

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15112

研究課題名（和文）非ヒト霊長類モデルにおける生殖発生機構の解明及びin vitro再構築の試み

研究課題名（英文）Reconstitution in vitro of primate germ cell development

研究代表者

吉松 祥（Yoshimatsu, Sho）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・客員研究員

研究者番号：00882713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、マーモセットから採取した生殖巣細胞のシングルセル解析により、霊長類特異的な遺伝子発現プロファイルを同定することができ、今後の培養下での再構築に向けて、大きな一歩となった。さらに、マーモセット多能性幹細胞において生殖巣体細胞を誘導するためのレポーター系を構築した。これにより、今後の生殖巣再構築の研究が加速することが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の継続によって、生殖細胞の再構築を検討する上で、近年深刻になっている少子高齢化や、不妊治療に対する根本的な解決策を創出できることがきたいされる。

研究成果の概要（英文）：In this study, single cell analysis of germline cells from marmosets allowed us to identify primate-specific gene expression profiles, a major step toward future reconstruction in culture. Also, we generated reporter embryonic stem cell lines of marmosets harboring gonadal somatic cell-reporters. It would promote further studies for in vitro reconstitution of functional gametes from marmosets.

研究分野：生殖細胞生物学

キーワード：生殖細胞 マーモセット 霊長類

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞系譜は次世代に遺伝情報を伝達し、生物進化の連続性を担う基幹的役割を持つことから、その系譜分化の機構究明は進化生物学・発生学上の重要課題とされてきた。近年、マウス多能性幹細胞から生殖系列細胞を誘導し産仔形成能をもつ機能的配偶子が作出されたという成果は、「多能性幹細胞からの *in vitro* 配偶子形成」という革新的生殖技術に繋がり、ヒト ES/iPS 細胞についても *in vitro* 配偶子形成研究の新領域を拓いた。しかし、マウスと霊長類の生殖発生の機序には明確な進化的隔差があり、生殖医療への応用を踏まえた場合、実験的検証を可能とする非ヒト霊長類を用いた培養系の開発が求められる。

本研究では小型霊長類のコモンマーマモセットを対象として、多能性幹細胞から生殖系列細胞、生殖幹細胞から配偶子分化を *in vitro* で再現する培養系の確立を最終目標とする。その成立には、生殖細胞の成熟/分化を支持する生殖腺体細胞の共存が不可欠であり、胎児組織の継続的な供給が難しい霊長類では、生殖細胞だけでなく、発生途上の生殖腺体細胞もまた多能性幹細胞から誘導することが必要と考えられる。この目標のため本課題では第一に、複数の発生段階にあるマーマモセット胎児生殖腺を対象に *single cell RNA-seq* (scRNA-seq) 解析を行うことによって、生殖/体細胞両者について細胞特性や多様性のプロファイリングを行い、*in vitro* 再構築による機能的配偶子誘導培養法成立の比較対照となる基盤的知見を得ることを目的とする。

第二に、これまで申請者らのグループがマーマモセット多能性幹細胞からの誘導に成功している始原生殖細胞様細胞(Primordial germ cell-like cells; PGCLCs)、ならびに霊長類では世界初となる新生児/成体マーマモセット精巣由来の株化精子幹細胞(Spermatogonial stem cells; SSCs)、およびそれらの細胞の成熟分化培養によって得られた半数体様細胞(Haploid-like cells)の受精能・発生成を検証する上で、成体から採取した卵子・精子を用いた人工授精卵、及び各割球期の初期胚においても scRNA-seq 解析を行い、*in vitro* 誘導配偶子との比較解析を行う。

