



ES 細胞から生殖細胞へ新手法

高価なたんぱく質を用いず、始原生殖細胞への分化効率が 90%以上に上昇

動物実験の効率化が生殖医療の基礎研究を促進

生殖細胞である卵子・精子のもととなる始原生殖細胞^{*1}は、身体のいかなる細胞にもなれる性質(多能性)を持つ ES 細胞^{*2}(胚性幹細胞)を分化させて作ることができますが、高価なたんぱく質を必要とする上、分化効率が約 40%であることから、多くの時間と費用がかかることが課題でした。

本学の村上和弘助教と英ケンブリッジ大学の研究グループは、始原生殖細胞への分化をコントロールする新たな遺伝子を発見しました。これにより、高価なたんぱく質を用いずに、多能性細胞から始原生殖細胞への分化効率が 90%以上という画期的な手法を確立しました。これらの発見は、生殖細胞ができるメカニズムの全容解明や生殖医療の基礎研究の促進、また動物実験を必要とするあらゆる研究に大きく貢献するものです。本研究は、英「*Nature*」誌のオンライン速報版に掲載されました。

<論文発表の概要>

研究論文名 : NANOG alone induces germ cells in primed epiblast *in vitro* by activation of enhancers (NANOG は、分化したエピブラスト細胞内でエンハンサーを活性化し、生体外において生殖細胞を誘導する)

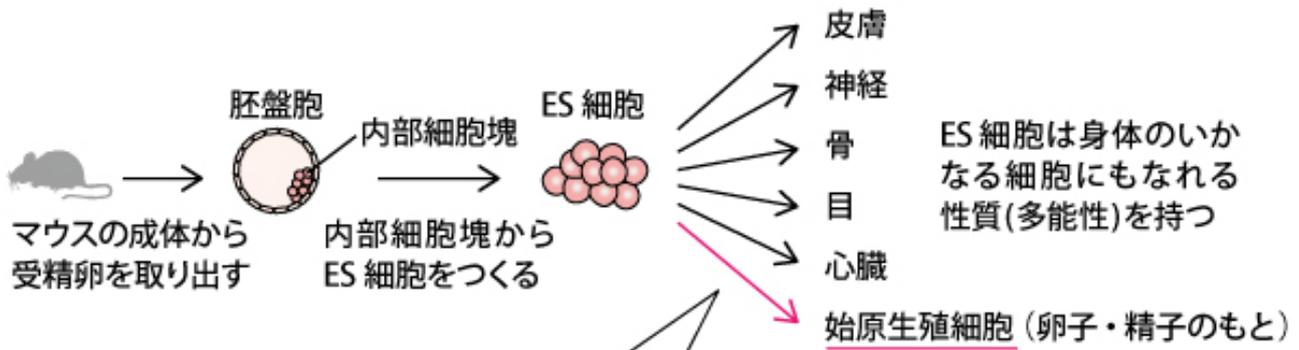
著者 : 村上和弘¹, Ufuk Gunesdogan², Jan J. Zylicz², Walfred W.C. Tang², Roopsha Sengupta², 小林俊寛², Shinseog Kim², Richard Butler², Sabine Dietmann², Azim Surani²

(¹北海道大学, ²英ケンブリッジ大学)

公表雑誌 : *Nature*

公表日 : 日本時間 (現地時間) 2016 年 1 月 12 日 (火) 午前 1 時 (英国時間 2016 年 1 月 11 日 (月) 午後 4 時) (オンライン公開)

