

## さまざまな哺乳動物における 多能性幹細胞からの生殖細胞分化誘導

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 再生発生学分野  
自然科学研究機構 生理学研究所 遺伝子改変動物作製室

小林 俊寛

### はじめに

近年、多能性幹細胞 (ES 細胞, iPS 細胞) から *in vitro* で生殖細胞を分化誘導する研究分野が急速に発展してきた。特に2011年に報告されたマウス多能性幹細胞からすべての生殖細胞の源である始原生殖細胞 (primordial germ cell; PGC) の分化誘導では, PGC 様細胞 (PGCLC) と名付けられた多能性幹細胞由来の PGC が生殖巣への移植を介して産仔作出に貢献できる精子, もしくは卵子を生み出せるという確かな「機能」をもつことが示された<sup>1)</sup>。このマウス PGCLC の分化誘導法開発に端を発し, これまで数が少なく解析が困難であった発生初期における PGC 分化のメカニズム解明, あるいは *in vitro* で PGC を配偶子まで分化・成熟させる研究が大きく進展した。一方で, マウスで開発された技術を応用するため, ヒトを含むさまざまな動物における生殖細胞分化誘導研究が進められている。本トピックスではそれらを中心に紹介したい。

### ヒト PGCLC の分化誘導

マウスの次に取り組まれたのがヒト PGCLC の分化誘導である。マウスの場合, 着床後の卵筒型構造をとる初期胚において多能性をもつエピブラスト後方部から BMP, WNT シグナルに応じて PGC が分化してくることが胚の *ex vivo* 培養や, ノックアウトマウスを用いた解析からよくわかっていた (図1)。実際にその発生過程を再現して, 着床前のエピブラストに近い Naïve 型マウス多能性幹細胞から, 着床後のエピブラストに近いエピブラスト様細胞 (Epiblast like cell; EpiLC) を経て, PGCLC が誘導される (図2)。一方で, ヒトの場合は PGC 分化が起こる着床後早期の胚が倫理的・实际的に扱えないため, 限られた情報しかなかった。そこでマウスの系を元に多能性幹細胞における特徴の違いを反映させることで, ヒト PGCLC 分化誘導系が開発された。方法としては大きく分けて2種類あり, 1つは4iと呼ばれる4

つのシグナル阻害剤を含む培地で培養した多能性幹細胞を起点とする方法である。4i 培地は元々 Naïve 型ヒト多能性幹細胞の培養系として開発されたが<sup>2)</sup>, 実際にはこの条件で培養された多能性幹細胞は中内胚葉のマーカーを適度に発現する少し分化が進んだ状態にあり, この細胞から形成させた胚様体に BMP を加えると PGCLC を効率的に誘導できる<sup>3)</sup>。もう1つの方法は着床後エピブラストに近い Primed 型ヒト多能性幹細胞を起点とする。Activin A と GSK3 阻害剤の存在下で短期間培養することで初期の中内胚葉様細胞を誘導し, その細胞から作った胚様体に BMP を加えることで PGCLC が誘導できる<sup>4,5)</sup>。こうしたヒト PGCLC 分化誘導系が開発されたことで, 長らく謎に包まれていたヒト PGC の分化メカニズムが紐解かれ, マウスとヒトの PGC 分化に関わる転写因子ネットワークに違いがあることが浮き彫りになってきた。特に顕著な例として *SOX17*, *SOX2* の機能的な違いであげられる。マウスでは PGC の維持に必須な *SOX2* がヒト PGC では殆ど発現しておらず, 一方で, マウス PGC 分化には無関係とされる *SOX17* がヒト PGC 分化に重要な機能を担っていることが明らかになった<sup>3)</sup>。近年では次世代シーケンサーを用いた包括的な解析により, *SOX17* をはじめとしたヒト PGC 分化に中心的な役割を担う転写因子群の相互作用あるいは遺伝子発現制御機構も明らかにされつつある<sup>6)</sup>。また, ヒト PGCLC とマウス胎児生殖腺の体細胞から作った凝集体を長期培養することで, 卵原細胞・精原前駆細胞へ分化できることも報告されており<sup>7,8)</sup>, メカニズム解明と配偶子作製に向けた技術開発の両側面から研究が進んでいる。

