

2024年5月17日

ヒト iPS 細胞から前精原細胞及び卵原細胞を大量誘導

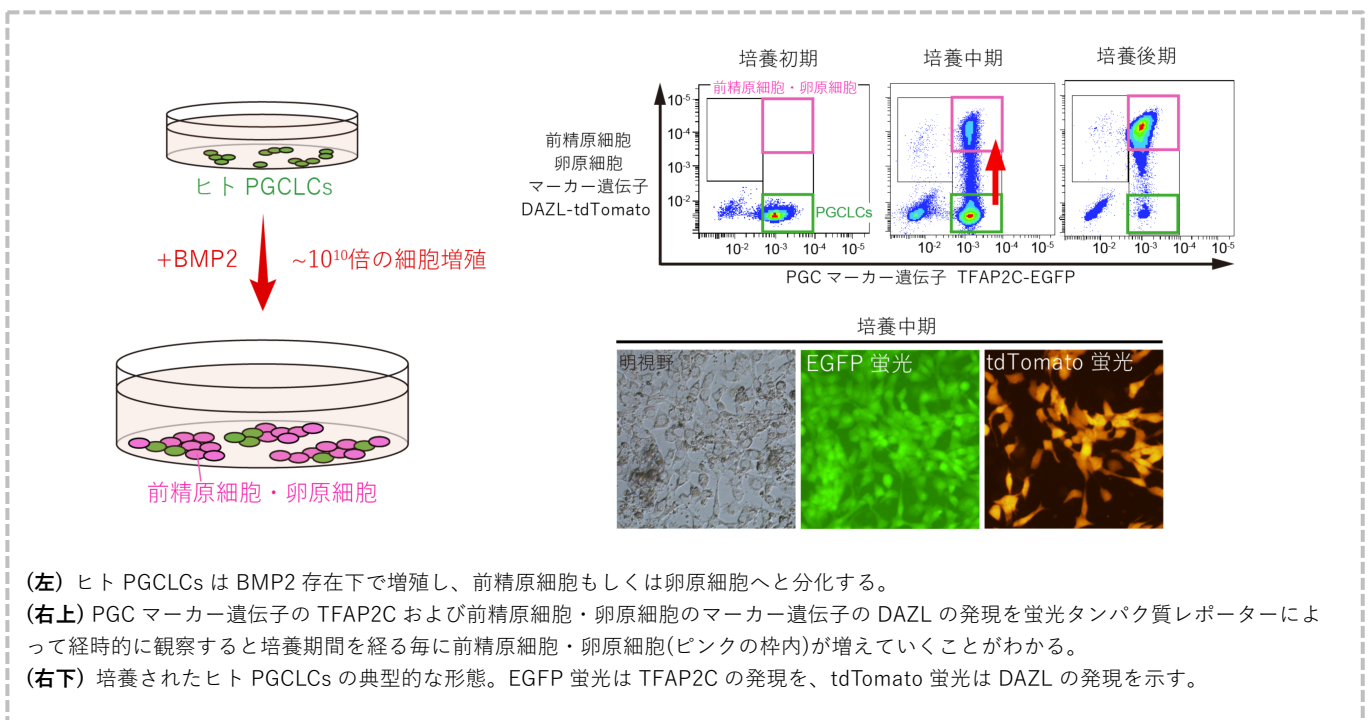
— ヒト生殖細胞試験管内造成研究のマイルストーン —

概要

京都大学高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 (WPI-ASHBi) 斎藤通紀 拠点長/主任研究者 (兼: 同大学院医学研究科教授)、同大学高等研究院 村瀬佑介 ASHBi 特定研究員、同大学大学院医学研究科 横川隆太 博士課程学生らの研究グループは、ヒト iPS 細胞から、始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells, PGCs) ^{注1} を経て、精子及び卵子のもととなる前精原細胞及び卵原細胞^{注2} を大量に分化誘導する方法論の開発に成功しました。

本研究では、同グループが開発したヒト PGC 様細胞 (PGC-like cells, PGCLCs) ^{注3} の維持培養法^{注4} をもとに、特定のシグナル分子^{注5} を用いることで、ヒト PGCLCs を前精原細胞及び卵原細胞に分化させることに成功しました。本培養では、ヒト PGCLCs は 2 ヶ月程度で前精原細胞及び卵原細胞に分化し、また、染色体数を安定に維持したまま細胞数を $\sim 10^{10}$ 倍 (~ 100 億倍) 以上に増幅出来ます。培養過程で見られる遺伝子発現やゲノム DNA メチル化レベル^{注6} の変化は生体内の過程を再現していました。同グループが以前に開発した卵原細胞誘導法である異種間再構成卵巣培養^{注7} の難点であった、分化過程の不明瞭さや細胞収量の著しい低さが克服されました。また、同グループは、本培養法を用いて、前精原細胞及び卵原細胞の分化に関するエピゲノムリプログラミング^{注8} の分子機構を解明しました。本研究成果は、ヒト生殖細胞の発生機構を解明し、ヒト生殖細胞試験管内造成研究を推進する重要なマイルストーンであり、不妊症等の疾患機序解明および治療戦略開発への応用が期待できます。

