

機関番号：17102

領域設定期間：平成30年度～令和4年度

領域番号：7002

研究領域名（和文） 配偶子インテグリティの構築

研究領域名（英文） Ensuring integrity in gametogenesis

領域代表者

林 克彦（はやし かつひこ）

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20287486

交付決定（予定）額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,181,700,000円

研究の概要

生殖細胞系列は次世代に遺伝情報を伝える唯一の細胞系列であり、厳密に制御された分化過程を経て、個体をつくる能力「配偶子インテグリティ」を備えた卵子や精子となる。生殖細胞の分化過程の異常は不妊のほか、次世代の個体の発生・発育異常の原因となることから、その分化を制御するメカニズムの解明は重要な研究課題である。本領域研究では、配偶子の分化過程を体外培養系で再現する技術「in vitro gametogenesis」を基盤として、個体をつくる能力を備えた配偶子の再構築を目指す。このために培養技術の最適化、最先端イメージング技術による配偶子の能力の予見、および培養系と生体内における配偶子の形成過程の違いを様々な角度から検証する。

研究分野：生殖生物学、発生学、細胞生物学、

キーワード：配偶子インテグリティ、発生能、体外培養、細胞の非破壊的評価、細胞選択

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞系列は次世代の個体をつくるという特殊な性質をもつことから、長らく生物学の中心的研究対象であった。その特性を解明するために、多くの基礎研究が展開されてきたと同時に、その利用は発生工学分野を創成し、基礎生物学・医学・畜産学・水産学等に大きな影響を及ぼしてきた。長い歴史をもつ生殖細胞研究は、配偶子形成過程を体外培養で再現する「in vitro gametogenesis」によりひとつの転機を迎えた。体外培養で配偶子を分化誘導する方法論が完成すれば、世代サイクルの循環に動物個体は不要となり、生殖細胞の分化メカニズムの解明や継続的な観察が培養皿上で可能となる。また in vitro gametogenesis で作られる配偶子の利用は、モデル動物から産業的価値の高い動物や稀少動物へ拡大すると思われる。これまでにマウスの生殖器官（卵巣や精巣）の培養や多能性幹細胞（ES細胞やiPS細胞）からの分化誘導により機能的な配偶子を体外培養で得ることが可能になっている。しかしながら、in vitro gametogenesis で作られる配偶子の発生能「配偶子インテグリティ」は、生体内で作られる配偶子に遠く及ばないことが大きな課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、生体内の配偶子産生システムの理解のもと、配偶子インテグリティを担保する in vitro gametogenesis を革新的技術として確立することを目的とする。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、本研究領域では3つの研究グループ（A01、A02、A03）に分ける。A01グループでは、これまでの in vitro gametogenesis の開発過程で得られた知見や経験をもとに、培養条件および技術の最適化を行う。これと同時に、配偶子の形成を支える支持細胞を人工的に作製することにより卵巣や精巣の環境を再構築する。またこれまでマウスで確立された技術を他の動物へ適用する。A02とA03はこれまでにない新しい技術を導入してA01の研究を支える。A02グループは最先端のイメージング技術や情報処理技術を用いて、配偶子の発生能を非破壊的に予見する。すなわち、これまで結果論的に（産仔が得られたかどうかにより）判断されてきた発生能について予見かつ定量的に判断する新たな技術の開発を目指す。A03グループは生体内で高い発生能をもつ配偶子が作られるプロセスを、「細胞の不均一性と選択」という新しい観点から理解する。これらの研究グループが緊密に連携して、配偶子インテグリティを再構築・

予見・理解することにより、*in vitro gametogenesis* を革新的技術として確立する。

4. 研究の進展状況及び成果

本研究は当初の計画に従って順調に進展している。A01 では *in vitro gametogenesis* を強固なものにする新しい培養条件の発見があった。A02 では発生能を予見するシステムの基盤を構築できた。A03 では生殖細胞系列の選択・除去機構において新しい発見があった。具体的な進捗状況と成果はおもに以下の通りである。

(1) 原始卵胞を作り出す培養条件の発見 (A01) : 生体内と体外培養由来の卵母細胞の遺伝子発現の比較により低酸素条件と物理的刺激が原始卵胞の成立に重要であること明らかにした。これによりこれまでの *in vitro gametogenesis* では不可能であった原始卵胞の再構築に成功した (発表論文: *PNAS*, 2019, *Sci. Adv.*, 2019)。

(2) 化学組成が明らかな培地を用いて精子形成の誘導に成功 (A01) : AlbuMAX (牛の血清アルブミン製剤) から抽出した脂溶性物質に精子形成を誘導する物質が含まれていることを見だし、それがビタミン E 等の抗酸化物質とリゾリン脂質であることをつきとめた。これによりすべての組成が明らかな培地を用いた精子の誘導が可能となった (発表論文: *FASEB J.*, 2020)。

