

卵巣内の「幹細胞」をめぐる現状

高井 泰

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

はじめに

卵巣組織中、あるいは胚性幹細胞 (ES 細胞)・人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から卵子幹細胞と考えられる細胞が分離、あるいは作成され、マウスでは産仔が得られたとの報告がなされた。ES 細胞や iPS 細胞からの配偶子形成に関する研究はその後めざましい成果を上げ、今日に至るまでその動向が高い関心を集めている。一方、卵巣組織中から増殖可能な「幹細胞」が得られたことは、成体卵巣中の始原生殖細胞は補充・再生されないという従来の学説の見直しを迫るものであるにも関わらず、今日に至るまで懐疑的な評価が少なくない。卵巣内の「幹細胞」に関する研究の現状を概説し、今後の可能性を展望した。

卵巣組織からの卵子幹細胞の分離

卵巣中の始原生殖細胞は出生後減り続けるのみであり、補充・再生されないというのは生殖医学における「セントラル・ドグマ」ともいべき学説だった。これに対して2004年、マウス成体卵巣中での卵胞再生を示唆する知見 [1] が報告され、大論争を引き起こした。その後、複数の施設から、ショウジョウバエやメダカ同様に、マウス成体卵巣中にも少数の増殖可能な生殖細胞が存在し、卵子さらには産仔を生成しうることが報告された [2]。そして遂に2012年、ヒト成人の卵巣から増殖可能な卵子幹細胞 (oogonial stem cells; OSCs) が分離され [3]、臨床応用の可能性が議論されることとなった。

本研究では、性同一性障害に対する性別適合手術を受けた20代から30代前半までの6人の卵巣を、Cryotissue法という卵巣組織に最適化されたガラス化凍結保存技術 [4] によって予め凍結保存したものを使用した。この凍結ヒト卵巣組織を融解した細胞懸濁液から、上述した従来の分離法 [2] を改良した、生殖細胞特異的な RNA

helicase である DDX4 (DEAD box polypeptide 4) の細胞外ドメインを認識する抗体を用いた FACS (蛍光活性化細胞分離法) によって、OSCs とみられる細胞を分離した (図1)。このヒト OSCs は直径 5~8 μ m の細胞で、卵巣中にごくわずかに (懸濁生細胞中の約1.7%) 存在し、PRDM1, DPPA3, IFITM3, TERT などの初期生殖細胞に特異的な mRNA を発現していた。ヒト OSCs を、マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) を feeder として4~8週間培養したところ、MEF 非存在下で安定的に増殖する細胞が得られ、4カ月以上の培養後も前述した初期生殖細胞特異的な mRNA および蛋白を発現していた。

卵子幹細胞からの卵子の産生

培養ヒト OSCs では、継代の72時間後をピークとして直径35~50 μ m の大きな細胞が産生された。この大細胞は DDX4, KIT, YBX2, LHX8 などの mRNA および蛋白を発現しており、卵母細胞と考えられた。さらに継代72時間後のヒト OSCs では減数分裂特異的な DMCI および SYCP3 蛋白の発現を核に認め、FACS を用いた核 DNA 量分析では生殖細胞 (卵子) と思われる 1n 細胞を認めた。

また、ヒト OSCs を GFP で標識してからヒト卵巣組織の細胞懸濁液と培養したところ、24時間後には直径50 μ m 超の大きな GFP 陽性細胞を小さな GFP 陰性細胞が取り囲む卵胞に類似した構造を認めた。これは、ヒト OSCs から卵母細胞が産生され、卵巣組織懸濁液中の顆粒膜細胞が周囲に結合したものと考えられた。さらに GFP 標識ヒト OSCs をヒト卵巣組織片に注入し、この組織片を免疫抑制マウスに異種移植すると、1~2週間後に GFP 陽性細胞を扁平な細胞が取り囲んだ原始卵胞を認めた (図1)。この GFP 陽性細胞は卵母細胞特異的な LHX8 および YBX2 蛋白を発現しており、特に YBX2 は減数分裂の複糸期 (相同染色体の対合・交差・相同組み替えが起こる) に特異的なマーカーである点が重要である。倫理的・法的理由からヒト OSCs から得られた卵子をヒト精子と受精させることはできなかったが、同様の方法でマウス卵巣から分離された細胞を GFP で標識

連絡先：高井 泰，埼玉医科大学総合医療センター産婦人科
〒350-8550 川越市鴨田1981
TEL：049-228-3681
FAX：049-226-1495
E-mail：yastakai@saitama-med.ac.jp

