

新生仔マウス卵巣から分離された莖膜幹細胞と卵子の特徴について

本多 新, 小倉 淳郎

独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室

はじめに

山中伸弥博士らによる誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) 技術の開発 [1] をきっかけに, 再生医療のツールとしての多能性幹細胞研究が飛躍的な勢いで進んでいる。「多能性 (pluripotency)」とは「ほとんど」すべての組織あるいは細胞に変化する能力を指し示すが, 一方で「全能性 (totipotency)」とはすべての組織あるいは細胞に変化する能力のことをいう。具体的には, 全能性とは単一の細胞からあらゆるすべての細胞 (個体) に変化することができることを示すが, 単一の細胞から個体が生じない (胎盤などに分化しない) ES 細胞は全能性ではなく多能性幹細胞であるといえる。唯一, 全能性を示す細胞として受精卵が挙げられるが, 受精卵には自己複製能がないために, 幹細胞とはいえない。実際に全能性をもつ幹細胞を純粋に分離・培養・分化に成功したという報告例はなく, そのような細胞が存在するのか否かも不明である。そこでわれわれは生殖細胞に注目した。生殖細胞ゲノムは生殖巣において体細胞としての情報を書き換えられ, 受精卵として全能性を獲得し個体へと発生するいわば個体の起源である。特に生殖幹細胞 (卵子幹細胞) にその可能性を期待し, 卵子幹細胞の分離・培養を試みた。体細胞核移植クローン技術は, 分化した体細胞の核を卵子に注入することにより, そこに含まれる「リプログラム因子」の力で体細胞核に可塑性を与える技術である。つまり, 卵子には細胞に全能性を与える『なにか』が存在していることを表している。この解析を始めた 2003 年当時, 京都大学の篠原教授らのグループによってマウス雄性生殖幹細胞 (精子幹: Germline Stem (GS) 細胞) の単離と培養方法が見い出された [2]。GS 細胞は新生仔精巣から特殊な培地 (特に Glial cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF) を含む) で培養することにより, 精子の幹細胞を純化することができ, かつ非常

に安定的に長期培養が可能となった。篠原教授らはその後, GS 細胞から ES 細胞に匹敵する多分化能を兼ね備えた mGS 細胞が生じることを発見し, 生後の生殖細胞からでも多能性幹細胞を生じさせることが可能であることを示した [3]。さらに, Johnson らのグループはこれまでの常識を覆し, 生後の卵巣に卵子の幹細胞が存在することを見い出し [4], それが骨髄から運ばれて来るといふ報告まで発表した [5]。いずれの報告も, われわれに卵子幹細胞の単離・純化・培養への期待を抱かせるには充分であった。そこで, われわれは GS 細胞の培養方法を利用して卵子幹細胞の実験を開始した。

1. 卵子が“生えて”くる新生仔卵巣由来細胞コロニーの解析

マウス GS 細胞は, 生後 2~4 日齢の新生仔マウス精巣を酵素で解離したものを, GDNF 等の成長因子を含む培地を用いて, 比較的薄めの濃度で撒いたマウスフィーダー細胞上で培養することにより生じる。GS 細胞の樹立初期の操作の特徴として, 精巣に含まれる繊維芽細胞様の細胞 (培養皿に高付着性) を除去し, 生殖細胞などの低付着性の細胞を培養に供することが挙げられる。このような培養により, ブドウの房のような (細胞 1 個 1 個の境界が明瞭な) 細胞塊としてコロニーが生じてくる。まずわれわれは, この方法を新生仔卵巣に置き換えて卵子幹細胞の培養を試みた。この培地には血清が含まれているが, 新生仔卵巣の細胞を血清入りの培地で培養すると, 繊維芽細胞様の細胞が増殖してしまい, GS 細胞のようなコロニーが生じることはなかった。そこで, われわれは無血清培地を用いることにより, 繊維芽細胞様の細胞増殖を抑えることに成功した。無血清培地を用いて新生仔卵巣由来の細胞を培養すると, 細胞の境界が比較的ハッキリとしたような細胞塊が日を追うごとに成長する様子が観察された。さらに驚くべきことに, 培養数日目のコロニーの表面に卵子らしきものが生えてきている様子まで確認された (図 1 A)。このコロニーは GS 細胞同様にアルカリフォスファターゼ活性も陽性であり, われわれは高鳴る期待に胸を躍らせた。卵子のよう

