

# ヒト生殖細胞の運命決定機構を解明 —ヒトとマウスの分子機構の差が明らかに—

## ポイント

1. ゲノム編集により6種類の遺伝子ノックアウトヒトiPS細胞株を樹立
2. それぞれの遺伝子が精子や卵子の元となる細胞への分化のどの時点で必要となるか特定
3. マウスと異なるヒト独特の運命決定機構を解明

京都大学大学院医学研究科の斎藤通紀教授 [兼 科学技術振興機構 (JST) ERATO 斎藤全能性エピゲノムプロジェクト研究総括、京都大学 iPS 細胞研究所研究員]、と京都大学 iPS 細胞研究所の小島洋児特定拠点助教は、ゲノム編集技術を用いて遺伝子を欠失させたヒト iPS 細胞を作製し、精子や卵子の元となる始原生殖細胞<sup>1</sup>への分化における6種類の遺伝子の役割を特定しました。その結果マウスでの始原生殖細胞への分化機序とは異なる機構が判明し、ヒトに特異的な分子機構が明らかになりました。

哺乳類の生殖細胞研究は主にマウスを用いて発展してきました。本研究グループではこれまでに、マウス胚での研究を元に、世界に先駆けてマウス多能性幹細胞から始原生殖細胞様細胞<sup>2</sup>を作成しました。一方でヒトの生殖細胞への分化は着床後の受精後 2 週目頃に起こるため、生体を用いた研究は、技術的にも倫理的観点からも困難です。近年、ヒト iPS 細胞から始原生殖細胞様細胞へと分化する手法が開発され、ヒトでもこの時期の胚を使用せずに生殖細胞の初期の発生過程を再現できるようになりました。

本研究では、ヒト iPS 細胞に「クリスパー・キャス9」<sup>3</sup>というゲノム編集技術を用い、生殖細胞の発生に関わる可能性のある遺伝子を欠失させたノックアウト iPS 細胞株を作製しました。これらの細胞株を始原生殖細胞様細胞に分化させた際、遺伝子発現がどのように変動するかを追跡し、それぞれの遺伝子の機能を特定しました。その結果、マウスの始原生殖細胞の発生とは必須の遺伝子が異なり、それぞれの機能や発現する順序も異なることが分かりました。マウスで最も早く発現し、生殖細胞系列への運命決定に必須の *T* 遺伝子はヒトでは不要で、一方で他の生物種では生殖細胞分化への関与が知られていない *EOMES* 遺伝子が重要な役割を担っていることが分かりました。またマウスの生殖細胞分化に必須の *TFAP2C* と *BLIMP1* 遺伝子も、マウスとヒトとは異なる働き方をしていることも見出しました。ヒトの生殖細胞発生の入口に相当する時期のメカニズムが明らかになったことで、これ以降の生殖細胞の発生・分化研究や、生殖細胞の形成異常による数多くの疾患発症に関する研究を進める、基盤となる知見であると期待されます。

本研究成果は 2017 年 10 月 6 日 (日本時間)、*Cell Stem Cell* オンライン速報版で公開されました。

<sup>1</sup> 始原生殖細胞とは、卵子もしくは精子の起源となる細胞。マウスでは胚齢 6.5 日頃、サルでは胚齢 11 日頃に始原生殖細胞が発生することが報告されている。マウスではその発生機序が知られているが、霊長類ではそのメカニズムは未解明である。ヒトでもサルと同じ胚齢 10 日前後に発生すると考えられている。

<sup>2</sup> 多能性幹細胞から試験管内で誘導した、始原生殖細胞の特徴を持つ細胞。ヒトでも誘導法が確立したが、受精後何日目頃の始原生殖細胞と同じ性質を持つかはまだ分かっていない。サルの初期胚の解析との比較から、胚齢 3~4 週頃の始原生殖細胞と類似していると考えられている。

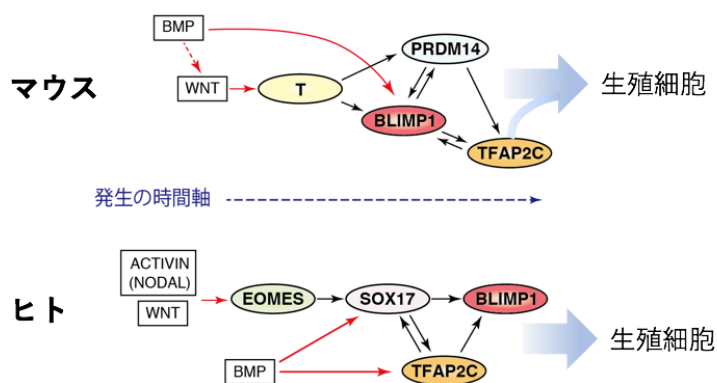
<sup>3</sup> 広く用いられているゲノム編集技術。特定の遺伝子のゲノム DNA 配列に合わせたガイド RNA を設計し、DNA を狙った位置で切断できる。切断後に DNA を再結合する際、塩基の挿入や欠失が起きやすい特徴がある。本研究ではこの機構を利用して遺伝子ノックアウト細胞株を作成した。

