

ヒトゲノム編集技術のガバナンスと基礎研究・臨床応用に関する委員会(第25期・第4回)

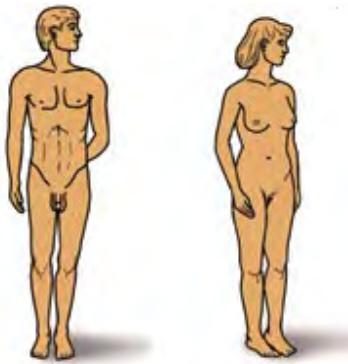
2022年7月8日(金) 10:00~12:00

ヒト幹細胞からの生殖細胞形成に関する研究について

林 克彦

大阪大学大学院医学系研究科・生殖遺伝学分野

生殖細胞研究の概要



生殖細胞系列

なぜ個体ができるのか？



特異的な分化過程

始原生殖細胞

インプリント

配偶子形成

受精

リプログラミング

トランスポソン抑制

性分化

減数分裂

生殖細胞系列の異常

不妊

次世代の発生・成長異常

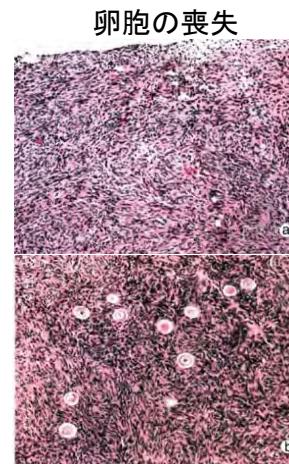
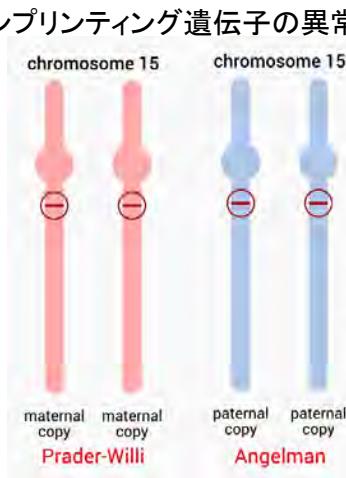
性腺機能低下

生殖細胞系列の利用

不妊治療

生物資源の保存

有益動物の產生



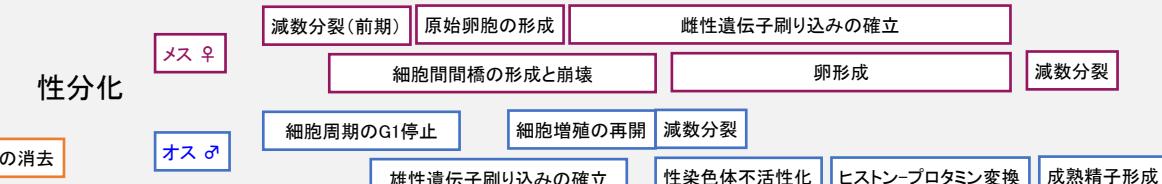
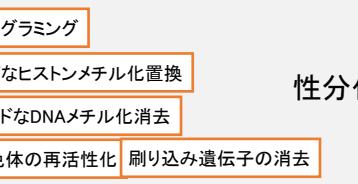
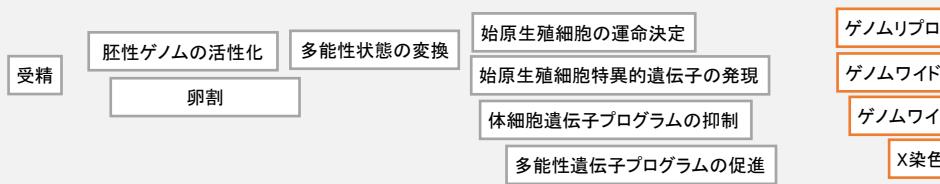
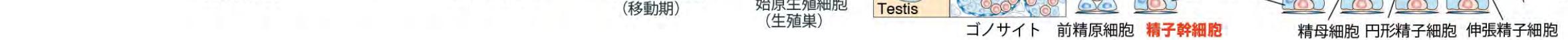
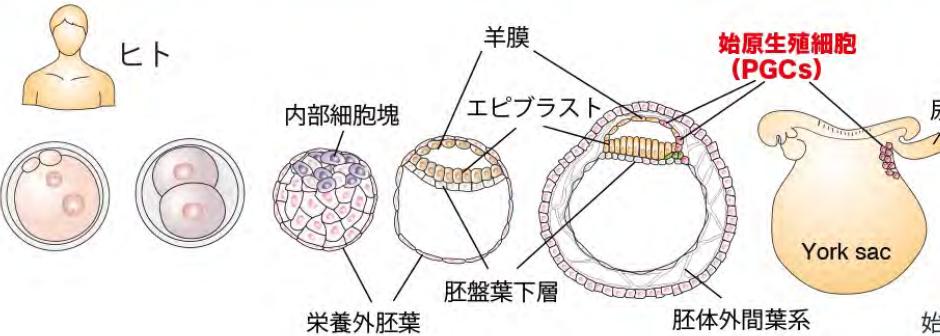
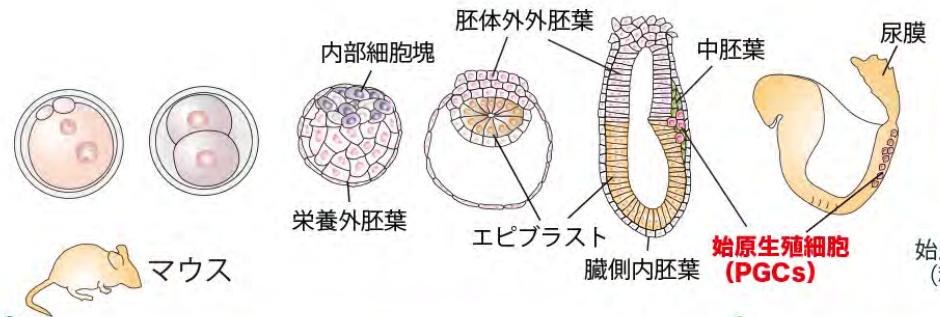
「体外受精技術の開発」
2010年ノーベル医学・生理学賞
Dr. Robert Edwards



セントマザー産婦人科医院

生殖細胞系列の発生過程の詳細

- 大事な生殖細胞の分化過程は胎児期に多い。
- 胎児期の生殖細胞の数は少ない。



in vitro gametogenesis: 体外で生殖細胞の分化を再構築する。



- 生殖細胞の分化メカニズムの理解(不妊原因や治療法の開発)

