

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462481

研究課題名(和文)単為発生胚由来のES細胞を用いた生殖細胞の再生についての研究

研究課題名(英文)Study on the regeneration of gametes using parthenogenetic embryonic stem cells.

研究代表者

平田 修司(HIRATA, Shuji)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号：00228785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「雌性または雄性の単為発生胚由来のES細胞を用いて生殖細胞、以下、pESまたはaES細胞)を再生させるための基礎的検討を行うことを目的としたのものであった。その結果、pESならびにaES細胞株を樹立し得た。また、このaES細胞株の性染色体解析の結果、YYは存在しなかったことから、X染色体が初期発生に必須であることがはじめて明らかになった。さらに、ES細胞を生殖細胞再生のソースとする目的でより高品質なESを樹立するための検討を行った。この結果、発生直後の胚内部のミトコンドリアの動態が、その後の初期発生に強く関連していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, basic investigation of regeneration of gametes using parthenogenetic embryonic stem cells (pES) and androgenetic ES cells (aES cells). We established the aES cells, as well as pES cells, using microinjection of 2 sperm into the enucleated meta II oocyte. Sex chromosomal analysis on the aES cells revealed that all the aES cells have XX or XY karyotype, indicating that the X chromosome is essential for the early embryonic development. Moreover, to establish the high-quality ES cells for regeneration of gametes, we investigated the factors defining the early embryonic development. The results indicated that the intracellular dynamics of mitochondria in the one-cell embryo is one of the key factor of the early embryonic development.

研究分野：生殖医学

キーワード：単為発生 胚性幹細胞 雌性単為発生 雄性単為発生 初期胚 ミトコンドリアの動態 生殖細胞の再生

1. 研究開始当初の背景

2012 年、山中伸弥教授が induced pluripotent cell (iPS 細胞) の樹立によってノーベル生理学・医学賞を受賞して以来、世界的に再生医学の臨床応用への期待が高まっている。現在のところ、再生医療においてソースとして用いることが想定されている細胞は、iPS 細胞ならびに体細胞核移植胚 (体細胞クローン胚) 由来の胚性幹細胞 (nuclear transfer-derived embryonic stem cell; ntES 細胞、クローン ES 細胞) である。

研究代表者は本研究の開始時まで、配偶子の採取ができない超重症の不妊症症例に対して、再生医療を用いて生殖細胞を再生しこれを治療することを展望して、基礎的検討を行っていた。しかしながら、iPS 細胞においては、現段階ではその作成に外来遺伝子の導入が不可欠であるため、導入遺伝子が子孫に伝搬してしまう生殖細胞の再生のソースには用いることができない。一方、ntES 細胞ではその作成に生命の萌芽である胚の破壊が不可欠であり、倫理的観点から、ntES 細胞を用いた生殖細胞の再生を臨床的に実施するに必要な社会的合意は得られていないのが現状である。

こうした中、マウスにおいて卵子を単為発生させた胚から得られた雌性単為発生胚由来の ES 細胞 (pES 細胞) の樹立が報告された。

2. 研究の目的

本研究は、以上のような再生医療の研究の現段階に立脚して、ヒトにおける生殖細胞の再生を将来的に展望して、pES 細胞ならびに雄性単為発生胚由来の ES 細胞 (aES 細胞) を樹立し、生殖細胞の再生についての基礎的な検討を実験動物 (マウス) のレベルで行うことを目的としたものである。

3. 研究の方法

本研究では pES ならびに aES 細胞

を用いて生殖細胞を再生させるための基礎的検討を行うことを目的としたのもであり、研究開始の段階では、1) pES ならびに aES 細胞の樹立、2) 同細胞のキメラマウスを用いた in vivo での特製解析、3) pES ならびに aES 細胞の in vitro での分化誘導、等を行うという計画であった。

しかしながら、次項の研究成果欄に述べるとおり、本研究の開始後に、pES 細胞株のみならず aES 細胞株の樹立に成功したが、それら ES 細胞の分化誘導研究において、これらの ES 細胞の分化能が限定的であることが判明した。

すなわち、本研究の目的である「生殖細胞の再生」には、より高品質の ES 細胞の樹立が必要であることが判明した。また、とくに雄性単為発生胚においては、初期発生段階で発生が停止する胚が少なくなかった。これらを総合すると、初期発生段階において何らかの発生異常が生じることによって、その単為発生胚由来の ES 細胞の品質が低下するものと考えられた。

そこで、本研究では、より高品質な pES ならびに aES 細胞株を樹立することを主目標として、aES 細胞の性染色体についての解析、ならびに、発生直後の単為発生胚の細胞内のミトコンドリアの動態の解析を詳細に行った。