## 1. 背景

ヒトの始原生殖細胞の発生は受精後 2 週目の着床直後に起こるとされ、中絶胚を用いる研究などでも観察することが不可能です。本研究グループではこれまで、主にマウス胚を用いて精子や卵子の起源となる、始原生殖細胞の発生機構を研究してきました。その知見に基づき、マウスだけでなく、ヒトの iPS 細胞からもヒト始原生殖細胞様細胞を作成することに成功してきました。これまでにヒトでは *SOX17* 遺伝子が *BLIMP1* 遺伝子を誘導することで生殖細胞への運命決定が起きることが分かっていますが、何が *SOX17* 遺伝子を誘導するのか、あるいは他にどのような遺伝子が必要なのか、分かっておらず、解明が待たれていました。

## 2. 研究手法・成果

今回は本研究グループで開発された、ヒト iPS 細胞を始原生殖細胞様細胞へと分化させる系を用いました。分化の初期に発現変動する遺伝子の中から *SOX17*、*TFAP2C*、*T*、*EOMES* などを選び、ゲノムを編集して一つずつ欠失させたヒト iPS 細胞株を樹立しました。これらの iPS 細胞株から始原生殖細胞様細胞への分化を試み、その過程での遺伝子発現の変遷を詳細に解析しました。その結果、マウスでは最も初期に見られる *T* 遺伝子がヒトでは生殖細胞発生に全く関与しておらず、*EOMES* 遺伝子が *SOX17* 遺伝子の転写を促すことが鍵となることが分かりました。*EOMES* 遺伝子は、カンクイザルの胚齢 11 日の羊膜にも発現が確認でき、始原生殖細胞が羊膜の同部位から発生していることから、霊長類に共通する生殖細胞分化メカニズムである可能性が示唆されました。また、マウスでは *T* を発現した細胞が分化の刺激を受けて *BLIMP1*、*PRDM14* を発現させ、この 2 つが *TFAP2C* の発現を促し、これら 3 因子がそろって生殖細胞への運命が決定します。一方、本研究からヒトでは *TFAP2C* 遺伝子の発現は *BLIMP1* の発現よりも早く、また *TFAP2C* を欠失すると *BLIMP1* の発現を維持できないことから、*TFAP2C* は *BLIMP1* の上流にあたり、マウスとは逆であることも分かりました。このように、ヒトにおける生殖細胞系列への分化に関わる因子が新たに分かり、マウスとは機序が異なることを特定しました。



本研究結果のモデル図。マウスと人では分化に必要な遺伝子や発現のタイミング、シグナル伝達が異なる

## 3. 波及効果、今後の予定

本研究は、ヒト iPS 細胞から始原生殖細胞様細胞の分化系を用いて、着床直後の胚における生殖細胞への運命決定の分子機序を明らかにしました。他の臓器の発生に比べ、まだ解明の進んでいない生殖細胞発生への最初の分子機構が解明したことで、以降の生殖細胞の分化形成機序を研究する基盤となる情報が得られました。今後もヒト始原生殖細胞からの分化成熟の分子機序を明らかにし、様々な生殖細胞異常による先天性疾患の発症機序解明に向け、研究を推進していきます。

## 4. 研究プロジェクトについて

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

J S T 戦略的創造研究推進事業 総括実施型研究(ERATO) 日本学術振興会 科学研究費 特別推進研究  
研究プロジェクト：「斎藤全能性エピゲノムプロジェクト」 「ヒト生殖細胞発生機構の解明とその試験管内再構成」  
研究総括：斎藤 通紀 研究代表者：斎藤 通紀  
研究期間：平成 23 年度～平成 28 年度 研究機関：平成 29 年度～平成 33 年度

図 1. *EOMES* と *SOX17* のノックアウト iPS 細胞からは始原生殖細胞様細胞は誘導できない

- (A) *TFAP2C-EGFP* と *BLIMP1-tdTomato* の 2 種類 の 蛍 光 レポーター を 導 入 し た ヒ ト iPS 細 胞 株 から (Control ; 上) と *SOX17* の ノック アウト 株 (中)、*EOMES* の ノックアウト 株 (下) から の 始 原 生 殖 細 胞 様 細 胞 の 誘 導 。 Control の み で 蛍 光 が 見 ら れ 、 ど ち ら の ノック アウト 株 から も 始 原 生 殖 細 胞 様 細 胞 は 誘 導 さ れ ない。
- (B) *SOX17* の ノックアウト 株 で の *EOMES* 遺 伝 子 の 発 現 の 推 移 。 Control (黒) と ノック アウト (赤) で 差 は 見 ら れ ない (縦 軸 は RNA 発 現 量 を 、横 軸 は サンプル 回 収 の タイ ミング を 表 す)。
- (C) *EOMES* の ノックアウト 株 で の *SOX17* 遺 伝 子 の 発 現 の 推 移 。 軸 は 上 と 同 様 。 Control (黒) で 上 昇 が 見 ら れ る 時 期 に も ノック アウト 株 (赤) で は *SOX17* の 発 現 が ほ と ん ど 見 ら れ ず 、*EOMES* が *SOX17* の 上 流 で 制 御 し て い る こ と が 分 か る 。

