

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制
御等の医療基盤技術」
研究課題「生殖系列におけるゲノムリプログラミング
機構の統合的解明とその応用」

研究終了報告書

研究期間 平成21年10月～平成24年3月

研究代表者: 斎藤 通紀
(京都大学 大学院医学研究科、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究提案とその発展研究は、平成23年8月より ERATO 研究に採択された。そのため CREST 研究は平成24年3月までの2年半にて終了となった。当初の研究計画は概ね計画通り進行中であるが、平成24年3月の時点では、それぞれの計画が実験系・方法論の開発を伴う挑戦的なものであることもあり、実験系の構築中・実験結果の解析中等、未完成となっているものが多い。それぞれの計画の速やかな完成を目指している。

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 Cells: PGCs) 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。第一の研究は、1-1) 少数細胞 (~1000-10000 細胞) のエピゲノム状態を ChIP-Seq (クロマチン免疫沈降 DNA 次世代シーケンス) 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、1-2) 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、1-3) 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を同定する。第二の研究は、2-1) 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する、2-2) 再現された過程における Blimp1 や Prdm14 の機能を詳細に解析する。第一第二の研究成果を総合することで、生殖細胞の発生過程で起こるゲノムプログラミングの本態を高い解像度で解明し、それを引き起こすに必要十分な分子機構を同定する。

一方、第二の研究を可能とする実験系として、我々は、ESCs 及び人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPSCs) から胚体外胚葉様細胞 (epiblast-like cells: EpiLCs) を経て始原生殖細胞様細胞 (primordial germ cell-like cells: PGCLCs) を誘導することに成功した。PGCLCs 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、PGCs と非常に類似した細胞で、重要なことに、生殖細胞を欠損する *W/W^o* 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 (Hayashi et al., Cell, 146, 519-532, 2011)。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。

また、我々は、本実験系を用いて、メス ESCs からメス EpiLCs、メス PGCLCs 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、に関する実験を行った。誘導した PGCLCs を、胎児卵巣体細胞と浮遊状態で共培養すると胎児卵巣様組織が再構成され (再構成卵巣)、再構成卵巣内で培養された PGCLCs 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、減数分裂開始直前の PGCs と類似した状態にまで効率よく発生した。再構成卵巣を、ヌードマウスの卵巣被膜下に移植し、移植後1ヶ月で摘出・解析すると、PGCLC 由来の成熟卵胞が形成されていることがわかった。平成24年3月の時点で、これら卵胞の発生能、及び iPSCs を起点に同様のことが再現出来るかを解析中である (平成24年10月に、Hayashi et al., Science, 338, 971, 2012, として発表済み)。

ESCs から EpiLCs を経て PGCLCs を誘導する実験系を開発後、2-1) を達成するため、Blimp1 や Prdm14 など生殖細胞形成過程において重要な働きをすることが知られている転写制御因子もしくはその過程で発現することが知られている転写制御因子の発現を doxycyclin 依存的に誘導可能かつ PGC マーカーを有する ESCs を樹立した (BVSC:: ROSA26::rtTA ESCs)。この ESCs に、piggybac transposon 法により、doxycyclin 依存的 promoter 下にその発現が誘導される転写制御因子群を transfect し、それら細胞を EpiLCs に誘導し、その後 doxycyclin により転写制御因子の発現を誘導することで、PGC 様細胞が誘導されるかを検証したところ、複数の転写制御因子を組み合わせて発現させることで PGC 様細胞が誘導されること、PGC 様細胞の誘導効率は転写制御因子の組み合わせに依存することがわかった。平成24年3月の時点で、転写制御因子により誘導される PGC 様細胞の特性 (遺伝子発現、エピゲノムプロファイル、精子形成能) を解析中である (平成25年8月に、Nakaki et al., Nature, 501, 222, 2013, として発

表済み)。

(2) 顕著な成果

1. ESCs から EpiLCs を誘導する系の確立。

概要: マウスの発生過程において、内部細胞塊の特徴を有する embryonic stem cells (ESCs) から胚体外胚葉の特徴を有する epiblast-like cells (EpiLCs) を誘導する系の確立に成功した (Hayashi et al., Cell, 146, 519-532, 2011)。この系は ESCs を起点としたマウス発生過程の再構成に有用である。

2. EpiLCs から PGCLCs を誘導する系の確立。

概要: EpiLCs から始原生殖細胞の特徴を有する primordial germ cell-like cells (PGCLCs) を誘導する系の確立に成功した。PGCLCs は PGCs と同様の精子形成能を有することを証明した (Hayashi et al., Cell, 146, 519-532, 2011)。この系は生殖医工学の発展に有用である。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

