養条件を見出す。また、ヒト生殖巣の使用を最小限に抑えるため、カニクイザルの生殖巣細胞を用いて培養条件の検討を行った後、ヒトの再構成卵巣の培養を行う。培養後の生殖巣に含まれる卵母細胞の評価は抗体染色を含めた組織学的解析およびトランスクリプトーム解析により行う。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

カニクイザル生殖巣細胞を用いた再構成卵巣の培養系の確立

カニクイザル生殖巣細胞を用いて再構成卵巣の培養条件の検討を行ったところ、霊長類の再構成卵巣はマウスで行われている気相液相境界面培養で培養できないことが明らかとなった。各種条件検討を行ったところ、再構成卵巣を約 12 週間浮遊培養することにより、卵原細胞から原始卵胞を試験管内で誘導することに成功した。さらに、試験管内で誘導した卵母細胞は成体の卵母細胞と同様の遺伝子発現を示すことが明らかになった。

ヒト生殖巣細胞を用いた再構成卵巣の培養系の確立

次にカニクイザルにより確立された培養系を用いてヒト生殖巣細胞を用いた再構成卵巣の培養を行った。その結果、ヒトの再構成卵巣を 14 週間培養したところ、カニクイザルと同様に原始卵胞を認めることに成功した(図 1)。また、培養により得られた原始卵胞は成体の原始卵胞で発現する TP63 および ZP3 を発現することが明らかとなった(図 1)。

体外培養により誘導された卵母細胞をより詳細に評価するため、単一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を行った。その結果、培養 14 週目に含まれる卵母細胞の一部は成体原始卵胞の卵母細胞に近い遺伝子発現パターンを示すことが明らかとなった(図 2)。

以上の結果から、本研究課題によりヒトの卵原細胞から卵母細胞発生過程を体外で再構成することが可能となった。

その他の成果

マウス、カニクイザル、ヒトにおける卵母細胞発生過程のトランスクリプトームの種間比較解析を行ったところ、第一減数分裂特異的なイベント(DNA 二重鎖切断・相同組換え等)に関わる主要な分子の機能や染色体制御機構は 3 種において保存されていた。一方で、霊長類においてのみ、減数分裂開始時に遺伝子発現状態のダイナミックな変化が認められることから、霊長類特異的な減数分裂の開始制御機構の存在が示唆された。その他に、パターン形成に関連する遺伝子(PAX6・HOX 遺伝子群など)の減数分裂期における一過性の発現上昇など、マウスには存在しない現象が認められた。

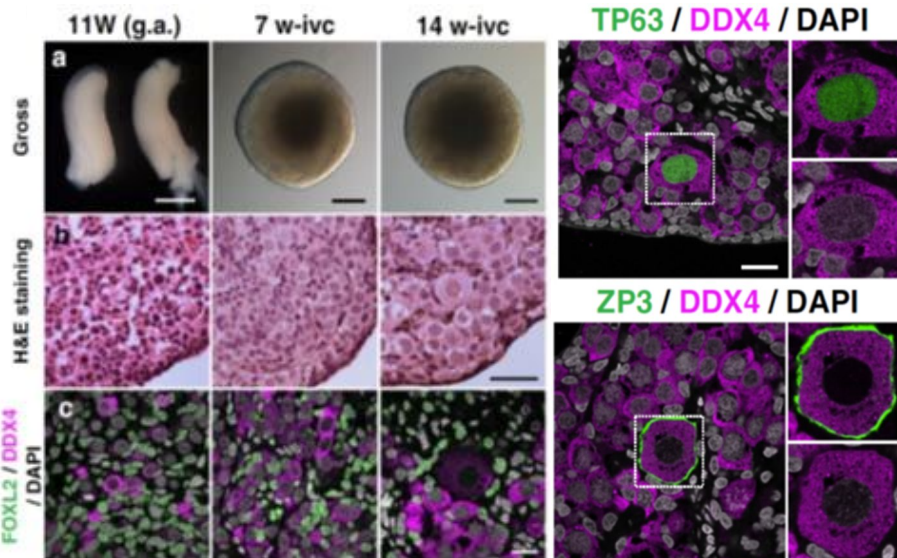


図 1 . ヒト再構成卵巣の培養系の確立 .

(左パネル) 妊娠 11 週のヒト胎児卵巣の外観と組織染色像 (左列). 胎児卵巣内の生殖細胞のほとんどは卵原細胞である . 体外培養 7 週目 (中央列) および 14 週目 (右列) の再構成卵巣の外観と組織染色像 . 下段は各組織の前顆粒膜細胞マーカー (FOXL2) および生殖細胞マーカー (DDX4)、細胞核 (DAPI) の組織染色像を示す . 培養後の再構成卵巣内に , 原始卵胞の形成を認める (右列) . g.a.: gestation age. w-ivc: week-in vitro culture .

(右パネル) 培養後の卵母細胞の TP63 および ZP3 の発現 . 培養 14 週目に認められた原始卵胞は成体の原始卵胞で発現する TP63 および ZP3 (透明帯マーカー) を発現する .

