

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24680045

研究課題名(和文)ES細胞由来始原生殖細胞を用いた新規発生工学技術の開発

研究課題名(英文)Establishment of novel technique using primordial germ cells induced from embryonic stem cells

研究代表者

大田 浩(Ohta, Hiroshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50391892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、我々はES細胞もしくはiPS細胞から精子および卵子へと分化可能な始原生殖細胞様細胞(primordial germ cell like cell; PGCLC)を誘導できる培養系を構築した。本研究ではPGCLCを用いてchemical library screeningを行う事により、PGCLCの増殖を一定期間支持する化合物を同定することに成功した。この試験管内で増殖させたPGCLCは不妊マウスの精巣に移植すると精子へと分化可能なPGCLCである事が明らかとなった。今後、この実験系を発展させることにより、試験管内でPGCLCの増殖・分化を自由に操作可能な実験系の確立に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have recently succeeded in establishing the culture system to induce primordial germ cell like cells (PGCLCs), which possible to differentiate functional sperm or oocytes, from ES cells or iPS cells. In this study, we performed chemical library screening using PGCLCs and identified the chemicals possible to support the proliferation of PGCLCs for a certain period in vitro. This proliferated PGCLC population in vitro was able to differentiate functional sperm when the cells were trasplanted into the tetes of infertile male mice. Further improvement of this culture system will allowed us to regulate the proliferation and differentiation of PGCLCs in vitro.

研究分野：発生生物学

キーワード：始原生殖細胞 ES細胞 小分子化合物 増殖・分化 精子形成

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖細胞は、始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) を起源とし、マウスでは胎生 7 日頃出現する。その後、増殖しながら生殖巣へ向けて移動し、胎生 10 日頃、生殖巣に到達する。胎生 12 日頃、雌雄決定が行われ、それに従い、雄の PGC は細胞増殖を停止し、雌の PGC は減数分裂へと移行する。出生後、性成熟に伴い、精子および卵子へと分化し配偶子形成が完成する。このように生殖細胞は、非常に複雑な細胞分化過程を経ることにより、次世代にその遺伝情報を継承する能力を獲得することができる。生殖細胞は生命現象の基盤を担う細胞であり、それを理解することは生命科学において非常に重要な研究課題である。しかしながら、PGC を研究する上での最大の障壁は、その増殖・分化を試験管内で操作可能な実験系が存在しないことであった。また、胎生期の PGC は細胞数が非常に少ない事もあり、遺伝学的・生化学的解析を行う上で大きな問題となっていた。

2. 研究の目的

近年我々は ES (embryonic stem) 細胞あるいは iPS (induced pluripotent stem) 細胞から機能的な精子へと分化可能な PGC 様細胞 (PGC like cell; PGCLC) を試験管内で分化誘導することに成功した (Hayashi et al., Cell 146, 519-532, 2011)。しかしながら、この誘導方法で培養を継続しても PGCLC は増殖を維持することができず、誘導 6 日頃をピークに次第に細胞数が減少する。本研究の目的はこの実験系をさらに発展させることにより、PGC の増殖・分化に関わる因子を同定し、試験管内で PGC を自由に制御できるシステムを構築することである。本研究計画が達成されることにより、PGC の増殖・分化の制御機構が明らかになると共に、PGC を用いた新規の発生工学技術の開発に繋がると考えている。

3. 研究の方法

PGCLC の分化誘導には、生殖細胞特異的に蛍光蛋白質を発現する ES 細胞 (Blimp1-mVenus, Stella-ECFP) を用いた。誘導後 4 日目の PGCLC を FACS (fluorescence activated cell sorting) により分取し、assay 用の細胞と使用した (図 1)。PGCLC を用いた high throughput chemical library screening のためには、PGCLC を 96 well plate に播種し、各 well に chemical library より調製した小分子化合物を添加し、培養した。培養後 1 日、3 日、5 日、7 日で各 well の細胞増殖の程度を細胞イメージングシステム (Cellavista, SynGene) により測定した。PGCLC の増殖に作用する化合物を選び出し、濃度、組み合わせを検討することにより、培養系を最適化した。培養した PGCLC の評価には PGC マーカーを用いた蛍光免疫染色、3' -RNA sequencing に