生体における秩序だったゲノムプログラミング過程を内包する生殖系列発生機構の研究は、iPS 細胞誘導機構の研究を相補し、両機構の解明は、細胞形質制御機構解明において高い相乗効果を生み出すと期待される。本研究は、精子および卵子の源となる始原生殖細胞 (Primordial Germ Cells: PGCs) 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。この目標を達成するため、以下に記す、相補的な2つの研究を遂行した。

第一の研究は、1-1) 少数細胞 (~1000-10000 細胞) のエピゲノム状態を ChIP-Seq により定量的に測定する技術を開発し (平成24年3月での達成を目標とした)、それに基づいて、1-2) 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 (平成26年3月での達成・発表を目標とした)、1-3) 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を同定する (平成26年3月での達成・発表を目標とした)。

第二の研究は、2-1) Blimp1 や Prdm14 などの生殖細胞形成に必要な因子を、生殖細胞形成能を有する多能性幹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する (平成24年3月での達成を目標とした)、2-2) 再現された過程における Blimp1 や Prdm14 の機能を詳細に解析する (平成26年3月での達成・発表を目標とした)。

第一第二の研究成果を総合することで、生殖細胞の発生過程で起こるゲノムプログラミングの本態を高い解像度で解明し、それを引き起こすに必要十分な分子機構を同定する (平成27年3月での達成・発表を目標とした)。また解明した分子機構に基づき、細胞のエピゲノム状態と細胞の増殖を制御する技術開発に端緒をつける。

(2) 新たに追加・修正など変更した研究構想

本研究提案とその発展研究は、平成23年8月より ERATO 研究に採択された。そのため CREST 研究は平成24年3月までの2年半にて終了となった。当初の研究計画は概ね計画通り進行中であるが、平成24年3月の時点では、それぞれの計画が実験系・方法論の開発を伴う挑戦的なものであることもあり、実験系の構築中・実験結果の解析中等、未完成となっているものが多い。それぞれの計画の速やかな完成を目指している。

§ 3 研究実施体制

(1)「斎藤」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
斎藤 通紀	京都大学大学院医学研究科	教授	H21.10～H24.3
林 克彦	同上	講師	H21.10～H23.9
栗本 一基	同上	助教	H22.4～H24.3
大田 浩	同上	助教	H23.4～H24.3
山路 剛史	同上	特定研究員	H22.3～H24.3
藪田 幸宏	同上	特定研究員	H22.4～H24.3
福永 愛子	同上	教務補佐員	H22.3～H23.1
小代 明美	同上	教務補佐員	H22.4～H23.7
加畑 倫子	同上	教務補佐員	H23.4～H24.3
大迫 清子	同上	教務補佐員	H23.7～H24.3
廣田 孝幸	同上	オフィスアシスタント	H22.4～H24.3
丹羽 薫	同上	教務補佐員	H21.10～H24.3

② 研究項目

- ・ 微量エピゲノム測定法の開発と生殖系列エピゲノム変換の本態の解明
- ・ 転写制御因子による生殖系列エピゲノム変換機構の解明

(2)「栗本」グループ

① 研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
栗本 一基	独立行政法人理化学研究所	基礎科学特別研究員	H21.10～H22.3

② 研究項目

- ・ 微量エピゲノム測定法の開発と生殖系列エピゲノム変換の本態の解明

§ 4 研究実施内容及び成果

マウス及びヒト体細胞からの iPSCs 作成は、発生・細胞・幹細胞生物学分野に衝撃を与え、また再生医学領域の大きな前進に貢献しつつある。iPSCs 作成効率の上昇・ベクターのゲノムへの組み込みを伴わないより安全な iPSCs 作成技術の開発などの分野は急速に進展し、技術的にはほぼ確立されつつある。今後は iPSCs を高い効率で再現性よく医学的有用細胞に分化させる技術の開発がさらに重要になる。そうした研究を推進する際に改めて重要になるのが、多能性幹細胞から様々な系譜の細胞群がいかんして形成されるかを正しく理解することと、そうした理解に基づいて iPSCs から誘導された細胞の分化状態を正しく評価することである。

一方で、体細胞が多能性幹細胞である iPSCs にリプログラミングされる分子機構に関しては、その過程に stochastic な要素が関与するため、多くの点が未解明である。リプログラミング過程に関与する分子機構のより詳細な解明は、iPSCs 作成のさらなる効率化・簡便化につながりうる。上述の背景を考慮すると、生体における細胞系譜分化・機能維持機構の正確な理解とそれらの過程を規定するエピゲノム状態の測定を可能とすることが、本領域を確実に発展させうる基礎研究になると言える。

