

## 95. 再構成卵胞による卵子産生系の構築

林 克彦

九州大学 大学院医学研究院 ヒトゲノム幹細胞医学分野

Key words : 卵母細胞, 卵子, 多能性幹細胞, 始原生殖細胞

### 緒 言

卵母細胞系列は、遺伝情報のみならず、母性因子などの全能性の獲得や発生の進行に不可欠な要素を持つ。卵母細胞の形成機構の解明は生命の本質に迫る重要な課題であるが、数的な制限やその分化過程が胎児期から進行することから解析には困難を伴う。このような状況から、多能性幹細胞を用いて卵母細胞の分化過程を体外で再現する培養系の構築が試みられてきた<sup>1-4)</sup>。我々は以前 ES/iPS 細胞から誘導した始原生殖様細胞 (PGCLCs) を成体の卵巣に移植することにより卵母細胞を誘導した。しかしこの方法では、移植を介するために卵母細胞形成過程の大部分が観察できない欠点があった。本研究では ES/iPS 細胞を用いて卵母細胞の分化過程のすべてを培養下で再現することを目的とした。

### 方 法

雌の ES 細胞または iPS 細胞は Blimp1-Venus, Stella-ECFP レポーター雄マウスの交配から得られ胚盤胞または胎児/成体の体細胞から樹立した。既法に従い ES/iPS 細胞から分化誘導した PGCLCs を胎仔期卵巣体細胞と混合させることで、再構成卵巣を作製した。再構成卵巣を *in vitro* differentiation (IVDi) 培地、*in vitro* growth (IVG) 培地、さらに *in vitro* maturation (IVM) で培養し卵母細胞の分化誘導を試みた。また、これらの培養で得られた卵母細胞系列の遺伝子発現を RNA-seq により解析した。またインプリント遺伝子領域のメチル化の状態も解析した。さらに個体形成能の評価として、野生型精子との体外受精 (IVF) を行った後に仮親に移植した。

### 結 果

#### 1. ES/iPS 細胞から卵子への分化誘導

ES/iPS 細胞由来の PGCLCs と体細胞から作製した再構成卵巣を IVDi 培地培養すると、約 21 日目に二次卵胞様の構造が観察された。これらの二次卵胞様構造を、IVG 培地で 11 日間培養したところ十分に成長した GV 卵が得られ、これらを IVM 培地で培養すると MII 卵が得られた (図 1A、B)。

#### 2. 体外卵子産生系の遺伝子発現による評価

RNA-seq による遺伝子発現解析の結果、ES 由来の各卵母細胞系列の遺伝子発現は生体由来のものと極めて高い相関 ( $r=0.98$  以上) を示した (図 1C)。しかしながら MII 卵において、両者の間に 4 倍以上の発現量の差が見られる遺伝子が約 400 あった。これらの遺伝子はミトコンドリアに関連する遺伝子が多く含まれていた。ES 細胞由来 MII 卵と、それを受精して得られた個体のインプリンティング遺伝子領域のメチル化状態は野生型と比較して差は見られなかった。

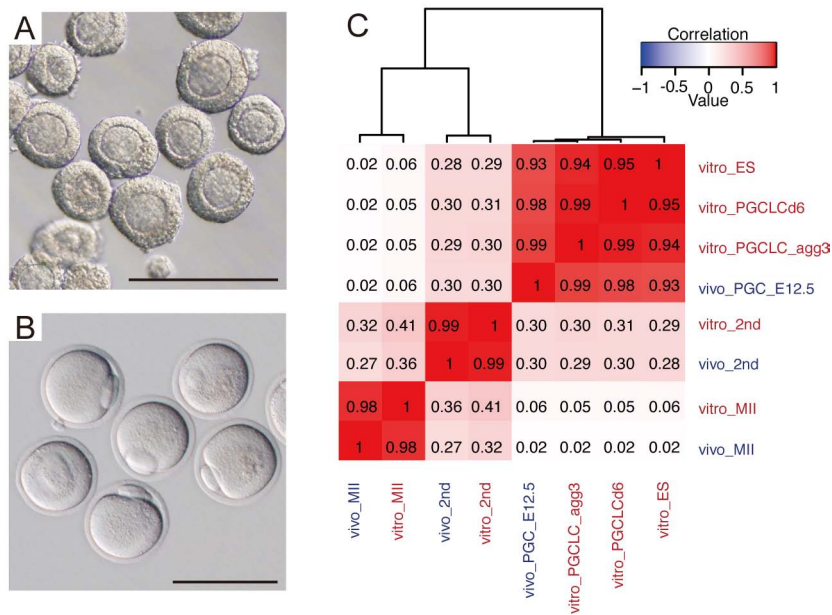


図1. 体外卵子産生系で得られた卵母細胞／卵子

体外卵子産生系において多能性幹細胞は未成熟卵母細胞（A）を介して、受精可能な卵子（B）に分化する。この分化過程の遺伝子発現は体内の卵母細胞／卵子と高い相関を示した（C）。スケール: 100μm.