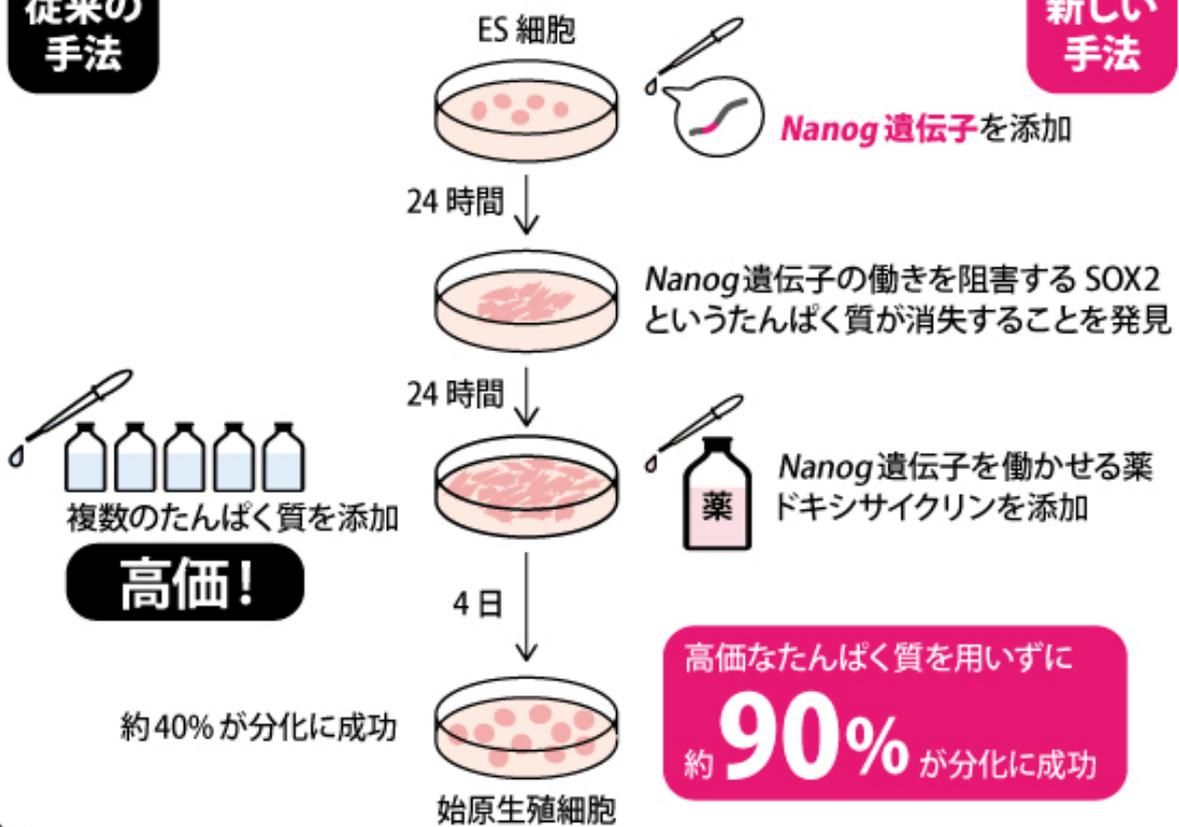
<1. 新手法のポイント>



ES細胞から始原生殖細胞を作る新手法を確立!

