

論文内容の要旨

氏名	福永直人		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	生第34号		
学位授与の日付	平成25年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第5条該当		
学位論文題目	多能性幹細胞から生殖細胞への分化誘導に関する研究		
論文審査委員(主査)	教授	細井美彦	
	(副主査)	教授	松本和也
	(副主査)	教授	三谷匡

不妊症に対する治療法である生殖補助技術は、著しく進歩発展してきた。その背景には不妊症患者数が年々増加傾向にあり、解決が急がれていることも関係している。しかし、生殖補助技術が進歩した現在においても、早発性卵巣不全や無精子症など、配偶子の存在が認められない症例に対しては、有効な治療法は確立されていない。

近年、様々な幹細胞から生殖細胞を作製する試みが報告され、配偶子を欠損した不妊症に対する新たな治療法となりうる可能性が示唆された。中でも、胚性幹細胞(Embryonic stem cells;ES細胞)を用いた分化誘導研究が多数報告されている。着床前胚である胚盤胞期胚の内部細胞塊を由来とするこの細胞株は、内部細胞塊と同様に、体を構成する全ての細胞に分化することのできる多能性とその能力を維持し続ける自己複製能を併せ持っている。そのため、再生医療の細胞源として期待され、多くの研究がなされてきた。そして現在では、マウスとヒト以外にも、アカゲザルやカニクイザルなど様々な動物種で樹立が報告されている(Evans and Kaufman.,1981;Thomson et al.,1998; Marshall et al.,2001;Suemori et al.,2001)。

マウス ES 細胞を用いた生殖細胞の分化誘導研究では、体外で誘導した始原生殖細胞(Primordial germ cells;PGCs)様細胞を成体のマウス精巣や卵巣に移植することで、受精能を有する配偶子の作出に成功している(Hayashi et al.,2011;Hayashi et al.,2012)。また霊長類 ES 細胞においても、PGC 様細胞が誘導されており(Clark et al.,2004;Teramura et al.,2007)、最近の研究では、ヒト ES 細胞にいくつかの生殖細胞関連遺伝子を過剰発現させることで、減数分裂へと進行し、半数体となった生殖細胞に分化能があると報告されている(Kee et al.,2009;Panula et al., 2011)。霊長類 ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導研究では、受精能を有する配偶子の作出には至っていないが、体外での薬物代謝モデルとして利用できる可能性が示唆されている(West et al.,2012)。

しかし、研究が進展している現在においても、ES 細胞を用いた生殖細胞の分化誘導研究では、誘導効率の低さや不安定さが課題となっている。体外モデル系としての応用を視野に入れた場合、ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導研究におけるこれらの問題点は解決されなければならない。

本研究の第 2 章では、ヒトに近縁種であり移植実験が可能な、カニクイザルの ES 細胞から生殖細胞の分化誘導を行い、誘導効率の改善を試みている。現在までに、カニクイザル ES 細胞を用いた生殖細胞の分化誘導研究から、PGC 様細胞の分化誘導が可能である事は証明されている(Teramura et al.,2007;Yamauchi et

al.,2009)。しかし、どちらの報告も誘導効率は低率(～5%)である。本来 PGCs は、体外の環境では細胞死が引き起こされるため、培養が困難な細胞である。そこで申請者らは、この低率な誘導効率が、誘導後の PGCs における細胞死に起因する可能性を考え、ヒト PGCs の体外培養時において生存性を向上させる白血病阻害因子(Leukemia Inhibitory Factor,LIF)を添加して生殖細胞の分化誘導を行っている(De Felici et al.,2004)。その結果、分化誘導 8 日目において、PGCs で活性が認められるアルカリ性フォスファターゼ(ALP)活性陽性の細胞凝集塊の形成が、LIF 添加区において有意に促進された。さらに、生殖細胞に関連する遺伝子発現およびタンパク質の発現解析を行ったところ、細胞凝集塊において、それらの発現が局在していることが確認された。このことから、LIF が PGC 様細胞の誘導効率を改善することが示唆されている。つぎに、LIF がどのような作用で PGC 様細胞の増加を促しているのか検討するため、まず ALP 陽性細胞数の経時的な変化を観察している。その結果、誘導 6 日目から ALP 陽性細胞数に有意な増加が確認された。そして、この時期に細胞死は誘起されておらず、LIF の作用は細胞死の抑制に影響していないことが確認された。さらに詳細な検討が行われたところ、LIF 非添加区から誘導された PGC 様細胞は減数分裂に進行しているが、LIF を添加して得られた PGC 様細胞は減数分裂に移行していないことが確認された。体外で培養した生体由来の PGCs も自発的に減数分裂に移行することが報告されている。そのため、分化誘導時における LIF の作用としては、減数分裂の進行を抑制することで有糸分裂を行う PGC 様細胞を増加させ、誘導効率の改善を促した可能性が考えられた。また、興味深いことに、LIF の経路を阻害して生殖細胞の分化誘導を行ったところ、PGC 様細胞は誘導できないことが明らかとされた。未分化維持に LIF が効果のない霊長類 ES 細胞は分化が始まると LIF の分泌が行われることが知られている(Aghajanova et al.,2006)。このことから、LIF の作用は増殖を促すだけでなく、PGC 様細胞の分化に重要であることが示唆されている。

