

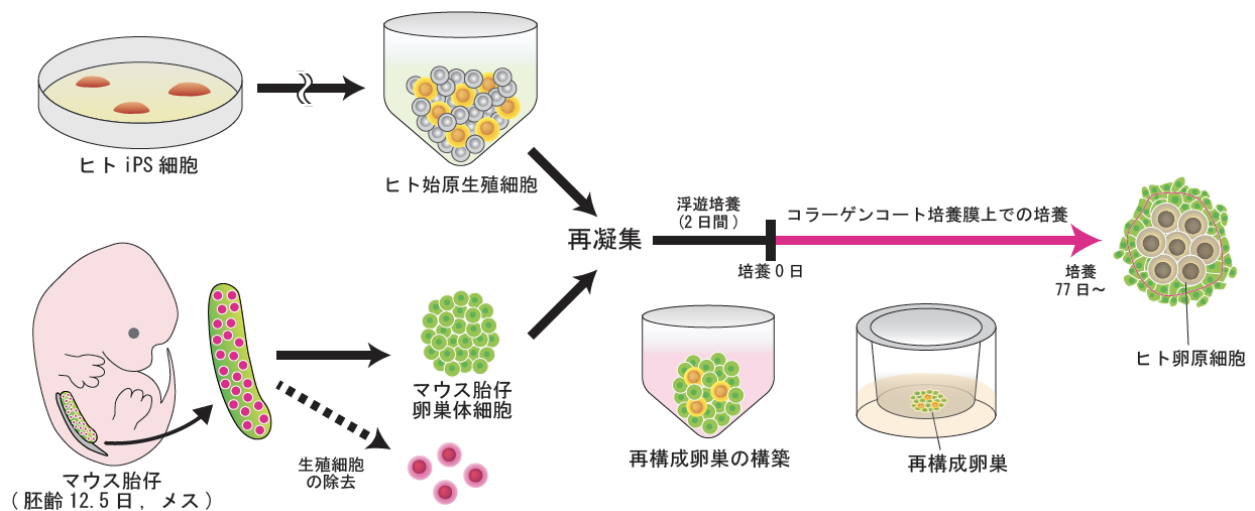
ヒト iPS 細胞からの卵原細胞の作出に成功

概要

京都大学大学院医学研究科の斎藤通紀 教授（兼・物質－細胞統合システム拠点（iCeMS＝アイセムス）連携 PI、iPS 細胞研究所主任研究者）と同研究科の山城知佳 博士課程学生（技術補佐員）らの研究グループは、ヒト iPS 細胞から誘導した始原生殖細胞様細胞¹から卵原細胞²を作出することに成功しました。卵原細胞とは、発生 7 週目頃のヒト胎子から新生子にまで存在する、卵母細胞³に分化を開始する直前の細胞です。これまで本研究グループは、ヒト iPS 細胞⁴から始原生殖細胞様細胞の誘導を報告してきましたが、ヒト始原生殖細胞様細胞をさらに分化させる技術の開発が望まれてきました。

本研究では、ヒト始原生殖細胞様細胞を、マウス胎仔卵巣の体細胞と共に約 3 ヶ月間培養することにより、卵原細胞へと分化させることに成功しました。本成果は、ヒト卵原細胞の作出に成功した世界で初めての成果で、ヒト生殖細胞の発生機構の理解を促進し、ヒト卵原細胞から卵母細胞、さらに卵子を誘導する研究の基盤を築く成果です。将来的には不妊症の原因解明など、生殖医療の発展に役立つと期待されます。

本研究成果は、アメリカ東部時間 2018 年 9 月 20 日（木）午後 2 時 [日本時間: 2018 年 9 月 21 日（金）午前 3 時] に米国科学誌 *Science* のオンライン速報版で公開されました。



iPS 細胞から卵原細胞を作製するための実験手順。ヒト iPS 細胞から分化させた始原生殖細胞とマウス胎仔卵巣体細胞を凝集させた再構成卵巣を構築し、コラーゲンコート培養膜上で培養した。再構成卵巣中の始原生殖細胞は、培養 77 日目頃より卵原細胞へと分化した。