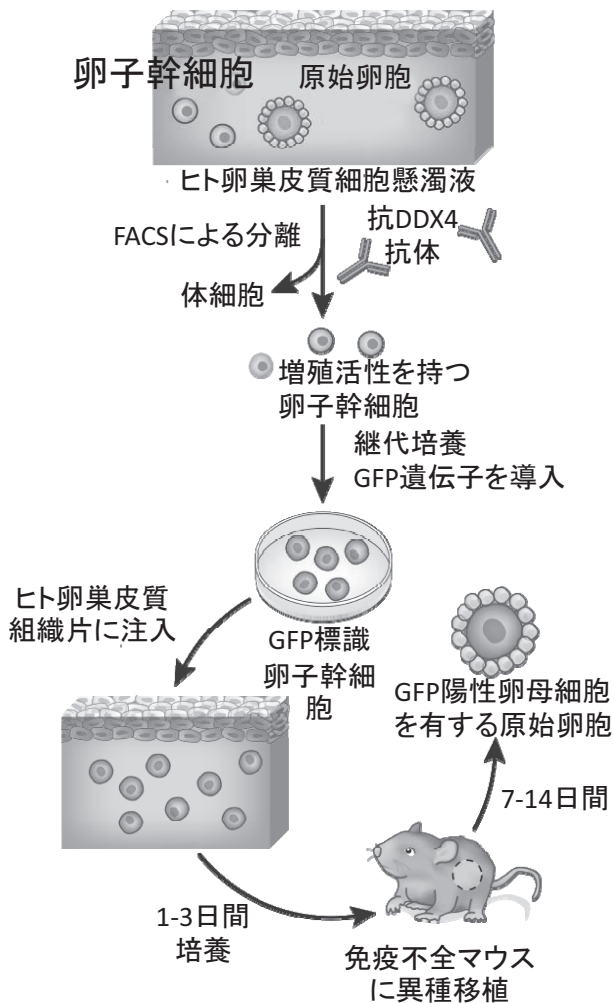


図1 ヒト卵巣組織からの卵子幹細胞 (OSCs) の分離と OSCs 由来卵胞の新生
文献 [20] より改変。

して成体マウスの卵巣に移植し、ゴナドトロピン製剤によって排卵誘発したところ、GFPを発現した成熟卵子が得られ、マウス精子との体外受精で胚盤胞が得られた。なお、従来の分離法で得られた OSCs を GFP で標識して不妊マウスの卵巣に注入したところ、GFP を発現する産仔が得られている [2]。

以上の知見は精子幹細胞研究で広く受け入れられた手法を応用して得られたものだが、凍結保存したヒト卵巣組織からヒト OSCs が分離・同定され、卵子が産生されることを強く示唆している。また、ヒト OSCs は数カ月以上にわたって分裂・増殖が可能であり、雌性生殖細胞は出生後に増殖しないという従来の学説の変更を迫る画期的な発見でもある。さらに、ヒト OSCs を注入したヒト卵巣で、わずか1~2週間のうちに OSCs 由来の原始卵胞が認められたことより、ヒト成人卵巣においても、

他の動物同様に、卵胞新生を支持する仕組みが存在することが示唆された。

「卵子幹細胞」に対する懐疑論

この「卵子幹細胞」に関する Tilly らの報告 [3] に対しては、複数の懐疑的な論評や反証が呈示され、議論は現在も続いている。まず、「卵子幹細胞」の分離の際に手懸かりとされた DDX4 (マウスでは Ddx4) は従来細胞質に局在すると考えられていたため、その細胞外ドメインを対象とした FACS を用いた方法論に対する疑義が示された。これに対して Tilly らは、初期生殖細胞特異的で細胞膜貫通型蛋白として知られる Ifitm3 (Fragilisとも呼ばれる) を用いても、同様の細胞がマウス成体卵巣から分離できることを報告した [5, 6]。さらに、細胞外に helicase ドメインが「隔離」されて機能を抑制された Ddx4 が、OSCs の継代培養の過程で細胞質に移動し、減数分裂開始に関わる Stra8 などの発現に関与する可能性を示唆した [7]。また、マウス OSCs の遺伝子発現プロファイルを、マウス胚性幹細胞 (ESCs) やマウス胎仔始原生殖細胞 (PGCs) と比較したところ、分離直後の OSCs では ESCs や PGCs でみられる多能性遺伝子を認めず、数カ月間の継代培養後に多能性遺伝子を発現することが報告された [8]。