連絡先: 小倉 淳郎, 独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室
〒305-0074 つくば市高野台3-1-1
TEL: 029-836-9165
FAX: 029-836-9172
E-mail: ogura@rtc.riken.go.jp

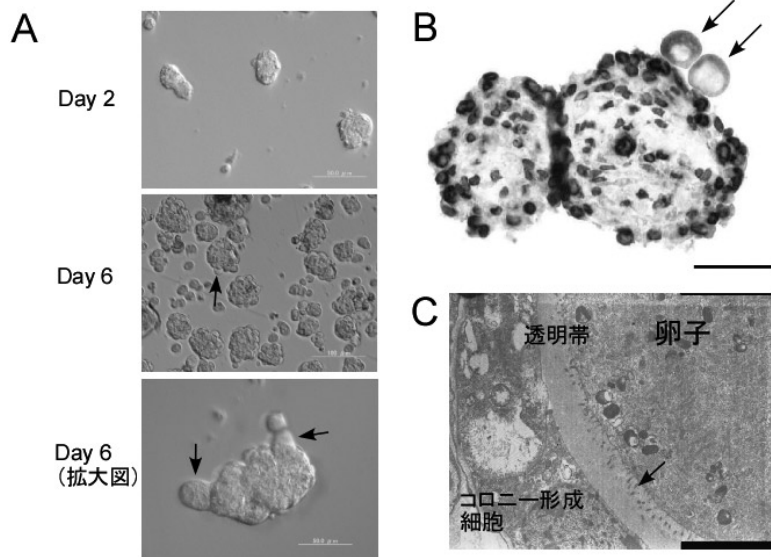


図1 新生仔卵巢由来コロニーとそこから生じる卵子の解析
 (A) 新生仔卵巢由来の細胞コロニーが日を追って发育している。6日以降ではコロニーの表面に卵子が確認できる(矢印)。
 (B) 卵巢由来の細胞は BrdU 陽性であったが、VASA タンパク質は陰性であった。一方、コロニーから生じた卵子(矢印)は、BrdU 陰性であった。スケールバーは50 μm である。
 (C) 卵子は透明帯に向かって突起を伸ばしているが(矢印)、卵子を取り囲む細胞からは突起の伸長が認められなかった。スケールバーは2 μm である。

に見えた細胞には透明帯を形成し、卵子であることが明らかであった。「新生仔卵巢由来細胞コロニーから卵が生えてきたのであれば、それはもう卵子の幹細胞以外に考えられない！」という期待や思い込みに反して、多くの実験結果が「ノー」を突きつけた。新生仔卵巢に存在する卵子は第1減数分裂前期で停止している未发育期卵子(卵母細胞)であり、それらは細胞分裂しない。もしもコロニーから生えてきた卵子が、培養中に卵子幹細胞から分化して卵子になったのであれば、培養初期に作用させた BrdU 陽性の卵子になるはずである。そこで、培養初期に培地に BrdU を添加した後にしばらく培養し、生じてきた卵子やコロニーの細胞を BrdU 染色に供した。また、同時に生殖細胞マーカーである VASA タンパク質での免疫染色も行った。その結果、培養中に生じた卵子は当然 VASA タンパク質陽性であったが、BrdU は陰性であった。さらに、コロニーの細胞は BrdU 陽性であったものの、VASA タンパク質は陰性であった(図1B)。この結果は、コロニーから生えてきた卵子は、培養中に卵子幹細胞から卵子に分化したのではなく、単に生後すでに卵子として分化していたものが、コロニーから生えてきただけということの意味していた。つまり、生殖細胞ではない“なんらかの体細胞コロニー”が成長する過程で、培地中に浮遊していた未发育卵子を取り込