ヒトを含む多細胞生物を構成する細胞系譜の中で、生殖細胞系列はその遺伝情報を次世代に継承する唯一の細胞系譜である。その機能を保証するために、生殖細胞決定過程に伴って、体細胞型のエピゲノムが多能性幹細胞型のエピゲノムにリプログラミングされることが示唆されている。本研究は、生殖細胞系譜分化・機能維持機構の正確な理解とそれらの過程を規定するエピゲノム状態を測定しゲノムリプログラミングの詳細な分子機構を解明することで、本領域の重層的な発展に貢献することを目標とした。本研究の目的の一つである、少数細胞のエピゲノム測定法の開発は、生体に存在する多くの細胞系譜のエピゲノム測定を可能にすると期待される。

本研究は、斎藤グループ及び栗本グループ2つで開始したが、実際には栗本グループは開始半年後に斎藤グループと合流し、京都大学大学院医学研究科にて研究を行った。

4.1 微量エピゲノム測定法の開発と生殖系列エピゲノム変換の本態の解明(理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター 栗本グループ)

(1) 研究成果の今後期待される展開

栗本グループは、開始半年後に斎藤グループと合流し、その後京都大学大学院医学研究科にて研究を行ったので、開始半年後の研究及び今後の展開に関しては、斎藤グループの項に記す。

4.2 微量エピゲノム測定法の開発と生殖系列エピゲノム変換の本態の解明、転写制御因子による生殖系列エピゲノム変換機構の解明(京都大学大学院医学研究科 斎藤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果(平成21年10月～平成24年3月)

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 Cells: PGCs)の形成過程]に随伴するゲノムリ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。

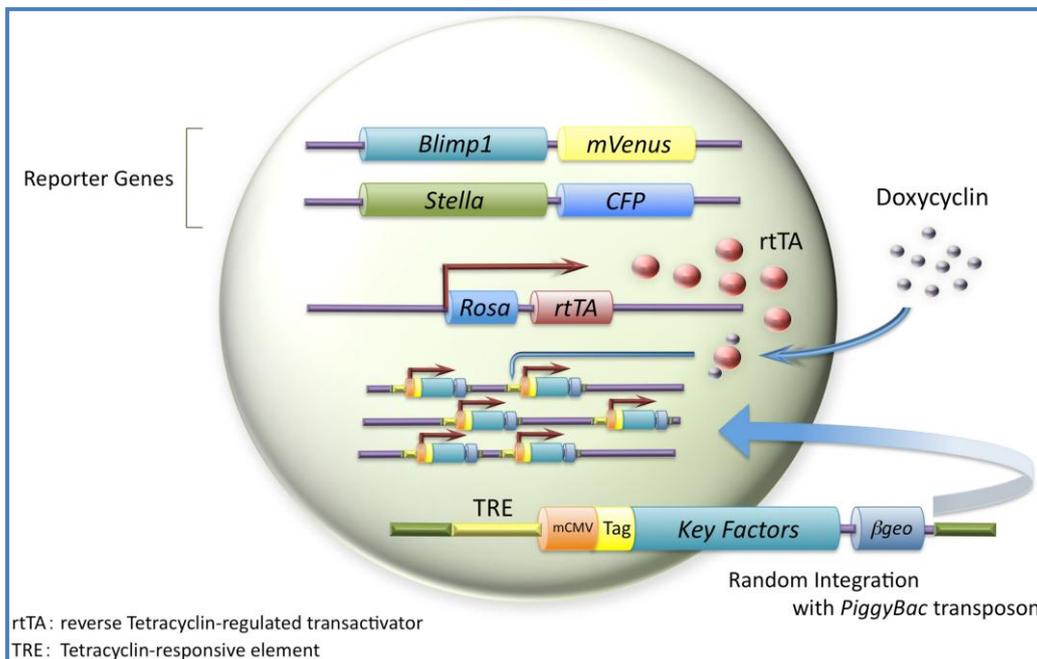
<転写制御因子による生殖系列エピゲノム変換機構の解明>

本研究は、PGCs の形成過程に随伴するゲノムリ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、上述の研究を相補するため、Blimp1 及び Prdm14 などの PGCs 形成過程に必須の役割を果たす転写制御因子を、PGCs を形成するコンピテンスを有する多能性幹細胞に発現誘導し、PGCs 形成過程がどの程度再現されるかを、胎仔精巣への移植実験も含めて、あらゆる観点から検証する。また、再現された PGCs 形成過程において、それぞれの因子が果たす役割を詳細に解明する [PGCs 形成過程に随伴して、体細胞化の抑制・多能性の再獲得・ゲノムリプログラミングなどの現象が起こるが、これらの過程

において Blimp1 や Prdm14 が機能するメカニズムは不明である]。これらの研究成果を達成することによって、生体内において秩序だった機構に基づいて起こるゲノムプログラミングの分子機構がこれまでにない解像度で明らかになると期待される。

