

霊長類の多能性幹細胞から卵母細胞の誘導に成功

概要

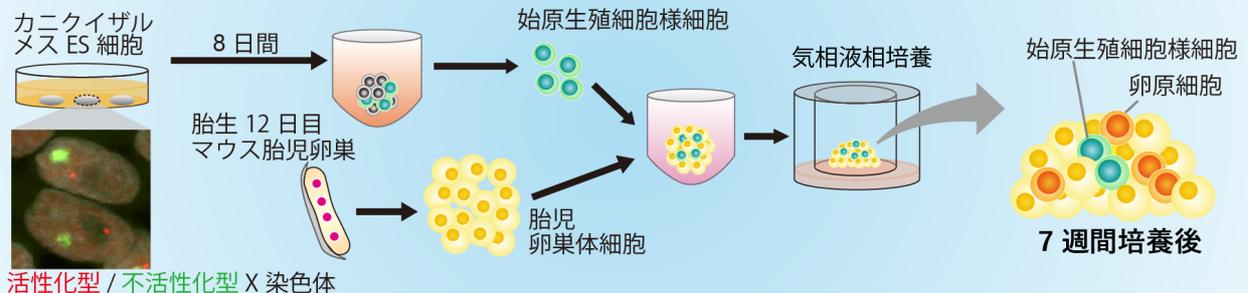
京都大学高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 (WPI-ASHBi) 斎藤通紀 拠点長/主任研究者/教授 (兼: 同大学院医学研究科教授) と茂谷小百合 同特定研究者らの研究グループは、霊長類であるカニクイザル^{注1}の多能性幹細胞^{注2} (ES 細胞) から減数分裂期の卵母細胞を試験管内で誘導することに成功しました。

ヒトの生殖細胞の発生機序を解明するために、試験管内で多能性幹細胞を生殖細胞 (卵子または精子) へ分化させる培養系樹立を目指した研究が世界中で進められています。本研究グループでは、試験管内でヒト多能性幹細胞 (iPS 細胞) から卵原細胞^{注3} を誘導する培養系を報告しています^{注4} が、効率よく減数分裂期^{注5} の卵母細胞^{注6} へ分化を進める培養系の確立には至っていませんでした。

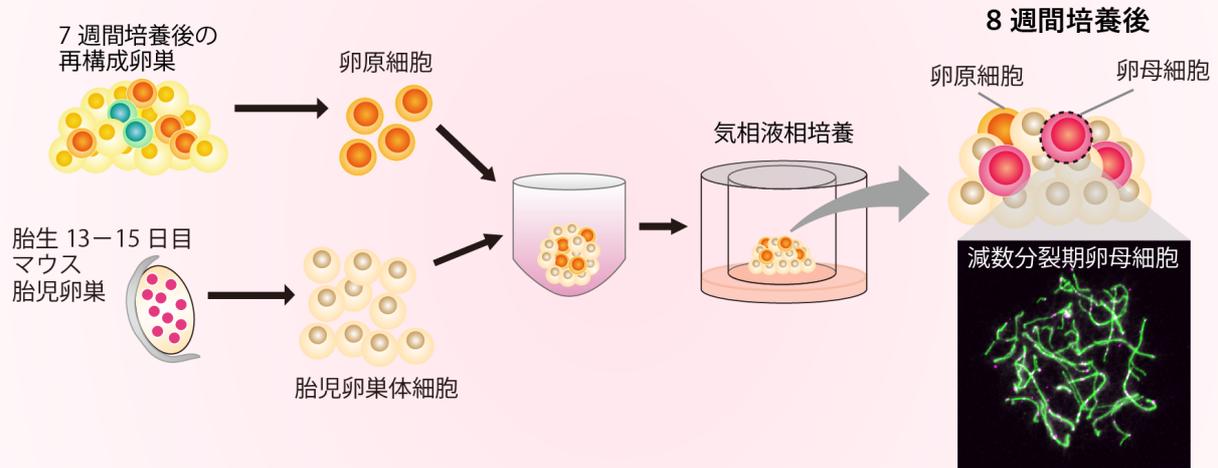
この度、本研究ではヒトのモデルとしてカニクイザル ES 細胞より卵母細胞を誘導することに成功しました。カニクイザル ES 細胞由来の始原生殖細胞様細胞^{注7} をマウス胎児の卵巣体細胞と凝集させたのち気相液相界面培養^{注8} し、そこから得られる卵原細胞を新たにマウス胎児の卵巣体細胞と再び凝集させ、気相液相界面培養したところ、約 4 か月で減数分裂期の卵母細胞が誘導されることがわかりました。また、種々の解析により、当培養方法で得られた卵母細胞はサル胎児卵巣の卵母細胞と類似していることを示しました。この研究成果により、霊長類の雌性生殖細胞発生の分子機構の解明や、不妊症等の疾患機序の解明および治療戦略開発への応用が期待できます。

