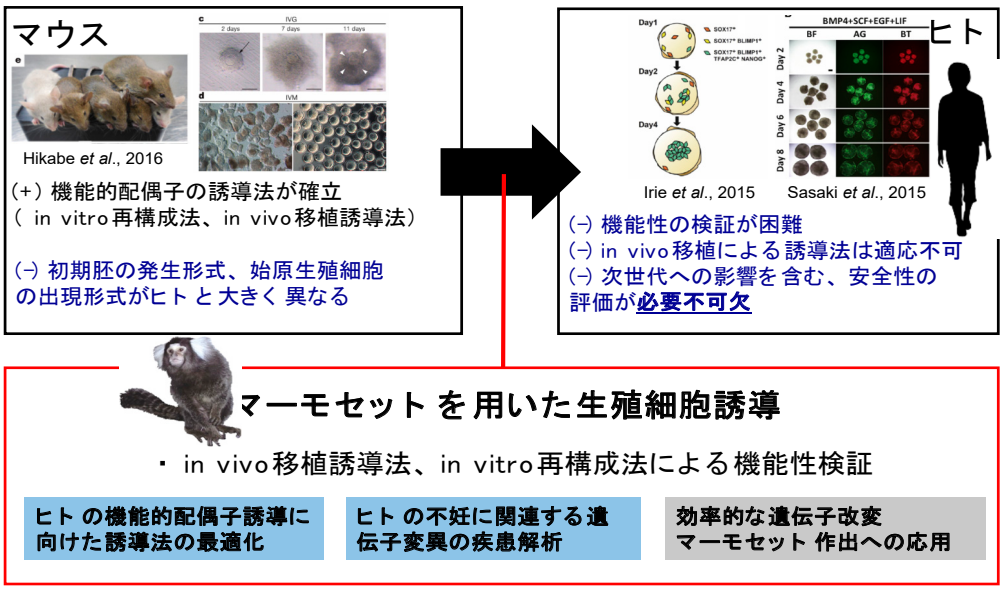
172　非ヒト霊長類モデルにおける機能的配偶子誘導法の確立	吉松　祥

【目的】生殖細胞系譜は次世代に遺伝情報を伝達し、生物進化の連続性を担う基幹的役割を担うことから、その系譜分化の機構究明は進化生物学・発生学上の重要課題とされてきた。近年、マウス多能性幹細胞から生殖系列細胞を誘導し産仔形成能をもつ機能的配偶子が作出されたという成果（Hayashi et al, Cell 2011、Hayashi et al., Science 2012、Hikabe et al, Nature 2016）は、「多能性幹細胞からの *in vitro* での配偶子形成」という革新的生殖技術に繋がり、ヒトES／iPS 細胞についても *in vitro* 配偶子形成研究の新領域を拓いた。しかし、マウス（齧歯類）と霊長類の生殖発生の機序には明確な進化的隔差があり、ヒト生殖医療への応用を踏まえた場合、実験的検証を可能とする非ヒト霊長類の細胞を用いた培養系の開発が求められていた（図）。

【方法】そこで本研究では、1 年という限られた期間ながら、小型霊長類のコモンマーモセットを対象として、多能性幹細胞から生殖系列細胞、生殖幹細胞からの配偶子分化を *in vitro* で再現する培養系の確立を目標とし、ヒトでは倫理的に不可能である正常産子形性能という機能的検証を行う事を目指した。