み、それがコロニーから押し出されていたのである。

2. 莢膜幹細胞の同定と解析

マウス GS 細胞とほぼ同様の方法で培養して生じたマウス新生仔卵巢由来のコロニーは、卵子幹細胞であるどころか生殖細胞でさえないことが明らかになった。ちょうどその頃、精巣のライディッヒ幹細胞が同定され誌上発表された[6]。われわれが培養していた正体不明の細胞ももしかしたらライディッヒ細胞のような支持細胞の一種なのではないかと考えた。卵巢のなかで卵子は、顆粒膜細胞と莢膜細胞に包まれた卵胞のなかで发育・成熟する。生後2日のマウス卵巢には多くの原始卵胞と、いくつかの裸の卵子、そして非成長期卵胞が見受けられ、1次卵胞などはほとんど見いだされない。原始卵胞期には1層の立方状顆粒膜細胞が卵を取り囲み、その外側に基底膜を介して数個の未分化な纖維芽細胞状の細胞が見受けられ、増殖する様子も観察されるが、分化の様相は呈していない。マウスでは生後2.5~4.5日の間に原始卵胞は1次卵胞への成長を開始する。もしもコロニー形成細胞が顆粒膜細胞であった場合、卵子と顆粒膜細胞は透明帯を挟んでギャップ結合を形成するはずである。そこで、コロニーの電子顕微鏡切片を解析したところ、

コロニー内の卵子には透明帯が確認されたが、コロニーを形成する細胞から透明帯に向かって突起は伸びておらず、ギャップ結合を形成していないことが判明した(図1C)。また、そのコロニー形成細胞をほぼ純化した後にRT-PCRで各種マーカー遺伝子の発現を調べたところ、顆粒膜細胞マーカー遺伝子の発現は検出されなかったものの、莢膜細胞遺伝子であるPtch1やGli3の発現が確認された。この結果から、われわれが培養していた新生仔卵巣由来細胞は莢膜細胞であると推測した。実際に莢膜細胞にはアルカリフォスファターゼ活性があることも知られており、先の結果と合致していた。これらの細胞は、培養の初期過程において血清を含む培地で培養すると、繊維芽細胞様によく増える細胞に変化することを掴んでいた。この変化を‘分化’と仮定し、無血清培養で生じるコロニーが莢膜幹細胞である可能性について検討した。それまで卵巣由来の幹細胞の存在は知られておらず、当然莢膜幹細胞も同定されていなかった。

そこで、これまでの無血清培養を基準として、莢膜の分化に関与すると考えられる4種類の試験区についてさらに検討した。つまり、1. GSM (Germline Stem cell Medium)-K(無血清培地)、2. GSM-S(血清培地)、3. GSM-SL (血清培地+LH)、4. GSM-SLC (血清培地+LH+顆粒膜細胞のコンディション培地)、5. GSM-SLG (血清培地+LH+顆粒膜細胞との共培養)の5試験区である。その結果、1の無血清培地→5の顆粒膜細胞との共培養という試験区の順序に従ってその分化段階は進み、Ptch1やGli3だけでなくPtch2, Gli2, およびLhr遺伝子などの莢膜細胞マーカーも発現することが明らかになった(図2A)。また、その分化に従って脂肪顆粒も発達するだけでなく(図2B)、電子顕微鏡像からもステロイド産生細胞としての機能を獲得していく様子が確認できた。莢膜細胞がステロイド産生能を獲得するのは、2~3層の顆粒膜細胞を有するpreantral follicleの時期であると考えられている。顆粒膜細胞が肥厚しパラクリン因子を莢膜前駆細胞に作用させ、Lhrやステロイド産生酵素であるP450sccや3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD)の発現を誘導する。莢膜細胞は、LH感受性でステロイド産生に関する酵素群を発現しアンドロゲンを産生する。また、生後4日のラット卵巣には形態学的に分化した莢膜細胞は見受けられず、ステロイド産生能も検出できないが、生後5日目になって分化した莢膜細胞が見い出されるようになると、アンドロステンジオンが検出されるようになる[7, 8]。実際に、われわれが分化させた莢膜幹細胞において、3 β HSD活性やアンドロステンジオンの産生も確認することができ