本成果は、2023 年 3 月 16 日に国際学術誌「The EMBO Journal」にオンライン速報版で掲載されました。

カニクイザル ES 細胞から卵原細胞の誘導



カニクイザル卵原細胞から卵母細胞の誘導



1. 背景

生殖細胞は、すべての遺伝情報を次世代に伝えることのできる唯一の細胞種です。しかしながら、生殖細胞の発生異常は、不妊や遺伝性疾患発症の原因となると言われています。ヒトの生殖細胞の発生機序を解明するために、試験管内で多能性幹細胞を生殖細胞（卵子または精子）へ分化させる培養系樹立を目指した研究が世界中で進められています。

これまで本研究グループでは、ヒト iPS 細胞を起点とした始原生殖細胞様細胞を誘導し、卵原細胞へと分化させることに成功してきました。しかし、現行の培養法では次の分化段階にあたる卵母細胞の分化誘導効率が低く、減数分裂期の進行が見られませんでした。この原因の一つとして、ヒト iPS 細胞がもつ X 染色体^{注9}の特性が生殖細胞分化に影響している可能性が考えられるため、多能性幹細胞を見直し、卵母細胞の分化誘導法を確立することを目指しました。

2. 研究手法・成果

本研究では、ヒトのモデル動物である霊長類のカニクイザルの ES 細胞を起点とした卵母細胞分化誘導系の開発を目標としました。複数の雌カニクイザル ES 細胞株を検討した結果、すべての細胞株で2本の染色体のうち一方が活性化、もう一方が不活性化した状態を維持しており、正常に等しい X 染色体の特性を持っていることがわかりました。このことから、カニクイザル ES 細胞は卵母細胞分化誘導系に適しているとし、検討した細胞株のうちの一つを使って、試験管内における卵母細胞分化誘導系の樹立に着手しました。

まずは、ヒト卵原細胞誘導法に倣って、始原生殖細胞様細胞と胎生 12 日目の雌マウス胎児卵巣から単離した体細胞を凝集し（再構成卵巣）、気相液相境界面培養しました。しかし、ヒトと同様、卵原細胞は効率よく誘導されるものの、減数分裂期へ移行した卵母細胞は得られませんでした。培養条件検討を重ねた結果、卵原細胞を胎生 13 日目～15 日目の雌マウス胎児卵巣由来の体細胞と再凝集し、再び気相液相境界面培養することで、4 週間後には減数分裂直前の卵母細胞が、そして 8 週間後には減数分裂期（合糸期^{注10}まで）の卵母細胞を誘導することに成功しました。また、この培養系（以下、サル再構成卵巣法）では、高い卵母細胞誘導効率を実現することができました。

さらに、サル再構成卵巣法より得た卵母細胞の単一細胞遺伝子発現解析^{注11}を実施したところ、カニクイザル胎児卵巣の減数分裂期卵母細胞と類似していることが確認できました。全ゲノム DNA メチル化解析^{注12}においては、サル再構成卵巣の卵母細胞でゲノム全体の DNA 脱メチル化^{注13}が進行しており、霊長類モデル生物の生殖細胞でもマウスやヒトの卵母細胞と類似した経過を辿ることを世界で初めて示しました。驚くべきことに、X 染色体の場合、活性化状態によって DNA 脱メチル化の程度が異なり、ヒト再構成卵巣においても同様の傾向が見られることがわかりました。この他にも、本研究では、胎児およびサル再構成卵巣由来卵母細胞の詳細な比較、分化誘導効率に影響を及ぼす可能性のある遺伝子の探索についても報告しています。

3. 波及効果、今後の予定

本研究によって、霊長類モデル生物の多能性幹細胞から減数分裂期の卵母細胞を試験管内で誘導する培養法の確立に成功しました。本成果により、霊長類卵母細胞分化を制御する分子機構の解明が期待できます。また、不妊症等の発症機序の解明や治療戦略の開発を目的とした、サル再構成卵巣法の応用も今後の研究課題として興味深いものです。

4. 研究プロジェクトについて

- JSPS 若手研究「カニクイザル ES 細胞を用いた減数分裂期卵母細胞の試験管内誘導」
研究代表者：茂谷 小百合（京都大学高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 特定研究員）
- JSPS 若手研究「カニクイザル ES 細胞を用いた成熟卵子の試験管内誘導」
研究代表者：茂谷 小百合（京都大学高等研究院 ヒト生物学高等研究拠点 特定研究員）
- 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
- その他、AMED 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。