【結果】報告者はこれまでに、マーモセット多能性幹細胞における高効率なノックイン型遺伝子改変系の確立や、将来的な多能性幹細胞からの配偶子誘導に向けた“Transgene-free”マーモセット iPS 細胞の樹立、始原生殖細胞様細胞（Primordial germ cell-like cells：PGCLCs）の分化誘導法の確立を行った。まず多能性幹細胞からの生殖系列細胞分化を可視化する 3 種類の蛍光レポーターBLIMP1-Venus（BV：始原生殖細胞マーカー）、STELLA-Cerulean（SC：多能性幹細胞及び成熟生殖細胞マーカー）、VASA-tdTomato（VT：成熟生殖細胞マーカー）をマーモセット ES／iPS 細胞に導入した。さらに、これらの細胞において始原生殖細胞の分化に関わるサイトカイン（Activin-A、BMP4 等）の処理及び遺伝子（SOX17、BLIMP1）の強制発現を組合わせることで、BV 強陽性の PGCLCs の出現を認め 、これらの細胞の RNA-seq 解析によって、生殖細胞特異的な遺伝子発現を示す細胞特性を明らかにした。マウスやヒト多能性幹細胞を用いた研究において（Hikabe et al, Nature 2016、Yamashiro et al, Science 2018）、PGCLCs の成熟・減数分裂、機能的配偶子の誘導には、同種の胎児生殖巣由来体細胞（GSCs）との共培養が必要とされた。しかしながら、胎児の霊長類に由来する組織はマーモセットに限らず極めて希少性が高く、その検証は今まで実施困難であった。そこで本研究においては、所属先の九州大学のグループで開発された、多能性幹細胞から生殖巣体細胞系列の誘導による“胎児組織に依存しない配偶子誘導法”を検討するために、GSC レポーター系の確立を行った。

非ヒト霊長類を用いた生殖細胞誘導研究の意義



172. 非ヒト霊長類モデルにおける機能的配偶子誘導法の確立

吉松　祥

*理化学研究所 脳神経科学研究センター マーモセット神経構造研究チーム

Key words：霊長類，生殖細胞，生殖腺体細胞，配偶子，遺伝子改変

緒　言

生殖細胞系譜は次世代に遺伝情報を伝達し、生物進化の連続性を担う基幹的役割を担うことから、その系譜分化の機構究明は進化生物学・発生学上の重要課題とされてきた。近年、マウス多能性幹細胞から生殖系列細胞を誘導し産仔形成能をもつ機能的配偶子が作出されたという成果（Hayashi et al, Cell 2011、Hayashi et al, Science 2012、Hikabe et al, Nature 2016）は、「多能性幹細胞からの *in vitro* での配偶子形成」という革新的生殖技術に繋がり、ヒト ES／iPS 細胞についても *in vitro* 配偶子形成研究の新領域を拓いた。しかし、マウス（齧歯類）と霊長類の生殖発生の機序には明確な進化的隔差があり、ヒト生殖医療への応用を踏まえた場合、実験的検証を可能とする非ヒト霊長類の細胞を用いた培養系の開発が求められていた。そこで本研究では、当該研究期間において、小型霊長類であるコモンマーモセットの多能性幹細胞を用いた実験系を駆使し、霊長類における培養下での機能的配偶子形成に向け、各種レポーター系の樹立に取り組んだ。

方　法

1.　遺伝子改変

マーモセット ES 細胞のノックイン型遺伝子改変に関しては、以前報告者らが開発した方法［1］を用いて行った。具体的には、マーモセット ES 細胞株 CMES40［2］にリポフェクション法によって Cas9/gRNA ベクターとレポーター遺伝子ノックイン用のベクターを同時に導入し、薬剤選別によって相同組換え体を得たのちに、Cre 処理によって（2 箇所の loxP で挟まれた）薬剤耐性カセットの除去処理を行った。報告者らは昨年までに発表した研究において、生殖細胞系列に特異的に発現する遺伝子（*BLIMP1*、*STELLA*、*VASA*）のレポーターを導入したマーモセット ES 細胞株の樹立に成功しており［3，4］、またそれらのレポーター細胞株を用いて、霊長類特異的な遺伝子発現パターンを示す始原生殖細胞様細胞（Primordial germ cell-like cells：PGCLCs）の誘導にも成功している［5］。本研究においては、誘導した PGCLCs の培養下における、雌側（卵子形成）への更なる成熟及び減数分裂を促すため、マウス多能性幹細胞を用いた実験系において必要であった［6］胎児由来生殖巣体細胞（Gonadal somatic cells：GSCs）の誘導系の確立を目指し、マーモセット ES 細胞においても下図のように 3 種類のレポーター株 （Cell line ①、②、③）の作出を目指した（図 1）。

2.　遺伝型解析

マーモセット ES 細胞の遺伝型解析は、報告者らの既報［1］に基づき、ゲノム PCR 法によって行った。具体的には、細胞を Lysis buffer によって overnight で溶解し、その後フェノール・クロロホルム処理の後にエタノール沈殿法によって DNA を精製、Tris-EDTA buffer に懸濁した。その後、NCBI の BLAST を用いて各遺伝子に特異的なプライマーを設計し、PrimeStarMAX （タカラバイオ）を用いて PCR 反応を行い、1%アガロースゲルに泳動した。