本目的を達成するため、第一に、Blimp1 や Prdm14 の発現を誘導でき、かつ PGC マーカーを有する ESCs の樹立を行った。具体的には、Blimp1-mVenus:stella-ECFP ダブルレポーターマウスと ROSA26::rtTA マウス [構成的に活性化状態にある ROSA26 locus に tetracyclin-regulated transactivator (rtTA)が導入され、rtTA 応答配列を持つ任意の導入遺伝子の発現を doxycyclin 依存的に誘導できる]を交配し、その胚盤胞を培養し、BVSC:: ROSA26::rtTA ESCs を樹立した(図5)。

次に、ESCsからPGCsを形成するコンピテンスを有する多能性幹細胞の誘導を試みた。我々は、無血清培養条件下、E5.5-6.25 の胚体外胚葉に BMP4 を高濃度で添加すると PGC 様細胞が高効率かつ選択的に誘導されることを発表している。この事実は、ESCs を E5.5-6.25 の胚体外胚葉に相当する細胞に分化させ、その細胞に Blimp1 や Prdm14 を発現誘導することで、生殖細胞形成過程における Blimp1 や Prdm14 の機能を直接解析できることを示唆している。様々な試行錯誤の結果、無血清・無フィーダー細胞条件下、MEK inhibitor (PD0325901), GSK3 β inhibitor (CHIR99021), LIF 存在下(2i+LIF)で培養した ESCs を、ActivinA, basic fibroblast growth factor (bFGF), 1% knockout serum replacement (KSR)で誘導すると、一過性に、形態学的に胚体外胚葉に類似した上皮細胞に一樣に分化することを見出し、我々はこの細胞を胚体外胚葉様細胞(EpiBlast-like cells: EpiLCs)と名付けた。EpiLCs の遺伝子発現を検討した結果、特に誘導後2日目の EpiLCs(d2 EpiLCs)は、E5.75 の胚体外胚葉と極めて類似した遺伝子発現を呈することが明らかとなった。

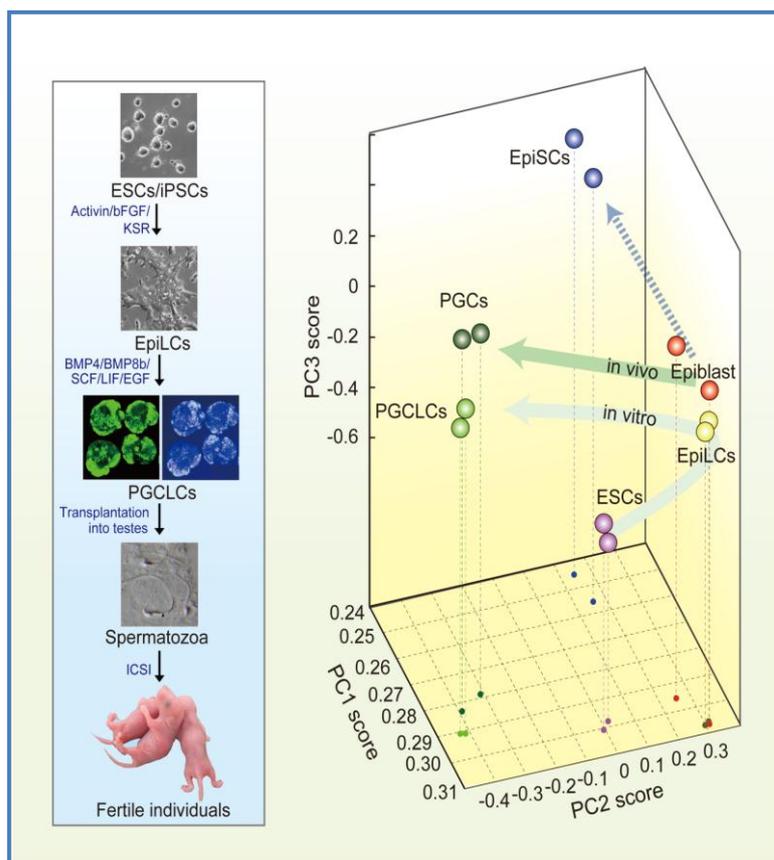


(図5) BVSC:: ROSA26::rtTA ESCs の樹立とそれを用いた転写制御因子の発現系。この細胞に rtTA 応答配列制御下に転写制御因子を発現する cDNA を piggybac transposon 系を用いて導入する。樹立された ESCs を EpiLCs に誘導し、Doxycyclin を添加することで、転写制御因子による PGC 様細胞形成能を検証する。

