

「生殖細胞の発生機構の解明と その試験管内再構成」



京都大学大学院医学研究科 教授 **斎藤 通紀 氏**

それでは、受賞させていただきました「生殖細胞の発生機構の解明とその試験管内再構成」のお話をさせていただきたいと思えます。

まず、なぜ私がこういう仕事を始めたかということですが、ヒトの体は細胞で構成されていますが、この細胞は体細胞と生殖細胞に大きく分けられます。体細胞は我々の体の機能を維持していくために必須な細胞であります。一方で、生殖細胞は精子、卵子のような、生命を次の世代につないでいく細胞です。では、生殖細胞にどのような能力、メカニズムが潜んでいるからそうしたことができるのかということに興味を持ちまして、この分野の研究を始めた次第であります。

ただ、精子や卵子というものをしているだけではその答えがわからないだろうと思い、この精子や卵子は一体どのような細胞から生まれてくるのかということに着眼いたしました。そうしますと、精子や卵子という細胞は胎児期にあらわれます始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells: PGCs) という細胞に由来することがわかりました。PGC はマウスの場合、発生初期の受精後 6.5 日前後にあらわれ、発生途上の腸の中を動いて生殖巣にたどり着き、そこで精子や卵子への分化を始めます (図 1)。そこで、まずは PGC がどう形成されるかというのを解明しようと考えました。

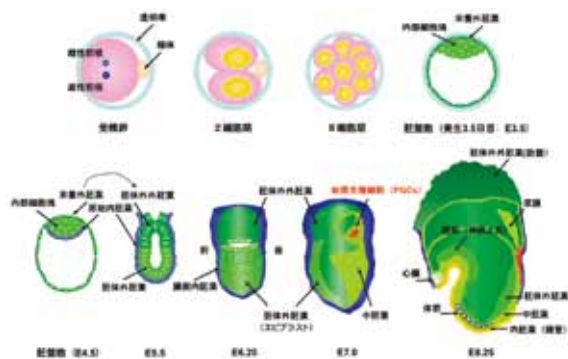


図 1

それを研究するために、アジム・スラーニー博士 (M. Azim Surani) のもとに留学しました。

実際どうやったかといいますと、PGC 形成の際に働く遺伝子を同定するために単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を行いまして、*Fragilis*、*Stella*、さらにはその後、*Blimp1* や *Prdm14* という遺伝子を見つけました。

このうち *Stella* という遺伝子は生殖細胞の形成には重要ではなかったのですが、卵子が正しく機能するために必須のたんぱくでありますし、生殖細胞のマーカーとしては今、全世界で使われているマーカーであります。

Blimp1 と *Prdm14* の話をいたします。このあたりからは理化学研究所での研究です。

BLIMP1 と PRDM14 (注: 遺伝子名は最初の文字のみ大文字で、Italics style で、遺伝子を基に作られる蛋白質はすべて大文字で、Roman style で書かれます) は、PGC の形成に必須な転写制御因子であることがわかりました。PGC が形成されるときには、体細胞化の抑制、多能性の再獲得、さらにはエピゲノム・リプログラミング、この 3 つの現象が起こっていることがわかりましたが、BLIMP1 はこの 3 つにすべてに重要で、また PRDM14 はこのうちの少なくとも 2 つ (多能性の再獲得とエピゲノム・リプログラミング) に必須であるということがわかりました (図 2)。

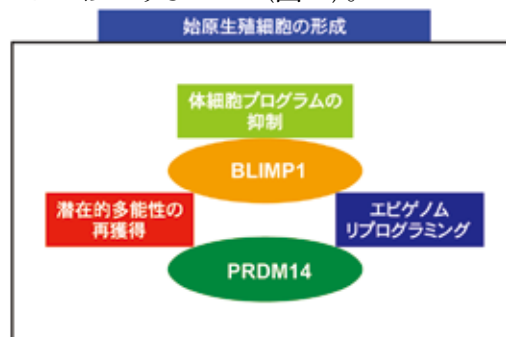


図 2

こうしたことがわかってきますと、次は、これら 2 つの遺伝子がなぜエピブラスト (胚体外胚葉) (図 1) と呼ばれる、PGC と全ての体細胞もともなる細胞の一部に発現してくるのかということが問題となりました。簡単に原理をま