一方、Liu らは Cre-loxP 部位特異的組換えシステムを応用して Ddx4 を発現する生殖系列細胞を蛍光により可視化した *Ddx4-Cre; Rosa26^{tdTm/+}* マウスを作成し、8日齢の同マウスの卵巣から直径40μm未満の細胞を分離し培養したところ、分割能をもった Ddx4発現細胞は認めなかったと報告した [9]。これに対して Tilly らは、同様の *Ddx4-Cre; Rosa26^{tdTm/+}* マウスを作成し、tdTm陽性細胞の大部分は生殖系列細胞ではなかったが、抗 Ddx4 抗体を用いた FACS によって tdTm陽性の OSCs が分離されたと報告した [10]。

さらに、Liu らは他の3研究室と共同で Tilly らの報告 [3] の追試を行った [11]。ヒト卵巣から抗 DDX4 抗体を用いた FACS によって細胞を分離したが、これらの細胞に DDX4は発現しておらず、非特異的な抗 DDX4 抗体への結合が示唆された。また、分離した細胞を EGFP で標識してヒト卵巣組織片に注入し、この組織片を免疫抑制マウスに異種移植したが、EGFP陽性の卵子は認めなかった。これに対して Tilly らは、Liu らの分離した細胞は純度が低く、解析法に改善の余地があることを指摘し、サルやヒビでも OSCs が分離されたことを報告した [6, 12]。

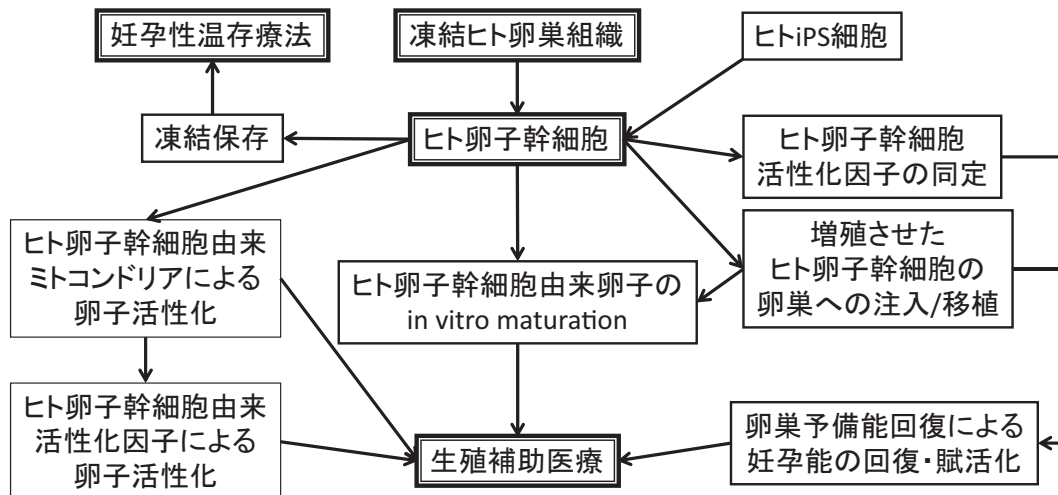


図2 ヒト卵子幹細胞 (OSCs) を用いた研究が生殖補助医療や妊孕性温存療法に及ぼす影響
文献 [21] より改変。

その後, Tilly らは, 自殺遺伝子 *HSVtk* を *Stra8* 発現細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作製し, 成体への3週間の GCV 投与で *HSVtk* を作動させたところ原始卵胞数が減少したが, GCV 中止後3週間で原始卵胞数が回復すること, この回復には減数分裂開始に関わる *Stra8* 発現細胞に関わること, 回復した新生卵胞由来の卵子によって産仔が得られたことを報告した [13].

また, Tilly らとは別個に Wu らは, 生殖補助医療における採卵時の卵巣穿刺液からヒト OSCs とと思われる細胞が分離抽出できたと報告した [14]. さらに最近, Silvestris らもヒト卵巣皮質からヒト OSCs を分離し, ごく一部が直径 $80\mu\text{m}$ までの大細胞に分化すること, これらの大細胞が *GDF-9* および *SYCP3* mRNA を発現した1倍体細胞であること, その他の小細胞が *DPPA3* mRNA を発現した2倍体細胞であることを報告するなど [15], ヒト OSCs の存在を支持する知見も散見されるようになった.