d2 EpiLCs を、胚体外胚葉から PGC 様細胞を誘導した条件にて培養すると、誘導2日目で強く BV を発現し、4日目で SC を発現する PGC 様細胞(PGC-like cells: PGCLCs)に効率よく分化することが明らかとなった。EpiLCs から PGCLCs が誘導される過程における遺伝子発現変化は、胚体外胚葉から PGCs が誘導される過程の遺伝子発現変化と酷似しており、また PGCLCs は、E9.5 の PGCs とよく似たエピゲノムプロファイル及び細胞動態を示した。さらに、PGCLCs は、生殖細胞を欠損する *W/W* マウスの新生児精巣に移植すると精子形成を起こし、形成された精子は健全で fertile な子孫形成に寄与した。これらの結果は、ESCs から、子孫形成可能な生殖系細胞の誘導に成功した初めての成果である (Hayashi et al., Cell, 146, 519-532, 2011)。

さらに、我々は、表面抗原である SSEA1 及び Integrin β 3 を用いると、Blimp1 -mVenus などのトランスジーンに依存せずに PGCLCs を選別出来ることを見出し、BVSC トランスジーンを有さない ESCs 及び iPSCs から PGCLCs を誘導し、それらから *W/W* マウスへの移植により精子及び健全な子孫を得ることに成功した (Hayashi et al., Cell, 146, 519-532, 2011) (図6)。これらの成果は大きな反響を起こし、国内外の新聞等でも大きく取り上げられた。

本方法の開発により、 10^5 - 10^6 の PGCLCs を比較的容易に得ることが可能となり、これらの細胞を用いて、上述した第一の研究で目的とする、生殖細胞形成・維持過程に伴う様々なヒストン修飾状態の測定、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、を行う基盤が形成された。また Blimp1 や Prdm14 などの転写制御因子を発現し、PGCLCs が形成されるかどうかを検証する実験の基盤も形成された。



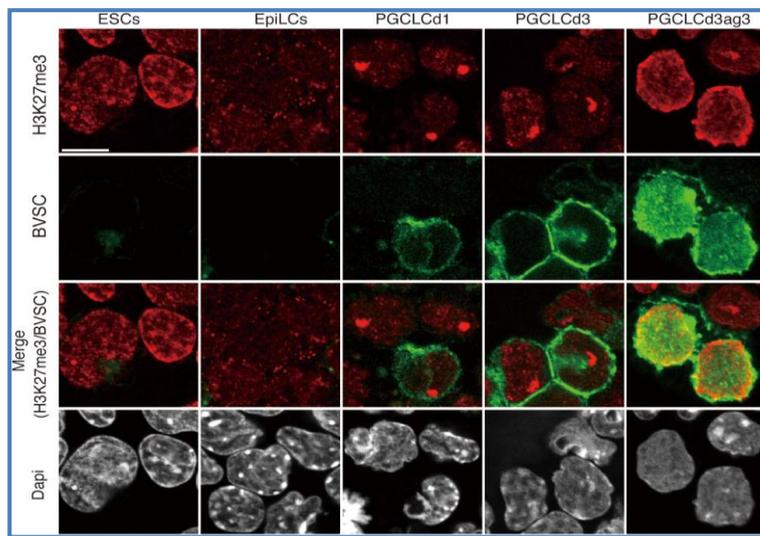
(図6) ESCs/iPSCs から EpiLCs を介した PGCLCs の誘導。

(左) ESCs/iPSCs から EpiLCs を介した PGCLCs の誘導過程の概念図。

(右) ESCs から EpiLCs を介した PGCLCs の誘導過程におけるマイクロアレイによる遺伝子発現変化を主成分分析 (Principle component analysis: PCA) にて解析した結果。EpiLCs から PGCLCs への分化に伴う遺伝子発現変化は、胚体外胚葉 (epiblast) から PGCs の分化に伴う遺伝子発現変化と非常に似ていることを示している。