- 体外培養による配偶子の供給源

ヒトへの不妊治療？

絶滅危惧種の保護

有用産業動物の作製と育種

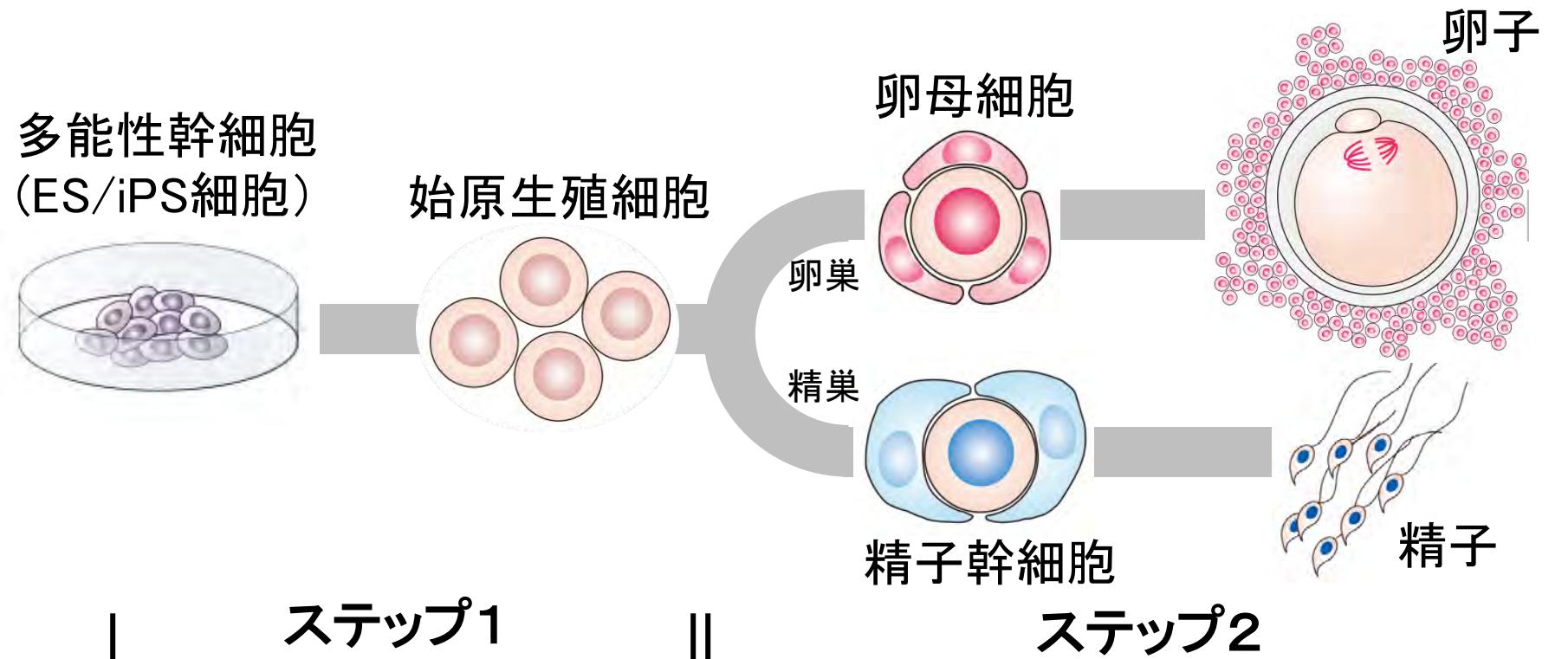


HANDMADE



地球に3頭 キタシロサイ

多能性幹細胞から生殖細胞をつくるステップ

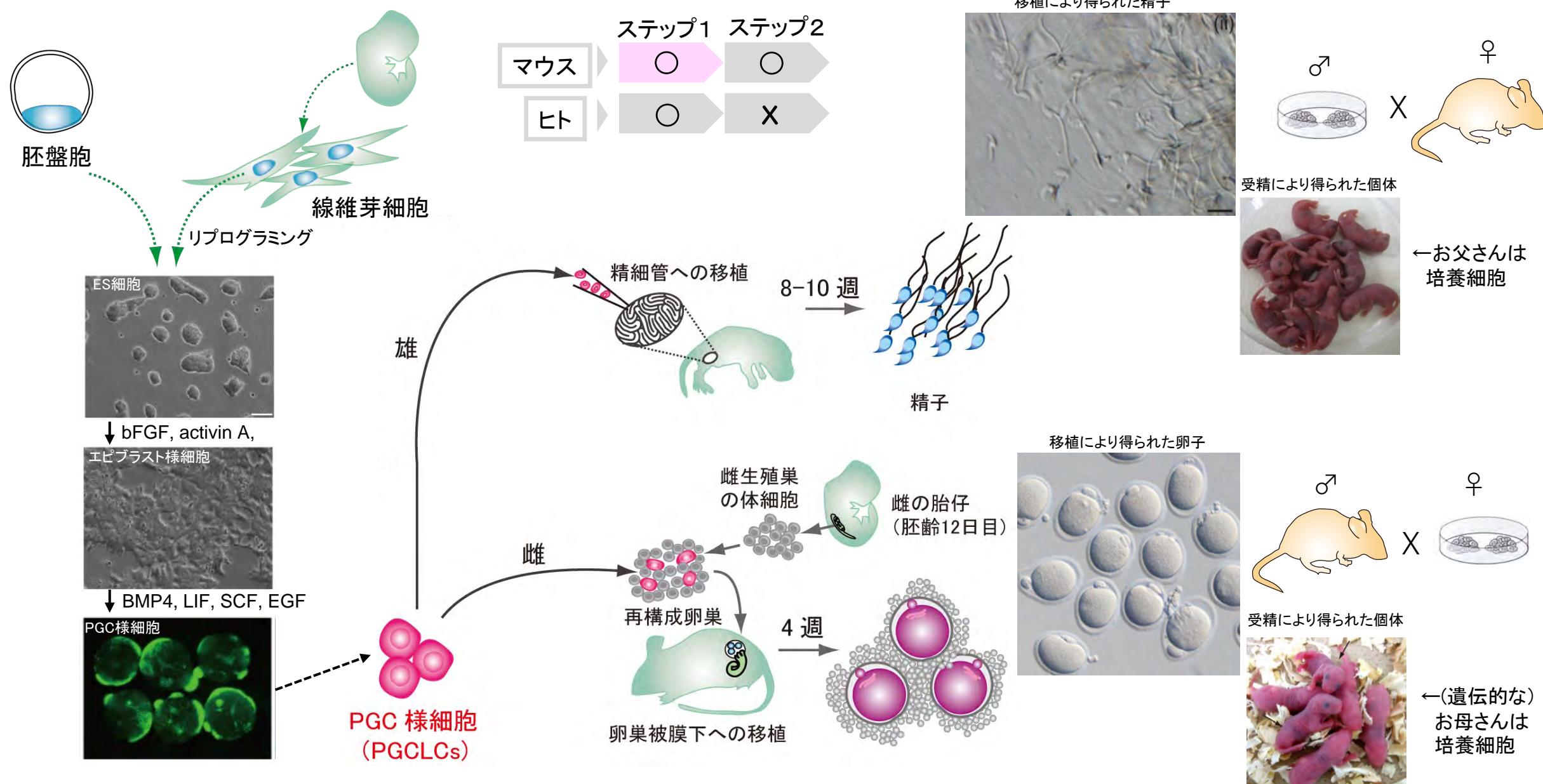


マウス → ○ → ○
ヒト → ○ → ×

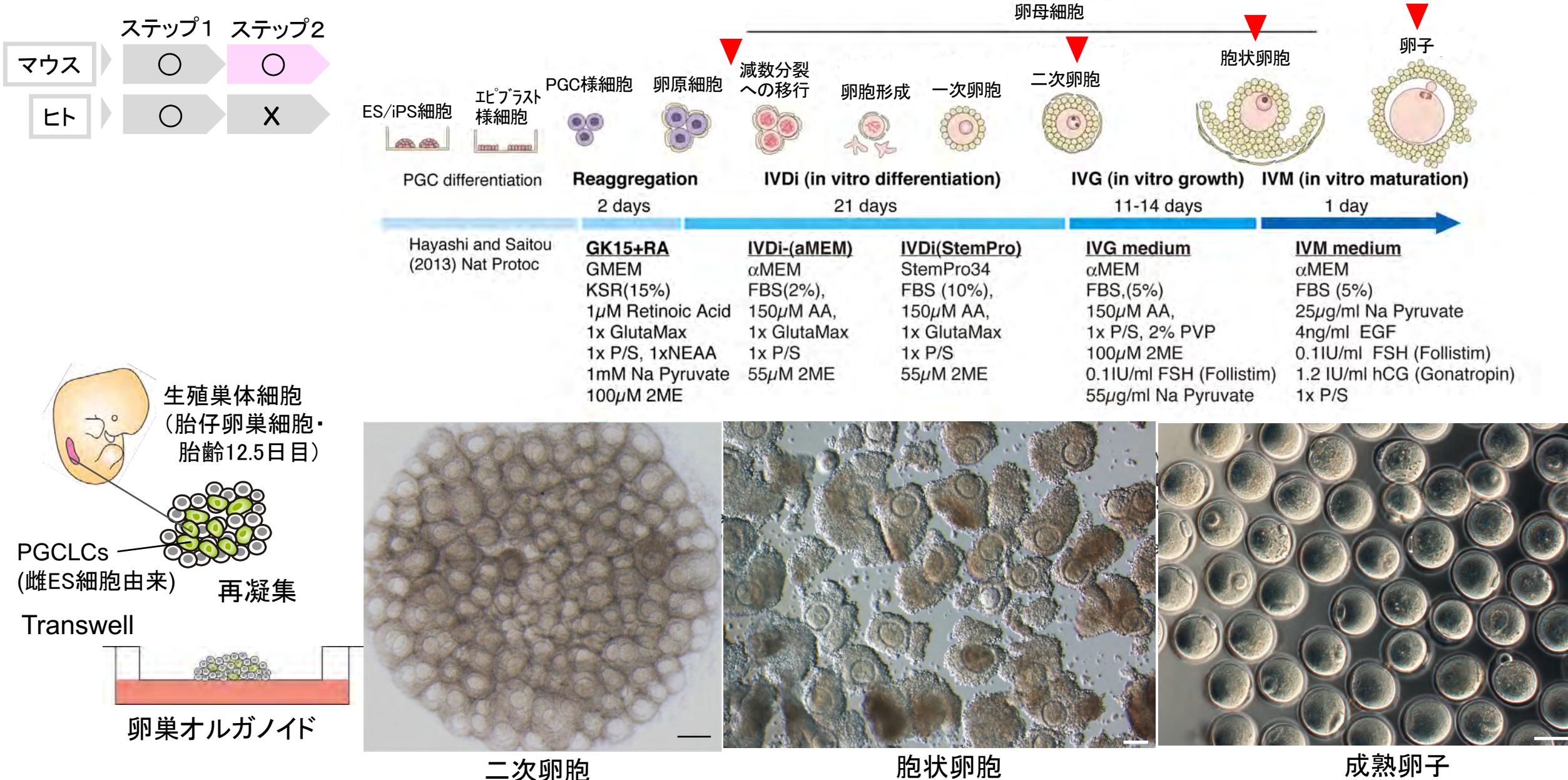
始原生殖細胞をつくる。
(性非特異的)