### さまざまな動物種における PGCLC の分化誘導

ヒト PGCLC 分化誘導の進展に加え, さまざまな動物種を用いた研究も進められてきた。それらは遺伝子改変動物作製や畜産分野など幅広い応用につながるだけでなく, ヒトでは困難な初期胚の解析や誘導した PGCLC の

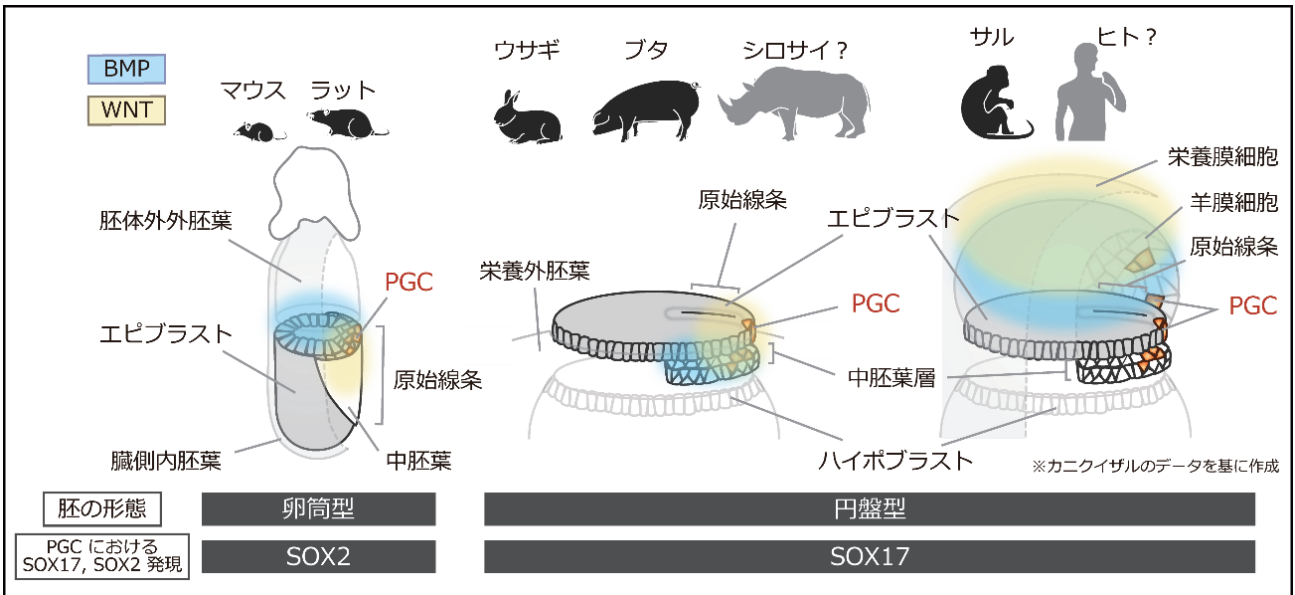


図1 さまざまな哺乳動物における PGC が出現する時期の胚

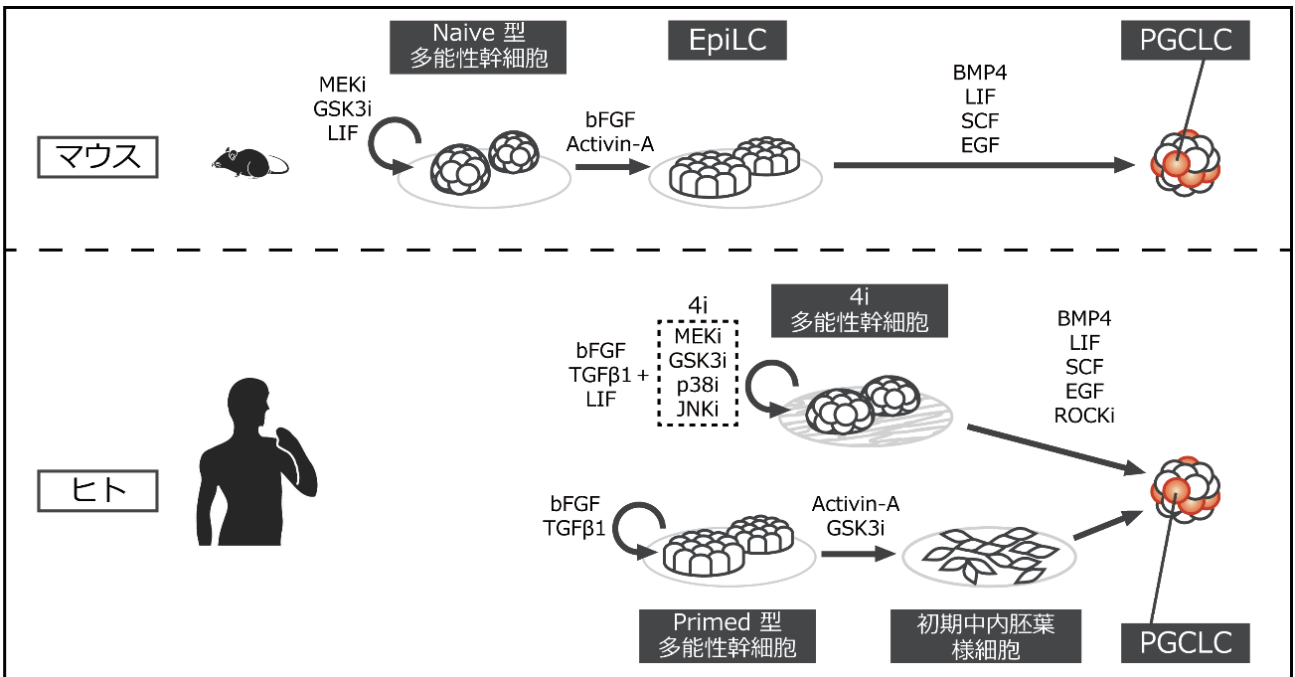


図2 マウスとヒトの PGCLC 分化誘導とそれらに必要なサイトカイン・低分子化合物

機能評価ができるモデルとしても注目されている。代表的な研究について以下に示す。

1) ラット

ラットはマウスと同じ齧歯目で、マウスに次ぐ汎用な実験動物である。しかしラットではES細胞の樹立にマウスから遅れること25年近くかかったこともあり、遺伝

子改変ラットの作製・利用が普及したのは近年のことである。そのため生殖細胞研究はマウスに比べて大きく遅れていた。筆者らはこのラットを用いてPGCLC分化誘導系の開発を進めてきた。まず *in vivo* のラット PGC を可視化できるレポーターラットを作製し、その動態とそれに伴う遺伝子発現変化を明らかにした<sup>9)</sup>。次に、こ

の情報およびマウスでの知見をもとにラット ES 細胞を用いて PGCLC の分化誘導を試みた。EpiLC の誘導にマウスの二次元的な単層培養ではなく三次元的なスフェロイド形成が必須であることを明らかにし、その EpiLC を BMP で刺激すると効率的 PGCLC が誘導できた。