### 3. 体外で得られた卵子の発生能

IVFの結果、ES/iPS細胞から誘導されたMII卵の約50%は受精卵となり、そのうち約60%が二細胞期胚へと発生した。これらを偽妊娠マウスに移植したところ、約3.5%が産仔となった（図2）。得られた産仔は成体にまで成長し妊孕性も確認された。



図2. 体外卵子産生系で得られた新生仔  
得られた新生仔（右）とその胎盤（左）。

### 4. 第二世代ES細胞の樹立と卵子の分化

ES細胞由来胚の胚盤胞からES細胞を37株樹立することができた。これらのES細胞を同様の体外培養系にて培養したところ、MII卵への分化が確認された。

## 考 察

本研究により ES/iPS 細胞から機能的な卵子を分化誘導できる培養系が開発されたが、ES 細胞由来の受精卵から産仔を得る効率は低い。ES 由来胚は移植された体内で発生を停止することが推測されるが、遺伝子発現の変化が原因の一つとして考えられる。今後、これらについて詳細な解析を行い、培養系を改良する必要がある。本培養法では ES 細胞を起点に成熟卵子を誘導し、それらの受精により再び胚盤胞を介して ES 細胞の樹立に成功した。このことにより 1 世代でおこる生殖細胞系列サイクルを培養下で再構築したことになる。このことは同時に減数分裂を介した遺伝的多様性を培養下で生み出すことが可能となったことを意味する。本培養系はこれまでに基礎的な生殖細胞の分化メカニズムの解明に貢献し<sup>5)</sup>、また希少野生動物の保護にも応用の範囲を広めつつある<sup>6)</sup>。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は東京農業大学応用生物科学部バイオサイエンス学科の尾畑やよい博士、農研機構畜産草地研究所の平尾雄二博士、九州大学医学研究院基盤幹細胞分野の中島欽一博士、今村拓也博士、京都大学医学研究科の斎藤通紀博士である。

## 文 献

- 1) Possibilities in Germ Cell Research: An Engineering Insight. Esfandiari F, Mashinchian O, Ashtiani MK, Ghanian MH, Hayashi K, Saei AA, Mahmoudi M, Baharvand H. Trends Biotechnol. 2015 Dec;33(12):735-46. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.09.004.
- 2) [Current advances in mammalian germ cell research]. Hayashi K. Fukuoka Igaku Zasshi. 2014 Oct;105(10):196-203.
- 3) Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition. Kimura T, Kaga Y, Ohta H, Odamoto M, Sekita Y, Li K, Yamano N, Fujikawa K, Isotani A, Sasaki N, Toyoda M, Hayashi K, Okabe M, Shinohara T, Saitou M, Nakano T. Stem Cells. 2014 Oct;32(10):2668-78. doi: 10.1002/stem.1781.
- 4) Perspectives of germ cell development in vitro in mammals. Hayashi K, Saitou M. Anim Sci J. 2014 Jun; 85(6):617-26. doi: 10.1111/asj.12199.
- 5) Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. Kurimoto K, Yabuta Y, Hayashi K, Ohta H, Kiyonari H, Mitani T, Moritoki Y, Kohri K, Kimura H, Yamamoto T, Katou Y, Shirahige K, Saitou M. Cell Stem Cell. 2015 May 7;16(5):517-32. doi: 10.1016/j.stem.2015.03.002.
- 6) Rewinding the process of mammalian extinction. Saragusty J, Diecke S, Drukker M, Durrant B, Friedrich Ben-Nun I, Galli C, Göritz F, Hayashi K, Hermes R, Holtze S, Johnson S, Lazzari G, Loi P, Loring JF, Okita K, Renfree MB, Seet S, Voracek T, Stejskal J, Ryder OA, Hildebrandt TB. Zoo Biol. 2016 May 3. doi: 10.1002/zoo.21284.