始原生殖細胞から卵子や精子つくる。
(性特異的・周囲の体細胞依存的)

ステップ1(マウス): ES/iPS細胞から始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)の誘導



ステップ2（マウス）：体外培養系によるPGCLCsからの卵子の誘導



in vitro gametogenesisで作られた卵子は受精により個体にまで発生する。



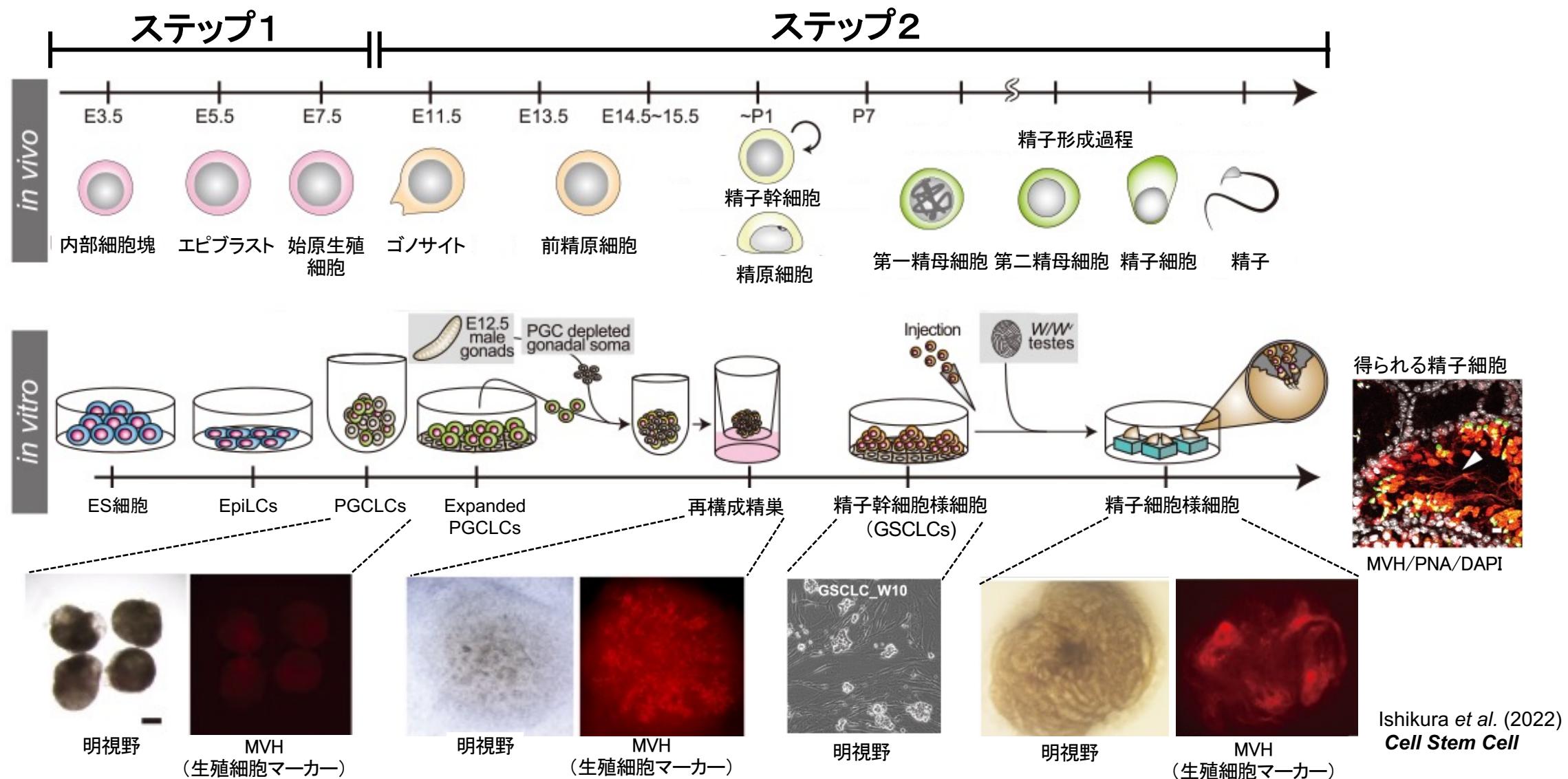
Hikabe et al. (2016) *Nature*

ES/iPS細胞由来の卵子は受精により個体にまで発生するが…

- ✓ 卵子間の質的なばらつきが大きい。
- ✓ 遺伝子発現がやや異なる。
- ✓ ミトコンドリアDNAの量が少ない。
- ✓ 染色体の異数体が多い。
- ✓ 物理的刺激に弱い。
- ✓ 発生率が低い: 生体由来の卵子(60–70%)と比較して、約1/20(3–5%)。