## 2. 研究の目的

マーマモセットは、多産で性成熟・妊娠期間が短いなど繁殖力に優れ、霊長類において最も発生工学に適した非ヒト霊長類実験動物とされる。実際に、申請者が参画する研究グループ(慶應大/理研 CBS)では、ゲノム編集技術を用いてノックイン型遺伝子改変が可能であることを示した(Yoshimatsu et al, Sci Rep 2019)ほか、様々な神経疾患モデルマーマモセットの作出にも成功している(Kobayashi-Hanada et al, 投稿中; Kishi et al, 投稿準備中; Yoshimatsu et al, Neurosci Res 2022)。しかし、現行の遺伝子改変法では、採卵数の限界や改変卵子の選別手段がないことが研究推進上の大きな障害であり、加速化に向けた新たな遺伝子改変個体作出技術の開発が急務とされてきた。この点において、本研究が目指す「幹細胞からの *in vitro* 配偶子形成」の開発は、革新的な生殖工学技術を提供することにつながり、幅広い研究分野において非ヒト霊長類動物の有用性を向上することが期待される。

具体的には、本研究では最新の RNA-seq 技術を駆使して、マーマモセット生殖腺の発生・分化過程を *single cell* レベルで解析することによって、始原生殖細胞(Primordial germ cells; PGCs)から卵原細胞、或いは PGCs から精子幹細胞(SSCs)に至る過程の細胞特性の変化を生殖細胞/支持体細胞の両面から究明することを目指す。その成果は、性分化やゲノム修飾など、これまで知見の乏しかった霊長類生殖腺分化過程の解明に寄与するとともに、並行して実施する ES/iPS 細胞から *in vitro* 誘導した PGCLC や生殖巣支持細胞前駆体、及び生体精巣から樹立した SSC 株等との比較検証を可能とすることから、「*in vitro* モデルがどの発生段階を模すことができるのか? 或いは、多様性や相違が何に起因しているのか?」という学術的「問い」を明らかにするものと考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、申請者自らの研究によって得られた、生殖細胞レポーターを導入したマーマモセット ES/iPS 細胞株とその *in vitro* 分化誘導によって得られた生殖細胞系譜、および共同研究者らが世界で初めて樹立に成功した精巣由来 SSC 株(未発表)など、各々独自に開発した細胞培養系を研究基盤としており、本課題で対象とする生体由来生殖腺の解析はそれぞれの比較対照として、および次の発展段階に必要な生殖腺支持細胞の解析データを得ることを目指している。従来、*single cell RNA-seq* は幅広い分野で利用されつつあるものの、一細胞あたりにおける検出可能遺伝子数が課題となるなど未だ発展途上の技術である。このなかで 2018 年に開発された RamDA-seq 法(Hayashi et al, Nat Commun 2018)は、ほぼ全ての発現 mRNA、さらには従来の *single cell RNA-seq* では検出不可能とされてきた long noncoding RNA や enhancer RNA なども検出可能としている。そのため、本研究では全ての試料を RamDA-seq 解析系に統一して実施する。

## 4. 研究成果

【査読付き国際誌原著論文】

#: 共同筆頭著者(吉松)、\*: 責任著者(吉松)

