

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名：生殖系列におけるゲノムプログラミング機構の統合的解明とその応用

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)：

研究代表者

斎藤 通紀(京都大学大学院医学研究科 教授)

3. 研究実施概要

本研究は、生殖細胞の初期発生過程、精子および卵子の源となる始原生殖細胞(Primordial Germ Cell: PGC)の形成過程に随伴するゲノムプログラミングの本態を高い解像度で解明し、それを引き起こす必要十分な分子機構の同定を目標とした。本研究では、目的達成に相補的な2つの研究を同時に推進した。第一の研究としては、少数細胞のエピゲノム状態を ChIP-Seq(クロマチン免疫沈降 DNA 次世代シーケンシング)により定量的に測定する技術「微量エピゲノム測定法」を開発し、それに基づき生殖細胞形成・維持過程に伴う様々なヒストン修飾状態を測定するとともに、生殖細胞形成・維持過程に伴う Blimp1 及び Oct3/4 のゲノム上の結合配列の同定を目指した。第二の研究は、Blimp1 や Prdm14 などの生殖細胞形成に必須な因子を胚体外胚葉様細胞に発現誘導することにより、生殖細胞形成過程を再現し、その過程における Blimp1 や Prdm14 の機能を詳細に解析することを目指した。

第一の研究では、少数細胞からの ChIP-Seq 技術開発の材料として、Oct3/4-EGFP ノックイン ES 細胞、EGFP-Blimp1 ホモノックインマウス及び ES 細胞、及び BT(biotin ligase target sequence)-Blimp1 ホモノックイン: Biotin Ligase ホモ TG マウス及び ES 細胞を樹立し、EGFP-Blimp1 ホモノックインマウスを用いて Blimp1 の発現・局在を生殖細胞形成初期から生殖細胞の雌雄分化直前まで可視化することに成功した。さらに、微量エピゲノム測定法開発の第一段階として、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 個の細胞から ChIP にて回収したゲノム DNA 断片を PCR により増幅し定量性を検討する実験を行った。様々な試行錯誤の結果、独自にデザインしたプライマーと増幅産物精製法を用いることで、 1×10^5 個の細胞からは高い定量性を有し、また $3 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個の細胞からは十分に定量的な、転写因子結合配列及び特異的ヒストン修飾配列増幅法の開発に成功した。今後、本方法を用いて 1×10^5 個、 1×10^4 個、 3×10^3 個から増幅した ChIP-Seq データと、 1×10^7 個の細胞から増幅を行わずに得られる ChIP-Seq データを比較することで、本方法論の有用性を証明する。

一方、第二の研究を可能とする実験系として、ES 細胞及び iPS 細胞から胚体外胚葉様細胞を経て PGC 様細胞を誘導することに成功した。PGC 様細胞は、遺伝子発現、エピゲノムプロファイル、細胞動態において PGC と非常に類似した細胞で、生殖細胞を欠損する W/W^{ma}マウスの新生仔精巣に移植することで精子に分化し、得られた精子は卵子と顕微授精させることで、健全な子孫に貢献した。本研究により、初めて、マウス生殖細胞形成過程の試験管内再構成が可能となり、本実験系を用いた様々な応用実験が可能となった。本実験系を用いて、ES 細胞、胚体外胚葉様細胞、PGC 様細胞(それぞれ 10^6 細胞)における Blimp1 及び Oct3/4 の結合部位の同定、ヒストン修飾及び DNA メチル化、DNA ヒドロキシメチル化の動態解析を進めている。

また、本実験系を用いて、メス ES 細胞からメス胚体外胚葉様細胞、メス PGC 様細胞を誘導し、再構成卵巣法により卵子が形成されるか、形成されるとすればその卵子は健全な子孫に貢献するか、に関する実験を進めた。

4. 事後評価結果

4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

培養皿中でマウス ES 細胞および iPS 細胞から胚体外胚葉(エピブラスト、原始外胚葉)様細胞を経て PGC 様細胞を誘導することに成功した。この PGC 様細胞は生殖細胞形成能を有し、得られた PGC 細胞を移植することで精子を作出し、子孫を得ることに成功したことは特筆に値する成果である。さらに、同様の手法を用いて雌

