

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20740

研究課題名（和文）霊長類始原生殖細胞を高効率に卵母細胞へ誘導する体外培養系の確立

研究課題名（英文）Efficient ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in primates

研究代表者

水田 賢（Mizuta, Ken）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：40909503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、霊長類胎児の卵母細胞発生過程の既存の体外再構成法の高効率化を目的に、カニクイザル胎児卵巣細胞から作製した再構成卵巣を用いて、種々の体外培養条件検討を実施した。その結果、改良型の体外培養法でカニクイザル再構成卵巣を維持することで、卵原細胞の増殖効率・卵母細胞への分化効率・原始卵胞の形成効率が大幅に改善することが示された。改良型培養法で得られたカニクイザル卵母細胞様細胞は、いずれの減数分裂期においても、生体の卵母細胞に非常に近い組織学的特徴および遺伝子発現状態を有していた。これにより、高効率にカニクイザル卵母細胞を誘導可能な改良型培養法の確立に成功したといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した改良型培養法により、生体に近い効率でカニクイザル胎児卵母細胞の発生過程を体外再構成することが可能となった。当培養法は、霊長類の多能性幹細胞から誘導した未熟な生殖細胞を試験管内で分化・成熟させる際の基盤技術となり、ヒトを含めた霊長類の雌性生殖細胞の発生機構の解明に繋がるものである。生殖細胞は、遺伝情報の次世代への継承という、種の存続や進化において極めて重要な役割を担っている。よって、その発生機構の解明は、生物学的な知見の構築のみならず、その異常に起因する遺伝性疾患や不妊等のヒト疾患の病因解明・治療開発の推進に繋がると考えられ、医学的にも重要な研究成果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to improve existing methods for the ex vivo reconstitution of primate fetal oocyte development. Various culture conditions were examined using reaggregated ovaries (rOvaries) derived from cynomolgus monkey fetal ovarian cells. As a result, it was demonstrated that maintaining monkey rOvaries with the improved culture method significantly enhanced the efficiency of oogonia proliferation, oogonia-to-oocyte differentiation, and primordial follicle formation. The monkey oocyte-like cells obtained through the improved culture method exhibited histological characteristics and gene expression patterns highly similar to those of in vivo oocytes at all meiotic substages. Thus, the establishment of an efficient ex vivo reconstitution method of primate fetal oocyte development was successfully achieved.

研究分野：発生生物学、細胞生物学、生殖生物学、分子生物学、生殖医学

キーワード：生殖細胞 霊長類 カニクイザル 胎児 体外培養 卵母細胞 原始卵胞 減数分裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は、卵子もしくは精子に分化し、それらの融合により次世代の個体を生み出すことのできる唯一の細胞系譜であり、種の存続や進化において極めて重要な役割を担っている。近年、マウスにおける生殖細胞研究は国内外で盛んに行われており、マウス多能性幹細胞から成熟卵子および精子を形成するまでの全ての過程を試験管内 (in vitro) で再現することが可能となった (Saitou and Hayashi, *Science*, 2021)。

ヒトの生殖細胞の発生・分化過程では、マウスとは異なる制御機構が多く働いていると考えられている。しかしながら、ヒトの雌性生殖細胞の発生機構の解明には、ヒト胎児を対象とした研究が必要となることから倫理的・技術的な困難さを伴い、詳細な研究はこれまでに殆ど実施されていない。我々は、ヒトの雌性生殖細胞の発生動態や運命決定メカニズムの詳細な解明が重要な課題であり、この課題に対し、霊長類の胎児期の雌性生殖細胞発生過程を in vitro で観察できる体外培養系の開発が必須と考えた。妊娠初期のヒト胎児を対象とした研究が国外では実施されているが、妊娠中期・後期の胎児を必要とする減数分裂期～卵胞形成期を対象とした研究は国内外で今後も極めて困難であると考えられる。そこで、まず初めにこの期間に相当する体外培養法の確立を目指し、ヒトと進化系統的に近縁な霊長類モデルとして、カニクイザルを用いた研究を令和元年度より開始した。