3.　ノックインベクターの設計、作製

レポーター遺伝子ノックイン用のベクターに関しては、野生型 CMES40 株のゲノム DNA を増幅し、任意の相同配列を 2A 配列（自己切断型ペプチド配列）とレポーター遺伝子に連結できるように設計した。具体的には、相同組換えによって各遺伝子の最終コドンに 2A 配列の先頭が来るような設計を行った。本研究では図 1 に示す概念図を参考に、

*現在の所属：九州大学大学院 医学研究院 ヒトゲノム幹細胞医学分野

T-tdTomato、*FOXF1-tdTomato*、*GATA4-eCFP*、*OSR1-EGFP*、*SF1-hCD271* 及び *SF1-tdTomato*、*FOXL2-emiRFP670* 及び *FOXL2-EGFP* のノックインベクター各種、および各遺伝子の最終コドン近傍を標的とした gRNA を発現する Cas9/gRNA ベクターを、過去の研究［1］を参考に新たに作製した。

4. マーモセット胎児の採取

マーモセット胎児の採取は、事前に動物実験計画を理化学研究所脳神経科学研究センターの動物実験委員会に提出し、その承認を受けた上で実施した。妊娠した雌個体をイソフルラン及びケタミンによって麻酔処置を行い、帝王切開によって各ステージの胎児を採取した。

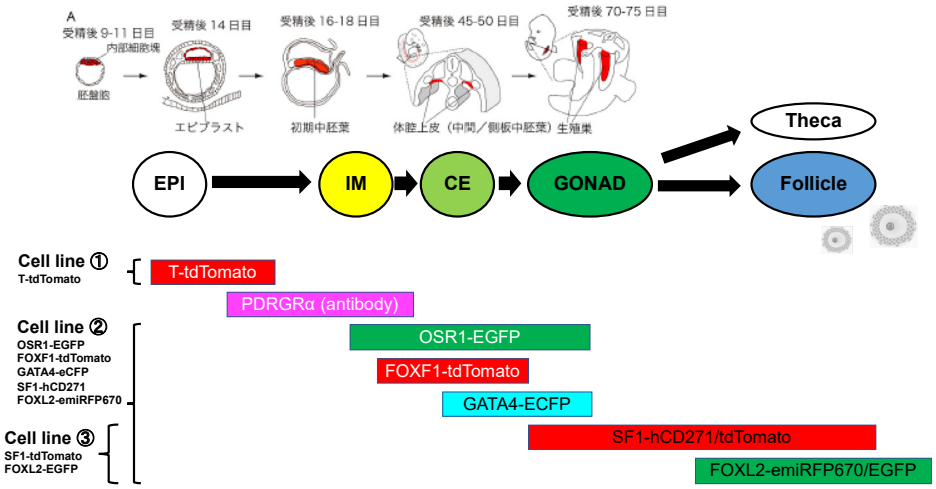


図 1. 本研究におけるレポーター導入遺伝子と発生過程における発現様式
EPI : Epiblast（胚盤葉上層、エピブラスト）、IM : intermediate mesoderm（中間中胚葉）、CE : coelomic epithelium（体腔上皮）、Gonad（生殖巣）、Theca（卵胞膜細胞）、Follicle（卵胞細胞）。

結果および考察

1. T-tdTomato レポーター細胞の作出

図 1 のように、GSCs はエピブラスト→中間中胚葉→体腔上皮→生殖巣といった分化過程を辿って得られ、最終的には PGCLCs との共存によって卵胞細胞もしくは卵胞膜細胞に分化し、卵子の成熟や減数分裂、貯蔵といった極めて重要な役割を担う。本研究においては、まず初期の中胚葉分化を可視化するために *T*（*Brachyury*）遺伝子に赤色蛍光タンパク遺伝子 *tdTomato* をノックインした Cell line ①を作出した（図 2）。