この PGCLC を生殖細胞欠損ラットの新生児精巣に移植するとおよそ 2 カ月後には精子形成が観察され、回収した精子・精子細胞をラット未受精卵へ顕微授精すると正常な産仔が得られた<sup>10</sup>。マウス、ラット共に機能的な PGCLC を誘導できる確かな実験系がそろったことで、PGC 分化メカニズムにおける種間の保存性や違いにアプローチできると期待される。

## 2) ウサギ

ウサギはマウス・ラット同様に世代サイクルが短く、多胎で、実験動物としての歴史も深い。一方でマウス、ラットと大きく異なって初期胚におけるエピブラストが円盤型の単層構造をとることが知られ、これは齧歯類以外の大型動物やヒトと類似している (図 1)。また胎児期のウサギ PGC を調べると、*SOX17* を高発現する一方、*SOX2* を発現していないというヒトに近い発現パターンを示すことが明らかになった。ラット同様、ウサギも胚における PGC 分化に関する情報がほとんどなかったため、筆者らは初期胚の詳細な組織学的解析や、シングルセル RNA-seq を駆使し、ウサギ PGC が原腸陥入開始前後にエピブラスト後方部から出現する過程を明らかにした。また、新たに開発した培養方法で樹立したウサギ多能性幹細胞を用い、PGCLC の分化誘導系を確立した。興味深いことにウサギ PGCLC の分化にはヒトと同様に *SOX17* が不可欠であった<sup>11</sup>。これらのことから実験動物としての利点も含め、ウサギはヒト胚の初期発生を理解するうえで良いモデルになると考えられる。

