

博 士 論 文 （要 約）

免疫不全動物を用いた異種異所発生による
始原生殖細胞からの生殖腺様組織誘導

葉 山 智 工

論文の内容の要旨

論文題目 免疫不全動物を用いた異種異所発生による
始原生殖細胞からの生殖腺様組織誘導

氏名 葉山 智工

研究の背景

不妊症の治療法は年々進歩しているがその一方でそうした治療の恩恵にあずかることの出来ない絶対不妊の患者が注目されている。Turner 症候群などの性分化異常 (disorder of sex development: DSD) に合併する配偶子形成不全の患者は現在の不妊治療でその遺伝子を引き継いだ子どもを得ることは不可能である。こうした患者は卵巣内に原始卵胞が無く、原始卵胞を取り出して試験管内卵胞発育 (in vitro Growth: IVG) を行うことは出来なく、子供を得るためには何らかの方法で卵を作成する必要性がある。

卵の起源となる始原生殖細胞 (primordial germ cell: PGC) はマウスでは胎生 7.5 日齢、ヒトでは妊娠 5 週 (胎生 3 週) 胚 Epiblast 中に発生する。移動、胎児性腺 (生殖隆起) 内への定着、増殖を経てから卵原細胞、卵母細胞へと分化する。卵は第一減数分裂複糸期で一旦停止し、卵核胞 (germinal vesicle: GV) 期の状態で思春期以降まで維持される。胎児期に作られた卵母細胞は原始卵胞の形で保存され生涯、排卵されるだけで、新生することは無いと考えられている。この卵を作成する方法の一つとして多能性幹細胞からの誘導が注目されている。

多能性幹細胞を用いた再生医療研究は iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell: iPSC) が報告されてから国内外で加速され、ES 細胞 (embryonic stem cell: ESC) や iPSC から様々な細胞・組織の誘導が試みられ、その機能の解析が行われている。生殖細胞への分化誘導も 2000 年代前半には bone morphogenetic protein 4 (BMP4) などを用いた PGC 誘導の報告がされ、続いて 2006 年には Nayernia らがマウス ESC から PGC そして 1 倍体精子細胞を分化させ、顕微受精により産仔に至ったと報告した。その後、2011 年には Schöler HR. らによりマウス胎児 PGC における遺伝子発現パターンは ESC などの多能性幹細胞と近いことが報告され、2012 年には Saitou らが Stella、Blimp1、Prdm14 などの PGC で発現している遺伝子のプロモーター下流に蛍光タンパク質を組み込んだレポーターマウスを用いてマウス多能性幹細胞からの機能的雄・雌の PGC 誘導法を報告した。この報告では多能性幹細胞から雄・雌のどちらの生殖細胞の誘導にも成功し、また産子も正常に発育している。このようにマウスでは機能的な PGC 様細胞 (PGC-like cell: PGCLC)

が多能性幹細胞から分化誘導が可能になった。

この新たな技術はヒトの不妊治療は元より、絶滅危惧種の種の保存などへ応用されることが期待されるが、一方で、実際にこの方法をマウス以外の動物種に適応し、生殖細胞を得る為には *in vitro* で誘導した PGC を異種の動物に移植し、性腺様構造を作成しなければならない。しかしながら、これまでに PGC を異種の動物に移植し、性腺様構造を作成した例は無く、異種体内で PGC が性腺様構造を構築できるかは明らかではない。

そこで、私の研究は、マウスとラットという異種動物を利用し PGC の異種間移植による性腺様構造作成およびその性腺様構造より得た生殖細胞を成熟させ産仔を得ることで生殖細胞再生の小動物モデルを作成し、proof of concept (POC) を確立することを目的とした。

方法

1、ラット PGC の免疫不全マウスへの移植によるラット性腺様構造の構築： 胎生 14.5 の雌ラットより減数分裂を起こしていない後期 PGC を採取し、免疫不全マウス (NOD-SCID マウス又は NOG マウス) の同所または腎被膜下に移植した。胎児性腺間質細胞との共移植の方法は胎児生殖隆起全体を腎被膜下に移植する単純移植法と Shen らの報告した酵素で単一細胞に分離させ、再び凝集させる再凝集法を採用した。次に卵巣様組織の組織学的な検討を行う為に得られた卵巣様組織の組織染色を行い、さらに、卵巣組織としての機能を検定する為に、赤色蛍光タンパク質である tdTomato の蛍光を発現するラット胎児生殖隆起より卵巣様組織を作成し F344 ノードラットに移植して腔垢検査、交配試験を行った。