2. *FOXF1-tdTomato*、*GATA4-eCFP*、*OSR1-EGFP* レポーター細胞の作出

次に、図 1 で示す Cell line ②の作出を試みた。3 度のノックイン株の選別及び Cre 処理によって 3 重組換え体の作出に成功した（図 3）。なお、当初計画していた SF1 および FOXL2 のレポーター株作出（Cell line ②の最終目標および Cell line ③の作出）に関しては、一昨年度に公開された最新版のマーモセットゲノム情報（cj1700; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_009663435.1/）を参考にノックインベクターの作製し直しなどを行った影響で、今年度の進捗としてはノックインベクターの作出（*SF1-hCD271* 及び *SF1-tdTomato*、*FOXL2-emiRFP670* 及び *FOXL2-EGFP*）および当該遺伝子座用の Cas9/gRNA ベクターの構築までに留まった。今後も、引き続きノックインおよび Cre 処理によってレポーター株の作出を進めていきたい。

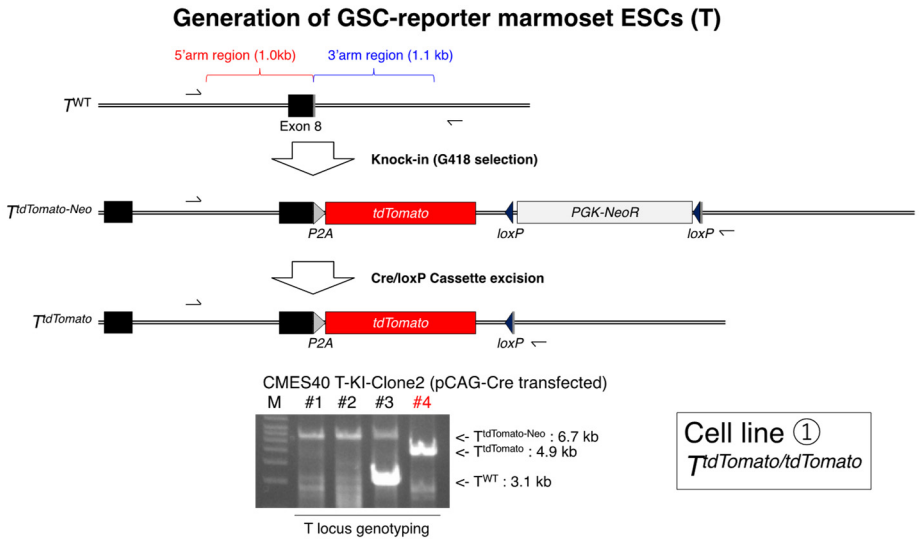


図 2. *T-tdTomato* レポーター細胞の作出

上図はマーモセット *T* 遺伝子座におけるノックインおよびカセット除去処理の概要を示しており、下図ではカセット除去処理後のゲノム PCR 方法による各クローンの遺伝型解析を行い、このうちクローン 4 番 (#4) では両アリルに *tdTomato* が導入され、かつ *PGK-NeoR*（ネオマイシンおよび G418 への耐性遺伝子発現カセット）が除去されていることが確認できた。Black boxes：endogenous exons。

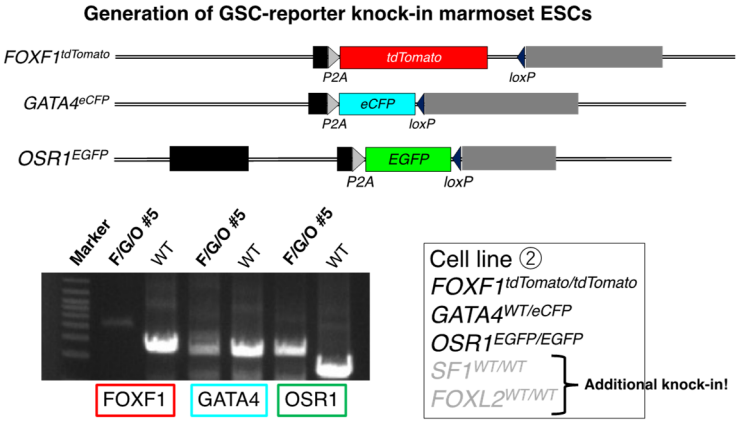


図 3. 3 重組換え体の作出

上図に各遺伝子座におけるノックイン及び Cre 処理後の遺伝子導入状態を示した。下図では、3 重組換え体の ES 細胞株（F/G/O #5）のゲノム PCR の結果を示した。それぞれ、FOXF1-tdTomato ホモ組換え体、GATA4-eCFP ヘテロ組換え体、OSR1-EGFP ホモ組換え体と判断された。Black boxes：endogenous exons、gray boxes：3'UTRs。