(3) ラットの生殖細胞の発生機構を解明 (A01) : 遺伝子改変ラットを用いて、生殖細胞のもとである始原生殖細胞の発生過程を明らかにした。またその発生過程にはマウスやヒトに保存された遺伝子 *Prdm14* が必須であることを明らかにした (発表論文: *Development*, 2020)。

(4) 非侵襲的に染色体の動態を観察する技術を開発 (A02) : 体外培養で作られた卵母細胞は機械的操作に弱いと、培地に添加するだけで細胞に取り込まれる蛍光物質を用いて染色体・紡錘体をイメージングする技術を確認した。

(5) 細胞内の状態を非侵襲的に観察するシステム「CRIF 解析」を配偶子解析用に最適化 (A02) : 配偶子の内在性蛍光パターンをスキャンするために、各励起波長の強さを記録する顕微鏡制御プログラムと、得られた撮影データから一細胞ごとの内在性蛍光パターンを再構築するアルゴリズムを確認した。

(6) 精子幹細胞の増える環境因子を発見 (A03) : 生体内の精子幹細胞が維持されるために重要な因子を同定し、その観察から精子を作る幹細胞の数が長い間一定に保たれる新しい仕組みを明らかにした。(発表論文: *Cell Stem Cell*, 2019)

(7) 生殖細胞系列の品質管理の分子機構を解明 (A03) : ゲノムに損傷が起こったショウジョウバエの生殖細胞は転写因子 Myc の低下により積極的に除去されていることを明らかにした (発表論文: *Commun Biol*, 2020)。

(8) 生殖細胞系列を維持する機構を解明 (A03) : 始原生殖細胞を決定する因子 Nanos および Pgc はともに始原生殖細胞において体細胞遺伝子の発現を抑制すること、また Pgc が始原生殖細胞の細胞分裂を抑制することも明らかにした (発表論文: *PLoS Genetics*, 2019, *iScience*, 2020)。

5. 今後の研究計画

これまでの研究計画に従って、以下のように領域研究を推進する。特に各研究グループの連携を深めて、領域研究の発展を図る。

(1) A01 における培養条件の最適化に関しては、これまでに確立した培地と培養方法を用いて、高い発生能をもつ精子や卵子の構築に寄与する因子を同定する。また長期培養や観察に適したマイクロデバイス (微小培養機器) の開発を行う。精巣や卵巣の環境の再構築に関しては、これまでのマウスで得られた知見をもとに、ラットや他の動物への応用を試みる。A02 との連携において、これまでに明らかとした発生能と相関するイメージングの特徴を確認するとともに、その責任物質をつきとめる。A03 との連携において、生体内の生殖細胞集団の変化が体外培養でどのように変わるか解析する。

(2) A02 においては、これまで開発してきたイメージング技術をさらに進化させる一方で、発生能と相関する特徴の詳細について明らかにする。染色体イメージングに関しては、体外で作製された卵子の染色体の追跡解析を行うほか、紡錘体の複数の固有ドメインにおける形状変化解析を行う。また CRIF 解析を発展させ、オルガネラの形状を 3 次元的に可視化することを目指す。可視化された画像に基づいて各オルガネラの内部の内在性蛍光パターンを記録する画像処理アルゴリズムを開発する。またこれらにより区別された配偶子の物質的な違いを、これまでに確立した高精度・高感度の質量解析などにより明らかにする。

(3) A03 においては、これまでの予備実験で確立された方法により雌雄のマウス生殖細胞のレパートリー動態 (細胞の集団的变化) の全体像を解明する。これと同時に A01 と連携して、*in vitro gametogenesis* におけるレパートリー動態について解析する。またこれまでショウジョウバエで観察されている生殖細胞の排除機構を分子レベルで明らかにし、その機構が他の動物の生殖細胞において保存されているかを検証する。これらのレパートリー動態や生殖細胞の排除が、どのような空間的な位置情報により行われているかを明らかにするために、組織中より切り出した単一細胞を用いて遺伝子発現解析を行う。