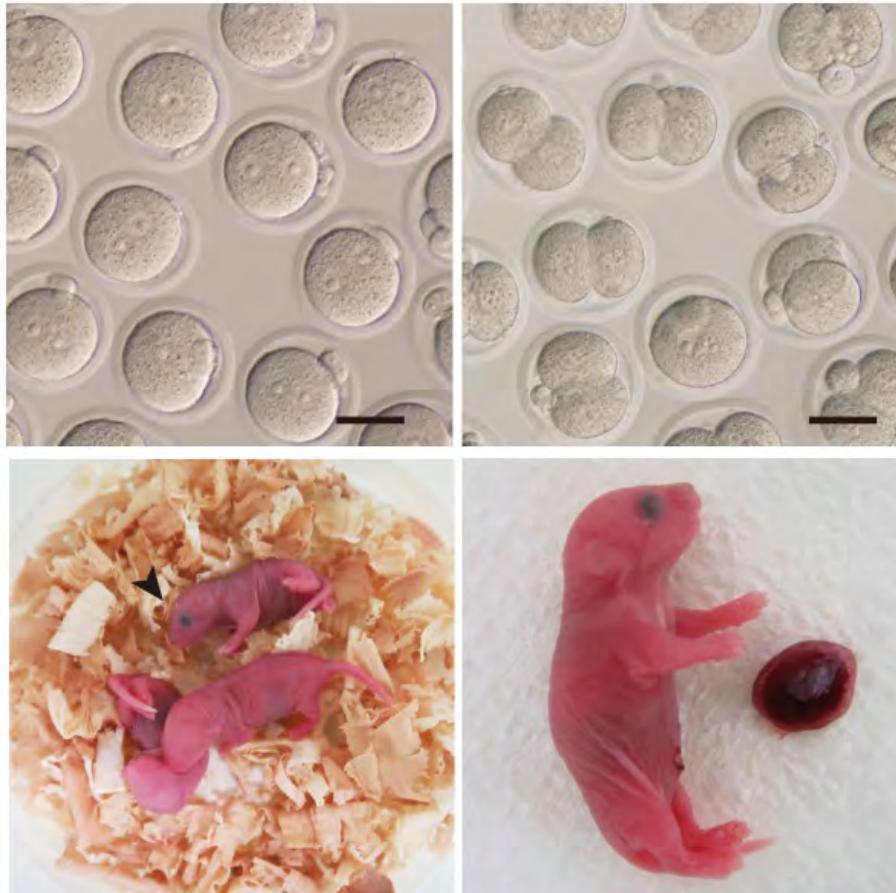
培養条件の再検討
良質な卵子の選択

ステップ2（マウス）：体外培養系によるES細胞からの精子の誘導



マウスでは複数の培養システムの組み合わせで、精子をES細胞から分化誘導できる。

in vitro gametogenesisで作られた精子は受精により個体にまで発生する。

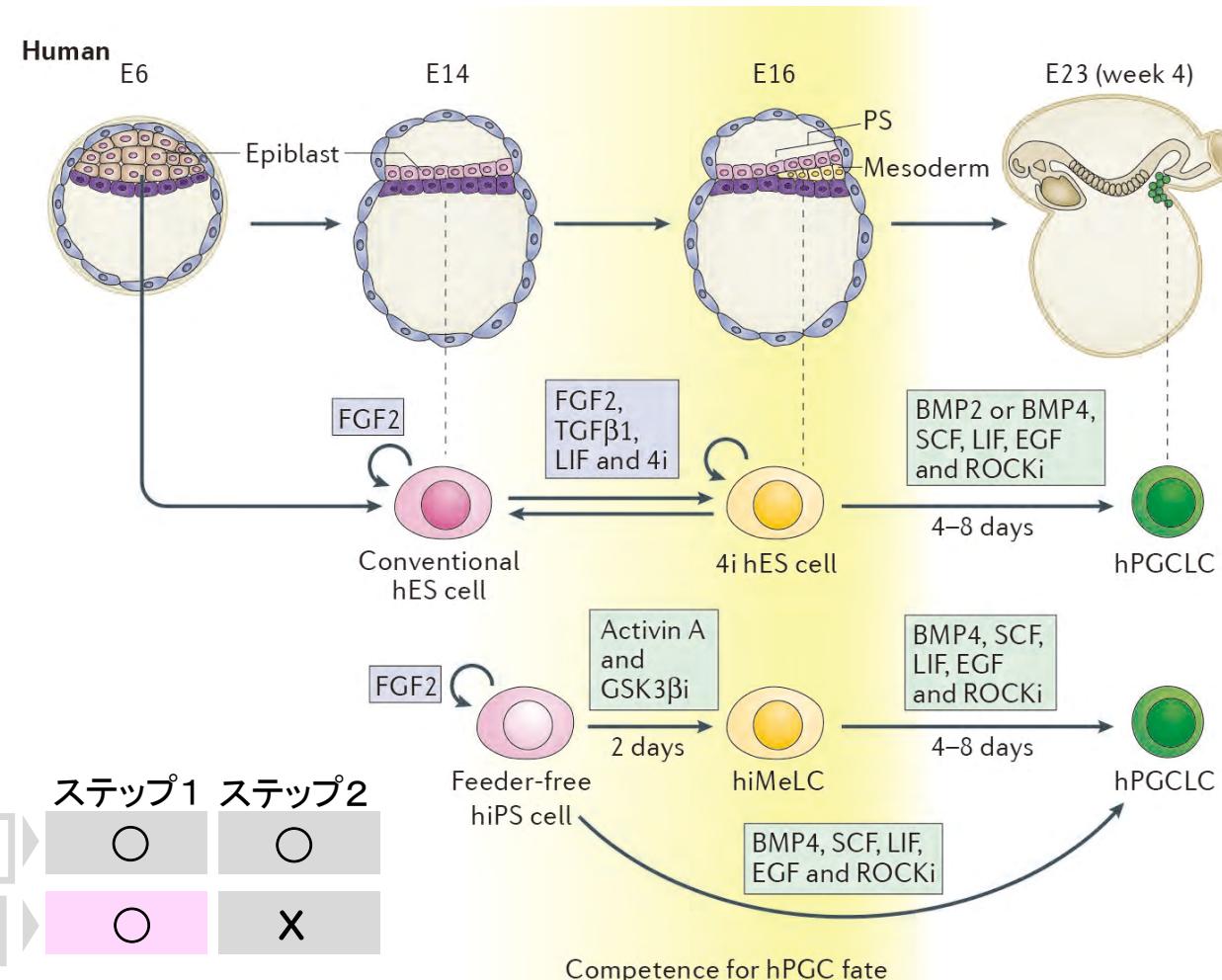


生体由来の精子幹細胞と比べて、ES/iPS細胞由來の精子幹細胞は概ね遺伝子発現等は似ているが…

- ✓ 精子形成能が低い。
- ✓ 細胞株間のばらつきが大きい。
- ✓ ヒストン修飾パターンが異なる
(H3K9me2↑、H3K27me3↑)
- ✓ ゲノムのInsulationの残留がある。
- ✓ 核内のB-compartmentの増加
- ✓ 得られる精子由來の受精卵の発生率が悪い。

Cell line	No. of oocyte survived after ROSI	No. of zygotes with 2PN (%)	No. of 2-cell embryos (%)	No. of embryos transferred	No. of pups (% • sex)
GSCLC_W3 [1]	48	23(47.9%)	23(100%)	23	1 (4.3% • Female)
GSCLC_W3 [2]	33	21(63.6%)	20(95.2%)	20	1 (5.0% • Male)

ヒトのステップ1:ヒトES/iPS細胞からの始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)の分化

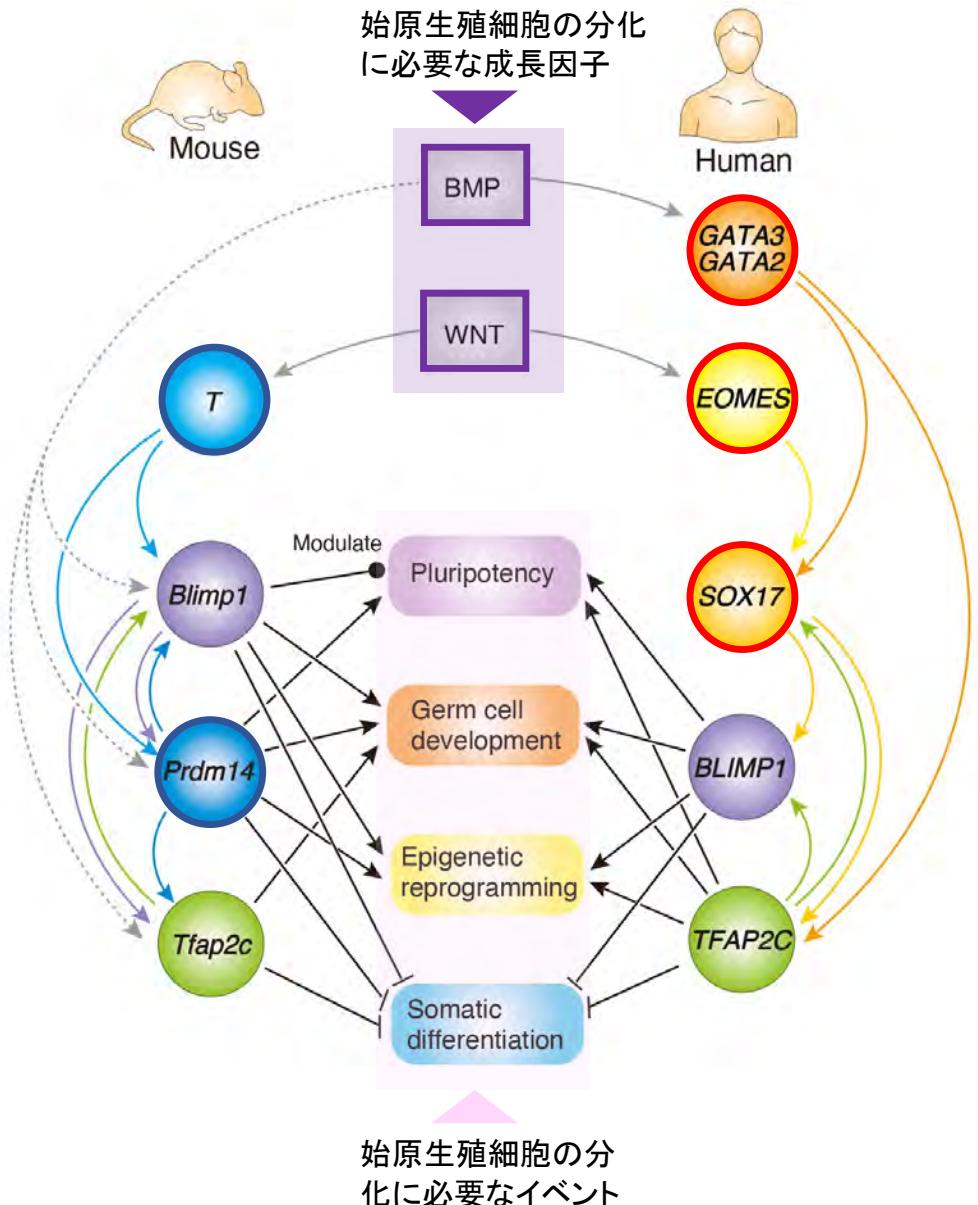


- ヒトES/iPS細胞からマウスと同じような培養条件でPGCLCsが簡便かつ高効率に誘導できる。
- ヒトPGCLCsの遺伝子発現は生体内のPGCsのものとよく似ている。
- ヒトPGCLCsと生体内のPGCsではよく似たエピゲノムリプログラミングを起こしている。