本成果は、2024年5月20日 (英国時間) に国際学術「*Nature*」に Accelerated Article Preview 版で掲載されます。



<研究の背景>

生殖細胞は遺伝情報の伝達を担う唯一の細胞です。一代限りで役割を終える体細胞とは対照的に、生殖細胞に起きた変異は次世代に継承され生物の進化の原動力になるとともに、その異常は不妊や遺伝性疾患の原因となります。こうした生物学的・医学的重要性にも関わらず、倫理的・技術的な制約、適切な研究方法の欠如から、ヒト生殖細胞の発生機構は多くの点が不明なままです。

ヒト胚において、PGCs は受精後 2 週に形成され、それらは受精後 6–10 週に精巣及び卵巣内で前精原細胞及び卵原細胞に分化します。その後、前精原細胞は精原細胞を経て精子に、卵原細胞は卵母細胞を経て卵子に分化します。我々は、これまでの研究で、ヒト iPS 細胞から PGCLCs を誘導する方法 (*Cell Stem Cell*, 2015)、異種間再構成卵巣法を用いることでヒト PGCLCs を卵原細胞に分化させる方法 (*Science*, 2018) を報告してきました。しかしながら、異種間再構成卵巣法では、卵原細胞の分化過程が不明瞭で得られる卵原細胞の数が著しく少ない、分化がマウス胎児卵巣体細胞に依存する等、多くの改善を要する点がありました。

<研究手法・成果>

本研究では、我々が開発したヒト PGCLCs の維持培養法 (*EMBO J.*, 2020) を出発点として、シグナル分子を含む種々の添加物を検討することで、異種間再構成卵巣法で見られる細胞生存率の低さ、マウス胎児卵巣体細胞への依存を克服し、前精原細胞及び卵原細胞を効率良く分化させる方法論の確立を目指しました。様々なシグナル分子やシグナル伝達経路を制御する化合物のヒト PGCLCs に対する影響を評価したところ、骨形成因子(Bone Morphogenic Protein, BMP)ファミリーの BMP2/4/7 が前精原細胞及び卵原細胞の分化に特徴的な遺伝子発現を誘導することを見出しました。BMP を用いる培養法を検討した結果、ヒト PGCLCs を 2 ヶ月程で前精原細胞及び卵原細胞に分化させ、また、染色体数を安定に維持したまま、4 ヶ月程で細胞数を $\sim 10^{10}$ 倍 (~ 100 億倍) に増幅させることに成功しました。BMP シグナルに引き起こされる遺伝子発現変化を網羅的に評価したところ、ヒト PGCLCs は、生体での分化との類似した過程を経て、前精原細胞及び卵原細胞様の状態へと分化することが確認されました。さらに、全ゲノム DNA メチル化解析から、BMP シグナルによるヒト PGCLCs の前精原細胞及び卵原細胞への分化は、ゲノムワイドな DNA 脱メチル化を伴っていることが明らかとなり、生体内の PGCs の分化過程で見られるエピゲノムリプログラミングが試験管内で再現されていることが明らかとなりました (本論文のタイトルはこの生物学的に重要なエピゲノムリプログラミングを使用しました)。また、本培養法を用いて、エピゲノムリプログラミングの分子機構の重要な一端を解明しました。

<展望>

本培養法を用いることで、膨大な量のヒト前精原細胞及び卵原細胞を作成することが出来ます。多くの細胞を必要とするメタボローム解析、プロテオーム解析やエピゲノムリプログラミングの詳細なメカニズム解析など、ヒト生殖細胞ではこれまで不可能であった未踏の研究を推進できる可能性が拓けました。また、本培養法の確立によって、ヒト前精原細胞及び卵原細胞を得ることが比較的容易になり、それらから (生物学的に明確な条件下を含め) ヒト精原細胞や卵母細胞を誘導する研究が飛躍的に進むと期待されます。一方、培養にはまだ改良の余地があります。より生物学的に明確な条件下で前精原細胞及び卵原細胞の分化を誘導する培養法の確立は非常に重要な研究となります。

<研究プロジェクトについて>

本研究は、以下の支援を受けて実施されました。

- JSPS 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
- JSPS 特別推進研究「試験管内再構成系に基づくヒト卵母細胞発生機構の解明とその応用」
研究代表者：斎藤 通紀
- この他、ヒューマン・フロンティア・サイエンス・プログラム、Open Philanthropy Project の助成を受けて行われました。