3. マーモセット胎児のサンプリング

理化学研究所脳神経科学研究センターのマーモセット・コロニーにおいてマーモセットの自然交配および、正常発生における胎児 GSCs の遺伝子発現様式を解析し、培養下で誘導した GSCs の対象とするため、GSCs が発生・増殖すると考えられる E70（図 4）、およびその後生殖細胞と共に成熟していくと考えられる E87（図 5）、E100（図 6）、E120（図 7）の各ステージにおいて胎児を採取し、そのうち生殖巣と思われる領域をシングルセル化して、現在 10x Genomics 社の chromium を用いてシングルセル cDNA ライブラリを作製、および RNA-seq 解析を行っている。ちなみに、マーモセットの正常の妊娠期間は 145 日とされ、ヒトの 280 日と比べ約半分とされている。

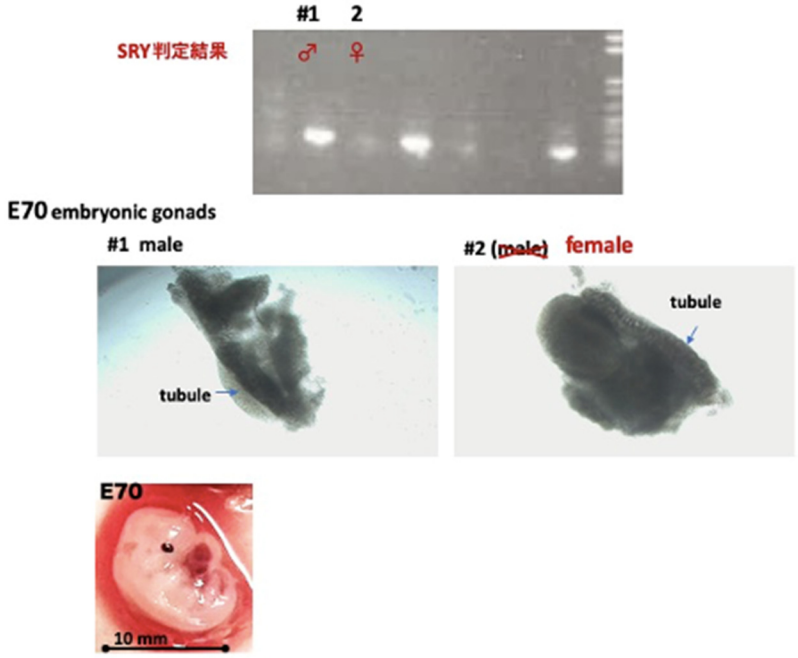


図 4. E70 マーモセット胚の採取および雌雄判定
上図は SRY 遺伝子（Y 染色体）による雌雄判定の結果を示す。下図はそれぞれ今回サンプリングを行った生殖巣と思われる領域。