ヒトの生殖細胞の分化を制御する遺伝子のスクリーニングには極めて有効

ゲノム編集技術によりヒトPGCs/PGCLCsの分化に必須な遺伝子が複数同定された。
SOX17、EOMES、PRDM1、GATA3など

始原生殖細胞の分化(ステップ1)の解析でわかったマウスとヒトの違い



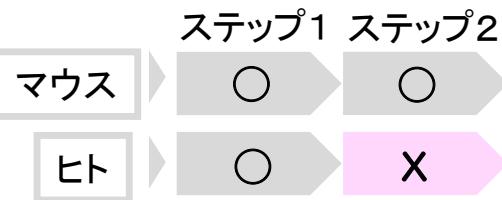
マウスとヒトの共通点

- PGCLCsを誘導する成長因子
→ BMP4, WNT3/3A
- 始原生殖細胞の分化に必須な一部の転写因子
→ PRDM1/BLIMP1、TFAP2C
- 体細胞プログラムの抑制
- ゲノムワイドリプログラミングの特徴

マウスとヒトの相違点

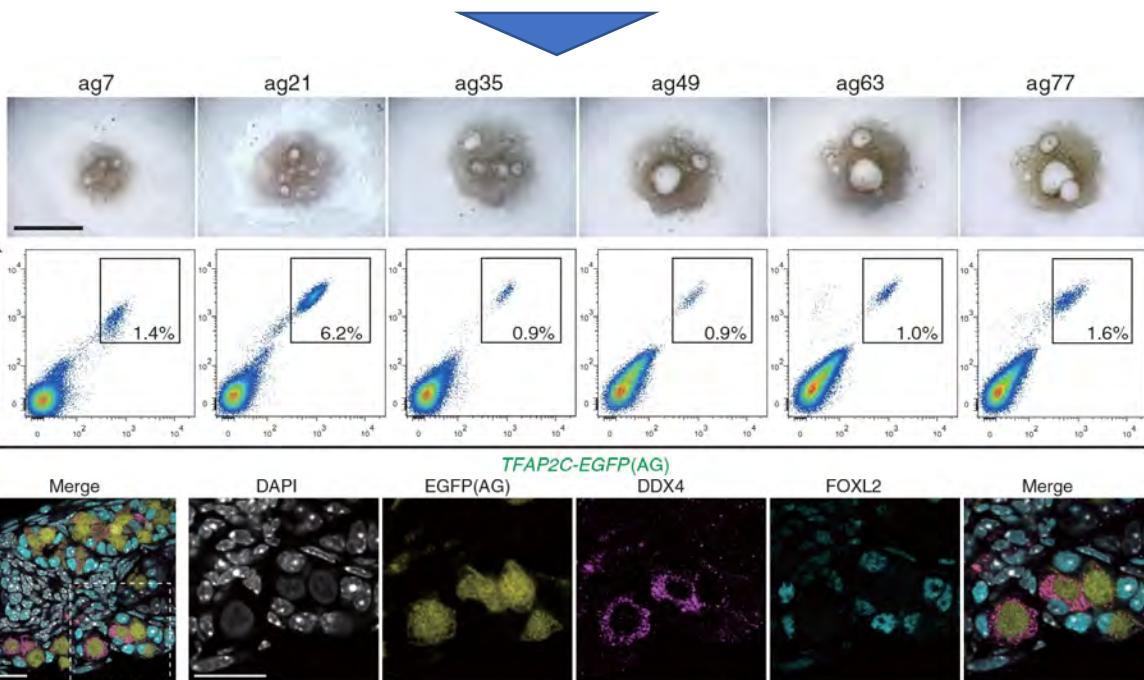
- 成長因子の直下で機能する転写因子
→ EOMES(ヒト)、T(マウス)
→ GATA2、GATA3(ヒト)
- 始原生殖細胞の分化に必須な一部の転写因子
→ SOX17(ヒト)、SOX2(マウス)
- PGCLCsの増殖能
→ ヒトではほぼ無限に増える？

ヒトES/iPS細胞を用いた配偶子形成(ステップ2)はいまのところできない。



ヒトPGCLCsから配偶子を分化させた成功例はない。

ヒトPGCLCsとマウスの卵巣の体細胞を用いた
異種間混合卵巣オルガノイドの結果



培養約12週間後に卵原細胞ができた。

ヒトのステップ2の技術的な問題点と解決策

- ① 胎児の卵巣・精巣の体細胞の調達が困難
- ② 長時間の培養時間が必要
卵母細胞の成熟期間: マウス3週、ヒト4-6ヶ月
- ③ 培養液の組成がマウスのものと異なる。

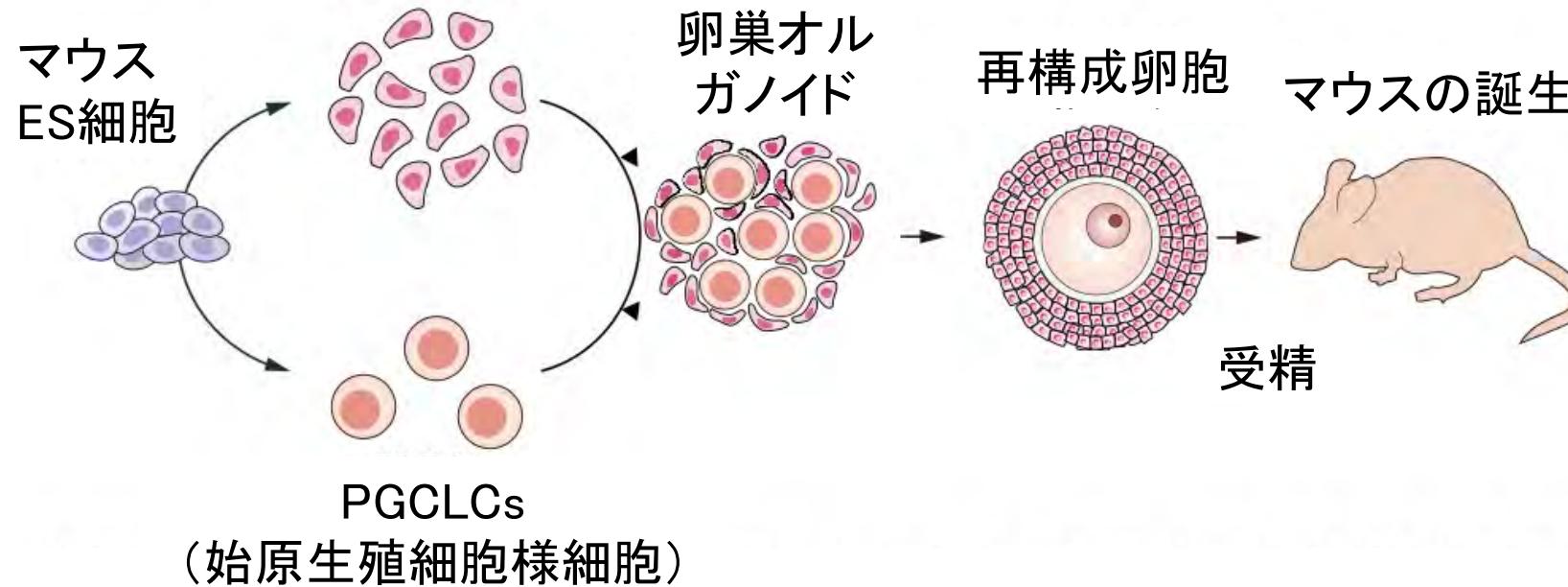
→ 解決策

- ① ヒトES/iPS細胞から胎児の卵巣・精巣の体細胞と同等の細胞を分化誘導する。
- ②] ヒトの未成熟卵胞などの材料を用いて条件検討を行う。
- ③]

