

研究報告書

「細胞周期操作による新規卵原幹細胞の樹立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 李 知英

1. 研究のねらい

一生に渡って新たな精子が作られる精巣と違って、卵巣では一回作られた卵子は排卵によって消費されるのみならず、成体が年を取るにつれて卵子は退化し、高齢出産による突然変異率の増加などの危険性も存在する。したがって、生殖幹細胞の不妊治療材料としての有用性から着目して、本研究ではマウスの胎児期の雌性生殖巣と生後マウスの卵巣から、卵原幹細胞の増殖能力を高めるため細胞周期を操作する新たな方法を用いて卵原幹細胞の樹立を行う。さらに試験管内で卵原幹細胞から卵子様細胞を分化誘導し、最終的にはこれらの卵子様細胞から IVF による子孫作製を可能にすることを目指す。これらの研究が成功すれば、卵子形成に関するメカニズムを分子レベルで解明することが出来るとともに、試験管内で卵原幹細胞と卵子様細胞が培養出来ることで、不妊治療や再生医療にその技術が応用出来ると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

新規卵原幹細胞の長期培養と樹立のために、雌性生殖細胞の生物学的性質究明、新規卵原幹細胞の長期培養と樹立の試みおよび卵子形成の試験管内再構築のテーマについて研究を行ない以下のような成果が得られた。胎児期雌の生殖細胞と生後卵巣の生殖細胞において CD9 と CD49f が発現することが明らかとなり、胎児期 13 日目以降の生殖細胞にも細胞周期の G1 と S 期の細胞が存在することを見出した。また、MVH-Venus Tg マウスを用いて新生児卵巣から MVH 陽性細胞の培養を行ない、これらの細胞は試験管内で feeder 細胞なしの条件で非対称分裂することが明らかとなり、新生児卵巣細胞の培養や器官培養により新生児の未分化卵細胞を試験管内で分化させることに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「雌性生殖細胞の生物学的性質究明」

本研究の目標である新規卵原幹細胞の長期培養と樹立のために、胎児期の雌性生殖巣、新生児の卵巣、成体の卵巣やその中の細胞等を詳細に解析することは大変重要である。このため、卵原幹細胞の試験管内増殖のため卵子形成過程での細胞周期の変化パターン、または卵巣内細胞外環境関連遺伝子を見出すため胎児期 13 日から 17 日雌性生殖巣と卵巣を用いてマイクロアレイ解析を行なった。その結果、細胞周期関連遺伝子の Gadd45a と p27 の高発現が成体マウスの卵巣で見られることを確認した。p27 の核内局在で細胞周期が arrest され、p27 の核外移動で細胞周期が進行することから考えると、上記の結果は胎児期生殖巣や新生児卵巣で Gadd45a と p27 の低発現が生殖細胞の増殖に重要であることを示唆する。

次に、組織学的解析により胎児期雌性生殖巣と生後卵巣において幹細胞マーカーまたは生殖細胞マーカーの発現を確認した所、細胞表面抗原の CD9 が生殖細胞マーカーである MVH(Mouse Vasa homolog)と共発現することが分かった。興味深いことに生後6日目卵巣で見られている CD9 と MVH 陽性細胞は単独で顆粒膜細胞に囲まれているのに対して、生後1日目卵巣の CD9 と MVH 陽性細胞はまだ同一細胞の cluster として存在していたので、この時期の生殖細胞は幹細胞として培養できる(自己複製能を持つ)候補の一つと考えた。最終的に、細胞表面抗原パターンから、野生型マウス胎児期雌性生殖巣から細胞表面抗原の CD9 high/CD49f intermediate の細胞集団が MVH 陽性の生殖細胞であることが明らかとなった。また、胎児期 13-18 (12.5-17.5)日雌性生殖巣の CD9 high/CD49f intermediate 細胞集団を用いて細胞周期の DNA 合成期(S phase)の DNA に取り込む BrdU の取り込み実験を行ない生殖細胞の細胞周期パターンを詳細に調べることができた。その結果、胎児期 15(14.5)日までは生殖細胞の 20%以上が S phase の細胞であることが明らかとなり、G2 arrest 細胞が増加する後期胎児期 17, 18 (16.5, 17.5)日にも数%の S phase の細胞が存在することが明らかとなった。この結果は胎児期後期にも増殖能を持つ生殖細胞が存在することを示唆する。