よる遺伝子発現の確認、不妊マウスの精巣への移植による精子形成能の機能確認等を行った。

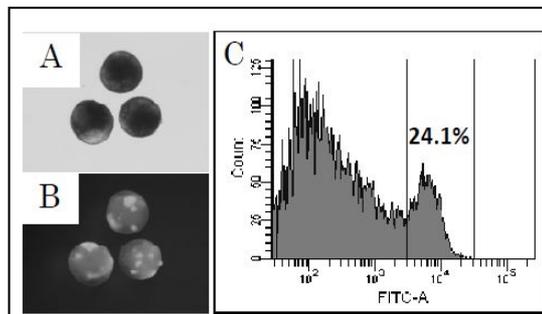


図 1. ES 細胞から PGCLC への分化誘導 (誘導 4 日目). (A,B) 誘導後の細胞塊 (A:可視光写真, B:蛍光写真). (B) PGCLC に分化すれば蛍光 (Blimp1-mVenus) を発する。(C) 細胞塊の細胞の内、24.1% が PGCLC. この細胞を FACS により分取し、assay 用の細胞として使用した。

4. 研究成果

PGCLC を用いた chemical library screening を行い、PGCLC の増殖を支持する小分子化合物の同定を試みた。また、この実験と並行して PGCLC に対する既知の栄養因子の作用を評

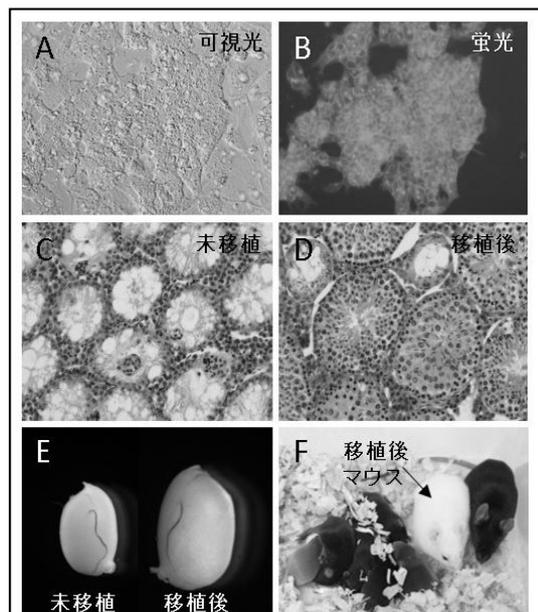


図 2. 培養した PGCLC の精細管内移植法による機能解析。(A,B) 1 週間培養した PGCLC. A: 可視光. B: 蛍光 (Blimp1-mVenus). 培養した PGCLC は (C - F) 1 週間培養した PGCLC の移植実験. C: 未移植精巣 (HE 染色). D: 移植後精巣 (HE 染色). E: 移植後精巣の実体顕微鏡写真. F: 交配による妊孕性の回復.

価した。その結果、PGCLC の増殖を促進する小分子化合物および栄養因子を同定することができた。これらの因子の濃度検討および組み合わせを検討することにより、PGCLC を一定期間増殖させることのできる培養系を構築する事に成功した(図2A,B)。

培養した PGCLC の分化段階を各種 PGC マーカーを用いた蛍光免疫染色および 3'-RNA sequencing により評価したところ、培養した PGCLC は胎生 9.5 日頃の in vivo PGC に近い性質を有していることが明らかとなった。さらに、培養した PGCLC を不妊マウス(WBB6F1-W/W^Y)の精巣に移植したところ、正常な産仔能を有する精子形成を行うことが可能であることが明らかとなった(図2C-D)。

本研究により、PGCLC を一定期間移動期 PGC の性質を維持したまま培養できることが明らかとなった。今後この培養系を応用することにより、メスの PGCLC の増殖培養方法の確立や、より長期的な PGCLC の培養方法の開発に繋がるものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)全て査読有

1. Kurimoto K, Yabuta Y, Hayashi K, Ohta H, Kiyonari H, Mitani T, Moritoki Y, Kohri K, Kimura H, Yamamoto T, Katou Y, Shirahige K, Saitou M. Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 16, 517-532 (2015).
doi: 10.1016/j.stem.2015.03.002.
2. Aramaki S, Hayashi K, Kurimoto K, Ohta H, Yabuta Y, Iwanari H, Mochizuki Y, Hamakubo T, Kato Y, Shirahige K, Saitou M. A mesodermal factor, T (brachyury), specifies mouse germ cell fate by directly Activating Germline Determinants. *Developmental Cell*, 27, 516-529, (2013).
doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.001.
3. Nakaki F, Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M. Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors in

vitro. *Nature*, 501, 222-226, (2013).

doi: 10.1038/nature12417.

4. Yamaji M, Ueda J, Hayashi K, Ohta H, Yabuta Y, Kurimoto K, Nakato R, Yamada Y, Shirahige K, Saitou M. PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 12, 368-382, (2013).
doi: 10.1016/j.stem.2012.12.012.
5. Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 338, 971-975, (2012).
doi: 10.1126/science.1226889.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者

大田 浩 (OHTA, Hiroshi)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：50391892

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：