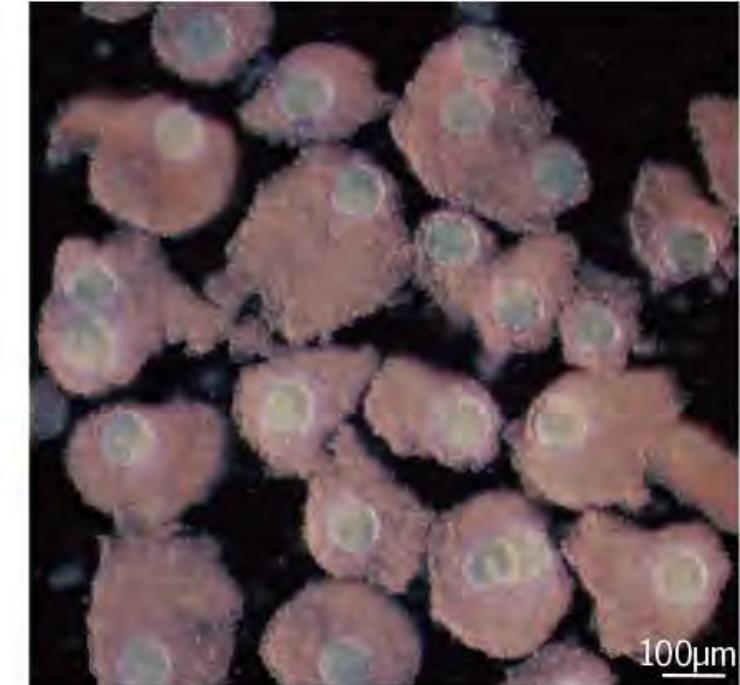
胎仔卵巣体細胞はマウスES/iPS細胞から分化誘導できる。

- ✓ 機能的な胎仔卵巣体細胞の分化誘導
- ✓ 性分化過程を含めた分化過程の再現

FOSLCs
(胎仔卵巣体細胞様細胞)



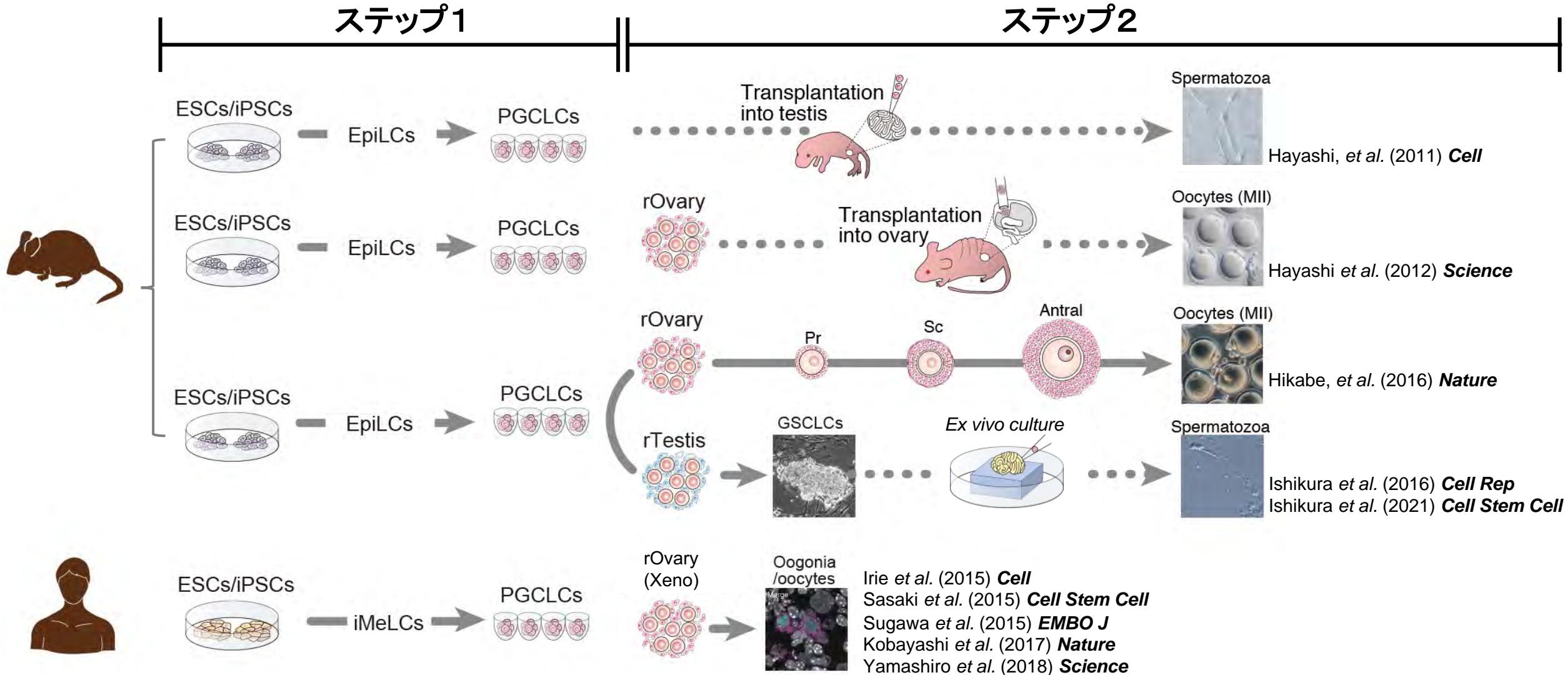
再構成卵胞



Yoshino et al. (2021) *Science*

概念実証(マウス): 生体組織を必要としない卵子產生系を構築できる

これまでの *in vitro* gametogenesis のまとめ

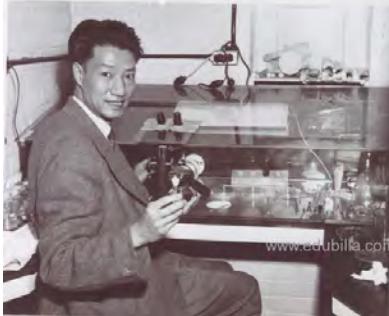


生殖工学技術の歴史的な背景と*in vitro* gametogenesisの行く末

1950

実験動物
・家畜

Dr. Min Chueh Chang



Nature (1959): Rabbit

1970

Sir Martin Evans



Nature (1981): Mouse

1990

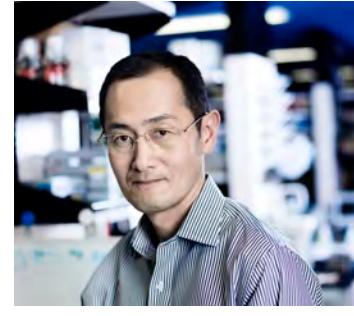
Drs. Keith Campbell
and Ian Wilmut



Nature (1996): Sheep

2010

Dr. Yamanaka



Cell (2006): Mouse

2030

in vitro
gameto-
genesis

IVF

ES細胞

核移植

iPS細胞

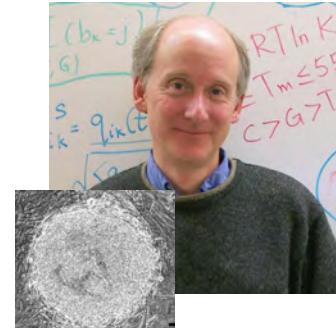
ヒト

Drs. Robert Edwards
and Patrick Steptoe



The first tube baby (1978)

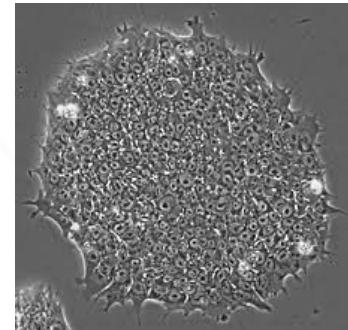
James Thomson



Science (1998)