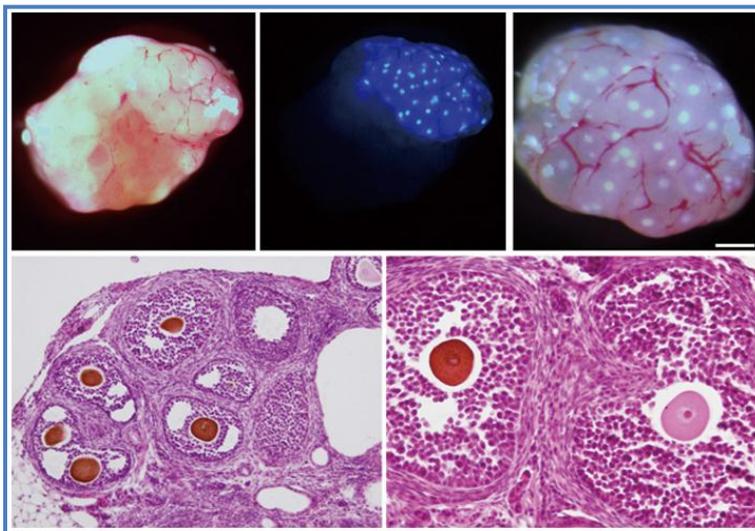
そこで、我々は、BVSC:: ROSA26::rtTA ESCs に、piggybac transposon 法により、rtTA 依存の promoter 下にその発現が誘導される転写制御因子群(Blimp1 及び Prdm14 を含む複数の候補を及びそれらの組み合わせを検討した)を transfect し、それら細胞を EpiLCs に誘導し、その後 doxycyclin により転写制御因子の発現を誘導することで、PGC 様細胞が誘導されるかを検証中である。予備的な結果であるが、複数の転写制御因子群を組み合わせで発現誘導することで、EpiLCs から BVSC 陽性の PGCLC 様細胞が誘導されること、発現誘導する転写制御因子群の組み合わせの違いにより PGCLC 様細胞の誘導効率が異なること、等を含む非常に興味深い結果を得つつある。平成24年3月の時点で、これら転写制御因子群によって誘導される PGCLC 様細胞が、遺伝子発現及びエピゲノムプロファイルにおいて PGCs 及び PGCLCs とどれくらい似ているか、それらは *W/W*マウスの新生児精巣への移植により精子形成を起こすかを検証しつつある(Nakaki et al., unpublished results) (平成25年8月に、Nakaki et al., Nature, 501, 222, 2013, として発表済み)。

PGCs は精子のみならず卵子の前駆細胞である。そこで、我々は、本実験系を用いて、メス ESCs からメス EpiLCs、メス PGCLCs 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、に関する実験を行った。誘導した PGCLCs を、胎児卵巣体細胞と浮遊状態で共培養すると胎児卵巣様組織が再構成され(再構成卵巣)、再構成卵巣内で培養された PGCLCs 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、減数分裂開始直前の PGCs と類似した状態にまで効率よく発生した(図7)。再構成卵巣を、ヌードマウスの卵巣被膜下に移植し、移植後1ヶ月で摘出・解析すると、PGCLC 由来の成熟卵胞が形成されていることがわかった(図8)。平成24年3月の時点で、これら卵胞の発生能、及び iPSCs を起点に同様のことが再現出来るかを解析中である(平成24年10月に、Hayashi et al., Science, 338, 971, 2012, として発表済み)。



(図7) メス ESCs からメス EpiLCs、メス PGCLCs を誘導し、再構成卵巣法によりメス PGCLCs をさらに発生させ、それらにおける H3K27me3 の状態を検証した。ESCs では H3K27me3 が核全体で高いが、EpiLCs になるとそれらが一様に低下する。誘導後一日目の PGCLCs(PGCLCd1)では、X 染色体の不活性化に伴う H3K27me3 陽性の強いスポット (Xi) が形成され、

それらは誘導後3日目の PGCLCs(PGCLCd3)でも同様だが、PGCLCd3 を、再構成卵巣内で3日間培養すると、Xiが消え、核全体に H3K27me3 のシグナルが高くなる。この現象は PGC 形成過程でおこる X 染色体の不活性化と再活性化を再現していると考えられる。



(図8) ノードマウスの卵巣被膜下に移植した再構成卵巣。(上左)明視野。右上に再構成卵巣組織片が観察される。左下はレシピエントのノードマウスの卵巣。(上中)CFPの蛍光写真。Stella-ECFP 陽性卵子様細胞を含む卵胞が形成されていることが示唆される。(上右)取り出した再構成卵巣の明視野、蛍光の合成写真。再構成卵巣に豊富な毛細血管網が見られる。Bar, 500 μ m。(下左)再構成卵巣とレシピエ

ント卵巣の複合体の組織切片。褐色に染色されているのが stella-ECFP 陽性の PGCLC 由来卵子様細胞。ヘマトキシリン・エオジン染色にて対照染色。(下右)切片の拡大図。stella-ECFP 陽性の PGCLC 由来卵胞は、レシピエント由来の卵胞と同様の発生をすることが示唆される。