1. 背景

多能性幹細胞から生殖細胞への分化誘導は、遺伝情報の次世代への継承機構を理解するうえで重要な研究分野です。われわれの生体内において生殖細胞は、多能性幹細胞の一部が始原生殖細胞として運命決定されることにより生じ、エピゲノム情報の大規模な再編成（エピゲノムリプログラミング⁵）を受け、さらに性特異的な配偶子形成過程を経て精子または卵子へと分化します。これまで本研究グループでは、マウス多能性幹細胞を培養環境下で始原生殖細胞様細胞へと誘導し、正常な産仔能をもつ精子や卵子へと分化させることに成功してきました。一方でヒト多能性幹細胞を起点とした分化誘導については、ヒト iPS 細胞から始原生殖細胞様細胞への誘導法は確立できたものの、その後の分化過程は再現できていませんでした。そもそもヒトを対象とした検討では、マウスのような産仔形成による機能性評価が現実的に不可能であり、誘導したヒト始原生殖細胞様細胞が真に生殖系列細胞であることは不確定のままでした。生殖系列細胞であることの証明には、誘導した始原生殖細胞様細胞がその後、生殖細胞でしか起こらない現象、たとえばエピゲノムリプログラミングや卵母細胞への分化を示す必要がありました。

2. 研究手法・成果

本研究は、ヒト始原生殖細胞様細胞を卵原細胞、さらには卵母細胞へと分化させることを目的としました。実験には、始原生殖細胞に発現する2つの遺伝子 *TFAP2C* と *BLIMP1* が発現するとそれぞれ緑色と赤色の蛍光を発する iPS 細胞と、*TFAP2C* が発現すると緑色、さらに発生が進んだ卵原細胞で発現する遺伝子 *DDX4* が発現すると赤色の蛍光を発する iPS 細胞を使用しました。各ヒト iPS 細胞は、先行研究の方法に則り始原生殖細胞様細胞へと誘導しました。またこれまで報告されてきたマウス生殖細胞の試験管内分化誘導法に倣い、ヒト始原生殖細胞様細胞とマウス胎仔から得た将来の卵巢を構成する体細胞（胎仔卵巢体細胞⁶）を凝集させた異種間再構成卵巢を構築し、コラーゲンをコートしたナイロン膜上で培養しました。ヒト胎仔の始原生殖細胞は数週間から数ヶ月かけ徐々にエピゲノムリプログラミングが進行することが知られており、培養下においても同様に長い期間を要することが考えられたため、本研究では約4ヶ月にわたる長期培養を計画し、その間定期的な観察を行いました。

その結果、長期培養を経たヒト始原生殖細胞様細胞に由来する細胞ではインプリント⁵情報の消去を含む大規模な DNA 脱メチル化がみとめられ、一部では X 染色体の再活性化⁵ も観察されました。また網羅的遺伝子発現解析においても、エピゲノムリプログラミングの進行を裏付ける遺伝子群の発現上昇がみとめられました。これらの結果を生体の生殖細胞と比較すると、DNA メチル化状態・遺伝子発現ともに発生約7~10週（妊娠9~11週）頃のヒト胎児卵原細胞に酷似していました。さらに *DDX4* を強発現した細胞群では、卵母細胞へ移行する直前の段階まで発生が進行していることがわかりました。

以上より、本研究ではヒト iPS 細胞から誘導した始原生殖細胞様細胞を卵原細胞へと分化させる技術の開発に成功しました。また、ヒト始原生殖細胞様細胞が生殖系列細胞へ分化することを世界で初めて証明しました。

3. 波及効果、今後の予定

本研究は、ヒト始原生殖細胞から配偶子（卵子）へ分化する過程の初期段階の解析を可能にしました。またヒト iPS 細胞から誘導したヒト始原生殖細胞様細胞は生殖系列細胞として分化することを初めて証明しました。本成果により、卵子における遺伝情報継承機構の追究や、不妊症の原因究明および遺伝病の発症機構解明が促進されることが期待されます。

今後は始原生殖細胞から卵原細胞への分化における分子機構の解明と、誘導した卵原細胞を卵母細胞、さら

には機能的な卵子へと分化させる技術の開発を推進します。

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 (E R A T O)

研究プロジェクト：「斎藤全能性エピゲノムプロジェクト」

研究総括：斎藤 通紀 (京都大学 大学院医学研究科 教授)

研究期間：平成23年度～平成28年度

日本学術振興会 科学研究費 特別推進研究

「ヒト生殖細胞発生機構の解明とその試験管内再構成」

研究代表者：斎藤 通紀 (京都大学 大学院医学研究科 教授)

研究機関：平成29年度～平成33年度

<論文タイトルと著者>

タイトル：Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells *in vitro*.

ヒト iPS 細胞からの卵原細胞の作出

著 者：山城 知佳、佐々木 恒太郎、藪田 幸宏、小島 洋児、中村 友紀、岡本 郁弘、横林 しほり、
村瀬 佑介、石藏 友紀子、白根 健次郎、佐々木 裕之、山本 拓也、斎藤 通紀

掲 載 誌：Science

<イメージ図>

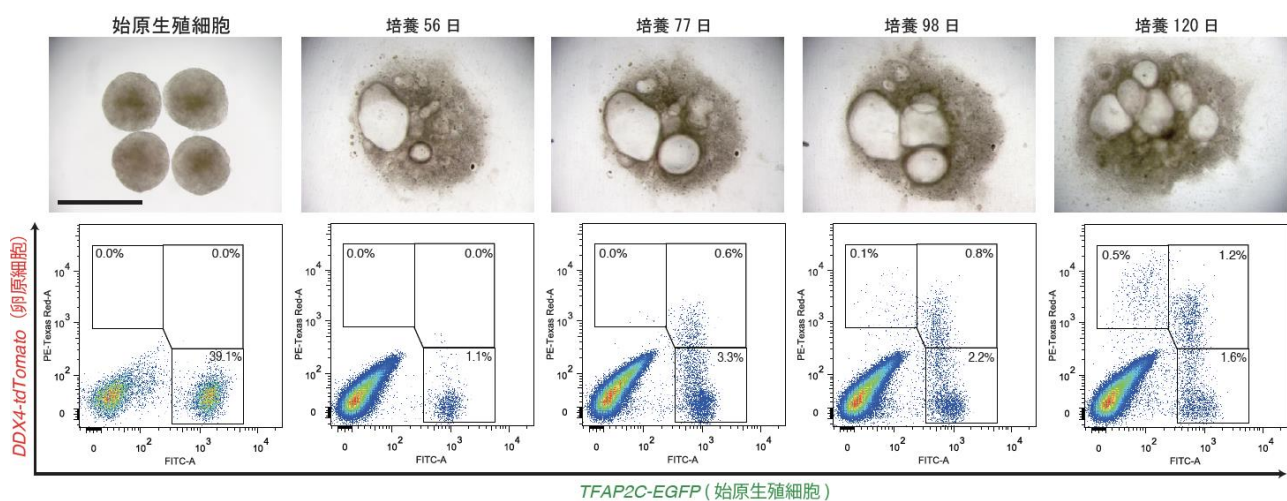


図 1 再構成卵巣内の観察像とレポータータンパク質の発現推移

(上) 始原生殖細胞塊および再構成卵巣(培養 56~120 日)の実体顕微鏡観察像。スケールバー 500 μ m。(下) 各培養ステージの組織を FACS にて解析した結果。培養 77 日目頃から卵原細胞の出現が観察された。

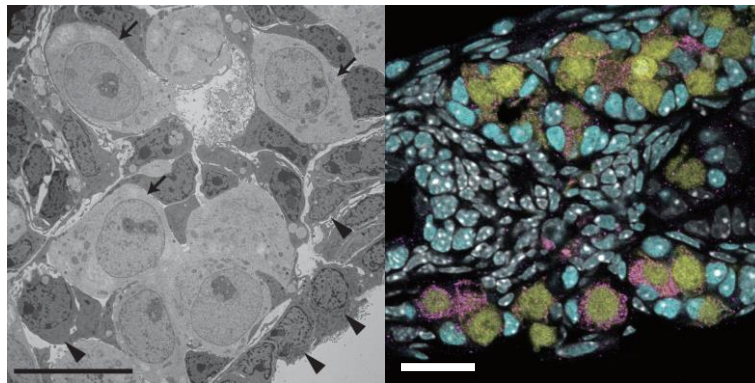


図 2 培養 77 日目における iPS 細胞由来卵原細胞の形態

(左) 再構成卵巣の透過型電子顕微鏡像。矢印はヒト iPS から誘導した卵原細胞、矢じりはマウス胎仔卵巣体細胞を示す。iPS 細胞由来卵原細胞は、均一な核質、不規則な網状の核小体など、卵原細胞に特徴的な形態をしていた。スケールバー 10 μm 。(右) 細胞凝集塊の蛍光免疫染色像。黄色はヒト iPS 細胞由来細胞、マゼンタは卵原細胞、シアンはマウス胎仔卵巣体細胞を示す。ヒト iPS 細胞由来細胞(黄)の一部は、卵原細胞(マゼンタ)へと分化している。スケールバー 20 μm 。

<用語解説>

- ¹ 始原生殖細胞様細胞：始原生殖細胞は、すべての精子および卵子の起源となる細胞。マウスの場合は胚齢 6.5 日前後に胚体外外胚葉（エピブラスト）の一部の細胞が運命決定を受けて生じる。霊長類においては、初期の羊膜内に誘導されることが示唆されている。始原生殖細胞様細胞は、多能性幹細胞から試験管内で分化誘導した、始原生殖細胞に非常によく似た性質をもつ細胞を指す。
- ² 卵原細胞：胚において始原生殖細胞が雌性生殖隆起へ移動した後の生殖細胞であり、卵子の元となる。始原生殖細胞とはエピゲノム状態および遺伝子発現に顕著な違いがある。減数分裂へと進行することで卵母細胞となる。
- ³ 卵母細胞：胎児期に卵原細胞から分化し、減数分裂中にある雌性生殖細胞のこと。減数分裂を完了することにより卵子となる。
- ⁴ iPS 細胞：人工多能性幹細胞(induced Pluripotent Stem Cells)のこと。体細胞に特定の遺伝子 (*OCT4*、*SOX2*、*cMYC*、*KLF4* など) を導入することにより作製され、自己複製能力と身体を構成するほとんどの細胞への分化能を併せ持つ。
- ⁵ エピゲノムリプログラミング：DNA メチル化やクロマチンを構成するヒストンタンパク質の修飾などの後生的化学修飾が一度消去された後、新たな修飾状態を再獲得すること。特に始原生殖細胞においては、インプリント遺伝子（父親由来または母親由来の対立遺伝子のみを発現する遺伝子）のメチル化消去を含むゲノムワイドな脱メチル化や、初期胚で不活性化された X 染色体の再活性化、ヒストンタンパク質の修飾パターンの変化などが分化の過程で起こる。
- ⁶ 胎仔卵巣体細胞：メス胎仔内の将来卵巣になる組織を構成する細胞。卵巣は卵子（生殖細胞）のほかに、卵子の発育を助ける種々の体細胞群により構成されている。マウスにおいて卵巣や精巣の原基は胚齢 10 日目頃に雌雄同様に現れる。胚齢 12 日目には卵巣としての形態的特徴を持つようになり、精巣との識別が可能となる。胎仔卵巣体細胞は、胚齢 12 日以降の胎仔卵巣組織から生殖細胞を除去することにより得られる。