とめますと、発生5.5日目ごろではすべてのエピブラストは生殖細胞になれる能力をどうも持っているみたいです。ところが、臓側内胚葉という細胞層が、前のほうは「神経細胞になれ」というシグナルを出します。一方、胚体外外胚葉という細胞層は、「生殖細胞になれ」というシグナルを送りまして、そのバランスで、エピブラストの後ろの一部が *Blimp1* 陽性の PGC になると。こうした原理を基に、エピブラストをとってきてうまく培養しますと PGC に似た細胞ばかりを培養ディッシュ上でつくるのが出来ました。

こうした細胞の遺伝子発現やエピゲノムプロファイルを細かく見たのですが、PGC に非常にそっくりであることがわかりました。次に、そっくりだからといってほんとうに生殖細胞になる能力を持っているのかというところが問題となりました。

それを証明する実験ですが、培養ディッシュ上でつくった PGC に似た細胞を、生殖細胞を形成出来ないオスマウスの精巣に移植してみました。そうすると、その中で、培養ディッシュ上でつくった細胞由来の精子が形成され、それら精子を、野生型の卵子と顕微授精させると健全な子孫が生まれてきました。こうした実験から、エピブラストからであれば、正しい機能を有した PGC に似た細胞をつくれることがわかったわけです。

こうしたことを受けまして、開始材料としてエピブラストではなく、ES 細胞 (embryonic stem cells) や iPS 細胞 (induced pluripotent stem cells) などの多能性幹細胞から PGC に似た細胞を培養ディッシュ上で作れないかということになりました。ES 細胞や iPS 細胞から PGC に似た細胞を作れますと、原理的には大量の生殖細胞を作れることになり、生殖細胞の研究を飛躍的に進めうると考えました。そこで、京都大学に移ってからは、この研究に取り組みました。

エピブラストを使うと始原生殖細胞ができるということがそれまでの研究でわかっていたので、ES 細胞や iPS 細胞をまずはエピブラストに似た細胞にしたらいいのではないかと考えました。ES 細胞や iPS 細胞をある種のサイトカインでエピブラストそっくりのエピブラスト様細胞 (Epiblast-like cells) に誘導出来ることがわかりました。次に、エピブラスト様細胞を、エピブラストを PGC に似た細胞に誘導したのと同じ方法で誘導しますと、PGC 様細胞 (Primordial germ cell-like cells) が誘導出来ました。この細胞を集めてきまして再び生殖

細胞を形成出来ないオスマウスの精巣に移植してみました。すると、PGC 様細胞は精子になりまして、それらは顕微授精の結果、健全な子供に貢献しました (図3)。



図3

では、PGC 様細胞から卵子はできるのだろうかというのが次の課題になりました。

そこで、メスの ES 細胞や iPS 細胞から誘導した PGC 様細胞を、胎児の卵巣を構成する体細胞と凝集培養し、再構成卵巣という卵巣と似た組織を培養ディッシュ上で作成してみると、その中で卵子とそっくりの細胞が出来上がってくるようになりました。ただ、この卵子に似た細胞はそのままでは機能しませんでした。

そこで、この再構成卵巣をマウスに移植してみようということになりました。再構成卵巣を免疫力の弱いヌードマウスの卵巣被膜下に移植しますと、再構成卵巣内で、二次卵胞でありますとかグラーフ卵胞に近いような卵子が発生していました。

それでは、この卵子が果たして子供をつくれるのだろうかということに次に検証しました。卵子をとってきまして、試験管内成熟、試験管内受精、胚の培養を行ったのですが、受精卵ができ、それが2細胞胚、4細胞胚、さらには胚盤胞になりました。この2細胞胚を仮親に移植してやりますと、少々確率は低かったのですが、健全な子供が生まれてきました (図3)。

これらの結果から、卵子や精子のもとになる PGC 様細胞をつくることまでは、機能を伴って非常に効率よく再現できるということがわかりました。

こうしたことができると、次はどのような研究をしようかということになるのですが、第一に、生殖細胞の形成に十分な転写制御因子をこの系を使って証明することが出来るかということに挑みました。

それをするために、遺伝学的にいろいろな仕掛けを行ったES細胞を作りました。このES細胞をエピブラスト様細胞に誘導し、ここに薬剤ををかけると、ES細胞の段階で組み込んでおいた転写因子が発現するようにしました。こうした実験の結果、*Blimp1*, *Prdm14*, *Tfap2c* の3つを発現させると、エピブラスト様細胞が80%以上の効率でPGC様細胞になることがわかりました。