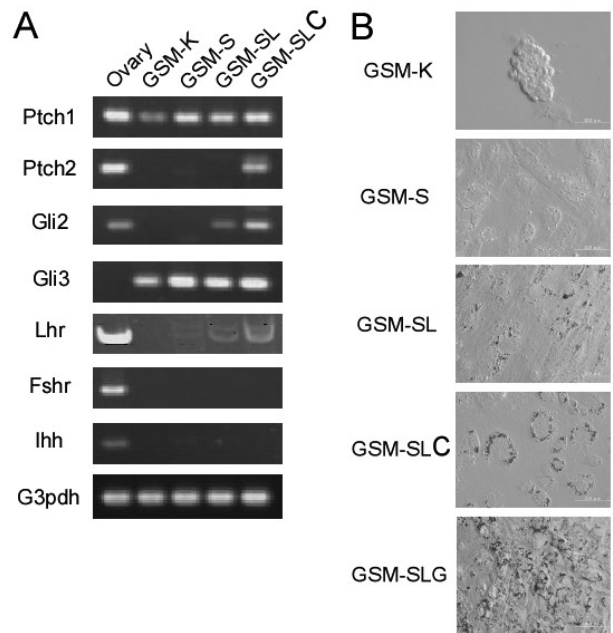


図2 莢膜幹細胞の体外分化誘導
新生仔卵巣から分離した細胞を各種培養条件で培養すると、その分化段階をコントロールすることができた。5種類の条件下で培養し、マーカー遺伝子のRT-PCR (A) および脂肪顆粒の染色 (B) により分化の様子を解析した。

た。さらに、組織普遍的にGFPを発現するマウスから莢膜幹細胞を単離し、GSM-Kにより未分化な状態で培養に供した後にコロニーの状態で卵巣に移植した。2週間後にその卵巣を解析すると、移植した細胞が卵胞の外側部分に分布している様子が確認できた(図3)。切片を観察すると成熟卵胞の外周部分に内莢膜層および外莢膜層として局在しているだけでなく(図3C)、未成熟卵胞の周辺部には比較的未分化な莢膜細胞と思われる状態での局在も見い出された(図3D)。この結果から、われわれが新生仔卵巣から単離、培養、および分化誘導させた細胞は卵子幹細胞ではなく、莢膜幹細胞であると結論した[9]。本研究で見い出された莢膜幹細胞は、培養条件を変化させることにより段階的にその分化を再現できることが明らかになったが、そのなかでも特に顆粒膜細胞感受性であり、より分化を促進させることが可能であることも示すことができた。顆粒膜細胞が卵胞の発育や莢膜の分化に多大な影響を及ぼしている事実はさまざまな関点から解析されているが、培養された莢膜幹細胞が顆粒膜細胞によって分泌される液性因子だけでなく、顆粒膜細胞と莢膜細胞の直接的な相互作用によってその分化を促進させることができることをin vitroで確認できたことから、われわれの実験系は莢膜幹細胞分化の作用機序だけでなく、卵胞の発育、ステロイドホルモン産生機構等を解析するために非常に有効な手段とし