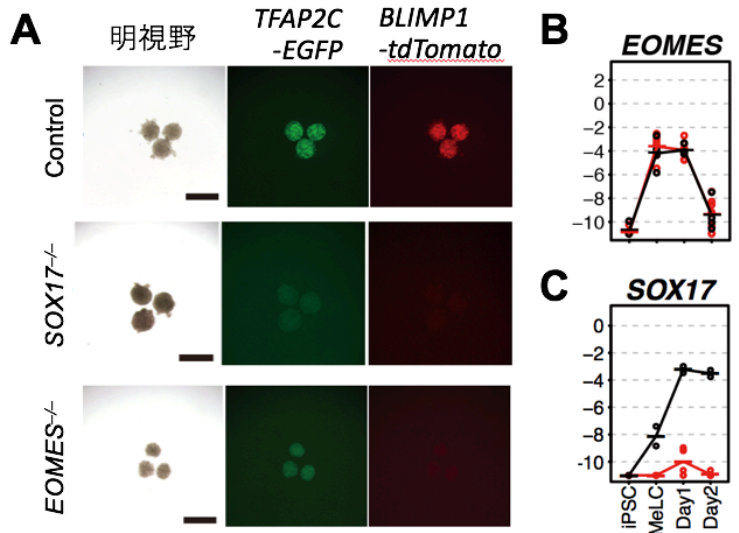
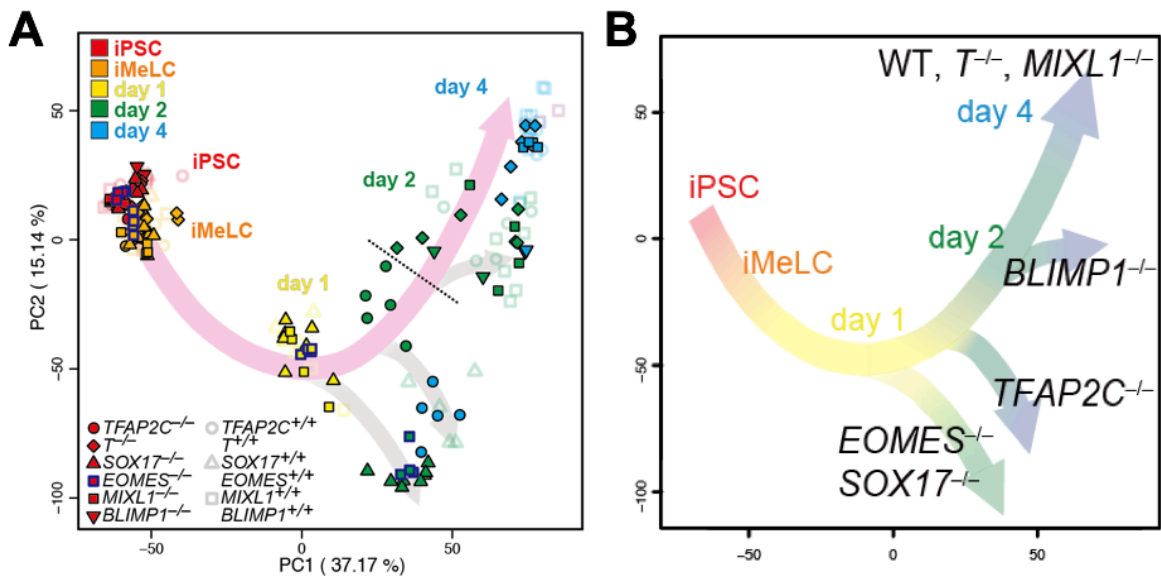


図 2. ヒトの生殖細胞系列への分化には *TFAP2C* が *BLIMP1* よりも早く必要となる

- (A) 本 研 究 で 採 取 し た 細 胞 の 遺 伝 子 発 現 を 網 羅 的 に 解 析 し た 結 果 。 ピ ン ク の 線 で 示 す 線 上 に iPS 細 胞 から 分 化 の 順 序 通 り に 並 び 、 ノック アウト の 影 響 の 出 ない *T* と *MIXL1* の ノック アウト 株 は 、 対 照 群 と 同 等 の 変 化 を 示 す 。
- (B) 上 記 の (A) を ノック アウト 株 ごと に ま と め た 図 。 時 間 軸 に 沿 っ て 色 分 け し て お り 、*EOMES* と *SOX17* は 1 日 目 以 降 で 、*TFAP2C* は 2 日 目 頃 から 、*BLIMP1* は 2 日 目 以 降 で 対 照 群 から 変 化 し て い く 。



<論文タイトルと著者>

タイトル : Evolutionarily Distinctive Transcriptional and Signaling Programs Drive Human Germ Cell Lineage  
Specification from Pluripotent Stem Cells

著者 : 小島 洋児、佐々木 恒太郎、横林 しほり、酒井 義岳、中村 友紀、藪田 幸宏、中木 文雄、  
長岡 創、Knut Woltjen、堀田 秋津、山本 拓也、斎藤 通紀

掲載誌 : *Cell Stem Cell*