4. 研究成果

本研究では、まず、aES 細胞株の樹立を試みた。BDF₁ マウスより採卵した MII 卵よりマイクロマニピュレーターで紡錘体を除去して「除核卵」とした。この「除核卵」に同系のマウスより採取した精子 1 個または 2 個をマイクロマニピュレーターで注入し、再構築した胚の初期発生を検討した。この結果、精子 1 個に比して 2 個注入すると胚盤胞期到達率が有意に改善し、概ね 40% 程度となった。この到達率は雌

性単為発生の場合の概ね 100 % に対して著しく低いものであった。得られた雄性単為発生胚由来の胚盤胞から、常法により雄性単為発生由来の ES 細胞 (aES 細胞) を樹立することができた。さらに、この aES 細胞の分化誘導を行ったところ、三胚葉系への分化は確認できたものの、その分化効率が低率であった。このことと、低い胚盤胞到達率から判断して、雄性単為発生胚の初期発生に問題があり、その問題を解決が本研究の目的達成のために不可欠であると考えられた。

そこで本研究では、性染色体に注目して以下の検討を行った。すなわち、上記で得られた雄性単為発生胚由来の aES 細胞の性染色体を FISH 法で解析した。その結果、作出した aES 細胞株のおよそ半数が XX であり、また、およそ半数が XY であった。このことから、X 染色体は胚の初期発生に重要な役割を演じていることが初めて明らかになった。また、核型が XX である雌性単為発生胚に対して、核型が XX または XY である雄性単為発生胚の初期発生率が低下することに、X 遺伝子内の何らかの遺伝子が関与している可能性が示唆された。

さらに本研究では、雄性単為発生胚の発生直後の状態が、その後の初期発生に強く影響を及ぼしている可能性について検討することとした。そのために、胚の初期発生に密接に関連していると考えられているミトコンドリアに注目した。すなわち、除核 MII 卵のミトコンドリアを蛍光ラベルし、精子注入後のミトコンドリアの細胞内動態を解析した。その結果、除核 MII 卵のミトコンドリアは、除去した紡錘体が存在した場所を中心に分布し、時間的経過によってその分布は変化しないのに対して、精子を注入すると、ミトコンドリアは注入した精子核周囲に移動することが明らかになった。しかし、MII 卵の中にはこうしたミト

コンドリアの移動現象が減弱したり消失したりするものも認められ、そうした胚の胚発生は高度に障害されていた。これらの成績から、雄性単為発生胚の初期発生には、発生直後のミトコンドリアの細胞内動態が大きく影響することが初めて明らかになった。

本研究では、精子の再生を念頭に XY の核型を有する aES 細胞を樹立し得たが、より分化能の高い aES 細胞の樹立を目指して上記のような検討を行った。本研究の成績から、発生直後のミトコンドリアの細胞内動態が良好な胚を選別して初期発生させ、得られた胚盤胞から pES 細胞を樹立することで、より分化能の高い株を高率に得ることができると考えられた。今後、この方法を用いてより分化能の高い aES 細胞の樹立し、*in vitro* での精子の再生を現実化したいと考えている。

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 3 件)

1. 岡本遼太、深澤宏子、平田修司. 1-day-old 卵における細胞質内ミトコンドリアの動態. 日本産科婦人科学会雑誌 69(2):712, 2017.

2. 岡本遼太、深澤宏子、平田修司. 1 精子由来の雄性発生胚の初期発生. 日本産科婦人科学会雑誌 68(2):259, 2016.

3. 深澤宏子、岡本遼太、平田修司. MII 卵紡錘体移植法を用いた卵細胞質内ミトコンドリア分布についての検討. 日本産科婦人科学会雑誌 67(2):728, 2015.

[学会発表] (計 3 件)

1. 岡本遼太、深澤宏子、平田修司. 1-day-old

卵における細胞質内ミトコンドリアの動態.
日本産科婦人科学会第 69 回学術講演会,
2017 年 4 月 14 日, 広島市 (広島県立総
合体育館)

2.岡本遼太、深澤宏子、平田修司.1 精子由来
の雄性発生胚の初期発生. 日本産科婦人科学
会第 68 回学術講演会. (ミニワークショップ)
2016 年 4 月 23 日, 東京(東京国際フォー
ラム)

3.深澤宏子、岡本遼太、平田修司. MII 卵紡
錘体移植法を用いた卵細胞質内ミトコンド
リア分布についての検討.日本産科婦人科学
会第 67 回学術講演会, 2015 年 4 月 11 日,
横浜市 (パシフィコ横浜).

〔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 :
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

平田 修司 (HIRATA, Shuji)
山梨大学・総合研究部・教授
研究者番号 : 00228785

(2)研究分担者

多賀谷 光 (TAGAYA, Hikaru)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号 : 50418711

深澤 宏子 (FUKASA, Hiroko)
山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号 : 60362068

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし