

研究報告書

「始原生殖細胞の内因性リプログラミング機構による幹細胞制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 林 克彦

1. 研究のねらい

生殖細胞系列は個体を形成する全細胞系列の中において、唯一エピゲノムを書き換えること(リプログラミング)により、新しい個体を作る能力(全能性)を獲得する細胞系列である。生殖細胞系列の起源である始原生殖細胞(Primordial Germ Cells: PGCs)は、その分化過程においてゲノムワイドなヒストン修飾の変換や DNA の脱メチル化など特徴的なエピゲノムリプログラミングをおこす。本研究は生理的条件下でエピゲノムリプログラミングを実行する生殖細胞系列の分化過程を体外培養で再現し、その分化メカニズムを明らかにするとともに、内因性のリプログラミング機構が iPS 細胞のエピメューテーションを消去する手段として有効であるかについて検討することを目的とした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究ではまず多能性幹細胞(ES 細胞/iPS 細胞)からすべての生殖細胞のもとである PGCs を分化誘導させる培養方法を構築した。この分化誘導系により得られた PGC 様細胞(PGCLCs)では胚内の PGCs と同様の遺伝子発現パターンやエピゲノムリプログラミングの特徴(DNA のメチル化の減少、ヒストン H3K27 のメチル化亢進と H3K9 のジメチル化減少、X 染色体の再活性化)が観察された。PGCLCs の機能性(配偶子への分化能および個体発生能)を評価した結果、雌の ES/iPS 細胞から分化誘導した PGCLCs は胎仔生殖巣の体細胞とともに卵巣に移植すると受精可能な卵子に分化し、それらの受精卵からは健全な個体が得られた(論文発表(3))。本研究は世界で初めて ES/iPS 細胞から分化させた PGCLCs から機能的な卵子が誘導されることを示した研究成果である。

次に ES/iPS 細胞から PGCLCs への分化誘導系を用いて、PGCs の分化機構について解析した。PGCs に特異的に発現する転写因子の強制発現系による機能的スクリーニングにより、PGCs の分化には転写因子 Prdm14 が中心的な働きがあることを明らかにした(論文発表(5))。Prdm14 は de novo DNA メチル化酵素である Dnmt3a/b の発現を抑制することが示唆されており、これまで不明であったエピゲノムリプログラミングを制御する遺伝子発現ネットワークを解明するための糸口を掴んだ。

(2) 詳細

多能性幹細胞から生殖細胞系列を分化誘導する培養方法の確立のためには、得られた生殖細胞系列の機能性の検証は必須である。本研究では雌の ES/iPS 細胞から分化誘導した PGCLCs の卵子への分化能を卵巣に移植することにより評価した。これまでの研究では PGCs の卵巣への移植方法は確立されていなかったため、関連する先行研究を参考に

PGCLCs を単独ではなく、卵子形成を補助する顆粒膜細胞の前駆体を含む胚齢 12 日目の雌の生殖巣の体細胞と再凝集させたのちに、その細胞塊(再構成卵巣)を免疫不全マウスの卵巣嚢内に移植した。その結果、移植後約 1 ヶ月目の再構成卵巣には多数の PGCLC 由来の卵母細胞が確認された。これらの卵母細胞は体外成熟培養により受精可能な卵子にまで分化し、これらの卵子を用いた体外受精により得られた受精卵は仮親の卵管に移植することにより健全な新生仔に発生した(図 1)(論文発表(5))。得られた新生仔のゲノムインプリントは Bisulfite 解析した遺伝子座において正常であり、胎盤の重量も野生型のマウスと同様であった。これらの新生仔は野生型のマウスと同様に発育し、雌雄ともに妊孕生をもつ個体となった。得られる次世代の個体数や健全性に異常は認められなかった。これらことから雌の

ES/iPS 細胞から分化誘導した PGCLCs は機能的な卵子に分化する能力をもつことが証明され、体外培養における多能性幹細胞から生殖細胞の源である PGCs (PGCLCs) の分化培養系が確立されたと考えられた(論文発表(2、4、5))。

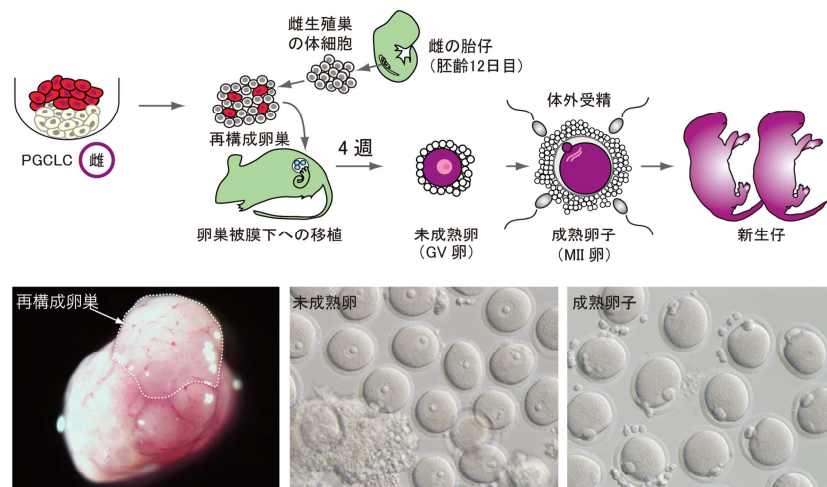


図 1 PGCLCs の移植による卵子への分化
(上段) 雌の PGCLCs は胚齢 12 日目の雌の生殖巣の体細胞と共に免疫不全マウスの卵巣嚢内に移植した。移植された体内において未成熟卵まで分化し、その後体外培養により受精可能な成熟卵子まで分化させた。これらの卵子は野生型の精子と受精させることにより個体発生能をもつ受精卵となった。(下段) 移植された再構成卵巣(左)から得られた未成熟卵子(中)と体外成熟培養後の成熟卵子(右)。スケールは(左) 500µm、(中および右) 50µm

上述した PGCLCs の分化培養系の確立は PGCs の数制的制限を排除し、PGCs の分化過程を解析する上で重要なツールとなった。実際に、この分化培養系を利用して PGCs の分化に十分な転写因子群を同定した。PGCs の発生に必須な転写因子 Blimp1、Prdm14、Tfp2c を、ドキシサイクリン誘導系を用いて PGCLCs の前駆細胞であるエピブラスト様細胞(EpiLCs)に発現させた結果、ほぼ全ての EpiLCs が PGCLCs に分化することを明らかにした(論文発表(3))。転写因子の発現により誘導された PGCLCs は精巣に移植すると精子にまで分化し、それらの精子からは健全な個体を得られた。また興味深いことに、Prdm14 のみを発現させるだけでも、3 種類の転写因子を同時に発現させた場合より分化の効率は落ちるものの、精子に分化する能力をもった PGCLCs に分化することが明らかになった。これらにより Prdm14 が PGCs の分化において中心的な役割を担っていることを明らかにした。Prdm14 は PGC 特異的遺伝子や多能性遺伝子の発現、さらには DNA メチル化酵素遺伝子の発現を制御していることが示唆されており、PGCs の初期分化を制御する転写因子とエピゲノムプログラミングの制御との接点が初めて明らかとなった。

3. 今後の展開

これらの一連の研究により確立された PGCLCs の分化誘導系を用いて、以下の研究の展

開が期待される。

- (1) 生殖細胞系列の分子メカニズムとエピゲノムを制御する遺伝子ネットワークの解明
PGCLCs の分化培養系により、通常胚あたり数百個しかないエピブラストや 50 個程度しかない分化初期の PGCs と同等の細胞を 10^6 レベルで調整することが可能となった。また培養の開始点が ES/iPS 細胞であるために、遺伝子改変が容易であり、遺伝子欠損による解析を迅速に行える。今後はこの分化培養系を用いて、PGCs の分化に必須な転写因子やエピジェネティック関連因子の機能を解析することにより、PGCs の分化メカニズムやエピゲノム制御する遺伝子ネットワークの詳細が明らかになると考えられる。
- (2) iPS 細胞を用いた不妊症の病態解明(ヒトへの応用も含む)
突然変異で配偶子欠損などの不妊症を呈する動物については、その系統を維持することが困難であり十分な解析が行われない。本分化誘導系では iPS 細胞から機能的な生殖細胞系列を分化誘導が可能のため、突然変異体から iPS 細胞を樹立することにより生殖細胞系列での詳細な解析が可能となる。このことは機能的に未知の遺伝子の同定につながると考えられる。またマウス ES/iPS 細胞から機能的な PGCLCs を分化誘導する方法はヒトへ応用できる可能性をもつ。ヒト ES/iPS 細胞から生殖細胞系列を分化させることが可能となれば、より具体的に不妊症の原因究明にも貢献できることが考えられる。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究の遂行によって、当初の目的のひとつである「生殖細胞系列の分化過程を体外培養で再構築」はほぼ達成できたと考えられる。またこの再構築の利用による PGCs の形成メカニズムの解明においてもほぼ満足のいく結果を得られたと考えている。ただし生殖細胞系列でおこる自律的リプログラミングによる iPS 細胞のエピメューテーション消去については検討にまでは至らなかった。この要因として、卵子の再構築に関して新聞等にも大きく取り上げられたために(いずれも平成 24 年 10 月 5 日付朝日新聞(1面、3面)、読売新聞(1面、2面)、毎日新聞(1面、2面)、産経新聞(1面、3面)、日本経済新聞(38面)、東京新聞(1面)、中日新聞(1面)、京都新聞(1面、3面))、そのテーマの進展に関する社会的要求が大きくなり、それに対応するために研究テーマを絞り込んだことが挙げられる。研究の実施はほぼ研究者が一人でおこなっており、多岐にわたる研究テーマの遂行は困難であった。しかし個人研究であるさきがけ研究の理念には則したものであると考えられた。また研究費執行状況に関しては、平成 26 年度に新しく研究室を主宰するために増額を申請した以外については、ほぼ予定どおりの執行になった。以上のことから研究の達成状況、研究費の執行状況、研究成果の社会的波及効果において概ね良好に研究を遂行できたと思われる。