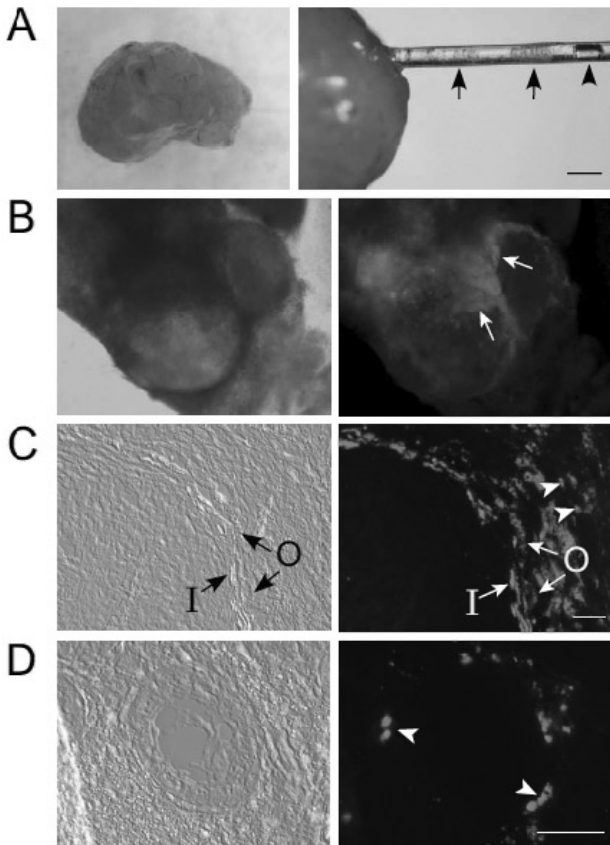


図3 莢膜幹細胞の卵巣への移植
 (A) 卵巣を体外に取り出して莢膜幹細胞を注入し、その後卵巣を個体に戻す。
 (B) 移植後二週間で卵胞を取り囲むように分布している様子が観察される。
 (C) 切片を解析すると、成熟卵胞の外周に内莢膜 (I) および外莢膜 (O) 部分への局在が確認された。
 (D) 未成熟卵胞の外周部分には未分化様の莢膜細胞シグナルが増殖している様子が確認できた。

て期待できる。

3. 未発育期卵子の大量誘出と体外発育

本研究を開始当初、われわれに過大な期待を持たせた“卵子”であるが、その後の解析によって非常に有益な実験系に発展させられることが可能となった。われわれの莢膜幹細胞の実験系でコロニーから生えてくるように見える卵子は、顆粒膜細胞などとの相互作用をしていない裸の状態です。この卵子のほとんどはGV期卵子ですが、生体内であれば顆粒膜細胞に包まれた卵胞の状態では存在してはなりません。卵胞状態の卵子は顆粒膜細胞とギャップ結合によって非常に強固に繋がっています。そのため、この時期の卵子のみを純粹に単離するのは困難であり、もしもGV期の卵子を純粹

に取り出すことができるのであれば、これまで解析できなかった卵子の発育機序や成熟の過程などにメスを入れることが可能となる。生殖細胞の体外培養系は古くから挑戦されているが、大量かつ再現性よく成功している例はない。精子幹細胞であるGS細胞の体外培養法でも、体外での精子形成までには至っていない。一方、精子と異なり、卵子はその幹細胞の存在さえ不明瞭だけでなく、量的・質的な制限があり、大量に調製するには非常に多くの困難がある。そのため、大量の卵子を用いた研究はカエルなどの両生類による研究が先行してきた。哺乳動物1匹の雌から発育・成熟が完了して排卵される卵子は微少である。また、卵巣内卵子は比較的多く存在しているが、上述したように卵子だけを良好な状態で調製するのは難しい。また、生後間もなく顆粒膜細胞からのシグナルに起因したアポトーシスによって多くの卵子が失われてしまうことも、卵子研究の難しさを助長している。さらに、哺乳動物卵子の体外培養系では顆粒膜細胞が必要不可欠とされており、体細胞との相互作用によって発育・成熟が促進されると考えられてきたことなどからも、卵子の体外大量培養系に明確な道はまったくといっていいほど見えていなかった。莢膜幹細胞は血清入りの培地で培養すれば、非常に効率よく増殖する一方で、無血清培地で培養した場合、未分化状態を維持出来る反面、その増殖率が低い。そこで無血清培養条件下で莢膜幹細胞を増殖させることを目的として、新生仔卵巣内で莢膜細胞の増殖に関与すると考えられていた stem cell factor (c-kit ligand) を培地に添加した。期待に反して、莢膜幹細胞は一向に増殖しなかったが、その代わりにコロニーから卵子が大量に湧き出すように生えてきた(図4A)。これは莢膜幹細胞が増殖する過程でコロニーの内部に取り込まれた未発育卵子が、stem cell factor の作用を受けて発育し、その影響でコロニーの内部から押し出されていることに起因していると考えられる。GSM-Kに stem cell factor を添加することにより、1匹の雌産仔から500個もの(裸の)未発育卵子を回収可能であった。しかし、この卵子も培養20日以降から急激に退行してしまい、10~15 μm でコロニーの外に出てきた卵子も最大で直径30 μm 程度にまでしか発育できなかった。さまざまな培地を検討したところ、最も効率よく未発育卵子の状態を保ち生存率を高めたのはマウスES細胞用の培地(ESM)であった。この培地はGSM-Kに比べて非常にシンプルであり、無血清培地にサイトカインとしてLIFを含んでいるのみである。GSM-Kはもともと莢膜幹細胞用に作成された培地であるため、莢膜幹細胞が増殖する。また、アスコルビン酸も含んでいるため、