由来 PGC 様細胞を移植し 卵子の作製にも成功するという世界が驚く成果も上げた。

生体から極少量の細胞 ($\sim 1 \times 10^4$ 個) を取り出しエピゲノム状態を ChIP-Seq により定量的に測定する「微量エピゲノム法」の開発については、S/N 比については改善の余地があるものの進展はみられた。iPS 細胞分野だけでなく多くの分野で期待される技術であり、また世界的に競争の激しい分野でもあることから、一度測定原理に立ち返って抜本的な見直しを行い、早期に技術を確立することが望まれる。

本プロジェクトは平成 23 年 8 月から ERATO 研究に採択され、CREST は平成 24 年 3 月迄の実施となった。研究代表者のリーダーシップの下、独自の手法を開発しつつ当初計画した研究項目を着実に推進し、平成 24 年度以降に予定されていた研究計画に確実につながる状況を作り出した。研究チームの体制やマネジメントは適切であったと評価できる。ERATO においてはマウスに加え霊長類の系への展開が図られるとのことで、本プロジェクトの成果を基に今後の着実な進展が期待される。

2011 年の ES 細胞からの PGC 様細胞の樹立に関する論文を始め、2 年半の研究期間で原著論文 4 報、総説・書籍 4 件、海外招待講演 13 件と多くの発表がなされた。世界から注目される大きな成果が得られたことは高く評価できる。また、同手法については基本技術について海外特許出願がなされているが、基盤技術としての有用性が高いことから、今後更なる特許戦略上の進展・拡大が期待でき、できるだけ包括的な特許網を構築することが強く望まれる。

4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

マウス ES/iPS 細胞から機能的な PGC 様細胞を誘導し生殖細胞の作製に成功したことは、多能性幹細胞を起点としたマウス生殖細胞形成過程の再構成に成功したことを示すものであり、マウス発生過程の再構成技術や生殖医工学への貢献は、基礎生物学的にも応用生物学的にも極めて大きい。世界で初めての成功であり、世界に高いレベルの科学的・技術的インパクトを与えている。

ES/iPS 細胞から生殖細胞分化を自在に誘導できることは、将来的に不妊治療にもつながる可能性があることから、基盤技術として医療応用上重要な進歩であり、社会的なインパクトも大きい。ERATO に採択され、研究規模の拡大が図られることから、今後はこれまでの成果を土台にして家畜や霊長類に向けての研究の発展、社会への展開が期待できる。

研究当初から iPS 細胞研究との関連性は必ずしも明確ではなかったが、PGC の研究を通じて未分化細胞の分化に関わる重要な成果を上げるなど、iPS 細胞の応用研究として社会へのインパクトと波及効果は大きく、得られた成果は戦略目標達成に大きく貢献すると評価する。

ES/iPS 細胞からの生殖細胞形成におけるゲノムリプログラミング過程、エピゲノム変化の本格的な解析は今後の大きな課題である。「微量エピゲノム法」の開発に成功した折には、本プロジェクトより創出された種々の細胞を用いて得られるエピジェネティック変化の網羅的かつ体系的解析結果は、発生工学のみならず複数の研究分野に大きな波及効果をもたらすであろう。

4-3. 総合的評価

本プロジェクトでは、微量エピゲノム解析手法の開発及び、転写調節因子による生殖系列エピゲノム変換機構の解明の大きく2つの研究が実施され、多能性幹細胞からのマウス生殖細胞形成過程の再構成に成功するなど国際的にも極めて高く評価される成果を創出した。

期間中に高いレベルの学術誌に論文を発表し多くの報道で取り上げられ、また多くの国際会議に招待されるなど国内外から注目されている。CRESTとしては短期間であったが、研究費を有効に活用し大きな成果を上げたことは高く評価される。

本領域の戦略目標と合致した研究であり、また研究成果でもある。科学的・技術的インパクトも高く、今後の研究の発展が期待できる。ただし、研究の方向性については、生殖医療に関わるだけに、生命・社会倫理の面からも慎重に考慮されるべきである。平成23年度をもってCRESTが終了して現在はERATOへと移行しているが、研究そのものは極めて高い連続性を有しているので、今後も研究の円滑な推進と更なる発展が期待される。