- (1) Qian E, Umemura M, Kobayashi H, Nakamura S, Ozawa F, **Yoshimatsu S**, Onodera O, Morimoto S, Okano H. A human induced pluripotent stem cell model from a patient with hereditary cerebral small vessel disease carrying R302Q heterozygous mutation in HTRA1. *Inflammation and Regeneration* (in press)
- (2) **Yoshimatsu S**#, Nakajima M#, Sonn I#, Natsume R, Sakimura K, Nakatsukasa E, Sasaoka T, Nakamura M, Serizawa T, Sato T, Sasaki E, Okano H. Attempts for deriving extended pluripotent stem cells from common marmoset embryonic stem cells. *Genes to Cells* 2023 Feb;28(2):156-169.
- (3) **Yoshimatsu S**#, Seki F#, Okahara J#, Watanabe H, Sasaguri H, Haga Y, Hata J, Sanosaka T, Inoue T, Mineshige T, Lee CY, Shinohara H, Kurotaki Y, Komaki Y, Kishi N, Murayama AY, Nagai Y, Minamimoto T, Yamamoto M, Nakajima M, Zhou Z, Nemoto A, Sato T, Ikeuchi T, Sahara N, Morimoto S, Shiozawa S, Saido TC, Sasaki E, Okano H. Multimodal analyses of a non-human primate model harboring mutant amyloid precursor protein transgenes driven by the human EF1 $\alpha$  promoter. *Neuroscience Research* 2022 Dec;185:49-61.
- (4) Inagaki E, **Yoshimatsu S**, Okano H. Accelerated neuronal aging in vitro ~melting watch ~. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2022 Aug 9;14:868770.
- (5) **Yoshimatsu S**\*, Yamazaki A#, Edamura K, Koushige Y, Shibuya H, Qian E, Sato T, Okahara J, Kishi N, Noce T, Yamaguchi Y, Okano H\*. Step-by-step protocols for non-viral derivation of transgene-free induced pluripotent stem cells from somatic fibroblasts of multiple mammalian species. *Development, Growth & Differentiation* 2022 Aug;64(6):325-341.
- (6) **Yoshimatsu S**\*, Kisu I, Qian E, Noce T. A new horizon in reproductive research with pluripotent stem cells: successful in vitro gametogenesis in rodents, its application to large animals, and future in vitro reconstitution of reproductive organs such as “uteroid” and “oviductoid”. *Biology* 2022 Jun 29;11(7):987.
- (7) Saeki T, **Yoshimatsu S**, Ishikawa M, Hon CC, Koya I, Shibata S, Hosoya M, Saegusa C, Ogawa K, Shin JW, Fujioka M, Okano H. Critical roles of FGF, RA, and WNT signaling in the development of human otic placode and subsequent lineages in a dish. *Regenerative Therapy* 2022 May 16;20:165-186.
- (8) Hosoya M, Fujioka M, Okahara J, **Yoshimatsu S**, Okano H, Ozawa H. Early development of the cochlea of the common marmoset, a non-human primate model. *Neural Development* 2022 May 7;17(1):6.
- (9) Sonn I, Ozaki F, **Yoshimatsu S**, Morimoto S, Watanabe H, Okano H. Single transcription factor leads pluripotent stem cells to functional microglia. *Inflammation and Regeneration* 2022 Jul 1;42(1):20.
- (10) **Yoshimatsu S**, Nakajima M, Qian E, Sanosaka T, Sato T, Okano H. Homologous recombination-enhancing factors identified by comparative transcriptomic analyses of pluripotent stem cell of human and common marmoset. *Cells* 2022 Jan 21;11(3):360.
- (11) Zhou Z#, **Yoshimatsu S**#, Qian E, Ishikawa M, Sato T, Ohtaka M, Nakanishi M, Okano H. Generation of a control human induced pluripotent stem cell line using the defective and persistent Sendai virus vector system. *Stem Cell Research* 2021 Sep 23;56:102549.
- (12) **Yoshimatsu S**, Murakami R, Nakajima M, Sato T, Kawasaki H, Okano H. Establishment of an induced pluripotent stem cell line from a female domestic ferret (*Mustela putorius furo*) with an X chromosome instability. *Stem Cell Research* 2021 May;53:102385.
- (13) **Yoshimatsu S**, Qian E, Sato T, Yamamoto M, Ishikawa M, Okano H. Establishing a common marmoset

induced pluripotent stem cell line NM-iPS by an all-in-one episomal vector approach. *Stem Cell Research* 2021 May;53:102380.

