

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21500

研究課題名（和文）試験管内において卵子形成の支持が可能な卵巣体細胞の新規培養法の確立

研究課題名（英文）Establish a culture system for somatic ovarian cells that can support in vitro oogenesis

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、マウスにおいて、再構成卵巣の作製が可能な卵巣生殖巣体細胞の培養系を確立し、その細胞を用いて多能性幹細胞より誘導した始原生殖細胞様細胞（primordial germ cell-like cells: PGCLC）からの卵子形成誘導を試みることである。卵巣生殖巣体細胞のうち卵子形成に必要な細胞種は前顆粒膜細胞であったため、前顆粒膜細胞の培養系の確立を試みている。また、マウス、カニクイザル、ヒトにおいて前顆粒膜細胞の遺伝子発現プロファイルを取得し、種間で共通な栄養因子受容体を同定した。今後これらの情報をもとに、培養系の改善が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類の卵子形成を理解する上で重要な実験系は試験管内再構成系である。マウスにおいては再構成卵巣を体外培養することにより、卵子形成の全過程を試験管内で再構成することが可能となり、飛躍的に研究が進んでいる。本研究の目的は再構成卵巣に必要な細胞種を同定し、さらにその細胞種を培養することである。本研究によりマウスの再構成卵巣には前顆粒膜細胞が必要であることが明らかとなり、さらに、マウス、カニクイザル、ヒトの前顆粒膜細胞に共通して発現する栄養因子受容体および細胞内シグナルを同定した。今後これらの情報を基に、試験管内で卵子形成を支持可能な細胞種の培養系の確立が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to establish a culture system for mouse ovarian somatic cells that can support in vitro oogenesis from primordial germ cell-like cells (PGCLCs). Among the ovarian somatic cells, we attempted to establish the culture condition for pre-granulosa cells, as we found that pre-granulosa cells could support in vitro oogenesis from PGCLCs. In addition to this, we analyzed the transcriptomes of pre-granulosa cells in mouse, monkey, and human to find the common cytokine receptors and cell signalling. We expect to improve the current culture condition based on the results obtained from transcriptome analysis.

研究分野：生殖生物学

キーワード：卵子形成 再構成卵巣 雌性生殖巣体細胞 前顆粒膜細胞 細胞培養 PGCLC マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) は発生初期に運命決定がなされ精子および卵子の起源となる細胞である。申請者はマウスおよびヒトの多能性幹細胞から試験管内において PGC 様細胞 (PGC-like cell; PGCLC) を分化誘導することに成功してきた (参考文献 1)。マウス PGCLC は胎生期の雌性生殖巣体細胞と再構成卵巣を作製・培養することにより、正常な産仔へと発生することが可能な卵子へと分化することができる (参考文献 2)。しかしながら、現在のところ、PGCLC から卵子形成を誘導する方法は胎生期卵巣の全ての体細胞種を用いており、どの細胞種からの支持やシグナルが配偶子形成に必須なのかを調べるのが非常に困難である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスにおいて、再構成卵巣の作製が可能な胎生期卵巣生殖支持細胞の増殖培養系を確立し、その細胞を用いて PGCLC からの卵子形成誘導を可能にすることである。本研究計画が達成されることにより、試験管内における PGCLC からの卵子形成誘導が全て特定の培養細胞を用いた培養系で可能となり、生殖細胞の基礎研究のみならず、発生工学、不妊症の機構解明など幅広い分野への応用が期待できる。