<用語解説>

注1 カニクイザル：サル目オナガザル科のサルで、学名は *Macaca fascicularis*。脳機能や寿命、妊娠・出産形式がヒトに類似していることから、ヒトのモデル生物として用いられる。

注2 多能性幹細胞：ほぼ無限に増殖する自己増殖能と、個体を構成するあらゆる細胞に分化する多分化能を併せ持つ細胞のこと。多能性幹細胞には、胚性幹細胞（Embryonic stem cells: ES 細胞）や人工多能性幹細胞（induced Pluripotent stem cells: iPS 細胞）がある。

注3 卵原細胞：胎児期のごく初期に見られる雌性生殖細胞のこと。減数分裂はまだ開始していない。

注4 詳しくはこちらをご参照ください。

京都大学ホームページ・最新の研究を知る「ヒト iPS 細胞からの卵原細胞の作出に成功しました」

<https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2018-09-28>

注5 減数分裂期：生殖細胞で特異的にみられる細胞分裂様式のこと。分裂するごとに染色体数が半減する。

注6 卵母細胞：卵原細胞から分化し、減数分裂期へ移行した雌性生殖細胞のこと。減数分裂が完了すると卵子となる。

注7 始原生殖細胞様細胞：始原生殖細胞は、生殖細胞の起源にあたる細胞。雌雄どちらの細胞にも分化することが可能で、男性では前精原細胞に、女性では卵母細胞になる。始原生殖細胞様細胞は、試験管内で多能性幹細胞から誘導された、始原生殖細胞に非常に似た細胞のこと。

注8 気相液相境界面培養：マウスの卵胞誘導に用いる培養方法のこと。コラーゲンでコーティングしたフッ素樹脂の膜上で細胞塊を培養する。気相から酸素が、液相から栄養が供給される。

幹細胞から誘導された、始原生殖細胞に非常に似た細胞のこと。

注9 X 染色体：有性生殖する真核生物に見られる性染色体の一種。女性の細胞は X 染色体を 2 本持ち、片方は活性化状態、もう一方は不活性化状態を維持している。

注10 合糸期：減数分裂第一分裂前期の過程（細糸期、合糸期、厚糸期、複糸期）のうちの一つで、両親からきた 1 本ずつの相同染色体が互いに接近し、相同の部分で対合が始まる時期のこと。

注11 単一細胞遺伝子発現解析：1 細胞から得られる転写産物を用いて、次世代シーケンサーにより網羅的な遺伝子発現パターンを解析する手法のこと。個々の細胞の遺伝子発現パターンを基に、類似の性質を持つ細胞集団を特定できる。また、細胞集団間で遺伝子発現レベルを比較することで、その集団特異的な遺伝子を特定することが可能である。

注 12 全ゲノム DNA メチル化解析：DNA メチル化は、DNA 配列の変化を伴わずに、主にシトシンをメチル化する修飾のこと。メチル化することによって、遺伝子発現を抑制する。全ゲノム DNA メチル化解析では、次世代シーケンサーを用いてメチル化されている部位を網羅的に解析する。

注 13 DNA 脱メチル化：DNA からメチル化修飾が除去される現象のこと。ヒトやマウスの生殖細胞においては、始原生殖細胞から卵原細胞、卵母細胞へ分化するにしたがってゲノム全体で DNA 脱メチル化が進行することが報告されている。

<研究者のコメント>

本研究の培養法では減数分裂期の卵母細胞を得るために約 4 か月を要します。培養中ちょっとしたことがきっかけで細胞が死滅し、実験がやり直しになってしまいます。心が折れそうになることが多々ありましたが、減数分裂へ移行した細胞を確認できたとき、それまでの苦勞が吹き飛びました。研究の厳しさと楽しさを改めて感じることができました。(京都大学高等研究院 ASHBi 特定研究員 茂谷小百合)

<論文タイトルと著者>

タイトル：Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys

(カニクイザル ES 細胞を用いた減数分裂期卵母細胞の誘導)

著者：茂谷（形部）小百合、薮田幸宏、水田賢、加藤嘉崇、岡本郁弘、川崎正憲、北村彩佳、築山智之、岩谷千鶴、土屋英明、辻村太郎、山本拓也、中村友紀、斎藤通紀

掲載誌：The EMBO Journal DOI：doi.org/10.15252/emboj.2022112962