

生殖細胞系列に分化可能なヒト始原生殖細胞様細胞の長期安定培養法の確立

小林 睦¹⁾, 小林 美里¹⁾, 河村 和弘¹⁾, Shioda Toshi²⁾

1) 順天堂大学 医学部 産婦人科学講座

2) Massachusetts General Hospital, Center for Cancer Research

緒言

始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) は、哺乳類の胚着床期に現れる、精子・卵子の前駆細胞です。近年マウスやヒトの配偶子を多能性幹細胞である ES, iPSC 細胞から誘導する研究が活発に行われており、この多能性幹細胞から誘導された PGC を PGC 様細胞 (PGC-like cells; PGCLCs) と呼びます。この PGCLC はマウスでは既に精子・卵子が誘導され、産仔を形成することが確認されていますが、ヒトにおいてははまだ研究段階な状況です。

ヒト PGC は胎児の性腺内に存在しており、研究に供することは高度に倫理的な問題を有しています。そのため PGCLCs は、PGCs の代替モデルとしての利用が増えていますが、PGCLC の大量作成は技術的に困難であり、スクリーニング研究などの大量の均一な細胞が必要とされる実験への応用には障害となっていました。

今回著者らは、hPGCLC をフィーダー細胞なしで、生殖細胞の特性を保持したまま、長期安定的な状態で培養を行う方法を発見しました。150日間以上の培養でも hPGCLCs は、PGC の遺伝子発現プロファイルを維持し、安定的に増殖しました。この研究は、hPGCLCs の維持安定培養に成功した世界初の研究成果であり、将来的には hPGCLC を用いた疾患モデルの研究や再生医療への応用が期待されます。

フィーダー細胞上での hPGCLC の培養

著者の所属していた研究室ではヒト PGCLC の誘導は BMP4, SCF, LIF, EGF を含有した培地で8日間培養することで誘導していましたが、先行検討において最も重要な分化誘導因子である BMP4 は誘導初期の3日間

が重要で、その後の5日間の培養では BMP4 を除去しても hPGCLC の誘導効率に変化がないことがわかっていました。このことから hPGCLC 誘導培地に含まれる他の成長因子、すなわち SCF, EGF, LIF が hPGCLC の増殖をサポートする可能性があると考えられました。この可能性を探るために、誘導された EGFP ラベル付きの hPGCLC を一般的なフィーダー細胞である STO 細胞上に播種し、SCF, EGF, LIF を含む培地で培養を行いました。1週間後には EGFP 陽性の細胞がぶどう状のコロニーを形成しました。これらの EGFP 陽性細胞は STO 細胞上で4週間以上にわたって容易に増殖し、免疫蛍光染色で EGFP 陽性細胞は hPGCLC マーカーである PRDM1, TFAP2C, SOX17 を強く発現していました。一方、多能性関連マーカーである POU5F1 (OCT4) は発現していたのに対して SOX2 は発現していませんでした。これらの結果から、SCF, EGF, LIF の存在下で STO フィーダー細胞上の EGFP 陽性細胞は hPGCLC であると考え、この培養された hPGCLC を Long-term culture (LTC) hPGCLC (図1) と命名しました。

LTC-hPGCLC の培養におけるフィーダー細胞除去、増殖因子の最適化

フィーダー細胞上での hPGCLC の培養に成功したため、次にフィーダー細胞なしで LTC-hPGCLCs を培養する方法を探索しました。LTC-hPGCLCs は無コート上培養皿上には接着せず、マトリゲルコート上に接着しましたが、今までの使用していた培地ではフィーダー細胞なしの条件だと増殖せず、培地の変更が必要となりました。STO 細胞から分泌される、何らかの増殖因子が重要と考え、STO 細胞培養上清を基礎培地として使用したところ、STO 細胞上と遜色なく LTC-hPGCLC を増殖させることができました。次に SCF, EGF, LIF のどの増殖因子が LTC-hPGCLC の増殖に重要かを確認しました。その結果 SCF を除去すると増殖が止まること、さらには SCF のみがあれば EGF, LIF がなくても増殖するこ

連絡先: 小林 睦 順天堂大学医学部産婦人科学講座
〒113-8421 東京都文京区本郷2-1-1
TEL: 03-5802-1100
FAX: 03-5689-7460
E-mail: m.kobayashi.hc@juntendo.ac.jp