- (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

多能生幹細胞(ES細胞/iPS細胞)から始原生殖細胞(PGCs)を分化誘導させる培養方法を構築した。この系より得られたPGC様細胞(PGCLCs)を胎仔生殖巣の体細胞とともに卵巣に移植することで受精可能な卵子に分化させ、その受精卵から健常な個体を得た。これは世界初の快挙であり、波及効果のある成果である。次に、PGCの分化機構について、PGCLCsの分化誘導系を用いて解析し、PGCの分化には転写因子Prdm14が中心的な働きをすることを明らかにした。分化培養系ができたことにより、発生初期の生化学的解析が可能になり、PGCsの分化機構の解明が進む。また、マウスでのES/iPS細胞による分化誘導系の確立はヒトへの応用の可能性が高まり、不妊症の原因解明にもつながる。本さきがけ研究の成果が認められ、国際学会の招待講演が増え、本分野のトップランナーとして注目されるようになり、研究者としての飛躍につながった。

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. 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, specifies mouse germ cell fate by directly activating germline determinants. *Dev Cell*. 2013; 27: 516–529.
2. **Hayashi K** and Saitou M. Stepwise differentiation from naïve state pluripotent stem cells to functional primordial germ cells through an epiblast-like state. *Methods Mol Biol*. 2013; 1074: 175–183.
3. Nakaki F, **Hayashi K**, Ohta H, Kurimoto K, Yabuta Y, Saitou M. Induction of the mouse germ-cell fate by transcription factors in vitro. *Nature* 2013; 501: 222–226.
4. **Hayashi K** and Saitou M. Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nature Protoc*. 2013; 8: 1513–1524.
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*. 2012; 338: 971–975.

(2)特許出願

研究期間累積件数:なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

- ・ **林 克彦**、斎藤通紀 「Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice」 第45回日本発生生物学会 2012年5月30日
- ・ **Hayashi K** 「Producing sperm and oocyte from pluripotent stem cells」 The 3rd International Congress on Controversies in Cryopreservation of Stem Cells, Reproductive Cells, Tissue & Organs (CRYO) 2013年3月21日
- ・ **林 克彦** 「iPS細胞からの生殖細胞作製-技術開発とその意義-」 上廣倫理研究部門

開設記念シンポジウム 2013年7月26日

- ・ **林 克彦** 「生殖細胞系列の体外培養による再構築」 第25回高遠・分子細胞生物学シンポジウム 2013年8月29日
- ・ **Hayashi K** 「Germ cell differentiation from stem cells in mice」 17th World Congress on IVF 2013年9月7日
- ・ **林 克彦** 「始原生殖細胞の分化を体外で再現する培養系の確立と利用」 第85回日本遺伝学会 2013年9月19日
- ・ **林 克彦** 「生殖細胞系列の再構築培養系の確立と生殖巣の役割」 第21回日本ステロイドホルモン学会 2013年11月16日
- ・ **Hayashi K** 「Prospects of gamete production from pluripotent stem cells」 The 45th meeting of the Dutch Society of Obstetrics and Gynaecology 2014年5月23日
- ・ **林 克彦** 「In vitro germline formation from pluripotent stem cells」 第47回日本発生生物学学会 2014年5月30日
- ・ **林 克彦** 「Generation of eggs from mouse embryonic stem cells」 Society of Reproduction and Fertility 2014年9月21日

プレスリリース

- ・ 朝日新聞(1面、3面)、「iPS細胞で卵子 出産」、平成24年10月5日掲載、
- ・ 読売新聞(1面、2面)、「iPS細胞から卵子 マウスで成功 子ども誕生 京大チーム」、平成24年10月5日掲載
- ・ 毎日新聞(1面、2面)、「iPS細胞:卵子作成、マウス誕生 京大が世界初、精子に続き」、平成24年10月5日掲載
- ・ 産経新聞(1面、3面)、「iPS細胞から卵子 すでに精子も「生命作製」可能に」、平成24年10月5日掲載
- ・ 日本経済新聞(38面)、「iPS卵子からマウス 京大チーム、不妊症研究へ道」、平成24年10月5日掲載
- ・ 東京新聞(1面)、「iPS細胞から卵子」、平成24年10月5日掲載
- ・ 中日新聞(1面)、「iPSから卵子」、平成24年10月5日掲載、
- ・ 京都新聞(1面、3面)、「iPS 卵子でマウス」、平成24年10月5日掲載
- ・ 日刊工業新聞(22面)、平成24年10月5日掲載
- ・ 科学新聞(22面)、平成24年10月26日掲載、
- ・ 日本経済新聞(38面)、「京大の「iPS卵子」を12年10大成果に 米科学誌」、平成24年12月21日掲載
- ・ 日経産業新聞(9面)、「米サイエンス誌 iPS細胞から卵子作製 十大成果に京都大」、平成24年12月21日掲載
- ・ 毎日新聞(4面)、「米サイエンス誌:今年の10大成果に「iPS研究」」、平成24年12月21日掲載