転写因子で誘導したPGC様細胞、サイトカインで誘導したPGC様細胞、生体内のPGCの全遺伝子発現動態を測定し比較した結果、転写因子で誘導した場合、非常に速やかにPGC様の遺伝子発現を呈することがわかりました。さらにいろいろと検討した結果、PRDM14一つを発現しても同じようなことになるということがわかりました。

では、こうした転写因子で誘導された生殖細胞も本当に精子や卵子になれるのかということが次の問題になりました。精子のほうで検証したのですが、転写因子で誘導したPGC様細胞を、これまでと同じく、生殖細胞を形成出来ないオスマウスの精巣に移植しました。そうすると、転写因子で誘導したPGC様細胞から非常にきれいな精子ができることがわかりました。これら精子を顕微授精してやりますと健全な子供が生まれてきてまして、雄、雌ともに次の世代を産む子供に成長しました。こうしたことから、今や転写因子を用いても大量に生殖細胞をつくることのできるようになったわけでありました。

ここまでお話して来ましたが、我々が培養ディッシュ上で再現出来るようになったのは、生殖細胞の発生過程のごく一部で、PGCの形成過程とその後の一部の発生過程です(図4)。

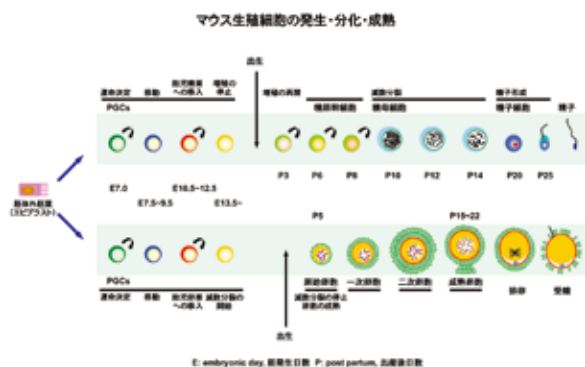


図4

ですが、精子の場合、PGCから次に精子形成

のもとになる精原幹細胞という細胞が発生しますが、精原幹細胞は培養ディッシュ上で増やすことが出来ることを京都大学の篠原隆司先生のグループが示されていますし、新生児の精巣ごと体外で培養すると、精原幹細胞から精子が誘導できることを横浜市立大学の小川毅彦先生のグループが示されています。ですので、我々の培養法をさらに発展させ、これらの方法と融合すると、マウスの場合、ES細胞やiPS細胞から、培養ディッシュ上で精子まで作ることが出来る日が来るかもしれません。

卵子の場合はどうでしょうか。PGCは次に卵母細胞に分化し、卵母細胞は卵巣の体細胞に取り囲まれて、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、グラーフ (Graaf) 卵胞と成長していきます。1996年にジョン・エピック博士 (John J. Eppig) が原始卵胞からグラーフ卵胞を誘導して子供をつくることに成功しています。また、2000年ごろに東京農業大学の河野先生、尾畑先生が、PGCからグラーフ卵胞様の卵胞を作成し、核移植技術を用いて、子供をつくることに成功しています。したがって、PGC様細胞から機能的な原始卵胞を誘導出来れば、マウスの場合、ES細胞やiPS細胞から、培養ディッシュ上で成熟した卵子まで作成出来るかもしれません。

では、同様な研究をヒトで行うことは出来るのでしょうか？数年前に有名な発生生物学者のジャネット・ロサン博士 (Janet Rossant) が「発生生物学の多能性幹細胞研究におけるインパクト 成功と挑戦」というタイトルで論文を書いておりますが、その内容を一言でまとめますと、当たり前かもしれませんが、ヒトとマウスは違うということです。したがって、提言としまして、ヒト多能性幹細胞を基盤とした医療の実現にはヒトもしくは霊長類の発生生物学的研究が大事であるとおっしゃっています。