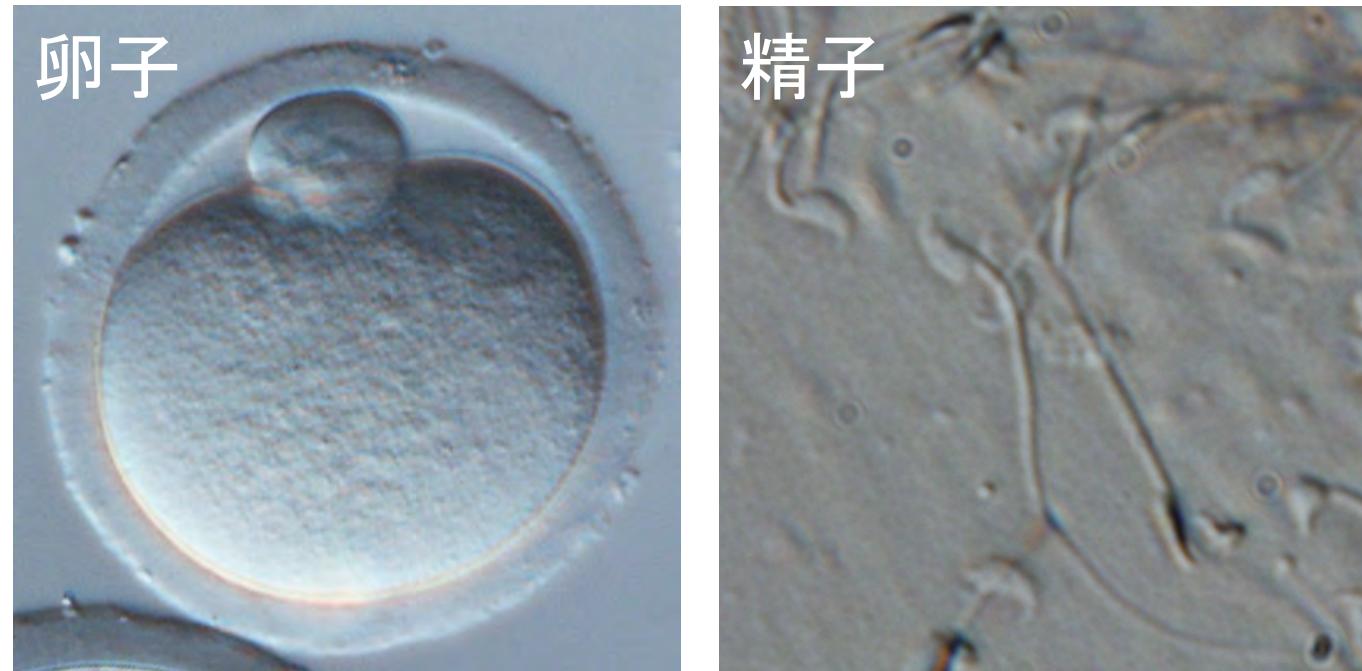


Dr. Yamanaka



Cell (2007)

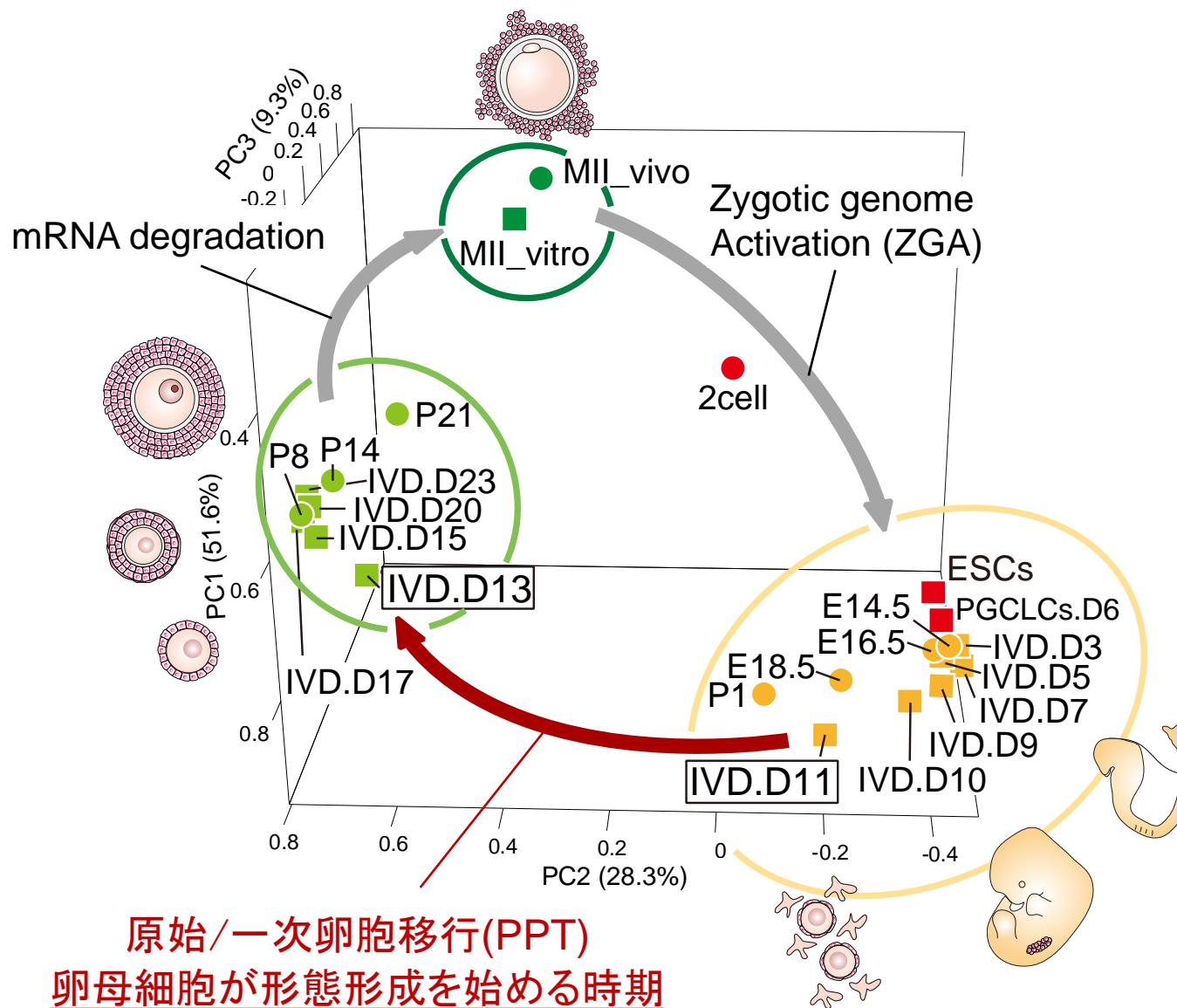
生殖細胞の分化メカニズムの理解(不妊原因や治療法の開発)



- 同じ前駆細胞(始原生殖細胞)から分化する。
- 雌雄で形態的・機能的に著しく異なる

配偶子の性差を規定する分子メカニズム？

体外培養系を用いた卵子形成過程の遺伝子発現解析

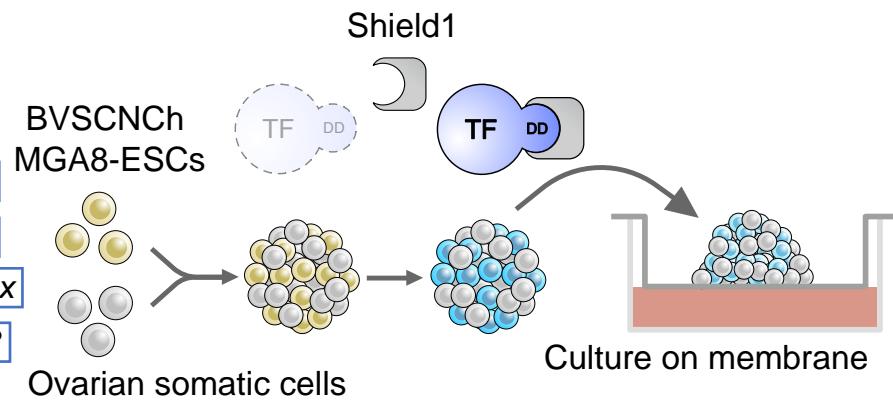
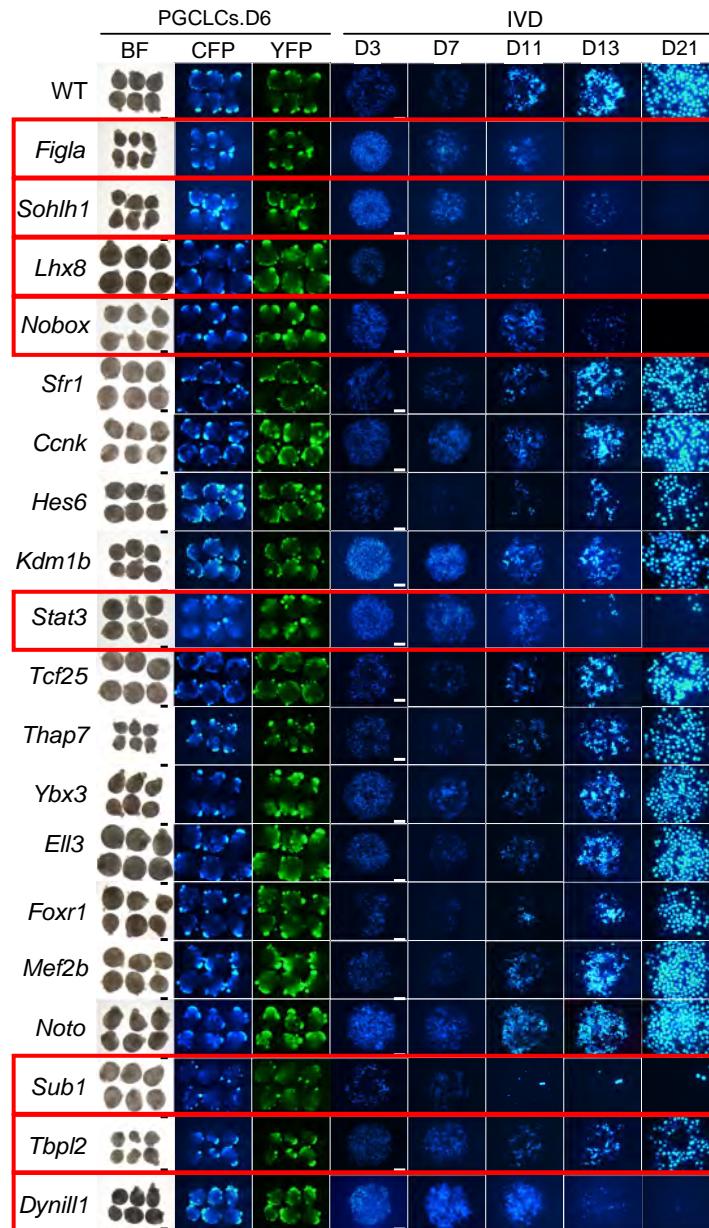
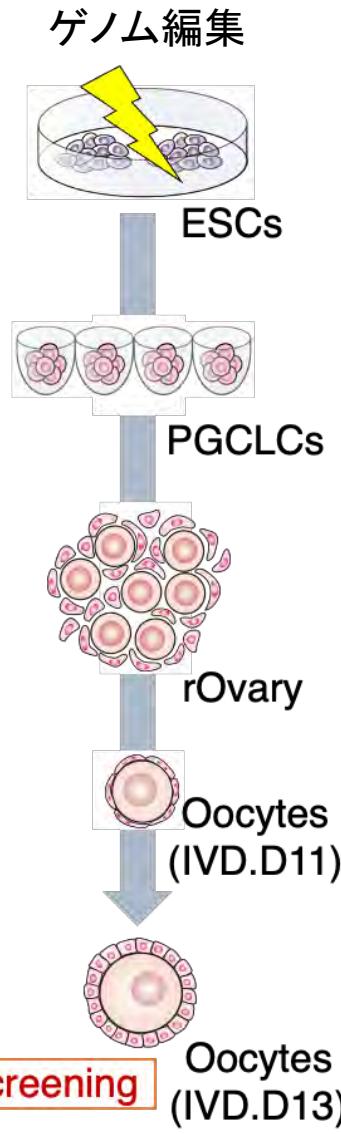