(2) 研究成果の今後期待される展開

< 転写制御因子による生殖系列エピゲノム変換機構の解明 >

本研究目標が達成されれば、我々のこれまでの研究成果とあわせて、生殖細胞系列の形成過程に際する遺伝子発現とそれを支えるエピゲノム基盤が解明され、さらにその過程が試験管内で人為的に再現されることになる。サイトカインを用いた誘導に関しては、すでに再現され、国内外の研究に様々な波及効果を与えた (Hayashi et al., Cell, 146, 519-532, 2011)。現在そのさらなる発展[ESCs/iPSCs から卵子を誘導する実験、ESCs から精子幹細胞を誘導する実験]に向けて研究を推進中である。生殖細胞の形成過程が転写制御因子の誘導により再現されれば、生殖細胞形成機構とエピゲノムリプログラミング機構解明の本態の解明にさらに近づくことになる。細胞分化過程を本研究が想定するレベルで達成した先例はなく、本研究が細胞分化研究全般の規範ともなることが期待される。生殖系列の形成過程は単純な細胞分化過程と異なり、大規模かつ秩序だったエピゲノムリプログラミングを随伴する細胞形質転換過程でもあり、本研究構想の達成によりその全容が解明・再現されれば、ゲノムリプログラミングの本質を明らかにする初めての研究となるといえる。これは iPSC 細胞誘導メカニズムの研究と高い相乗効果を産み出すと期待される。

生殖細胞は、全能性エピゲノムを形成するために自然な過程でエピゲノムリプログラミングを行う唯一の細胞系譜である。生殖系列の研究より得られる知識は、最終的には、細胞のエピゲノム状態を自由に制御する技術の開発につながり得ると考え、そうした技術開発は医学に大きな影響を与えると考えている。今後そうした方向性の研究を展開したいと考えている。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 4件)

1. Yamaji, M., Tanaka, T., Shigeta, M., Chuma, S., Saga, Y., and Saitou, M. Functional reconstruction of Nanos3 expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals distinct subcellular localizations of Nanos3. *Reproduction*, 139, 381–393. 2010 (DOI: 10.1530/REP-09-0373)
2. Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoro, K., Chuma, S., and Saitou, M., TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly and spermiogenesis in mice. *The Journal of Cell Biology*, 192, 781–795., 2010 (DOI:10.1083/jcb.201009043)
3. Hirota, T., Ohta, H., Shigeta, M., Niwa, H., and Saitou, M., Drug-inducible gene recombination by the Dppa3–MER Cre MER transgene in the developmental cycle of the germ cell lineage in mice, *Biology of Reproduction*, 85, 367–377., 2011 (DOI:10.1095/biolreprod.110.090662)
4. Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146, 519–532., 2011 (DOI:10.1016/j.cell.2011.06.052)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Saitou, M., and Yamaji, M. Germ cell specification in mice: Signalling, transcription regulation and epigenetic consequences. *Reproduction*, 139, 931–942, 2010 (DOI: 10.1530/REP-10-0043).
2. Kurimoto, K., and Saitou, M., Single-cell cDNA microarray profiling of complex biological processes of differentiation. *Current Opinion in Genetics and Development*, 20, 470–477., 2010 (DOI: 10.1016/j.gde.2010.06.003).
3. Kurimoto, K., and Saitou, M. A global single-cell cDNA amplification method for quantitative microarray analysis. *Methods in Molecular Biology*, 687, 91–111, 2011.
4. Saitou, M., Kagiwada, S., and Kurimoto, K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. *Development*, 139, 15–31, 2012. (DOI:10.1242/dev.050849)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 14件、国際会議 13件)

1. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、(独)理化学研究所発生・再生科学総合研究センター、JST, CREST 「生殖系列の起源と特性、その再構成」, 第9回日本再生医療学会総会, 広島国際会議場, 平成22年3月18日
2. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST 「生殖系列の起源と特性、その再構成」, 第62回日本細胞生物学会, 大阪国際会議場, 平成22年5月19日
3. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST 「Germ cell specification in vivo and in vitro」, ISSCR 8th Annual Meeting, San Francisco, 平成22年6月18日
4. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST 「生殖系列の起源と特性、その再構成」, 第43回日本発生生物学会, 京都国際会議場, 平成22年6月21日
5. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST 「生殖系列の起源と特性、その再構成」, 第16回 成人病の病因・病態の解明に関する研究会, 軽井沢プリンスホテル, 平成22年7月4日
6. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST, A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice, Joint Meeting of Society for Developmental Biology and Japanese Society for Developmental Biology, Albuquerque, 平成22年8月8日
7. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST 「生殖系列の起源と特性及びその再