従来の手法

新しい手法



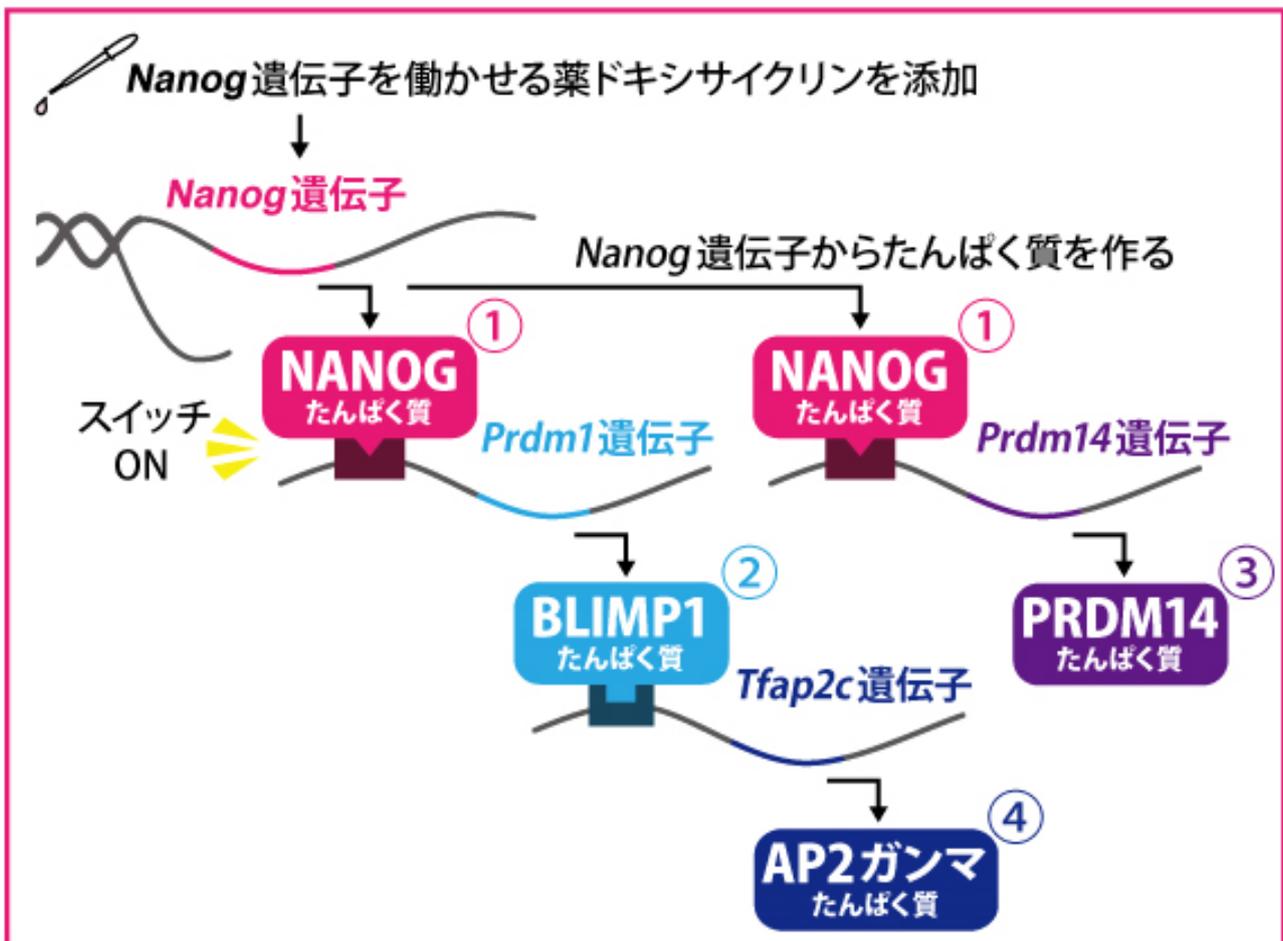
<2. Nanog (ナノグ) 遺伝子の働きを説明>

新しい手法の主役となっているのが *Nanog*(ナノグ) 遺伝子です。この遺伝子が働くと NANOG たんぱく質をつくります。この NANOG たんぱく質が連鎖的に別の遺伝子を働かせることで始原生殖細胞への分化に必要な3つのたんぱく質を発現させることを解明しました。

始原生殖細胞への分化に必要な十分な3つのたんぱく質が発現するまでの順序

遺伝子が働くきっかけになるもの	働く遺伝子	発現するたんぱく質	図内番号
ドキシサイクリン(薬)	<i>Nanog</i> 遺伝子	NANOG たんぱく質	①
NANOG たんぱく質	<i>Prdm1</i> 遺伝子	BLIMP1 たんぱく質	②
NANOG たんぱく質	<i>Prdm14</i> 遺伝子	PRDM14 たんぱく質	③
BLIMP1 たんぱく質	<i>Tfap2c</i> 遺伝子	AP2ガンマ たんぱく質	④