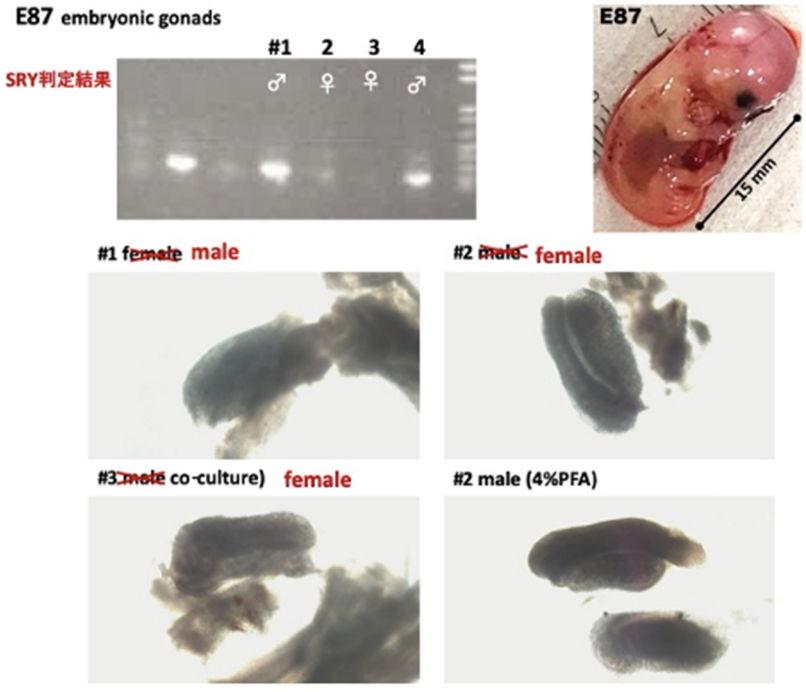


図 5. E87 マーモセット胚の採取および雌雄判定
上図は SRY 遺伝子（Y 染色体）による雌雄判定の結果を示す。下図はそれぞれ今回サンプリングを行った生殖巣と思われる領域。

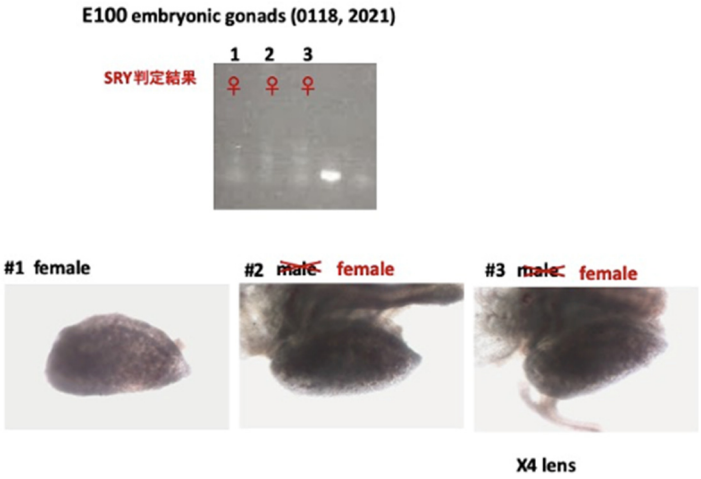


図 6. E100 マーモセット胚の採取および雌雄判定
上図は SRY 遺伝子（Y 染色体）による雌雄判定の結果を示す。下図はそれぞれ今回サンプリングを行った生殖巣と思われる領域。

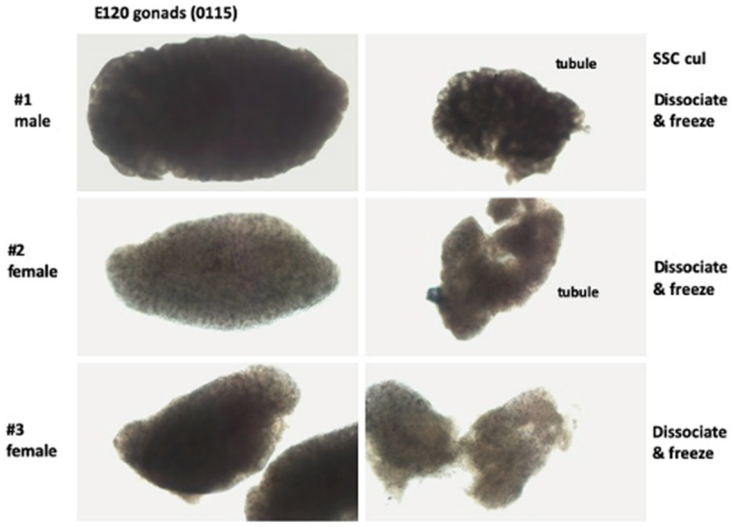


図 7. E120 マーモセット胚の採取および雌雄判定
それぞれ今回サンプリングを行った生殖巣と思われる領域。このステージでは tubule の有無によって雌雄判定が顕微鏡下で可能である。

4. その他の成果

上述の成果の他に、以前から取り組んでいた、様々な動物種からの「外来遺伝子の完全に除去された」高品質な多能性幹細胞の樹立に取り組み、今年度中に論文発表を行った［7～10］。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院医学研究科ヒトゲノム幹細胞医学分野の林克彦教授、吉野剛史助教、理化学研究所脳神経科学研究センターマーモセット神経構造研究チームの岡野栄之チームリーダー、野瀬俊明研究員、岡原純子研究員、中島龍介研究員、および慶應義塾大学の銭映美医学部 4 年生である。