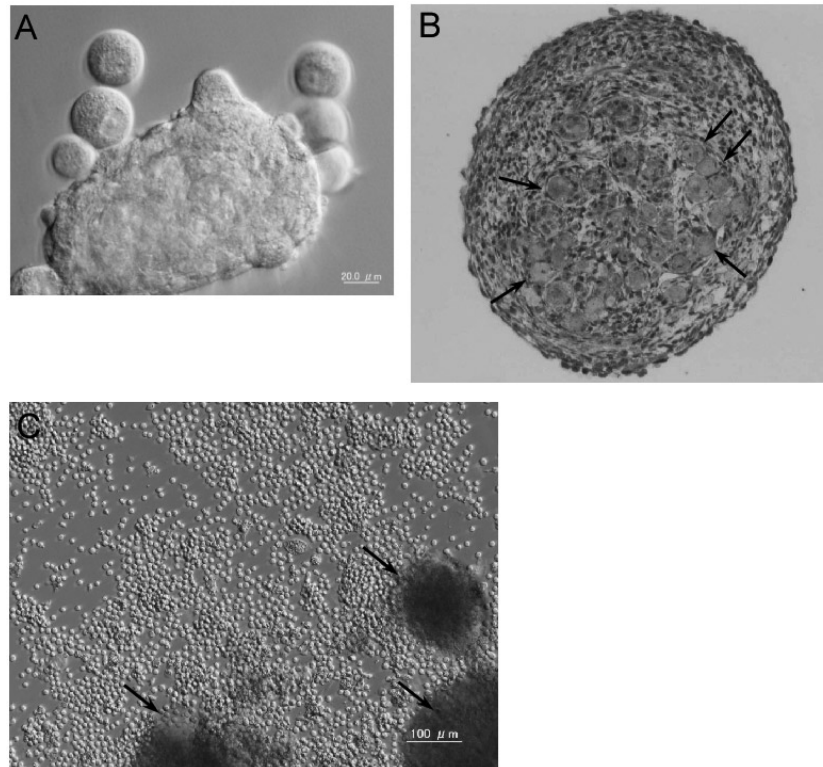


図4 未発育卵子の体外大量調製

- (A) 莢膜幹細胞の培地に stem cell factor を添加すると、コロニーから多数の卵子が生えてくるように押し出される。
- (B) GSM-K で培養した大きなコロニー内部には多数の卵子が留まったままであった(矢印)
- (C) 最終的には1匹の産仔から約800個もの未発育卵子を調製することも可能であった。矢印は莢膜幹細胞のコロニー。

比較的培地の酸性度が高い。そのため、培地の劣化が早く卵子の培養には不的確な状態になってしまい、結果的に卵子の退行が進むことが推測された。一方、ESMはGSM-K同様に無血清培地であるが、GSMとは異なり組成が非常に単純であるため、莢膜幹細胞の増殖率も低く、培地の劣化が起きにくい。さらに莢膜幹細胞の増殖率が低いことから、莢膜幹細胞の各コロニーもGSM-Kで培養する場合に比べ小さいままであり、コロニーから多くの卵子がコロニーの外に出てきやすい。実際にGSM-Kで培養した比較的大きなコロニーの中心部分を切片にして解析してみると、多くの卵子がコロニーの外に飛び出すことなく内部に留まっていた(図4B)。ESMにstem cell factorを添加した培地で培養することにより、1匹の産仔卵巣から約800個もの未発育卵子を調製することが可能となった(図4C)。さらに卵子の退行も防ぐことができるようになり、平均で50 μ m以上に、最大でほぼ発育卵子に相当する70~80 μ m程度にまで到達するものもみられた。これらの卵子の細胞膜には精子との融合能もあり、dbcAMPやオカタ酸を作用させる