始原生殖細胞への分化に必要な十分な3つのたんぱく質

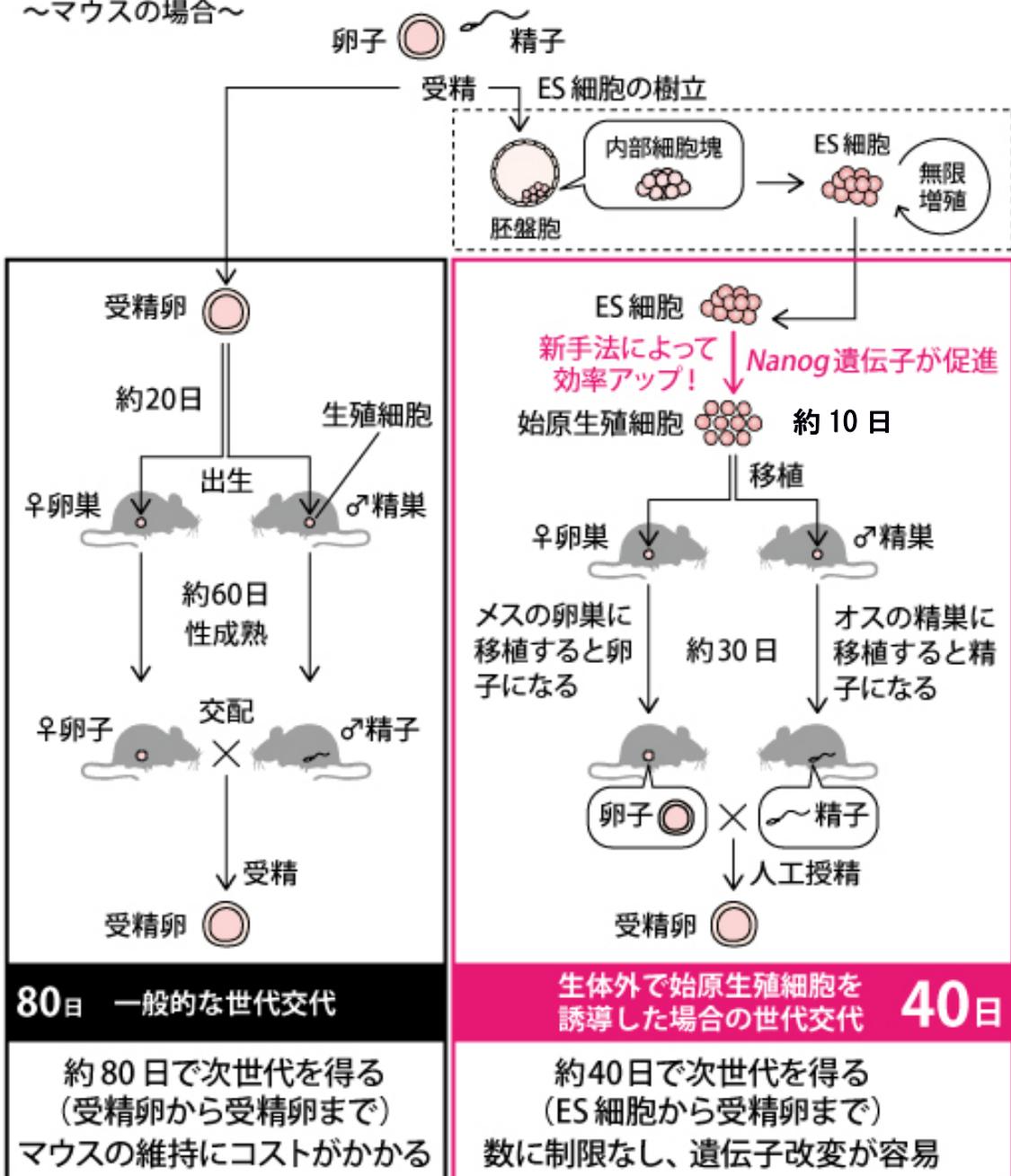


<3. 動物実験が効率的になる仕組み>

一般的な自然交配によるマウスの世代交代には約 80 日かかり、マウスが多数必要で維持していくためのコストもかかります。比べて、生体外での始原生殖細胞誘導を用いると、一度 ES 細胞を樹立してしまえば無限に始原生殖細胞が得られ、遺伝子改変も容易で凍結保存も可能です。さらに、ES 細胞から約 40 日という短期間で次世代の受精卵を得ることができます。今回の発見によって、ES 細胞から始原生殖細胞への分化効率が格段に上がるため、安定的に始原生殖細胞を得ることができるようになり、動物実験の効率化とコストの軽減が見込めます。さらに、マウスだけでなく一世代が長い動物種ではより一層の効率化が期待できます。

世代交代の迅速化 (一世代が長い動物ほど効率的!)

～マウスの場合～



<研究成果の概要>

(背景)

生殖細胞は生命の連続性を保証するために欠かすことのできない細胞であり、その発生は必須サイトカイン^{*3}(分泌性シグナル伝達たんぱく質)によって時空間的に厳密に制御されています。しかし、生体内における初期生殖細胞の数は少なく、分子生物学的・生化学的な解析が難しいため、初期生殖細胞の発生を制御・保証するメカニズムの多くは明らかになってはいませんでした。私たちは初期生殖細胞を生み出すメカニズムの解明と生殖医療応用、動物実験に要する時間の大幅短縮による科学研究の飛躍的加速を目指した効率の良い生体外生殖細胞誘導法の確立を目的として研究をスタートさせました。

(研究手法)

生殖細胞へ分化することで緑色蛍光を発するように工夫されたマウスの胚性幹細胞(ES 細胞)を出発点にして、特別な培養液の中に 2 日間浸すことで、生殖前細胞^{*4}(エピブラスト様細胞)を作りました。この前細胞で生殖細胞の発生に大事であると思われる候補遺伝子を働かせることで、生体外で初期生殖細胞の誘導を制御・促進する遺伝子を特定しました。