2、マウス PGC の免疫不全ラットへの移植によるマウス性腺様構造の構築： 緑色蛍光タンパク質である GFP を全身で発現する GFP マウスの胎生 12.5 の雌より減数分裂を起こしていない後期 PGC を採取し、再凝集法により去勢した免疫不全ラット (IL-2gKO ラット) の腎被膜下に移植した。次に卵巣様組織の組織学的な検討を行う為に得られた卵巣様組織の組織染色を行い、さらに、その卵巣様組織から得られた生殖細胞の機能を調べる為に試験管内卵成熟 (*in vitro* maturation: IVM) により成熟能を解析し、受精可能になった卵に対しては卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) を行った。

結果および考察

1、ラット PGC の免疫不全マウスへの移植によるラット性腺様構造の構築：
ラット PGC を単純移植法または再凝集法で NOD-SCID マウスまたは NOG マウスの腎被膜下に移植後 28 日目に観察したところいずれのレシピエント、移植方法でも性腺様

組織の形成が認められた。しかし再凝集法で NOD-SCID マウスに移植した場合は癒痕所見や拒絶が観られた。

また卵巢間質への同所移植と腎被膜下への異所移植の二通りを比較したところ、GV 卵を採卵可能な卵巢組織の生着率は異所移植で 84% (37/44) あったのに対して同所移植では 0% (0/7) であり、検鏡にて異種卵胞を確認することが出来たが採卵は不可能であった。

次に、得られた卵巢様組織から組織標本を作成し検鏡観察したところ、ヘマトキシリンエオジン染色標本では、NOD-SCID マウス、NOG マウスのいずれでも卵胞を伴う卵巢様組織を認めた。免疫染色では NOG マウス由来の卵胞様構造に卵細胞のマーカーである MVH、Stella 陽性の卵胞が認められた。得られた卵巢様組織より採取した GV 期卵細胞(GV-OLC)と、正常卵巢組織由来 GV 期卵における遺伝子発現パターンを RT-PCR で解析したところ両者の発現パターンは非常によく似ていた。

さらに、ラット胎児生殖隆起より作成した卵巢様組織をヌードラットに移植して膣垢検査、交配試験を行ったところ、卵巢様組織を移植したヌードラットでは不規則ながらも性周期が回転し、発情前期に雄ヌードラットと交配させたところ偽妊娠が成立した。しかし産仔は得られず、卵管内採卵したが卵は採取できなかった。以上の結果から、異種での卵巢様構造の作成には、再凝集法で腎皮膜下へ移植する方法が適していると考えられる。また、産仔を得るに至らなかったが、これは IVM が確立されていない為、十分に卵細胞を成熟させられなかったことが原因だと考える。しかしながら、遺伝子発現プロファイルが正常卵母細胞と非常に良く似た GV 期卵母細胞が得られており、IVM の精度を上げることが出来れば産仔を得られる可能性がある。

2、マウス PGC の免疫不全ラットへの移植によるマウス性腺様構造の構築：

GFP マウス PGC を再凝集法で IL-2RgKO ラットの腎皮膜下に移植し、移植後 28 日目に観察したところ、性腺様組織が認められた。組織標本を作成し検鏡観察したところ、ヘマトキシリンエオジン染色標本では、卵胞を伴う卵巢様組織を認め、免疫染色では卵細胞マーカーである MVH、Stella、陽性の卵胞様構造が認められた。次に、卵巢様組織中の卵細胞の機能を調べる為に、卵巢様組織から Fine Needle Puncture 法で GV-OLC を採取し、IVM を行ったところ、GV-OLC のうち 50% が M2 期に成熟した。これらに正常精子を用いて ICSI を行ったところ 76% が生存し 56% が前核形成と極体放出した 2PN+PB となり、63% が 2 細胞期に発生した。さらに、これらを卵管移植したところ 7% で PGC 由来の産仔を得ることが出来た。これらの産仔には GFP (+) の個体もあり、移植した PGC を採取した GFP マウス由来であることを確認することが出来た。これらの雌雄のマウスを野生種の ICR マウスと交配させたところ F1 世代を得ることが出来た。以上の結果から、マウス PGC を再凝集法でラットの腎皮膜下へ移植することで、正常に近い発生過程が進み、機能的な卵細胞が得られることが確認できた。

この研究により、雌胎児の前減数分裂始原生殖細胞は性腺間質細胞との共培養、異種への共移植、試験管内成熟培養を経れば、同種の体内という環境がなくとも正常の減数分裂を経て機能的卵を産生可能となりえることが分かった。従って私の研究の目的である生殖細胞再生の小動物モデルを作成し、proof of concept (POC) を示すことができた。

この研究は、大動物やヒトの PGCLC から生殖細胞を得るときに、自家移植を行うことなく小型の免疫不全動物を用いて生殖細胞を再生できるという利点があり、将来の生殖技術や不妊治療の研究にも応用できる画期的な技術であると考えられる。