我々もそのように考えまして、今までどおりマウスの研究は続けますが、ヒトにより近いカニクイザルを用いましてその発生機構や生殖細胞の形成機構を研究しようというプロジェクトを始めています。その中でもエピゲノム・リプログラミングの分子機構解明を大事な柱に据えまして、その解析をさらに進めていこうと考えています。こうした研究をあわせまして、ヒト生殖細胞発生過程の再構成でありますとか細胞のエピゲノム状態の制御戦略の開発というのを行いたいと思っています。ヒト生殖細胞発生過程の再現が出来ますと、それを基盤にした不妊や染色体異常発生の病態解明でありますとか、発生過程におけるエピゲノム異常の発生機序の

解明につながりますし、治療法の開発にも貢献できると思います。

ヒトに一番近いのは現存ではチンパンジーやゴリラですが、これらを実験に使うことは出来ません。実験に使えるヒトに一番近い霊長類はマカク (Macaque) という種類になります。我々が使うのはカニクイザルと呼ばれるやや小型のサルであります。

マウスとカニクイザルとヒトのゲノム配列を比較しますと、マウスとヒトではかなり違うということがわかります。ところが、カニクイザルとヒトでは、当たり前といえば当たり前ですが、そっくりであります。

滋賀医科大学でカニクイザルの発生工学技術というのが開発されています。ヒトの不妊治療で用いられるのと同じ方法で卵を成熟させまして、腹腔鏡で卵巣から卵子を回収してきます。それに顕微授精してやります。そうすると胚盤胞まできれいに発生しまして、これを母体に戻しますとちゃんと子供ができます。この方法は、母親から卵はもらいますが、決して母親を犠牲にする必要はありません。この方法で得られる初期胚を用いて、多能性幹細胞や生殖細胞が形成される原理の、マウスとサル、さらにはヒトでの違いを、生体の現象に着目して研究していると考えています。

最後になりますが、2008年、世界で初めて体外受精が行われてから30年経ったことを記念しまして、『ネイチャー (Nature)』誌が特集をしました。体外受精が出来て30年、それでは、次の30年どのような方法で人類は赤ちゃんをつくらせているのだろうかということを世界中の著名な発生生物学者や産婦人科医に聞きました。ダボア・ゾルター (Davor Solter) 博士という、私が留学したアジム・スラニー (M. Azim Surani) 博士とともにゲノムインプリントを発見した著名な発生生物学者は、皮膚由来のiPS細胞から精子や卵子がつくられるのではないかと。さらに20~30年後には、ある研究者がiPS細胞由来の2万個のヒト胚作製研究というのを提案しまして、それは素晴らしい研究だということで社会がゴーサインを出す時代が来るかもしれないということを言っておられます。

我々は生殖細胞の持っている能力を解明して、細胞のエピゲノム制御とか自由な増殖ということを目指して研究を始めました。ですが同時に生殖細胞をつくるということをしてきておりますので、実際ゾルター博士が予測するような研究につながる可能性もあります。ですので、研究の科学的な正当性はもちろんのこと、倫理

的・哲学的な観点からも議論を尽くしていく必要性を感じています。

以上であります。どうもありがとうございました。(拍手)

【講師紹介】 齋藤 通紀 氏

京都大学大学院医学研究科 教授

平成 7年3月 京都大学医学部卒業
平成11年3月 京都大学大学院医学研究科修了
平成 8年4月~平成11年3月 日本学術振興会特別研究員DC1
平成11年4月~平成13年7月 日本学術振興会特別研究員PD
平成12年1月~平成14年12月 Wellcome Travelling Research Fellow
平成15年1月~平成15年5月 Wellcome Senior Research Associate
平成15年4月~平成22年3月 独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター チームリーダー
平成15年10月~平成19年3月 独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 PRESTO 研究者(兼任)
平成16年4月~平成21年3月 京都大学大学院生命科学研究科 連携併任准教授(兼任)
平成20年8月~平成21年3月 京都大学大学院医学研究科 客員教授(兼任)
平成21年4月~現在 京都大学大学院医学研究科 教授
平成21年10月~平成24年3月 独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 CREST 研究代表者(兼任)
平成21年12月~平成25年1月 京都大学 物質—細胞統合システム拠点 連携教授(兼任)
平成23年8月~現在 独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 ERATO 研究総括(兼任)
平成24年4月~平成25年3月 京都大学 iPS細胞研究所 特任教授(兼任)
平成25年2月~現在 京都大学 物質—細胞統合システム拠点 連携主任研究者(兼任)
平成25年4月~現在 京都大学 iPS細胞研究所 研究員(兼任)