(研究成果)

iPS 細胞^{*5}を作る過程でその重要性が知られている転写因子^{*6}*Nanog* を入れることで、90%以上の細胞が緑色蛍光を発するようになり、非常に効率よく始原生殖細胞が生じていることが明らかとなりました。さらなる解析により、*Nanog* は、これまでに知られている必須サイトカイン(分泌性シグナル伝達たんぱく質)とは独立に働き、生殖細胞の発生に必要な 3 つの遺伝子の発現制御領域^{*7}(エンハンサー)に結合し、それらの遺伝子の発現を直接・間接的に誘導することが明らかとなりました。

一方で、*Nanog* に対する生殖前細胞の感受性は、誘導 1 日目と 2 日目では大きく異なりました。*Nanog* は 2 日目の生殖前細胞からのみ初期生殖細胞を誘導します。この感受性を左右する分子メカニズムとして、*NANOG* ともう一つの転写因子 *SOX2* が経時的にその働きを変化させていることを明らかにしました。これらの結果は、生殖細胞の初期発生過程においては、状況依存的な転写因子の使い分けが大事であることを示唆しています。

<今後への期待>

- 初期生殖細胞を生み出すメカニズムの全容解明
- 胚性幹細胞(ES 細胞)や iPS 細胞と生殖細胞の発生・維持に関する共通原理の解明
- 生殖医療への応用、畜産業や遺伝資源保全への応用
- 動物実験を必要とする多くの科学研究の加速に期待
- がんの抑制に向けた治療法の開発に期待

本研究を発展させることで、遺伝子の相互作用を介して生殖細胞の発生を支配する機構の全容解明が期待されます。また、生殖医療へ向けた安全な生殖細胞の体外誘導法の確立のみならず、優秀な家畜を効率良く維持・作出する技術の確立、希少動物の保護・繁殖技術の確立など産業応用への基盤開発が促