## 3) 大型動物

大型動物もウサギ同様ヒトのモデルとして有用で、特に産業動物の中でも多胎で胚が手に入りやすく、発生工学技術も確立されているブタが注目されてきた。ブタも齧歯類とは異なり円盤型のエピブラストを形成し (図 1)、PGC における *SOX17*、*SOX2* の発現パターンもウサギ・ヒト同様であった<sup>9</sup>。ブタの多能性幹細胞樹立も最近になってようやく可能になりつつあり<sup>12</sup>、今後 PGCLC 分化誘導系の開発が望まれる。また、大型動物でも希少種としてその資源を保存するために近年研究が進展してきたのがシロサイである。特にキタシロサイは

絶滅危惧種に指定され、現存しているのはアフリカにいるメス 2 頭のみで、その iPS 細胞から卵子を作り出すことができれば、凍結保存されている精子と受精させることで個体復元につながる。実際に最近 PGCLC の分化誘導系が開発された<sup>13</sup>。シロサイ胚における PGC 出現は不明であるが、PGCLC の実験からやはり齧歯類以外の動物と同様に *SOX17* が分化に重要な機能を担っている。これまでのところ胚の形態と PGC における *SOX17*、*SOX2* 発現には高い相関性があり、齧歯類と進化的にどのように分岐したのかも興味深い。

## 4) 非ヒト霊長類

ヒト以外の霊長類でも生殖細胞の分化誘導系開発が進められている。ヒトに近いカニクイザルではその希少な初期胚の解析も進んでおり、PGC の出現が初期羊膜に見られるという興味深い観察がされている<sup>14</sup> (図 1)。また、PGCLC の誘導およびその成熟が奨められ、最近ではマウス生殖腺体細胞との共培養により成熟させた PGCLC をさらにサル生殖腺体細胞と再凝集させることで、卵母細胞まで進行させることが可能になった<sup>15</sup>。ヒトに最も近いモデルとしてそう遠くないうちに PGCLC 由来配偶子の機能的な証明がなされるかもしれない。一方、小型の霊長類で世代サイクルの短いマーモセットも胚の空間トランスクリプトーム解析などの豊富な情報の取得や PGCLC 誘導系の開発が進められている<sup>16,17</sup>。非ヒト霊長類は胚が高価で扱う施設が限られるなど制限はあるものの、ヒト初期発生を知るうえで極めて重要なモデルであることは疑いの余地がない。

## 終わりに

マウス多能性幹細胞からの PGCLC 誘導に加え、遺伝子編集技術、単一細胞レベルでの解析法および非モデル動物のゲノム情報の拡充に後押しされる形で、ここ 10 数年あまりで生殖細胞分化誘導研究が動物種を超えて大きく研究が進展した。技術的にはマウスにおいても *in vivo* のものに比べ *in vitro* で作られた生殖細胞は個体発生能が劣る、マウス・ラット以外の動物における機能的な証明がなされていないなど課題は見られる。しかしながら、今後も胚発生や生体の多角的な情報がますます蓄積され、それを *in vitro* で正確に模倣する研究が進むことが予想され、医学や産業に利用できる生殖細胞を作り出せる日が来るのはそう遠くない未来なのかもしれない。