文 献

#: co-first authors

1) Yoshimatsu S, Okahara J, Sone T, Takeda Y, Nakamura M, Sasaki E, Kishi N, Shiozawa S, Okano H. *Sci Rep*. 2019 Feb 6;9(1):1528. doi: 10.1038/s41598-018-37990-w. PMID: 30728412
2) Sasaki E, Hanazawa K, Kurita R, Akatsuka A, Yoshizaki T, Ishii H, Tanioka Y, Ohnishi Y, Suemizu H, Sugawara A, Tamaoki N, Izawa K, Nakazaki Y, Hamada H, Suemori H, Asano S, Nakatsuji N, Okano H, Tani K. *Stem Cells*. 2005 Oct;23(9):1304-13. doi: 10.1634/stemcells.2004-0366. Epub 2005 Aug 18. PMID: 16109758
3) Yoshimatsu S#, Sone T#, Nakajima M, Sato T, Okochi R, Ishikawa M, Nakamura M, Sasaki E, Shiozawa S, Okano H. A versatile toolbox for knock-in gene targeting based on the Multisite Gateway technology. *PLoS One*. 2019 Aug 27;14(8):e0221164. doi: 10.1371/journal.pone.0221164. eCollection 2019. PMID: 31454364
4) Yoshimatsu S, Sato T, Yamamoto M, Sasaki E, Nakajima M, Nakamura M, Shiozawa S, Noce T, Okano H. Generation of a male common marmoset embryonic stem cell line DSY127-BV8VT1 carrying double reporters specific for the germ cell linage using the CRISPR-Cas9 and PiggyBac transposase systems. *Stem Cell Res*. 2020 Apr;44:101740. doi: 10.1016/j.scr.2020.101740. Epub 2020 Feb 21. PMID: 32151954
5) Yoshimatsu S, Nakajima M, Iguchi A, Sanosaka T, Sato T, Nakamura M, Nakajima R, Arai E, Ishikawa M, Imaizumi K, Watanabe H, Okahara J, Noce T, Takeda Y, Sasaki E, Behr R, Edamura K, Shiozawa S, Okano H. Non-viral Induction of Transgene-free iPSCs from Somatic Fibroblasts of Multiple Mammalian Species. *Stem Cell Reports*. 2021 Apr 13;16(4):754-770. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.03.002. Epub 2021 Apr 1. PMID: 33798453
6) Hikabe O, Hamazaki N, Nagamatsu G, Obata Y, Hirao Y, Hamada N, Shimamoto S, Imamura T, Nakashima K, Saitou M, Hayashi K. Reconstitution in vitro of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*. 2016 Nov 10;539(7628):299-303. doi: 10.1038/nature20104. Epub 2016 Oct 17. PMID: 27750280
7) Yoshimatsu S, Edamura K, Yoshii Y, Iguchi A, Kondo H, Shibuya H, Sato T, Shiozawa S, Okano H. Non-viral derivation of a transgene-free induced pluripotent stem cell line from a male beagle dog. *Stem Cell Research* 2021 May;53:102375. doi: 10.1016/j.scr.2021.102375. Epub 2021 Apr 29. PMID: 34088004
8) Yoshimatsu S, Qian E, Sato T, Yamamoto M, Ishikawa M, Okano H. Establishing a common marmoset induced pluripotent stem cell line NM-iPS by an all-in-one episomal vector approach. *Stem Cell Research* 2021 May;53:102380. doi: 10.1016/j.scr.2021.102380. Epub 2021 Apr 30. PMID: 34088009
9) Yoshimatsu S, Murakami R, Nakajima M, Sato T, Kawasaki H, Okano H. Establishment of an induced pluripotent stem cell line from a female domestic ferret (Mustela putorius furo) with an X chromosome instability. *Stem Cell Research* 2021 May;53:102385. doi: 10.1016/j.scr.2021.102385. Epub 2021 May 11. PMID: 34088013
10) Zhou Z#, Yoshimatsu S#, Qian E, Ishikawa M, Sato T, Ohtaka M, Nakanishi M, Okano H. Generation of a control human induced pluripotent stem cell line using the defective and persistent Sendai virus vector system. *Stem Cell Research* 2021 Sep 23;56:102549. doi: 10.1016/j.scr.2021.102549. Epub 2021 Sep 23. PMID: 34598113