カニクイザルでは、生殖細胞の起源である始原生殖細胞が胎生 11 日頃の初期羊膜から誘導される (Saitou and Hayashi, *Science*, 2021; Sasaki *et al.*, *Dev Cell*, 2016)。その後、始原生殖細胞は腸間膜内を増殖しながら移動し、胎生 5 週頃には生殖巣に到達する。雌では、始原生殖細胞は卵原細胞へ分化し、体細胞分裂により増殖した後、胎生 8 週頃から減数分裂を開始することで卵母細胞へと分化する。その後、約 8 週間の時間をかけて第一減数分裂前期を進行し、原始卵胞を構成するディプロテン期の卵母細胞へと分化する。卵母細胞は、ディプロテン期で一旦休眠し、個体が性成熟した後に減数分裂を再開する (Mizuta *et al.*, *EMBO J*, 2022 [本研究期間中に執筆・発行])。これまでに、胎生 8～18 週のカニクイザル胎仔卵巣に対し、減数分裂の進行を評価する詳細な組織学的解析と、single-cell 3' RNA sequence (SC3-seq) 法・10x Chromium を用いた単一細胞レベルの遺伝子発現解析を実施した。また、胎生 8 週のカニクイザル胎仔卵巣を単細胞に解離・保存後、in vitro で再凝集させた再構成卵巣の作成法を確立した。さらに、種々の培養条件検討の結果、約 12 週間で原始卵胞様構造を体外で作出することが可能な新規体外培養法を開発した (Mizuta *et al.*, *EMBO J*, 2022; 水田他, *細胞*, 2023; 水田他, 医学のあゆみ, 2023 [いずれも本研究期間中に執筆・発行])。遺伝子発現解析等から、再構成卵巣内の卵母細胞様細胞は質的に生体内 (in vivo) の卵母細胞と同等であると考えられたが、誘導できる卵母細胞が非常に少数、且つ誘導までに長期間がかかる、という 2 つの大きな問題点が残っており、霊長類の生殖細胞発生過程を in vitro で観察するのに十分な体外培養法が確立されたとは言いがたかった。そこで、体外培養条件をさらに改良し、高効率に霊長類の卵母細胞を誘導する体外培養法を確立することが極めて重要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、霊長類の始原生殖細胞・卵原細胞を高効率に卵母細胞へ誘導する改良型の体外培養系の確立である。高効率に誘導可能な改良型培養法は、霊長類の多能性幹細胞 (ES・iPS 細胞) から誘導した雌性生殖細胞を培養する際の基盤となり、ヒト雌性生殖細胞の動態解明に加え、ヒト生殖細胞関連疾患の病因解明や治療法開発を試みる上で強力な解析ツールとなり、ヒトの生殖細胞研究を飛躍的に促進させる可能性を有すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) カニクイザル再構成卵巣の培養条件検討

カニクイザル胎仔のサンプル採取は、滋賀医科大学 動物生命科学研究センターにて実施し、

胎仔卵巣細胞の凍結保存を行う。体外培養法の改良が期待される条件を中心に、既存の培養法との比較検討を実施する。具体的には、基本となる培養手法（気相液相境界面培養法・ハンギングドロップ法など）・酸素分圧・圧力環境・ホルモンやサイトカインの添加などの培養条件検討を進める。再構成卵巣の一次評価は、近赤外顕微鏡システムによる内部構造の観察と、培養 9～15 週目の組織学的解析により実施する。また、並行して、単一細胞遺伝子発現データ解析をさらに進めることで、既存法において分化が遅れる原因の特定を試み、原因が見つかればそれを改善するための培養条件も追加で検証する。なお、実験効率化と倫理的観点から、マウス再構成卵巣を用いた事前検討が有用だと考えられる検討項目に関してはマウスの細胞を用いた予備実験を実施し、カニクイザル胎仔の使用を可能な限り最小限に抑える努力をする。

(2) 卵母細胞様細胞と卵母細胞との比較

(1) で検討を進める改良型培養法で得られる再構成卵巣に対して、組織学的解析と単一細胞遺伝子発現解析を実施し、*in vivo* の卵母細胞と同等の構造や性質を有しているかを詳細に確認する。また、各因子の添加による遺伝子発現変動を捉えることで、霊長類雌性生殖細胞の発生過程における分子動態の理解も同時に進める。さらには、新規体外培養法における減数分裂の進行や卵母細胞の誘導効率が、どの程度 *in vivo* を模倣したものであるかを最終的に評価する。

4. 研究成果

(1) カニクイザル再構成卵巣の培養条件検討

研究期間を通じて、共同研究機関の滋賀医科大学動物生命科学研究センターにおいて、胎生 8 週齢のカニクイザル胎仔の採取を定期的に行い、体外培養実験に使用するための卵巣の細胞採取・保存を実施した。カニクイザルの胎仔サンプルは極めて貴重であることから、前述の通り、カニクイザル再構成卵巣を用いた培養条件を実施するにあたり、まずはマウス胎仔（胎生 12.5 日）の再構成卵巣を用いた予備実験を事前に行った。これまでの組織学的解析から、卵母細胞様細胞の多くが再構成卵巣の表層に存在しており、内部への栄養素や酸素の供給が不十分であることが示唆された。