6. 主な発表論文等（受賞等を含む）

1. Iwasaki-Takahashi Y, Shikina S, (著者 8 名略), *Yoshizaki G. Production of functional eggs and sperm from in vitro-expanded type A spermatogonia in rainbow trout. *Commun. Biol. in press*
2. Hamada N, Hamazaki N, Shimamoto S, Hikabe O, Nagamatsu G, Takada Y, Kato K, *Hayashi K. Germ cell-intrinsic effects of sex chromosomes on early oocyte differentiation in mice. *PLoS Genet.* 16:e1008676. (2020)
3. Ichida K, Kawamura W, Miwa M, Iwasaki Y, Kubokawa T, Hayashi M, Yazawa R, *Yoshizaki G. Specific visualization of live type A spermatogonia of Pacific bluefin tuna using fluorescent dye-conjugated antibodies. *Biol Reprod*, 100, 1637-1647. (2019)
4. *Nagamatsu G, Shimamoto S, Hamazaki N, Nishimura Y, *Hayashi K. Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes. *Sci Adv.* 5:eaav9960. (2019)
5. Hayashi M, Ichida K, Sadaie S, Miwa M, Fujiwara R, Nagasaka Y, *Yoshizaki G. Establishment of novel monoclonal antibodies for identification of type A spermatogonia in teleosts. *Biol Reprod.* 101, 478–491. (2019)
6. Shimamoto S, Nishimura Y, Nagamatsu G, Hamada N, Kita H, Hikabe O, Hamazaki N, *Hayashi K. Hypoxia induces the dormant state in oocytes through expression of Foxo3. *PNAS* 116:12321-12326. (2019)
7. Sanjo H, Yao T, (著者 12 名略), *Ogawa T. Antioxidant vitamins and lysophospholipids are critical for inducing mouse spermatogenesis under organ culture conditions. *FASEB J.*, June 2. (2020)
8. Ogawa T. Live Offspring after Testis Tissue Transplantation. *N Engl J Med.* 381:1477-1479. (2019)
9. Sasaki K, Hara S, Yamakami R, Sato Y, Hasegawa S, Kono T, Morohaku K, *Obata Y. Ectopic expression of DNA methyltransferases DNMT3A2 and DNMT3L leads to aberrant hypermethylation and postnatal lethality in mice. *Mol Reprod Dev.* 86, 614-623. (2019)
10. Kobayashi T, Kobayashi H, (著者 8 名略), Kurimoto K, *Hirabayashi M. Germline Development in Rat Revealed by Visualization and Deletion of *Prdm14*. *Development.* 147: dev183798. (2020)
11. Yoshida S, Nishiyama S, (著者 9 名略), Herbert M, and *Kitajima TS. Prc1-rich kinetochores are required for error-free acentrosomal spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes. *Nature Commun.*, doi:10.1038/s41467-020-16488-y. (2020)
12. Ding Y, Kaido M, Llano E, Pendas AM and *Kitajima TS. The post-anaphase SUMO pathway ensures the maintenance of centromeric cohesion through meiosis I-II transition in mammalian oocytes. *Current Biology* 28(10): 1661-1669. (2018)
13. Hirayama T, Takabe K, Kiyokawa T, Nomura N, *Yawata Y, Reconstruction of Single-Cell Innate Fluorescence Signature by Confocal Microscopy, *Journal of Visualised Experiments* 159, (2020)
14. *Yawata Y, Kiyokawa T, Kawamura Y, Hirayama T, Takabe K, *Nomura N. Intra and inter species variability of single-cell innate fluorescence signature of microbial cell, *Applied and Environmental Microbiology* 85, e00608-19 (2019)
15. Kitadate Y, D.J. Jorg, M. (著者 19 名略), *B.D. Simons and *S. Yoshida: Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche. *Cell Stem Cell* 24, 79-92 (2019)
16. Ota R and *Kobayashi S. Myc plays an important role in *Drosophila* PM-hybrid dysgenesis to eliminate germline cells with genetic damage. *Communications Biology*, 3, 185. (2020)
17. Morita S, Ota R, Hayashi M and *Kobayashi S. Repression of G1/S transition by transient inhibition of miR-10404 expression in *Drosophila* primordial germ cells. *iScience*, 23, 100950. (2020)
18. Nakamura S, Hira S, (著者 7 名略), Kobayashi S, and *Mukai M. A truncated form of a transcription factor Mamo activates *vasa* in *Drosophila* embryos. *Communications biology*, 2: 422. (2019)
19. *Asaoka M, Hanyu-Nakamura K, Nakamura A, and *Kobayashi S. Maternal Nanos inhibits Importin- α 2/Pendulin-dependent nuclear import to prevent somatic gene expression in the *Drosophila* germline. *PLoS Genetics*, 15, e1008090 (2019)
20. Nagaoka S, Nakaki F, (著者 4 名略), Kurimoto K, Hayashi K, Nakamura T, Yamamoto T, and *Saitou M. ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice. *Science*, 367, eaaw4115 (2020)

(このほか論文 80 報をこれまでに発表)

ホームページ等

新学術領域研究「配偶子インテグリティの構築」ホームページ

<https://www.gamete-integrity.com/>