- (14) **Yoshimatsu S**, Edamura K, Yoshii Y, Iguchi A, Kondo H, Shibuya H, Sato T, Shiozawa S, Okano H. Non-viral derivation of a transgene-free induced pluripotent stem cell line from a male beagle dog. *Stem Cell Research* 2021 May;53:102375.
- (15) **Yoshimatsu S**, Murakami R, Sato T, Saeki T, Yamamoto M, Sasaki E, Noce T, Okano H. Generation of a common marmoset embryonic stem cell line CMES40-OC harboring a POU5F1 (OCT4)-2A-mCerulean3 knock-in reporter allele. *Stem Cell Research* 2021 May;53:102308.
- (16) **Yoshimatsu S\***, Nakajima M, Iguchi A, Sanosaka T, Sato T, Nakamura M, Nakajima R, Arai E, Ishikawa M, Imaizumi K, Watanabe H, Okahara J, Noce T, Takeda Y, Sasaki E, Behr R, Edamura K, Shiozawa S, Okano H\*. Non-viral Induction of Transgene-free iPSCs from Somatic Fibroblasts of Multiple Mammalian Species. *Stem Cell Reports* 2021 Apr 13;16(4):754-770.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 11件）

|   |                               |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshimatsu Sho, Nakajima Mayutaka, Qian Emi, Sanosaka Tsukasa, Sato Tsukika, Okano Hideyuki   | 4. 巻<br>11                    |
| 2. 論文標題<br>Homologous Recombination-Enhancing Factors Identified by Comparative Transcriptomic Analyses of Pluripotent Stem Cell of Human and Common Marmoset     | 5. 発行年<br>2022年               |
| 3. 雑誌名<br>Cells   | 6. 最初と最後の頁<br>360 ~ 360       |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/cells11030360   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Zhou Zhi, Yoshimatsu Sho, Qian Emi, Ishikawa Mitsuru, Sato Tsukika, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito, Okano Hideyuki                                     | 4. 巻<br>56                    |
| 2. 論文標題<br>Generation of a control human induced pluripotent stem cell line using the defective and persistent Sendai virus vector system                         | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research  | 6. 最初と最後の頁<br>102549 ~ 102549 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.scr.2021.102549   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Yoshimatsu Sho, Murakami Rei, Nakajima Mayutaka, Sato Tsukika, Kawasaki Hiroshi, Okano Hideyuki   | 4. 巻<br>53                    |
| 2. 論文標題<br>Establishment of an induced pluripotent stem cell line from a female domestic ferret ( <i>Mustela putorius furo</i> ) with an X chromosome instability | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research  | 6. 最初と最後の頁<br>102385 ~ 102385 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.scr.2021.102385   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |
| 1. 著者名<br>Yoshimatsu Sho, Qian Emi, Sato Tsukika, Yamamoto Masafumi, Ishikawa Mitsuru, Okano Hideyuki   | 4. 巻<br>53                    |
| 2. 論文標題<br>Establishing an induced pluripotent stem cell line from neonatal common marmoset fibroblasts by an all-in-one episomal vector approach                 | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research  | 6. 最初と最後の頁<br>102380 ~ 102380 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.scr.2021.102380   | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-                     |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshimatsu Sho, Edamura Kazuya, Yoshii Yumi, Iguchi Aozora, Kondo Hiroataka, Shibuya Hisashi, Sato Tsukika, Shiozawa Seiji, Okano Hideyuki | 4. 巻<br>53                    |
| 2. 論文標題<br>Non-viral derivation of a transgene-free induced pluripotent stem cell line from a male beagle dog  | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research   | 6. 最初と最後の頁<br>102375 ~ 102375 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.scr.2021.102375  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshimatsu Sho, Murakami Rei, Sato Tsukika, Saeki Tsubasa, Yamamoto Masafumi, Sasaki Erika, Noce Toshiaki, Okano Hideyuki            | 4. 巻<br>53                    |
| 2. 論文標題<br>Generation of a common marmoset embryonic stem cell line CMES40-OC harboring a POU5F1 (OCT4)-2A-mCerulean3 knock-in reporter allele | 5. 発行年<br>2021年               |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Research   | 6. 最初と最後の頁<br>102308 ~ 102308 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.scr.2021.102308  | 査読の有無<br>有                    |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-                     |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Yoshimatsu Sho, Nakajima Mayutaka, Iguchi Aozora, Sanosaka Tsukasa, Sato Tsukika, Nakamura Mari, Nakajima Ryusuke, Arai Eri, Ishikawa Mitsuru, Imaizumi Kent, Watanabe Hiroataka, Okahara Junko, Noce Toshiaki, Takeda Yuta, Sasaki Erika, Behr Ruediger, Edamura Kazuya, Shiozawa Seiji, Okano Hideyuki | 4. 巻<br>16              |
| 2. 論文標題<br>Non-viral Induction of Transgene-free iPSCs from Somatic Fibroblasts of Multiple Mammalian Species  | 5. 発行年<br>2021年         |
| 3. 雑誌名<br>Stem Cell Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>754 ~ 770 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.stemcr.2021.03.002   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>該当する            |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Sonn Iki, Ozaki Fumiko, Yoshimatsu Sho, Morimoto Satoru, Watanabe Hiroataka, Okano Hideyuki | 4. 巻<br>(in press) |
| 2. 論文標題<br>Single transcription factor leads pluripotent stem cells to functional microglia           | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>Inflammation and Regeneration   | 6. 最初と最後の頁<br>-    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1186/s41232-022-00201-1  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-          |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Hosoya Makoto, Fujioka Msato, Okahara Junko, Yoshimatsu Sho, Okano Hideyuki, Ozawa Hiroyuki | 4. 巻<br>(in press) |
| 2. 論文標題<br>Early development of the cochlea of the common marmoset, a non-human primate model         | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>Neural Development  | 6. 最初と最後の頁<br>-    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)  | 国際共著<br>-          |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Saeki Tsubasa, Yoshimatsu Sho, Hosoya Makoto, Saegusa Chika, Ogawa Kaoru, Fujioka Masato, Okano Hideyuki                 | 4. 巻<br>(in press) |
| 2. 論文標題<br>Critical roles of FGF, RA, and WNT signaling in the development of human otic placode and subsequent lineages in a dish | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>Regenerative Therapy   | 6. 最初と最後の頁<br>-    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)   | 国際共著<br>-          |