### 3. 研究の方法

PGCLC との再構成卵巣が作製可能な胎生期卵巣生殖支持細胞の増殖培養系を確立するため、まず始めに再構成卵巣の形成に必要な最少細胞種の同定を行う。最小細胞種の同定については胎生 12.5 日 (E12.5) の雌性生殖巣を酵素により単一細胞まで解離した後、細胞表面マーカーによる FACS (fluorescence activated cell sorter) により行う。再構成卵巣に用いる生殖細胞は生殖細胞特異的に EGFP を発現する Stella-EGFP マウスの生殖細胞もしくは B1imp1-mVenus;Stella-EGFP (BVSC) を保有する PGCLC を用いる。Stella-EGFP マウスからの生殖細胞の精製・分取は、E12.5 雌性生殖巣を酵素により単一細胞に解離し、EGFP を指標とした FACS により行う。PGCLC の誘導は以前の報告 (参考文献 1) と同様の方法により行い、誘導 4 日目の PGCLC を BV を指標とした FACS により精製・分取する。再構成卵巣の作製には 1 再構成卵巣当たり体細胞 50000 個、生殖細胞 10000 個を用い、10  $\mu$ M ROCK inhibitor 存在下で 2 日間の浮遊培養を行った。その後再構成卵巣を気相液相境界面培養し、卵子形成誘導の評価を行った。

再構成卵巣の作製が可能な胎生期卵巣生殖支持細胞を同定した後、その細胞種のトランスクリプトーム解析を行う。具体的には、マウス、サル、ヒトの三種において単一細胞レベルでのトランスクリプトーム解析を行い、種間で保存されて発現している栄養因子受容体、細胞内シグナルの同定を行う。その情報に基づいてマウス胎生期卵巣生殖支持細胞の培養系の確立を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) 研究の主な成果

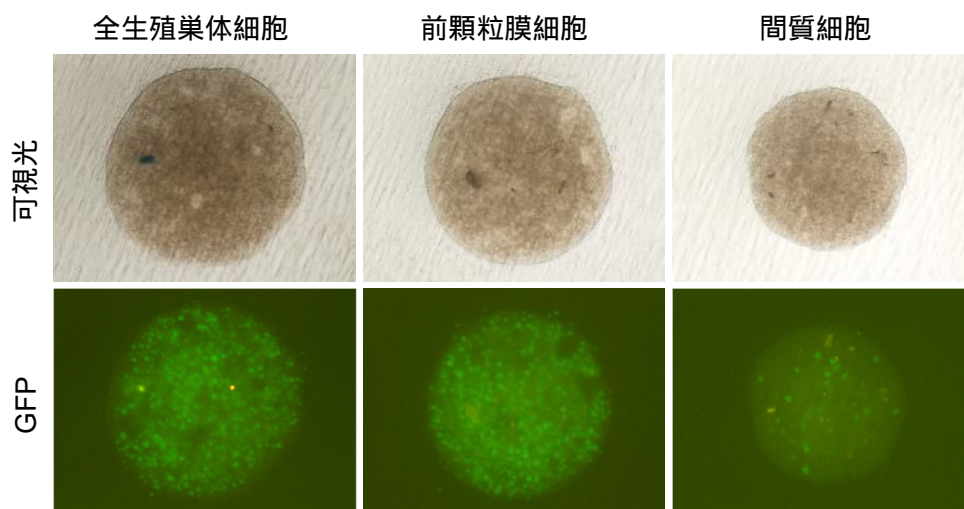
##### 再構成卵巣が作製可能な雌性生殖巣支持細胞の同定

再構成卵巣が作製可能な雌性生殖巣支持細胞を同定するため、E12.5 の雌性生殖巣支持細胞を FACS により精製・分取し、蛍光を有する E12.5 雌性生殖細胞 (Stella-EGFP) もしくは ES 細胞から誘導した PGCLC (誘導 4 日目) と混合し、再構成卵巣を作製し、培養後の経過を観察した。コントロールとして全生殖巣体細胞を用いた場合には、既報 (参考文献 2) と同様に再構成卵巣内において生殖細胞の生存が確認された (図 1 左列)。次に、血管を構成する細胞のみでは再凝集塊を形成することができず、生殖細胞を支持できないことが明らかとなった。生殖巣に存在する間質細胞を用いた場合には、培養 2 日目にはコントロールと同様の生殖細胞が存在していたが、培養を経るに従って生殖細胞の減少が認められた (図 1 右列)。このことから生殖巣の間質細胞は生殖細胞を内部に取り込む能力は有するが、卵子形成を支持できないことが示唆された。最後に、前顆粒膜細胞との再構成卵巣では、コントロールと遜色のない生殖細胞の生存が確認された。以上の結果から、再構成卵巣の作製には生殖巣を構成する細胞種のうち、前顆粒膜細胞のみが卵子形成を支持できることが明らかとなった。