第 3 章では、不安定な誘導効率の改善が試みられている。ES 細胞は様々な遺伝子発現パターンを呈する細胞集団が混在していることから、申請者は不安定な誘導効率に関与する要因として、ES 細胞の有する不均一な遺伝子発現に注目した(Canham et al., 2010;Hayashi et al.,2008;Singh et al.,2007;Toyooka et al.,2008)。このような遺伝子発現の異なる細胞間では、分化能に差が生じる。例えば、Nanog 陽性細胞は未分化なコロニーを形成すると共に、生殖細胞系譜の細胞に分化することが可能である。一方、Nanog 陰性細胞は初期内胚系系譜の遺伝子マーカーである *Gata6* の発現を有しており三胚系系譜の細胞に高い分化能を示す(Chambers et al.,2007)。このような ES 細胞の有する不均一性は、細胞株間および培養環境に左右され変化する(Enver et al.,2009)。そのため、生殖細胞の分化誘導

時における不安定な誘導効率の一因となっている可能性が示唆されている(Graf and Stadtfeld,2008)。しかし、カニクイザル ES 細胞では、このような不均一性を是正する培養環境は報告されていない。そこで本章では、安定的な基底状態での維持を促す、MEK/Erk の阻害剤および GSK3 β の阻害剤を添加して培養を行ったマウス ES 細胞を用いて生殖細胞の分化誘導を行い、誘導効率の安定化に繋がるか検討を行っている(Ying et al.,2008)。

蛍光免疫組織化学染色の結果から、2 つの阻害剤を添加して培養した ES 細胞(以下、2i-ESCs)は、コロニー内で遺伝子発現が均一になっていることが確認された。また未分化に関連する遺伝子発現は増加する傾向にあり、初期分化に関連する遺伝子、中でも *Gata6* や *Eomes*、*Tcf3* などの発現が有意に減少することが確認された。このことから、2i-ESCs は不均一性が是正され、同時に未分化性の高い状態にあることが示された。続いて、2i-ESCs から生殖細胞の分化誘導を試みた結果、誘導効率に変化はなかったが、反復実験による誤差が抑えられ、安定的に PGC 様細胞へと分化することが明らかとなった。さらに、2i-ESCs より誘導された PGC 様細胞は、生殖細胞に関連する遺伝子発現やインプリント遺伝子のメチル化の消去など、PGCs が有する特徴をより強く反映していた。これらの結果は、遺伝子発現が均一な状態の ES 細胞から分化誘導を行うことで、誘導効率が安定化することを示唆している。また、2i-ESCs はキメラマウスの作製時に、生殖細胞系譜への寄与率が向上することが確認されている(Kanda et al.,2011)。そのため、2i-ESCs 自体が生殖細胞系譜の細胞へと分化する能力が高い可能性も示唆される。最後に、単離した PGC 様細胞を、不妊マウスである B6WBF1-W/W^y マウス精巣へ移植を行った。移植後の精巣から凍結切片を作製して、生殖細胞に関連するタンパク質の局在を、蛍光免疫組織化学染色を用いて観察している。その結果、 Δ PE Oct4-GFP 陽性/Mvh 陽性の細胞が精細管内に確認された。成体精巣中で、このような遺伝子発現を示す細胞は精子幹細胞のみである(Tanaka et al.,2000)。さらに、そのような細胞の周辺には、減数分裂を完了した精子細胞において特異的な発現を示す HASPIN 陽性の細胞が確認された(Tanaka et al.,1999)。このことから、本実験で誘導した PGC 様細胞は、精子形成過程へ進行する能力を有することが証明された。

本研究結果から、ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導では、分化を誘導する因子のみでなく、分化時における培養環境および分化誘導に供試する ES 細胞自体の培養環境も重要であることが示唆された。近年の研究展開から、本研究で得られた成果は生殖細胞の分化誘導研究へ大きく貢献できる可能性が示唆される(Bao et al.,2009;Buecker et al.,2010;Hanna et al.,2010;Gu et al.,2012)。このように、本研究結果は、ES 細胞からの生殖細胞分化誘導研究を体外モデル系として応用する際に重要な知見となると考えられる。