## 引用文献

- Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, Aramaki S, Saitou M (2011) Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146, 519–532.
- Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH (2013) Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 504, 282–286.
- Irie N, Weinberger L, Tang WWC, Kobayashi T, Viukov S, Manor YS, Dietmann S, Hanna JH, Surani MA (2015) SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell*, 160, 253–268.
- Sasaki K, Yokobayashi S, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Kurimoto K, Ohta H, Moritoki Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Nakamura S, Sekiguchi K, Sakuma T, Yamamoto T, Mori T, Woltjen K, Nakagawa M, Yamamoto T, Takahashi K, Yamanaka S, Saitou M (2015) Robust In Vitro Induction of Human Germ Cell Fate from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 17, 178–194.
- Kobayashi T, Zhang H, Tang WWC, Irie N, Withey S, Klisch D, Sybirna A, Dietmann S, Contreras DA, Webb R, Allegrucci C, Alberio R, Surani MA (2017) Principles of early human development and germ cell program from conserved model systems. *Nature*, 546, 416–420.
- Tang WWC, Castillo-Venzor A, Gruhn WH, Kobayashi T, Penfold CA, Morgan MD, Sun D, Irie N, Surani MA (2022) Sequential enhancer state remodelling defines human germline competence and specification. *Nat Cell Biol*, 24, 448–460.
- Yamashiro C, Sasaki K, Yabuta Y, Kojima Y, Nakamura T, Okamoto I, Yokobayashi S, Murase Y, Ishikura Y, Shirane K, Sasaki H, Yamamoto T, Saitou M (2018) Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro. *Science*, 362, 356–360.
- Hwang YS, Suzuki S, Seita Y, Ito J, Sakata Y, Aso H, Sato K, Hermann BP, Sasaki K (2020) Reconstitution of prospermatogonial specification in vitro from human induced pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 11, 5656.
- Kobayashi T, Kobayashi H, Goto T, Takashima T, Oikawa M, Ikeda H, Terada R, Yoshida F, Sanbo M, Nakauchi H, Kurimoto K, Hirabayashi M (2020) Germline development in rat revealed by visualization and deletion of Prdm14. *Development*, 147.
- Oikawa M, Kobayashi H, Sanbo M, Mizuno N, Iwatsuki K, Takashima T, Yamauchi K, Yoshida F, Yamamoto T, Shinohara T, Nakauchi H, Kurimoto K, Hirabayashi M, Kobayashi T (2022) Functional primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells in rats. *Science*, 376, 176–179.
- Kobayashi T, Castillo-Venzor A, Penfold CA, Morgan M, Mizuno N, Tang WWC, Osada Y, Hirao M, Yoshida F, Sato H, Nakauchi H, Hirabayashi M, Surani MA (2021) Tracing the emergence of primordial germ cells from bilaminar disc rabbit embryos and pluripotent stem cells. *Cell Rep*, 37, 109812.
- Kinoshita M, Kobayashi T, Planells B, Klisch D, Spindlow D, Masaki H, Bornelöv S, Stirparo GG, Matsunari H, Uchikura A, Lamas-Toranzo I, Nichols J, Nakauchi H, Nagashima H, Alberio R, Smith A (2021) Pluripotent stem cells related to embryonic disc exhibit common self-renewal requirements in diverse livestock species. *Development*, 148.
- Hayashi M, Zywitza V, Naitou Y, Hamazaki N, Goeritz F, Hermes R, Holtze S, Lazzari G, Galli C, Stejskal J, Diecke S, Hildebrandt TB, Hayashi K (2022) Robust induction of primordial germ cells of white rhinoceros on the brink of extinction. *Sci Adv*, 8, eabp9683.
- Sasaki K, Nakamura T, Okamoto I, Yabuta Y, Iwatani C, Tsuchiya H, Seita Y, Nakamura S, Shiraki N, Takakuwa T, Yamamoto T, Saitou M (2016) The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion. *Dev Cell*, 39, 169–185.
- Gyobu-Motani S, Yabuta Y, Mizuta K, Katou Y, Okamoto I, Kawasaki M, Kitamura A, Tsukiyama T, Iwatani C, Tsuchiya H, Tsujimura T, Yamamoto T, Nakamura T, Saitou M (2023) Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys. *EMBO J*, e 112962.
- Bergmann S, Penfold CA, Slatery E, Siriwardena D, Drummer C, Clark S, Strawbridge SE, Kishimoto K, Vickers A, Tewary M, Kohler TN, Hollfelder F, Reik W, Sasaki E, Behr R, Boroviak TE (2022) Spatial profiling of early primate gastrulation in utero. *Nature*, 609, 136–143.
- Seita Y, Cheng K, McCarrey JR, Yadu N, Cheeseman IH, Bagwell A, Ross CN, Toro IS, Yen LH, Vargas S, Navara CS, Hermann BP, Sasaki K (2023) Efficient generation of marmoset primordial germ cell-like cells using induced pluripotent stem cells. *Elife*, 12.