進されることが期待されます。さらに、多能性幹細胞 (ES 細胞や iPS 細胞) から生体外で生殖細胞を誘導することで、個体の性成熟過程を経ずに次世代を誕生させることが可能となるため、霊長類などの一世代が長い生物を用いた実験に要する時間が劇的に短くなり、動物実験を必要とする多くの科学研究が飛躍的に加速することも期待されます。生殖細胞はがんマーカーを発現しつつも、そのままでは生体内でがん化しない細胞です。今回 *Nanog* により作成した生殖細胞も同様の特徴を持っており、この仕組みを解明することで、がんの抑制法の開発につながることを期待されます。

今回、私たちはマウスのみならずヒトを含めた霊長類においても、生殖細胞を人為的に操作できる可能性を持つ新たな手法を開発しました。しかし、ヒトにおける生殖細胞の研究は、倫理的な課題を十分に検討しつつ、遂行するかどうか慎重に判断する必要があります。

<お問い合わせ先>

北海道大学大学院先端生命科学研究院 助教 村上 和弘(むらかみ かずひろ)

TEL:011-706-9083 FAX:011-706-9083 E-mail:murakami@sci.hokudai.ac.jp

ホームページ:

北海道大学 大学院先端生命科学研究院 生命融合科学コース

分子細胞生物学研究室(小布施研究室)

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/infgen/>

Azim Surani laboratory, Wellcome Trust/ Cancer Research UK Gurdon Institute, University of Cambridge

<http://www.gurdon.cam.ac.uk/research/surani>

<用語解説>

*1 始原生殖細胞

卵子・精子のもととなる初期生殖細胞。受精後、細胞分裂を繰り返して初期発生が進む過程で、胎仔の体の中で生じる生殖細胞のもと。後に、雌ならば卵巣で卵子へ、雄ならば精巣で精子へと分化する。

※生体外で誘導した始原生殖細胞は、生体内で得られたものと区別するため、正確には始原生殖細胞様細胞 (Primordial Germ cell-like Cells; PGCLCs) と言うが、本文中では簡略化のため「様細胞」の部分は省略している。

*2 ES 細胞

胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells)。身体の全ての組織に分化できる能力を持つ細胞。生体外でほぼ無限に増殖できる細胞株として樹立される。人為的に様々な遺伝子操作を加えることができるため、特定の遺伝子の働きを調べる実験に広く使われる。

*3 サイトカイン

分泌性シグナル伝達たんぱく質。細胞間の情報伝達を担い、細胞の分化、増殖など様々な生命現象の調節に関与している。

*4 生殖前細胞

身体の全ての組織を構築することになる未分化な細胞集団であるエピブラスト（着床後胚）によく似た性質を持つエピブラスト様細胞（Epiblast-like Cells）。体外培養系において始原生殖細胞へと分化する能力がある。

*5 iPS 細胞

人工多能性幹細胞（induced Pluripotent Stem Cells）。体細胞を初期化することにより樹立される細胞株。ES 細胞と同様に生体外でほぼ無限に増殖でき、身体の全ての組織に分化できる能力を持つ一方、初期胚を壊して樹立する必要がないため、倫理的な問題が生じないなど様々なメリットがある。

*6 転写因子

遺伝子が機能するには、DNA の遺伝情報がメッセンジャーRNA へと転写され、その後たんぱく質へと翻訳される必要がある。転写因子は、DNA に特異的に結合するタンパク質の一群であり、エンハンサーなどの DNA 上の特定の領域に結合し、遺伝情報の転写を制御する。iPS 細胞は4つの転写因子を体細胞で人為的に発現させることによりつくられた。

*7 遺伝子の発現制御領域

DNA 上の特定の領域であり、エンハンサーと呼ばれる。転写因子（*6 参照）と結合することで遺伝子の発現を調節している。