論文審査結果の要旨

現在、多能性を有する胚性幹細胞(ES 細胞)を用いて、様々な細胞への分化誘導が報告されている。この研究は、誘導した細胞を医療に適用する再生医療への応用が期待されている。また、近年では誘導多能性幹細胞(iPS 細胞)の樹立が報告され、一層の期待が寄せられている。これら多能性幹細胞は体外において、すべての系譜の細胞へと分化が可能であることが報告されており、生殖細胞も例外ではない。多能性幹細胞から生殖細胞への分化誘導系を確立することは、生殖細胞の形成過程を研究する上で有効であり、発生生物学を含めた生命科学の進展に貢献するだろう。また、臨床的にも配偶子を欠損した不妊症に対する、新しい治療法を提示する可能性を有している。しかし、多能性幹細胞からの生殖細胞の分化誘導研究を、体外モデル系へと応用するためには改善すべき問題点が多い。そこで、本研究ではそれらの問題に取り組み、以下の点を明らかにした。

まず、第2章では、カニクイザル ES 細胞を用いた生殖細胞の分化誘導研究で誘導効率の改善を試み、白血病阻害因子(LIF)の添加によって生殖細胞の誘導効率が上昇することを突き止めた。カニクイザルはヒト前臨床モデル動物として有効な動物種であり、実証的な実験として移植実験や産仔の作出が可能であるため、生殖細胞の分化誘導実験から得られる知見は重要となる。しかし、生殖細胞の誘導効成功率は低率であり、研究の進展を阻む要因となっていた。そのため、効率を向上させる LIF の添加は体外モデル系の確立に大きく貢献する結果であると考えられる。

また、本研究では生殖細胞の分化誘導に平面培養を用いており、その有効性も証明されている。現在までにカニクイザル ES 細胞から生殖細胞の分化誘導には ES 細胞を浮遊培養し、立体構造を構築することでのみ成功している。マウス、ヒト ES 細胞においては、平面培養を用いることでも誘導が可能となることは証明されているが、カニクイザル ES 細胞では今回の報告は新規なものである。これは、薬剤投与などの実験において、添加因子の影響を均一に反映する必要性がある場合に有効となり、体外モデルとしての平面培養系の実用性の価値を高めるものであると考えられる。

めるものであると考えられる。

続く第3章では、ES 細胞から生殖細胞の誘導効率の不安定性の改善を試みている。この実験では、分化の詳細なメカニズム研究が検討可能であるマウス ES 細胞を用いて、ES 細胞の有する不均一性を是正することが生殖細胞の誘導効率を安定させることを突き止めた。同時に、この結果は株差に影響されることなく、汎用性が高いことを証明した。現在まで生殖細胞の分化誘導研究における誘導効率は報告間で差が生じているが、本研究を応用することで誘導効率の安定化および標準化が可能となることが考えられる。そのため、本研究より得られた結果は、生殖細胞の分化誘導研究をメカニズム研究へ応用する際に重要な知見となると考える。

加えて、本論文は詳細な遺伝子発現の検討から、不均一性が是正された ES 細胞自体が生殖細胞へと分化する能力の高い細胞である可能性を示唆していた。このことは、現在までの幹細胞特性を研究した報告と矛盾点はないが、全く新しい可能性であり、非常に興味深い内容である。生殖細胞の分化誘導研究のみならず、今後の幹細胞研究にも大きく影響する可能性が示唆される。

以上の点を明らかにした本研究結果は、ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導研究を応用展開するために必要な基礎研究として重要な知見を含んでいると考えられる。ここで、最も評価する点は、従来の研究とは異なった着想およびアプローチを試みた点である。ES 細胞からの分化誘導研究における誘導効率の改善および安定化には、誘導を促進する因子をスクリーニング等により同定することが主流となっている。生殖細胞の分化誘導研究においても例外ではないが、本研究で提案された改善方法は誘導を促進する因子ではなかった。第2章で生殖細胞の誘導ではなく維持に、また第3章では誘導に供試す ES 細胞の培養環境に注目して実験が展開されている。この着想は非常に独創的である。またそこから得られた結果と考察も興味深く、今後の生殖細胞の分化誘導研究のみならず、幹細胞の性質研究においても重要な報告となると考える。以上のように、本論文は、ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導の研究において課題となる誘導効率の改善および安定化を行ったものであり、博士(工学)論文として価値あるものと認める。