マウス再構成卵巣の体外培養では、気相液相境界面培養法を用いるのが標準的であり、サル再構成卵巣と同様の浮遊培養を行うと再構成卵巣内部の細胞は殆ど死滅した。そこで、旋回培養や高酸素濃度環境下培養などの栄養素の供給を効率化するための工夫を施した培養を試みたところ、再構成卵巣のサイズが増大し、組織深部まで原始卵胞様構造が形成されることを見出した（図 1）。

次に、マウスによる予備実験で得られた結果をもとに、カニクイザル胎仔の再構成卵巣にも改良型培養法が有用であるかの検証を実施した。マウスにおいて有効であった高酸素濃度環境下での培養は、12 週間以上の培養期間が必要となるカニクイザル再構成卵巣においてはネガティブな影響が出たため、正常酸素濃度で維持する必要がある。また、改良型培養法に使用する血清のロットチェック及びその濃度の至適化など、改良型培養法のさらなる調整を実施した。これらを含む条件検討の結果、改良型培養法はカニクイザル再構成卵巣においても高効率に体外において原始卵胞の作出可能であることが明らかとなった（図 2）。

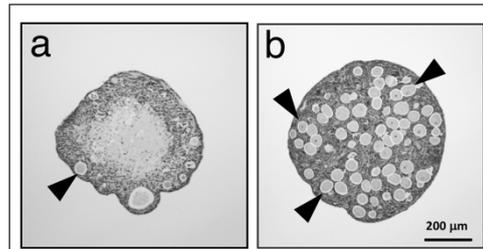


図 1 カニクイザル再構成卵巣内部への栄養素供給に関する検討に先駆けて実施した、マウス再構成卵巣での予備実験の結果。既存法(a)では原始卵胞様構造(矢頭)が再構成卵巣表層のみに形成され、内部の細胞が死滅するのに対し、新規の培養条件候補(b)では内部組織構造が改善し、多数の原始卵胞様構造の形成を認めた。

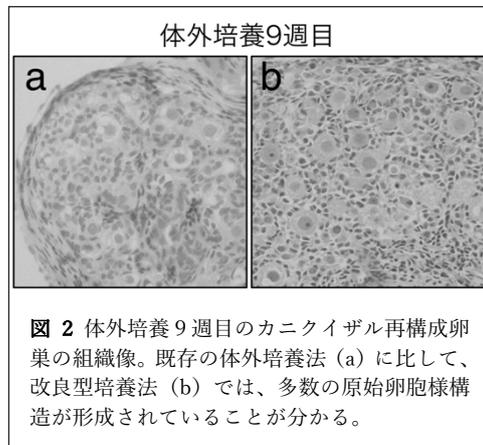


図 2 体外培養 9 週目のカニクイザル再構成卵巣の組織像。既存の体外培養法 (a) に比して、改良型培養法 (b) では、多数の原始卵胞様構造が形成されていることが分かる。

(2) 卵母細胞様細胞と卵母細胞との比較

本研究期間中に、改良型培養法によるカニクイザル原始卵胞の高効率な体外作出が、高い再現性をもって可能であることを確認した。改良型培養法で3~24週間維持したカニクイザル再構成卵巣に対して、組織学的解析（H&E染色・免疫染色など）と単一細胞レベルでの遺伝子発現動態の解析を実施した。単一細胞遺伝子発現解析にはSC3-seq法を用い、in vivo および既存法で得られた卵母細胞（様細胞）の遺伝子発現データ（Mizuta *et al.*, *EMBO J*, 2022[本研究期間中に執筆・発行]）との詳細な比較解析を、現在も引き続き継続中である。これまでに得られた結果では、いずれの減数分裂期においても生体の卵母細胞に非常に近い組織学的特徴および遺伝子発現状態を有していることが明らかになっており、概ね、カニクイザル始原生殖細胞・卵原細胞を高効率に卵母細胞へ誘導する体外培養系が確立されたと考えられる。