<研究者のコメント>

大学院生時代から足かけ8年続けてきたヒト PGCLCs の培養法開発が目指していたところまで来ました。コロナ禍にめげず、研究を続けられたのはラボメンバーや家族の協力があったからこそでした。改めて感謝申し上げます。（村瀬佑介）

生殖細胞は世代を超えて継承される不滅の存在であり、その神秘性に魅了され研究を開始しました。この研究は、生命の根源を探求するものであり、科学のおよび哲学的にも非常に魅力的です。我々が開発した技術は、生殖医療の未来を大きく変革する可能性を秘めています。この成果を基に、さらなる研究を推進し、安全で効果的な治療法の開発に貢献できることを願っています。（横川隆太）

<論文書誌情報>

Murase, Y., Yokogawa, R., Yabuta, Y., Nagano, M., Katou, Y., Mizuyama, M., Kitamura, A., Puangsricharoen, P., Yamashiro, C., Hu, B., Mizuta, K., Ogata, K., Ishihama, Y., & Saitou, M. (2024). *In Vitro* Reconstitution of Epigenetic Reprogramming in the Human Germ Line. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07526-6>.

<用語解説>

1. 始原生殖細胞(Primordial Germ Cells, PGCs)：ヒト胚では受精後2週目に形成される、最も未分化な生殖細胞。
2. 前精原細胞及び卵原細胞：始原生殖細胞は、胎児精巣あるいは卵巣に移入し、前精原細胞もしくは卵原細胞に分化します。この分化は、エピゲノムリプログラミング（注8参照）とよばれる重要な現象を伴います。前精原細胞は精原細胞を経て精子に、卵原細胞は卵母細胞を経て卵子に分化します。
3. PGC様細胞(PGC-like cells, PGCLCs)：iPS細胞やES細胞などの多能性幹細胞を起点として、成長因子や小分子化合物を用いて培養ディッシュ上で誘導することができるPGCsによく似た性質を持つ細胞のこと（*Cell Stem Cell*, 2015）。
4. PGCLCsの維持培養法：ヒトPGCLCsを、分化を誘導せずPGCLCsとして長期間維持・増殖させる培養法（*EMBO J*, 2020）。
5. シグナル分子：細胞外に分泌され、細胞の増殖や分化を促進するタンパク質群のこと。
6. 異種間再構成卵巣培養：ヒトPGCLCsとマウス胎児卵巣体細胞を凝集させ、試験管内で卵巣の環境を模倣することで卵原細胞への分化を促す培養法（*Science*, 2018）。
7. DNAメチル化：DNAの化学修飾の一種です。遺伝子近傍の遺伝子発現調節領域におけるDNAメチル

化は遺伝子発現を負に制御すると考えられています。

8. エピゲノムリプログラミング: エピゲノムとは、ゲノムの塩基配列に含まれない、遺伝子の制御に関する化学修飾の総体のことです。代表的なものとして DNA メチル化やヒストンの翻訳修飾が挙げられます。始原生殖細胞の発生過程では、エピゲノムリプログラミングと呼ばれる、ゲノム全域の DNA 脱メチル化やヒストン修飾の大規模な再編成が起こり、その結果、前精原細胞もしくは卵原細胞へと分化します。エピゲノムリプログラミングは、親世代のエピゲノム情報を消去し、その後、精子や卵子の分化過程で次の世代のエピゲノム情報が付与される基盤を形成します。

<参考文献情報>

Sasaki, K., Yokobayashi, S., Nakamura, T., Okamoto, I., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Ohta, H., Moritoki, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakamura, S., Sekiguchi, K., Sakuma, T., Yamamoto, T., Mori, T., Woltjen, K., Nakagawa, M., Yamamoto, T., Takahashi, K., Yamanaka, S., and Saitou, M. (2015). Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, 17, 178-194.

プレスリリース > https://www.kyoto-u.ac.jp/sites/default/files/embed/jaresearchresearch_results2015documents150717_101.pdf

Yamashiro, C., Sasaki, K., Yabuta, Y., Kojima, Y., Nakamura, T., Okamoto, I., Yokobayashi, S., Murase, Y., Ishikura, Y., Shirane, K., Sasaki, H., Yamamoto, T., and Saitou, M. (2018). Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro, *Science*, 362, 356-360.

プレスリリース > https://www.kyoto-u.ac.jp/sites/default/files/embed/jaresearchresearch_results2018documents180921_101.pdf

Murase, Y., Yabuta, Y., Ohta, H., Yamashiro, C., Nakamura, T., Yamamoto, T., and Saitou, M. (2020). Long-term expansion with germline potential of human primordial germ cell-like cells in vitro, *The EMBO Journal*, 39: e104929.

プレスリリース > https://ashbi.kyoto-u.ac.jp/ja/news/20200920_research-result_murase-saitou/