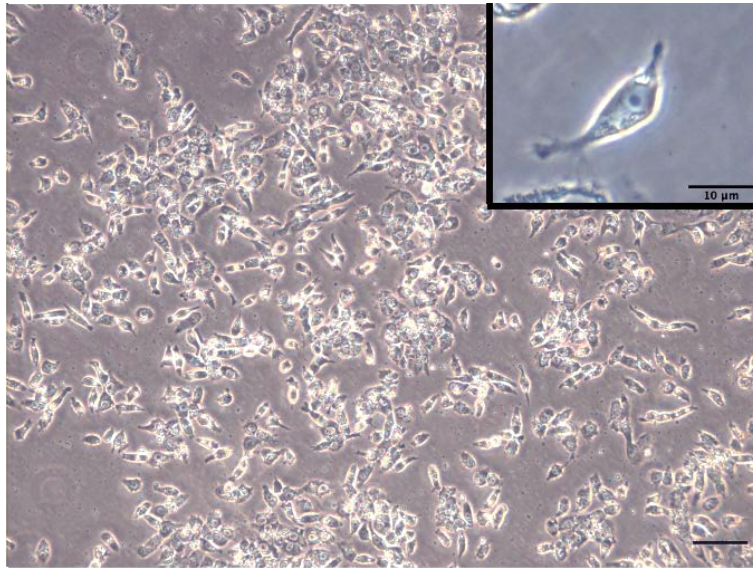


図1 LTC-hPGCLC

とが確認されました。このような結果から、LTC-hPGCLCの培養にはSCFとSTO細胞の培養上清（conditioned medium；CM）が必須であることを同定し、この培地をS-CMと命名しました。

LTC-hPGCLCの染色体数、遺伝子発現、細胞均一性

LTC-hPGCLCsは最低160日間、約4.5日間の倍加時間で活発に増殖し、初期の1万個のhPGCLCsは70日間で10億以上の細胞に拡大しました。初期の実験では男性のヒトiPS細胞を用いていましたが、その後その他の男性ヒトiPS細胞と女性ヒトiPS細胞からもLTC-hPGCLCを樹立することができました。興味深い点として、われわれが初期に使用していた男性ヒトiPS細胞はSCF、LIF、EGF含有培地でも安定してhPGCLCとして自己増殖していましたが、その他のiPS細胞株ではすぐに他系統細胞へと分化してしまっており、SCFのみでの培地を用いることで初めて安定的な状態を保つことができました。著者らが今回世界に先駆けてヒトPGCLCの安定培養に成功することができたのは、hPGCLCの状態でも安定的な細胞株を最初に使用していたことで「hPGCLCが安定培養する」という事実を容易に確認することができたという幸運があったと考えています。

上記のごとく安定培養できた複数のLTC-hPGCLCでGバンド法およびデジタル染色体分析を行ったところ、正常核型であることが確認されました。次にRNA-seq法を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、誘導直後のhPGCLCとLTC-hPGCLCの遺伝子発現を比較しました。56日、86日培養時点でのLTC-hPGCLCsは、hPGC

の代表的なマーカーであるPRDM1、TFAP2C、SOX17、NANOS3、KIT、CD38およびCXCR4の発現を維持していました。さらに、LTC-hPGCLCsは誘導直後のhPGCLCsよりもDPPA3、PIWIL2およびDND1といった後期のhPGCマーカーをより強く発現しましたが、より進んだ段階の発生を反映したDDX4やDAZLなどのマーカーの発現は見られませんでした。これらの結果より、LTC-hPGCLCは初期PGCと類似した細胞系譜でありかつ誘導直後のhPGCLCよりもやや分化が進んだ状態であることがわかりました。さらに、細胞培養によるLTC-hPGCLCの細胞均一性を評価するためにシングルセルRNA-seqを行ったところ、120日培養段階のLTC-hPGCLCはヒトiPS細胞と同レベルの均一性をもっていることが確認されました。このことから著者らは同培養条件でLTC-hPGCLCが均一な自己増殖を行っている結論づけました。

LTC-hPGCLCのテロメラーゼ活性・テロメア長

LTC-hPGCLCの増殖曲線は線形であり、細胞老化が起こるのか、それともiPS細胞と同様に無限増殖をする可能性があるのかどうかを探索しました。まずLTC-hPGCLCのテロメラーゼ活性を測定しました。iPS細胞の元となった新生児皮膚繊維芽細胞とiPS細胞と比較したところ、皮膚繊維芽細胞の約1000倍、iPS細胞の約1/4倍のテロメラーゼ活性を有しておりテロメラーゼ陽性細胞であることがわかりました。150日以上細胞の増殖に伴うテロメア長の短縮も起こらず、この結果から著者らはLTC-hPGCLCがテロメラーゼ陽性でiPS細胞