本研究期間中に、研究代表者らを発明者として、『霊長類の胎児卵巣細胞から卵胞を誘導する体外培養法』に関する特許出願を行った。ヒトの胎児卵母細胞発生過程を再構成可能な体外培養法の開発は世界初の成果であり、ヒト生殖細胞研究を推進する上での基盤技術となる。本研究では、この体外培養法をさらに高効率化した培養技術を開発しており、霊長類の生殖細胞研究分野へのインパクトは大きいものと考えられる。本研究期間は、カニクイザル再構成卵巣を用いた検討にとどまったが、今後は、改良型培養法がヒト胎児卵巣細胞から作製するヒト再構成卵巣においても有用であるかを検証する必要がある。また、ヒト・カニクイザル多能性幹細胞から誘導した始原生殖細胞様細胞・卵原細胞様細胞の培養に応用することで、多能性幹細胞を起点とするディプロテン期のヒト・カニクイザル卵母細胞様細胞の試験管内誘導が今後の展望としてあげられる。

【引用文献】

- Saitou, M. and Hayashi, K. (2021). Mammalian in vitro gametogenesis. *Science* 374, eaaz6830.
- Sasaki, K., Nakamura, T., Okamoto, I., Yabuta, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Seita, Y., Nakamura, S., Shiraki, N., Takakuwa, T., et al. (2016). The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion. *Dev Cell* 39, 169-185.
- Mizuta, K., Katou, Y., Nakakita, B., Kishine, A., Nosaka, Y., Saito, S., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Kawamoto, I., Nakaya, M., et al. (2022). Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys. *EMBO J*, e110815.
- 水田 賢, 加藤嘉崇, 大田浩, 斎藤通紀 (2023). ヒト生殖細胞の発生機構の解明とその試験管内再構成. *細胞*. 55, 16-19.
- 水田 賢, 大田浩, 斎藤通紀 (2023). ヒト胎児卵母細胞発生過程の体外再構成. *医学のあゆみ*. 285, 155-156.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3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 Nagano Masahiro, Hu Bo, Yokobayashi Shihori, Yamamura Akitoshi, Umemura Fumiya, Coradin Mariel, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiko, Ishikura Yukiko, Okamoto Ikuhiro, Ikeda Hiroki, Kawahira Naofumi, Nosaka Yoshiaki, Shimizu Sakura, Kojima Yoji, Mizuta Ken, Kasahara Tomoko, Imoto Yusuke et al.	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 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 Gyobu Motani Sayuri, Yabuta Yukihiko, Mizuta Ken, Katou Yoshitaka, Okamoto Ikuhiro, Kawasaki Masanori, Kitamura Ayaka, Tsukiyama Tomoyuki, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Tsujimura Taro, Yamamoto Takuya, Nakamura Tomonori, Saitou Mitinori	4. 巻 42
2. 論文標題 Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e112962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2022112962	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 水田 賢, 加藤嘉崇, 大田浩, 斎藤通紀	4. 巻 55
2. 論文標題 ヒト生殖細胞の発生機構の解明とその試験管内再構成	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 16-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 水田賢, 大田浩, 斎藤通紀	4. 巻 285
2. 論文標題 ヒト胎児卵母細胞発生過程の体外再構成	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 155-156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Mizuta K, Katou Y, Nakakita B, Iwatani C, Tsuchiya H, Ohta H, Saitou M
2. 発表標題 Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and monkeys
3. 学会等名 ASHBi Retreat 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken Mizuta
2. 発表標題 Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and monkeys
3. 学会等名 The 26th ASHBi Colloquium
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水田 賢
2. 発表標題 ヒト及びカニクイザル胎児の卵母細胞発生過程の体外再構成
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会 ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katou Y, Mizuta K, Imoto Y, Nagano M, Nakamura T, Yabuta Y, Ohta H, Saitou M
2. 発表標題 Cross-species analysis of denoised single-cell transcriptomic data unravels primate-specific and conserved programs during fetal oocyte development
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ken Mizuta
2. 発表標題 Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys
3. 学会等名 The 21st Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 加藤嘉崇, 水田賢, 井元佑介, 中村友紀, 藪田幸宏, 斎藤通紀
2. 発表標題 卵母細胞発生過程における遺伝子発現状態の種間比較解析
3. 学会等名 第31回 日本医学会総会 基礎医学研究者養成イニシアチブ 全国リトリート
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 霊長類の胎児卵巣細胞から卵胞を誘導する体外培養法	発明者 斎藤通紀, 大田浩, 水田賢	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-117665	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ヒト・サルの胎児卵巣から原始卵胞を体外で作出することに成功
https://ashbi.kyoto-u.ac.jp/ja/news/20220729_research-result_saitou/
New egg recipe to boost fertility research
https://ashbi.kyoto-u.ac.jp/news/https-20220729_research-result_saitou/

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
---------	---------