##### 前顆粒膜細胞の増殖に必要な因子の探索

再構成卵巣に必要な細胞種が前顆粒膜細胞であることが示されたため、次に前顆粒膜細胞の増殖に必要な因子の探索をトランスクリプトーム解析により試みた。ここで、増殖に必要な因子は種間で共通していると仮説を立て、マウス以外の種として、カニクイザルおよびヒトの前顆粒膜細胞のトランスクリプトームを取得し、種間で共通して発現している栄養因子受容体および細胞内シグナルの同定を試みた。マウスおよびカニクイザルについては胎生期前顆粒膜細胞および生後の原始卵胞を構成する前顆粒膜細胞のトランスクリプトームを取得し、ヒトについては成人の原始卵胞を構成する前顆粒膜細胞のトランスクリプトームを取得した。トランスクリプトーム解析により、種間で共通、霊長類特異的、マウス特異的な栄養因子受容体および細胞シグナルを同定することができている。現在、同定された因子を前顆粒膜細胞に添加することにより、

前顆粒膜細胞の培養系の改善を試みている。



**図 1. 培養 8 日目の再構成卵巣像**

培養 8 日目の再構成卵巣の可視光（上段）および GFP（下段）を示す。（左列）E12.5 の雌性生殖巣の全体細胞と E12.5 の雌性生殖細胞を用いて再構成卵巣を作製し培養 8 日目の写真。E12.5 の雌性生殖細胞は Stella-EGFP マウスより調製し、体細胞 50000 個と生殖細胞 10000 個を用いて 1 再構成卵巣を作製。E12.5 前顆粒膜細胞（中列）および E12.5 雌性生殖巣間質細胞（右列）と E12.5 Stella-EGFP 雌性生殖細胞の再構成卵巣の培養 8 日の写真。緑色は生殖細胞を示す。PGCLC を用いた実験でも同様の観察結果が得られている（data not shown）。

#### その他の成果

種間のトランスクリプトーム解析については、前顆粒膜細胞以外に生殖細胞についても行っており、卵子形成に関わる遺伝子発現様式について種間の差について知見を得ることができており、現在、公表に向けて論文を作成中である。

#### （ 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

これまで卵子形成にどの細胞種が必要であるかについては不明な点が多かった。本研究により、卵子形成に必要な細胞種が同定されたことにより、複雑な卵子形成機構をより単純化して解析することが可能になったと考える。また、トランスクリプトーム解析の結果については、種間の卵子形成に関わる遺伝子発現の保存性および種差についての知見が得られており、哺乳類の卵子形成機構に新たな知見をもたらすと考える。

#### （ 3 ） 今後の展望

哺乳類の種間で保存されている前顆粒膜細胞の増殖に関わる因子が同定できているため、今後、これらの因子を前顆粒膜細胞に添加することにより、安定的な培養系の確立が期待できる。また、種間のトランスクリプトーム解析により、哺乳類の卵子形成機構の基礎生物学的理解が深まるとともに、不妊症の原因解明、新たな不妊治療法の確立など幅広い分野への貢献が期待できる。

#### 参考文献

- 1 . Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. 2011;146:519-532.
- 2 . Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*. 2016;539:299-303.

## 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 0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 Ishikura Yukiko, Ohta Hiroshi, Nagano Masahiro, Saitou Mitinori	4. 巻 3
2. 論文標題 Optimized protocol to derive germline stem-cell-like cells from mouse pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101544 ~ 101544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101544	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 -

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 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/ioaa195	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
---------	---------