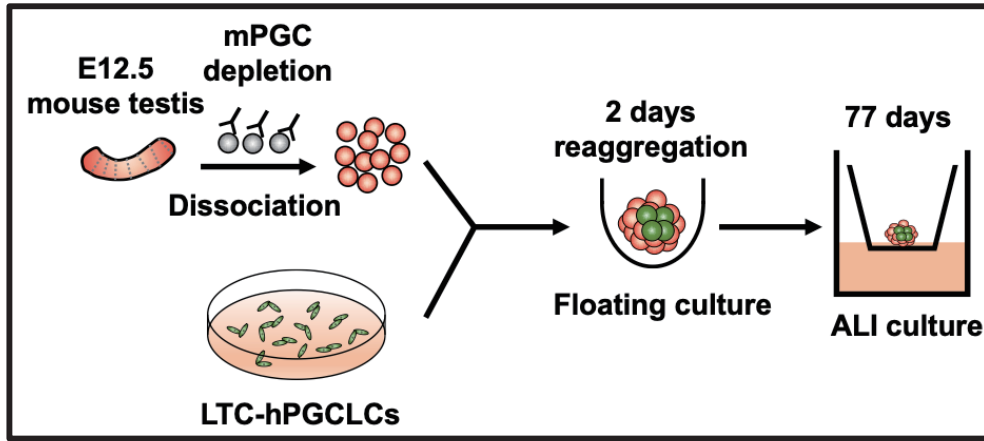


図2 xrTestisの作成方法

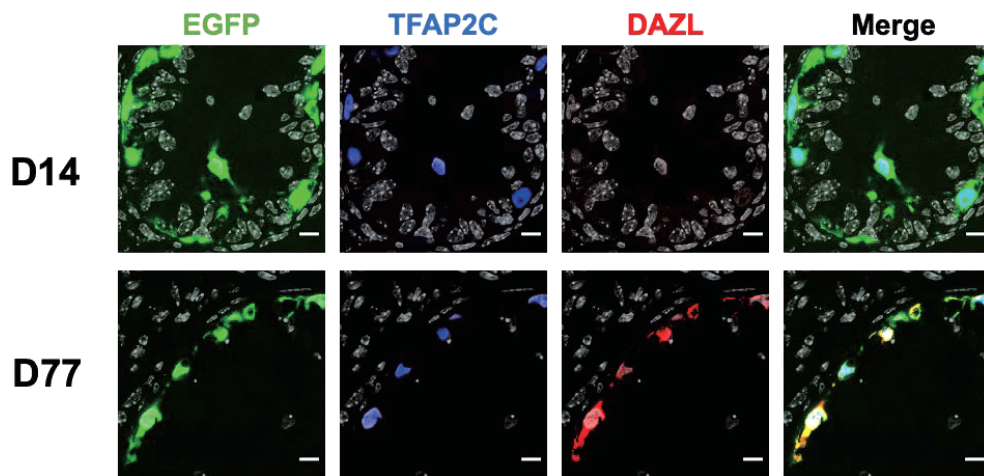


図3 xrTestisのEGFP陽性hPGCLCのDAZL発現

同様の制限のない増殖性を持つ非老化性細胞であると結論づけました。

LTC-hPGCLCの後期PGCLCへの分化誘導

LTC-hPGCLCが真に生殖細胞系列であるかを確認するため、既報の方法を用いて後期生殖細胞への分化誘導を試みました。Hwangらが報告した方法¹⁾を用いて、この手法を開発した佐々木博士との共同研究においてマウスの胎児精巢体細胞とhPGCLCからなる異種再構成精巢(xrTestis)の組織培養を行いました(図2)。xrTestisは培養14日目から精細管を思わせる管状構造を自発的に形成し、LTC-hPGCLCはこれらの精細管様構造の中に特異的に局在していました。xrTestisの断面の免疫蛍光染色では、EGFP+/TFAP2C+のLTC-hPGCLCはSox9陽性のマウスSertoli細胞に囲まれ、管上構造の外側に局在していました。xrTestis培養77日後、約40%のEGFP+/TFAP2C+細胞がDAZLを発現していた一方で、14

日目ではDAZLの発現は検出されませんでした(図3)。これらのデータから、先行研究におけるhPGCLCと同様にLTC-hPGCLCがxrTestis内で後期生殖細胞系列への分化能力を保持していることが示されました。

まとめ

本研究はhPGCLCsをフィーダー細胞不要で長期安定培養に成功した初めての研究成果であり、著者らはこの長期培養されたhPGCLCをLTC-hPGCLCと命名しました。マウスとは異なり、ヒトにおいてはhPGCLCを長期間維持培養できる可能性は報告されていましたが²⁾、本研究ではhPGCLCを①安定的に、②フィーダー細胞なしで培養できることが証明されたことに意義があります。LTC-hPGCLCは120日以上培養してもPGCマーカーを発現し均一な細胞増殖をする「生殖細胞株」のような細胞であり、この細胞を用いればiPS細胞を用いる実験技術を持たない研究室でも容易にhPGCLCを扱うこと

ができることから、ヒト配偶子再構成・再生研究のための重要な研究資源となることも期待されます。本記事では紹介できていませんが、この細胞を用いて大量の細胞を要するヒトPGCLCを用いたプロテオミクスも行うことができるようになり、さらには大量の細胞を用いたスクリーニング研究も容易に可能となりました。筆者らは今後同細胞を用いた応用研究を展開し、ヒト生殖学のフロンティアを開拓したいと考えています。

引用文献

1. Hwang YS, Suzuki S, Seita Y, Ito J, Sakata Y, Aso H, et al. Reconstitution of prospermatogonial specification in vitro from human induced pluripotent stem cells. *Nature communications*. 2020 ; 11 (1) : 5656.
2. Murase Y, Yabuta Y, Ohta H, Yamashiro C, Nakamura T, Yamamoto T, Saitou M (2020) Long-term expansion with germline potential of human primordial germ cell-like cells in vitro. *EMBO J*, 39 (21) : e104929.