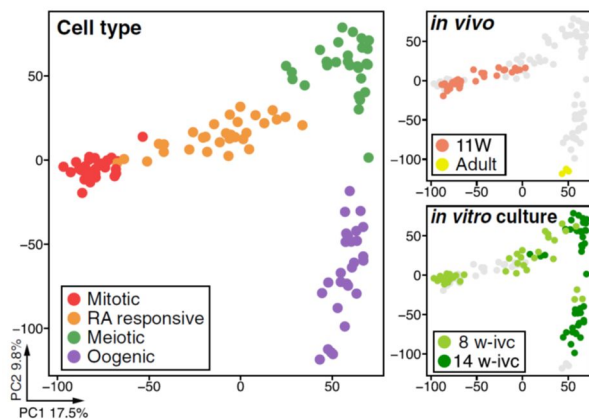


図 2 . ヒト再構成卵巣に含まれる卵母細胞のトランスクリプトーム解析 .

(左図) ヒト生体の卵母細胞の PCA . 4 種類の分化段階に分けられる . (右上) 妊娠 11 週の卵原細胞および成体原始卵胞の卵母細胞の PCA . (右下) 培養後の卵原 / 卵母細胞の PCA . 培養 14 週目の卵母細胞の一部は成体の原始卵胞に含まれる卵母細胞に近接する .

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

ヒトを含む霊長類の卵母発生過程を試験管内で再現性良く再構成することを可能にした初めての報告であり、本培養系が霊長類の卵母細胞誘導系の世界基準になることが期待される。

(3) 今後の展望

本研究課題により確立された培養系は、ヒトの生殖細胞発生機構の解明のみならず、生殖細胞関連疾患の病因解明と治療開発においての基盤技術となる。ヒト iPS 細胞からの始原生殖細胞様細胞および卵原細胞様細胞の誘導法はすでに報告されており、当培養法を用いて、ヒト iPS 細胞を起点に卵母細胞発生過程を試験管内再構成することが今後期待される。

なお、本研究報告の内容は下記論文で公表されている。

Ken Mizuta, Yoshitaka Katou, Baku Nakakita, Aoi Kishine, Yoshiaki Nosaka, Saki Saito, Chizuru Iwatani, Hideaki Tsuchiya, Ikuo Kawamoto, Masataka Nakaya, Tomoyuki Tsukiyama, Masahiro Nagano, Yoji Kojima, Tomonori Nakamura, Yukihiro Yabuta, Akihito Horie, Masaki Mandai, **Hiroshi Ohta***, and Mitinori Saitou*. Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys. EMBO J. 2022:e110815.* author for correspondence .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murakami Kenta, Hamazaki Nobuhiko, Hamada Norio, Nagamatsu Go, Okamoto Ikuhiro, Ohta Hiroshi, Nosaka Yoshiaki, Ishikura Yukiko, Kitajima Tomoya S., Semba Yuichiro, Kunisaki Yuya, Arai Fumio, Akashi Koichi, Saitou Mitinori, Kato Kiyoko, Hayashi Katsuhiko	4. 巻 615
2. 論文標題 Generation of functional oocytes from male mice in vitro	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 900 ~ 906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-023-05834-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuta Ken, Katou Yoshitaka, Nakakita Baku, Kishine Aoi, Nosaka Yoshiaki, Saito Saki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Kawamoto Ikuo, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nagano Masahiro, Kojima Yoji, Nakamura Tomonori, Yabuta Yukihiko, Horie Akihito, Mandai Masaki, Ohta Hiroshi, Saitou Mitinori	4. 巻 41
2. 論文標題 Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e110815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022110815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagano M, Hu B, Yokobayashi S, Yamamura A, Umemura F, Coradin M, Ohta H, Yabuta Y, Ishikura Y, Okamoto I, Ikeda H, Kawahira N, Nosaka Y, Shimizu S, Kojima Y, Mizuta K, Kasahara T, Imoto Y, Meehan K, Stocsits R, Wutz G, Hiraoka Y, Murakawa Y, Yamamoto T, Tachibana K, Peters JM, Mirny LA, Garcia BA, Majewski J, Saitou M	4. 巻 41
2. 論文標題 Nucleome programming is required for the foundation of totipotency in mammalian germline development	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e110600
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2022110600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sasaki Kotaro, Oguchi Akiko, Cheng Keren, Murakawa Yasuhiro, Okamoto Ikuhiro, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Yamamoto Takuya, Seita Yasunari, Saitou Mitinori	4. 巻 35
2. 論文標題 The embryonic ontogeny of the gonadal somatic cells in mice and monkeys	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109075 ~ 109075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikura Yukiko, Ohta Hiroshi, Sato Takuya, Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Kojima Yoji, Yamashiro Chika, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Ogawa Takehiko, Saitou Mitinori	4. 巻 28
2. 論文標題 In vitro reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 2167 ~ 2179.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2021.08.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Ohta Hiroshi, Yamashiro Chika, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 39
2. 論文標題 Long term expansion with germline potential of human primordial germ cell like cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104929	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Kurimoto Kazuki, Nakamura Tomonori, Murase Yusuke, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 104
2. 論文標題 Cyclosporin A and FGF signaling support the proliferation/survival of mouse primordial germ cell-like cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 344 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/iaaa195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Yoshitake, Nakamura Tomonori, Okamoto Ikuhiro, Gyobu-Motani Sayuri, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Tsukiyama Tomoyuki, Iwatani Chiduru, Tsuchiya Hideaki, Ema Masatsugu, Morizane Asuka, Takahashi Jun, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 102
2. 論文標題 Induction of the germ cell fate from pluripotent stem cells in cynomolgus monkeys	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 620 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagaoka So I., Nakaki Fumio, Miyauchi Hidetaka, Nosaka Yoshiaki, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Kurimoto Kazuki, Hayashi Katsuhiko, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 367
2. 論文標題 ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 620 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaw4115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------