卵子幹細胞の臨床応用

上述したように, OSCs から成熟 MII 期卵子を得るためには, これを卵巣組織中に注入して, 卵巣組織中の顆粒膜細胞に包囲させた原始卵胞を形成させることが必要である. 一方, 既に原始卵胞を含んだヒト卵巣組織を *in vitro* で培養し, 前胞状卵胞まで発育させた後に単離して, アクチビン A 存在下の卵胞培養によって胞状卵胞まで発育させる, 2ステップ無血清卵胞培養法が報告されており [16], 最近世界で初めてヒト MII 卵子を得るこ

とに成功している [17]. そこでヒト OSCs 由来の原始卵胞を本法によって培養・発育させ, 得られた胞状卵胞から卵子を単離し, *in vitro* maturation (IVM) によってヒト MII 期成熟卵子を得ることが計画されている (図2).

また, OSCs の *in vitro* 培養によって卵子が分化・産生される分子メカニズムが解析され, 卵巣組織内における卵子生成メカニズムと比較検討することによって, 卵子の産生や質に影響する因子を同定・評価することが期待される. さらに, 成人女性の卵巣中に存在する OSCs に作用する因子の投与によって, 卵巣予備能を維持・回復させる治療が可能となるかもしれない (図2).

さらに, OSCs は細胞エネルギー源としての有用性も期待されている. 加齢に伴う卵子の質の低下の理由の1つとして細胞内エネルギー産生能の低下が推定され, 若年ドナーの卵子から得られた少量の卵細胞質を反復 IVF 不成功例の卵子に注入することにより, 生殖補助医療 (ART) の成功率が著しく改善したとの報告が1990年代になされた. しかしながら, 他者からの卵細胞質移植は他者のミトコンドリア DNA を子孫に伝えることに繋がるため, 米国食品衛生局はこれを直ちに禁止した.

この他者の遺伝子の混入という問題点を克服するために, 患者自身から得られたヒト OSCs のミトコンドリアやその活性化因子を顕微授精 (ICSI) 時などに注入することによって, 卵子の質を改善し, ART 成功率を上昇させる臨床研究が行われており, 2015年末にわが国からも1施設の参加が発表された (図2). 現時点の報告 [18] によると, 海外では既に93名の ART 不成功歴をもつ不妊症患者からヒト OSCs が得られ, ミトコンドリアが抽

出された。電子顕微鏡による観察では、ヒト卵子とヒト OSCs のミトコンドリアは類似した形態を示していた。これらの患者から得られた卵子に、自身の OSCs 由来のミトコンドリアを注入したところ、採卵周期あたりの継続妊娠率が1.4~2.0%から18~26%に著明に改善した。25名の患者では、ICSI時に卵子を2群に分け、一方はICSIのみ、一方はICSIと同時に自身の OSCs 由来のミトコンドリアも注入したところ、ICSI単独群に比べてミトコンドリア注入群で有意に妊娠率が改善した。しかしながら、対象となった患者は必ずしも高齢では無く、多嚢胞性卵巣症候群など卵巣予備能が不良とはいえない症例も含まれており、適応の妥当性、安全性の検証など検討すべき多くの問題が指摘され、有効性は確立されていない。

また、卵巣組織由来の OSCs は、不妊症患者に対する生殖補助医療のみならず、悪性腫瘍患者に対する妊孕性温存にとっても非常に有用な選択肢を提供できる可能性がある。現在、わが国でも妊孕性温存療法としての卵巣組織の凍結保存が始められているが [19]、将来的には卵巣組織から OSCs を分離し、がん細胞を含まない体外培養系で増殖させ、そのまま体外で成熟させたり、残存性腺組織に再移植することなどによって、多くの成熟配偶子を安全に得ることが可能になるかもしれない。

卵子幹細胞研究の今後の課題

OSCs から得られた卵子そのものを用いた ART や妊孕性温存を施行するためには、なお一層の基礎的研究が必要である。例えば、成熟した卵子を得るためには、いったん卵巣組織中に注入することが必要だが、注入後に組織内で起こっている現象に関する知見は乏しい。また、幹細胞におけるヒストン修飾や DNA 修飾といったエピジェネティック制御に関する知見も重要であろう。既にマウスでは産仔が得られているが、ヒトへの応用には霊長類などの高等動物を用いた安全性の検証が必須と思われる。