原始/一次卵胞移行時に特異的に発現する転写因子群

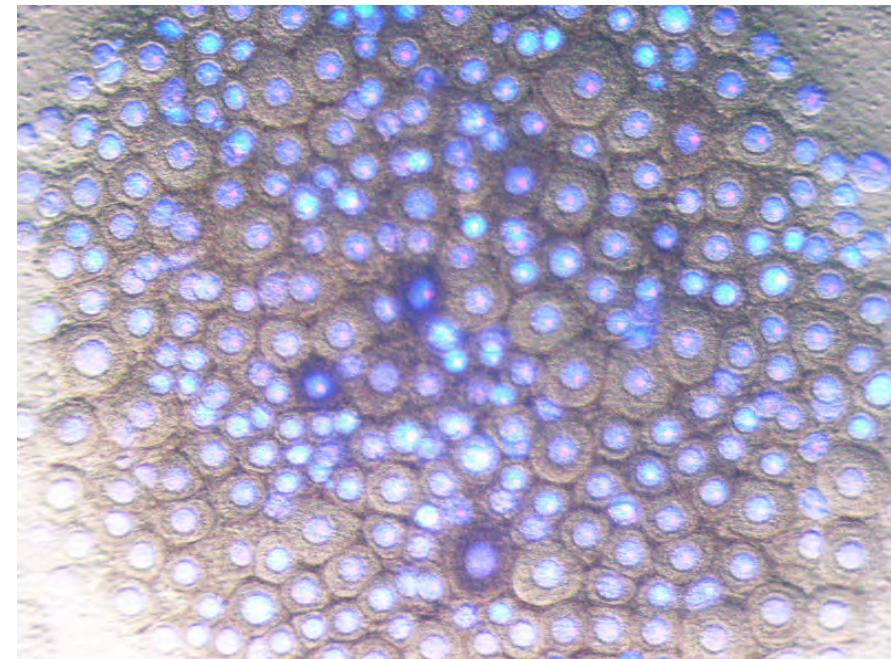
<i>Figla</i>	<i>Dnmt1</i>
<i>Sohlh1</i>	<i>Sp110</i>
<i>Dmap1</i>	<i>Thap7</i>
<i>Drap1</i>	<i>Ybx3</i>
<i>Kat8</i>	<i>Birc5</i>
<i>Lhx8</i>	<i>Eif3</i>
<i>Nobox</i>	<i>Foxr1</i>
<i>Sfr1</i>	<i>Mef2b</i>
<i>Ccnk</i>	<i>Noto</i>
<i>Hes6</i>	<i>Polr2j</i>
<i>Kdm1b</i>	<i>Sub1</i>
<i>Stat3</i>	<i>Tbp12</i>
<i>Tcf25</i>	<i>Dynll1</i>

体外培養系を用いた遺伝子スクリーニングと卵子様細胞の大量誘導

Figla
Sohlh1
Dnmt1
Dmap1
Sp110
Drap1
Thap7
Kat8
Ybx3
Lhx8
Birc5
Nobox
EII3
Sfr1
Foxr1
Ccnk
Mef2b
Hes6
Noto
Kdm1b
Polr2j
Stat3
Sub1
Tcf25
Tbp12
Dynll1

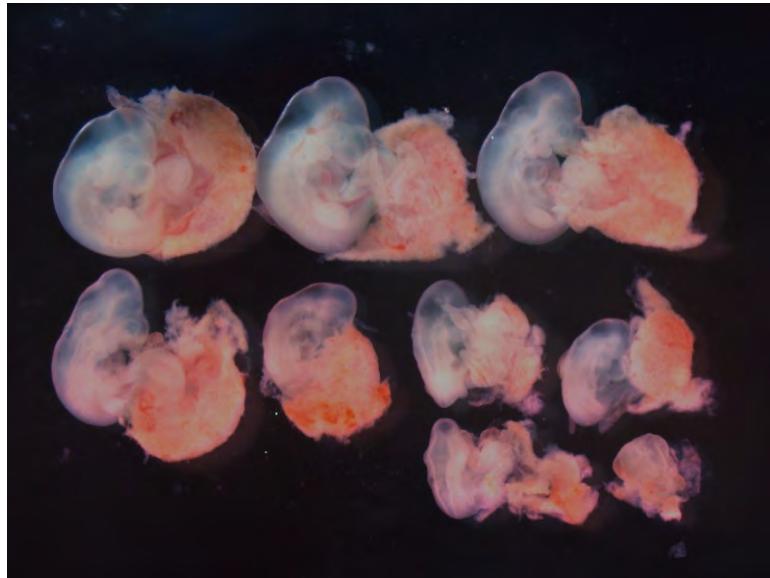


Transcription factor-induced oocyte-like cells
 (derived from ESCs)



体外培養による配偶子の供給源

- ✓ *in vitro* gametogenesis により生体の組織を利用することなく配偶子を供給できる。



in vitro gametogenesis由來の配偶子を用いると様々な段階で発生が停止する。

Hikabe et al. (2016) *Nature*

in vitro gametogenesis由來の配偶子の問題点

- ✓ 発生率の低さ
- ✓ 配偶子の質的なばらつき
(染色体、遺伝子発現、エピゲノム)
- ✓ 産仔の健常性?
(ゲノム/エピゲノム変異、行動、寿命、疾患等)

[iPS細胞を*in vitro* gametogenesisに用いる場合]

- ✓ iPS細胞の質的なばらつき
- ✓ 体細胞核で起こるゲノム変異(体細胞系列では生殖細胞系列よりも10倍以上ゲノムの変異率が高い)

結論

- 生殖細胞系列の発生過程は*in vitro* gametogenesisで再現できる：マウスではほぼすべての過程、ヒトでは始原生殖細胞。
- 始原生殖細胞の発生において、ヒト特異的に機能する遺伝子が存在する：*SOX17*, *EOMES*, *GATA2/3*など。
- *in vitro* gametogenesisとゲノム編集技術の組み合わせは生殖細胞発生のメカニズムを理解する上で極めて有効な手段である。
- *in vitro* gametogenesisで得られる配偶子には質的なばらつきがあり、生殖目的の利用には慎重な検討をする。