ことで、減数分裂を再開させる卵子もわずかではあるが確認できた。さらに、卵子の発育(直径)に依存した卵子特異的なインプリント遺伝子のメチル化も再現できることが明らかになった。この結果は、卵子のインプリントを(顆粒膜細胞などの卵胞構造を介さず)卵子がその発育に伴って自律的に獲得することを意味していた。これまでの一般的な卵子調製法は、大量の卵子を得るために莫大な手間と労力が必要であったため一般的ではなく、卵子研究には量的な制限がかかっていたのが実状である。われわれの卵子大量調製系は数腹分の同腹仔から10⁴個以上の卵子を調製可能であり、数だけでいえば、過排卵処理を施した成熟雌マウス500匹分程度から得られる卵子数に相当する。このように得た大量の体外調製卵子を用いれば、量的な制限が緩和され、これまで不可能とされてきた解析が可能となり、卵子研究の新しい局面を切り開く可能性がある[10]。

おわりに

卵子幹細胞の分離・培養・分化誘導を目指して始めた研究であったが、得られた幹細胞は予想に反して莢膜幹細胞であり、さらにまた予想に反して、卵子の大量調製技術に発展した。莢膜幹細胞は世界ではじめて見いだされた卵巣由来の幹細胞であり、その培養中に生じる卵子は、SCFの添加により莢膜幹細胞のコロニーから生えてくるようにして生じる。その数は1産仔当たり800個程度であり、培地を工夫することにより、30日以上も細胞死を抑えながら体外で培養・発育させることが可能であった。そして、もっとも重要な点は、顆粒膜細胞との相互作用のない裸の状態が発育が進行する点であろう。このことから、さまざまな発育段階の卵子を、顆粒膜細胞との分離といった従来の手間（および卵子へのダメージ）を考慮せずに調製できる点に、これからの研究の可能性が見いだされる。また、莢膜幹細胞を分離し、培養することが可能になったことから、卵巣環境から独立して莢膜幹細胞の特徴を調べることも考えている。本研究手法を用いれば、顆粒膜細胞を除いた莢膜細胞と卵子との直接的な相互作用についての解析も期待できる。今後はこの培養系をさらに改良し、莢膜幹細胞や卵子の質を高めることを常に目指しながら、産仔作出やさまざまな発育段階の莢膜幹細胞や卵子を選択的に調製してDNAマイクロアレイやプロテオーム解析に供することを考えている。これらの解析によって、これまでブラックボックスとされてきた莢膜幹細胞の分化機構や卵子形成機構の詳細に迫ることが可能となると期待している。これら全く新しい2つの手法を組み合わせることにより、これまで解析が難しいとされてきた卵巣内の営みに挑んでいきたいと考えている。

本総説で紹介した成果は、京都大学大学院医学研究科 篠原隆司教授、東京農業大学応用生物科学部 河野友宏教授、東京大学大学院農学系研究科 金井克晃准教授、理研バイオリソースセンター 阿部訓也チームリーダーの各研究室との共同研究によるものです。

引用文献

1. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
2. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T (2003) Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod* 69, 612-616.
3. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T (2004) Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119, 1001-1012.
4. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428, 145-150.
5. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL (2005) Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 122, 303-315.
6. Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR, Hardy MP (2006) In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2719-2724.
7. Hirshfield AN (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 124, 43-101
8. Van Den Hurk R, Zhao J (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63, 1717-1751.
9. Honda A, Hirose M, Hara K, Matoba S, Inoue K, Miki H, Hiura H, Kanatsu-Shinohara M, Kanai Y, Kono T, Shinohara T, Ogura A (2007) Isolation, characterization and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 12389-12394.
10. Honda A, Hirose M, Inoue K, Hiura H, Miki H, Ogonuki N, Sugimoto M, Abe K, Kanatsu-Shinohara M, Kono T, Shinohara T, Ogura A (2009) Large-scale production of growing oocytes in vitro from neonatal mouse ovaries. *Int J Dev Biol* 53, 605-613.