|  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 著者名<br>Inagaki Emi, Imaizumi Kent, Yoshimatsu Sho, Okano Hideyuki | 4. 巻<br>(in press) |
| 2. 論文標題<br>Accelerated neuronal ageing in vitro ~Melting Watch~      | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Neuroscience                                  | 6. 最初と最後の頁<br>-    |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                                       | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている (また、その予定である)                               | 国際共著<br>-          |

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>吉松祥, 岡野栄之  | 4. 巻<br>39      |
| 2. 論文標題<br>クローズアップ実験法series337「さまざまな動物種から高品質なiPS細胞を作出する方法」 | 5. 発行年<br>2021年 |
| 3. 雑誌名<br>実験医学   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし                             | 査読の有無<br>無      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>1)Yoshimatsu Sho, Okahara Junko, Nemoto Akisa, Sato Tsukika, Kishi Noriuki, Noce Toshiaki, Hayashi Katsuhiko, Okano Hideyuki |
| 2. 発表標題<br>A new horizon of marmoset research using highly efficient knock-in and pluripotent stem cell-based technologies              |
| 3. 学会等名<br>ISSCR/JSMR International Symposium 2021 (招待講演) (国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2021年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>吉松祥, 岡原純子, 根本晶沙, 佐藤月花, 岸憲幸, 野瀬俊明, 岡野栄之 |
| 2. 発表標題<br>高効率ノックイン技術を用いたマーモセット研究の新しい展開           |
| 3. 学会等名<br>第44回日本神経科学大会 / CJK第1回国際会議              |
| 4. 発表年<br>2021年                                   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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1件

|   |                    |
|---|--------------------|
| 国際研究集会<br>ISSCR/JSMR International Symposium 2021 | 開催年<br>2021年～2021年 |
|---|--------------------|

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 |
|---------|---------|