今後、OSCs を用いた生殖医学の研究が一層発展することが期待されるが、技術の進歩に議論が追いついていないのが現状である。わが国は、ART の研究に限って生体から採取した卵子と精子を受精させることを認めているが、幹細胞の取り扱いを定めた国の指針では「できた卵子や精子を受精させない」としている。研究の進展による成果への期待が高まるなか、どの段階までの研究が認められるのか、具体的な幅広い議論が必要だろう。

文献

1. 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.
2. Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, Xiang J, Shi L, Yu Q, Zhang Y, Hou R, Wu J (2009) Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 11, 631-636.
3. White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL (2012) Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nat Med* 18, 413-421.
4. Kagawa N, Silber S, Kuwayama M (2009) Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 18, 568-577.
5. Woods DC, White YA, Tilly JL (2013) Purification of oogonial stem cells from adult mouse and human ovaries: an assessment of the literature and a view toward the future. *Reprod Sci* 20, 7-15.
6. Woods DC, Tilly JL (2013) Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. *Nat Protoc* 8, 966-988.
7. Imudia AN, Wang N, Tanaka Y, White YA, Woods DC, Tilly JL (2013) Comparative gene expression profiling of adult mouse ovary-derived oogonial stem cells supports a distinct cellular identity. *Fertil Steril* in press.
8. Imudia AN, Wang N, Tanaka Y, White YA, Woods DC, Tilly JL (2013) Comparative gene expression profiling of adult mouse ovary-derived oogonial stem cells supports a distinct cellular identity. *Fertil Steril* 100, 1451-1458.
9. Zhang H, Zheng W, Shen Y, Adhikari D, Ueno H, Liu K (2012) Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 12580-12585.
10. Park ES, Tilly JL (2015) Use of DEAD-box polypeptide-4 (Ddx4) gene promoter-driven fluorescent reporter mice to identify mitotically active germ cells in post-natal mouse ovaries. *Mol Hum Reprod* 21, 58-65.
11. Zhang H, Panula S, Petropoulos S, Edsgard D, Busayavalasa K, Liu L, Li X, Risal S, Shen Y, Shao J, Liu M, Li S, Zhang D, Zhang X, Gerner RR, Sheikhi M, Damdimopoulou P, Sandberg R, Douagi I, Gustafsson JA, Liu L, Laner F, Hovatta O, Liu K (2015) Adult human and mouse ovaries lack DDX4-expressing functional oogonial stem cells. *Nat Med* 21, 1116-1118.
12. Woods DC, Tilly JL (2015) Reply to Adult human and mouse ovaries lack DDX4-expressing functional oogonial stem cells. *Nat Med* 21, 1118-1121.
13. Wang N, Satirapod C, Ohguchi Y, Park ES, Woods DC, Tilly JL (2017) Genetic studies in mice directly link oocytes produced during adulthood to ovarian function and natural fertility. *Sci Rep* 7, 10011.
14. Ding X, Liu G, Xu B, Wu C, Hui N, Ni X, Wang J, Du M, Teng X, Wu J (2016) Human GV oocytes generated by mitotically active germ cells obtained from follicular aspirates. *Sci Rep* 6, 28218.

15. Silvestris E, Cafforio P, D'Oronzo S, Felici C, Silvestris F, Loverro G (2018) In vitro differentiation of human oocyte-like cells from oogonial stem cells: single-cell isolation and molecular characterization. *Hum Reprod* 33, 464-473.
16. Telfer EE, McLaughlin M (2011) In vitro development of ovarian follicles. *Semin Reprod Med* 29, 15-23.
17. McLaughlin M, Albertini DF, Wallace WHB, Anderson RA, Telfer EE (2018) Metaphase II oocytes from human unilaminar follicles grown in a multi-step culture system. *Mol Hum Reprod* 24, 135-142.
18. Fakh MH, Shmoury MEL, Szeptycki J, de la Cruz DB, Lux C, Verjee S, Burgess CM, Cohn GM, Casper RF (2015) The AUGMENTS Treatment: Physician Reported Outcomes of the Initial Global Patient Experience. *JFIV Reprod Med Genet* 3, 154.
19. Takai Y (2018) Recent advances in oncofertility care worldwide and in Japan. *Reprod Med Biol* doi: 10. 1002/rmb2. 12214.
20. Telfer EE, Albertini DF (2012) The quest for human ovarian stem cells. *Nat Med* 18, 353-354.
21. Woods DC, Tilly JL (2012) The next (re) generation of ovarian biology and fertility in women: is current science tomorrow's practice? *Fertil Steril* 98, 3-10.