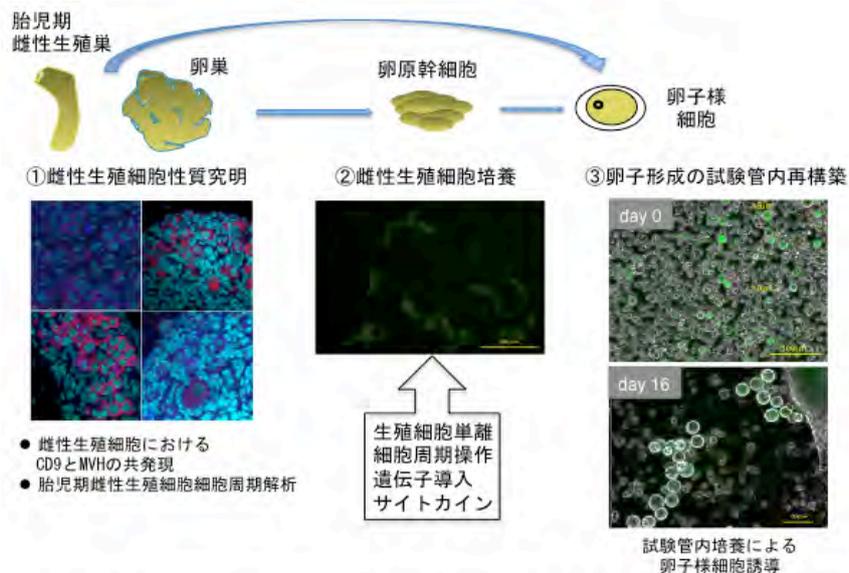


図1. 新規卵原幹細胞の樹立と卵子形成の試験管内再構築の概略図

研究テーマ B「新規卵原幹細胞の長期培養と樹立の試み」

卵原幹細胞の樹立法開発のために、最初に、研究テーマ A の結果から Gadd45a と p27 の高発現が成体マウスの卵巣で見られたため、p27 の核外移動を引き起こして細胞周期進行に役割を果たす Ras と CyclinD2/E を卵巣細胞へ遺伝子導入し、生殖細胞の増殖を試みた。その結果、遺伝子導入初期では分裂するコロニーが観察されたが、これらの細胞は長く培養できなかった。

次に、自己複製分裂する生殖細胞を単離するために、マウス卵巣の細胞を CD9 と MVH 抗体で反応したあと、ソーティングを行ない、CD9-intermediate/MVH 陽性集団を用いて培養を行った結果、これらの細胞集団は試験管内で凡そ2ヶ月間培養できた。これらの細胞は2ヶ月以上培養したあとでも CD9 と MVH を発現したが、長期培養までは至らなかった。CD9 と MVH

陽性の細胞が *in vivo* で growing oocyte へ分化できるのかを確認するために、これらの細胞を不妊マウス卵巣へ移植した。細胞が移植された卵巣が control より若干大きくなったのが移植1ヶ月後に観察され、免疫染色より MVH 陽性細胞が cluster を形成しているのが検出されたが成熟な卵は観察されてない。

最後に、MVH-Venus Tg マウスを用いて新生児卵巣から MVH 陽性細胞の培養を行なっている。これらの細胞は試験管内で feeder 細胞なしの条件で非対称分裂することが明らかとなった。また、培地にあるケモカインを添加することで生殖細胞の運動性が増加して細胞分裂が引き起こされる現象が確認された。細胞分裂する PGC は運動性を持っていることから、1)胎児期の PGC で上記のケモカイン受容体が高発現し、生後の卵巣では発現が低下して細胞分裂が rare event になる、2)ケモカイン受容体は同様な発現を示すが生後卵巣では integrin-fibronectin adhesion が増加して生殖細胞は運動性を失い、顆粒膜細胞などに囲まれ分化(成熟)の過程へ入ることが考えられる。Stella-EYFP マウスを用いて新生児卵巣から Stella 陽性細胞を単離して上記の MVH 陽性細胞と同様な実験を行なった結果、Stella 陽性細胞も MVH 陽性細胞と同様に試験管内で feeder 細胞なしの条件で非対称分裂するのが確認された。長期に至る培養を可能にするための条件の最適化を今後とも継続して行う必要がある。

研究テーマ C「卵子形成の試験管内再構築」

MVH 陽性細胞の単離なしで雌性生殖幹細胞を増やす条件を見出すために、色々な培養条件を検討した結果、新生児卵巣細胞を培養すると大きくて丸い卵子様細胞が出現することが分かった。同一培養条件で野生型マウス(ICR)の新生児卵巣細胞を15日と22日間培養して大きくて丸い細胞を免疫染色するとこれらの細胞は MVH(生殖細胞マーカー)と ZP3(透明帯マーカー)を発現していたので卵子様細胞であると考えられた。この結果は新生児卵巣の未分化生殖細胞が試験管内で成熟・分化できたことを示唆する。

雌性生殖細胞系列において、哺乳類の発生に必須なゲノムインプリンティングの成立は卵の成熟過程で起こるため、試験管内で成熟された卵子のインプリンティング状態は大変重要である。本研究で、新規の新生児卵巣器官培養法から試験管内で成熟された卵子には PGC と未成熟卵には消去されていたインプリンティングが再び入っているのが確認された。これはこの器官培養系が卵の成熟に充分であることを示唆する。幹細胞の樹立後の培養にこの器官培養系を用いることで、*in vivo* の卵巣への移植なしで、試験管内で卵の成熟まで至ることが可能になると考えられる。

3. 今後の展開

試験管内卵子様細胞の分化誘導または卵巣器官培養に関しては有用な成果が得られた。しかし卵原幹細胞の樹立に関しては、MVH または Stella 陽性細胞は両方とも試験管内で feeder 細胞なしの条件で分裂するのが確認されたが、これらは長期間に渡る自己複製能は獲得できていないため、今後、長期培養のため持続した研究が必要である。雌性生殖細胞に自己複製能が獲得される機構が明らかとなれば将来的に医療への応用なども期待できる。

ICR マウス新生児卵巣細胞の培養で MVH と ZP3 が発現するある程度成熟・分化した卵細胞ができたことから、この細胞で IVF または ICSI ができるように GVBD を引き起こす刺激(FSH,

PKA inhibitor などの添加を試みるなど、試験管内で誘導された卵子の受精能力獲得を測る研究を発展的に継続したい。さらにこれらの卵子の評価系としてインプリンティング領域と非インプリンティング領域のメチル化状態と遺伝子発現の網羅的(ゲノムワイド)解析を用いる。次世代シケンサーを用いて、微量サンプルからの RNA seq (遺伝子発現定量)やDNAメチル化解析(MeDIP, bisulfite sequencing)ができると、試験管内卵子の性質評価による上質の卵子誘導方法が見出されると期待される。

4. 自己評価

新規の卵原幹細胞を樹立するのが本研究の目的であり、試験管内で卵巣からの生殖細胞を培養し、分裂することを確認したが、長期培養という目的の完全な達成には至っていない。しかし、技術中心の研究の進め方に偏っていた私に、もっと生物学的意義について考えるようにと助言を頂いたおかげで、本研究を通じて、異論の多い雌の生殖幹細胞の存在に関して新たな知見が見出されつつある。これらの成果をもとにこれからも本研究を発展的に継続したい。また、卵原細胞の試験管内分化を可能にする代替の方法を確立したのは一つの成果といえる。特に器官培養から得られた卵子にインプリンティング遺伝子領域にDNAメチル化が入っていたことは大変望ましく、これらの系と卵原幹細胞を組み合わせることで完全に試験管内で端形成の再構築ができることが期待される。

5. 研究総括の見解

生後すぐに増殖を停止し、そのまま活性化されるまで停止期を維持する卵子を試験管内で増殖させようとする、ある意味では大挑戦的、ある意味では独断的な計画である。残念ながら、期待通りに卵子を試験管内で増殖させるところまでには至らなかった。これは外側から見ると当然の事とも言える。しかし、この挑戦を通して本人は卵子の増殖と成熟という、あまりよく分かっていないが重要な研究分野へもう少し地道なアプローチをするための準備ができたのではないかと期待している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Morimoto H, Lee J, Tanaka T, Ishii K, Toyokuni S, Kanatsu-Shinohara M and Shinohara T. In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection. *Biol. Reprod.* 2012, 86, 1-11.
2. Lee J § and Shinohara T. Epigenetic modifications and self-renewal regulation of mouse germline stem cells. *Cell Research* 2011, 21, 1164-1171. (§ corresponding)

(2) 特許出願

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)

1. Lee J et al. Alternative culturing method of in vitro oogenesis from postnatal mouse ovary.,

EMBO | EMBL Symposium: Germline – Immortality through Totipotenc, ドイツ、2012年10月13日-16日

2. Lee J: Establishment of germline stem cells and reconstruction of oogenesis in vitro., 東京医科歯科大学 第88回GCOE総合プレゼンテーション、東京、2011年11月7日
3. 李 知英: 生殖幹細胞の樹立と利用について: 第12回REG (Reproduction technology, Embryo manipulation and Gene recombination) 部会、教育講演、順天堂大学医学部、東京、2010年11月13日