- 構成」, 第1回 Molecular Cardiovascular Conference II, キロロ“ホテルピアノ”(北海道余市郡赤井川村), 平成22年9月4日
8. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST 「生殖系列の起源と特性、その再構成」, 第11回 運動器科学研究会, 万平ホテル軽井沢, 平成22年9月10日
 9. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST, Germ cell specification in mice in vivo and in vitro, 2010 Cold Spring Harbor Asia Conference: Molecular Switches & Genome Function in Stem Cells & Development, Cold Spring Harbor Asia Conference Centre (Dushu Lake Conference Hotel F1), 平成22年9月22日
 10. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST, Germ cell specification in mice in vivo and in vitro, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 平成22年10月5日
 11. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST, Specification of germ cell fate in mice in vivo and in vitro, International Symposium on “Epigenome Network, Development and Reprogramming of Germ cells”, 九州大学医学部百年講堂, 平成22年11月23日
 12. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST 「生殖細胞の形成機構とその再構成」, 第26回 Wako ワークショップ, The Grand Hall(品川グランドセントラルタワー3F), 平成22年11月26日
 13. 栗本一基、斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST, Global transcription profiling of complex biological processes of cellular differentiation at the single-cell resolution, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, 平成22年12月19日
 14. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST 「生殖細胞形成過程の解析と再構成:ゲノム情報再編機構を如何に研究するか?」, 岡崎統合バイオサイエンスセンター10周年記念シンポジウム, 岡崎コンファレンスセンター, 平成23年2月11日
 15. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科、JST, CREST, Single-cell Transcriptome Profiling in Development: from Pathway Analysis to Reconstitution, The 5th International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 東京大学武田ホール, 平成23年3月4日
 16. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科, Understanding and reconstituting mammalian germ cell specification, 44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Okinawa Convention Center, 平成23年5月21日
 17. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科, Germ cell specification in mice: signalling, transcription regulation, and epigenetic reprogramming, Heidelberg-Kyoto Joint Symposium, Heidelberg University, 平成23年7月22日
 18. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科, Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice, Stem Cells in Development and Disease, Max-Delbruck-Center, Berlin-Buch, 平成23年9月12日
 19. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科, Mechanism and reconstitution of germ cell specification in mice, 第84回日本生化学会大会, 京都国際会館, 平成23年9月22日
 20. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科 「Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice」, 発生工学・疾患モデル研究会 第89回定例会, 順天堂大学医学部, 平成23年10月26日
 21. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科 「マウスES細胞の未分化性維持におけるPrdm14の役割」, 生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク 第4回公開シンポジウム, 千里ライフサイエンスセンター, 平成23年11月17日
 22. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科 「生殖細胞の発生機構とその試験管内再構成」, 第26回日本生殖免疫学会総会・学術集会, ウィンクあいち, 平成23年12月3日
 23. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科, Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice, 27th RBC-NIRS International Symposium, コープ・イン・京都, 平成23年12月10日

24. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科, Mechanism and reconstitution in vitro of germ cell specification in mice, CiRA International Symposium 2012, Clock Tower Centennial Hall, Kyoto University, 平成 24 年 2 月 23 日
25. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科 「生殖細胞の発生機構とその試験管内再構成」, 第2回産婦人科スプリングフォーラム, 京都平安ホテル, 平成 24 年 3 月 3 日
26. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科 「生殖細胞の発生機構とその試験管内再構成」, 東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センターシンポジウム, 東京大学医学部教育研究棟 14 階 鉄門記念講堂, 平成 24 年 3 月 8 日
27. 斎藤通紀 京都大学大学院医学研究科 「生殖細胞の発生機構とその試験管内再構成」, 日本生殖再生医学会 第7回学術集会, シェーンバッハ・サポー(砂防会館別館会議室), 平成 24 年 3 月 25 日

(4)知財出願

①海外出願

1. 名称:METHOD OF INDUCING DIFFERENTIATION FROM PLURIPOTENT STEM CELLS TO GERM CELLS
出願国:米国
出願日:2010年8月13日
出願番号:61/373, 563
出願人:国立大学法人京都大学(100%)
発明者:斎藤通紀(京都大学医学研究科)、林克彦(京都大学医学研究科)

(5)受賞・報道等

①マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 毎日新聞全国版2010年4月6日(火)科学面(23面)に、「ヒト生殖細胞研究 体内の神秘に迫る:不妊症、遺伝病等の解明に期待」として、我々の研究が紹介された。
2. ESCs を用いて生殖細胞形成過程を試験管内で再構成した仕事(Hayashi et al., Cell, 146, 519-532, 2011)は多くの新聞及びテレビニュースで取り上げられた。
産経新聞 H23. 8. 5 1面《iPS細胞から精子》
朝日新聞 H23. 8. 5 1面《iPS細胞から精子 出産》 3面《体内の仕組み忠実に再現》
毎日新聞 H23. 8. 5 1面《iPSで精子 マウス誕生》
SANKEI EXPRESS H23. 8. 5 3面《京大が世界初 iPS細胞で作った精子からマウス》
京都新聞 H23. 8. 5 1面《iPS細胞でマウス》 3面《医療応用 安全面に課題》
読売新聞 H23. 8. 5 1面《iPSから精子⇒マウス誕生》
東京新聞 H23. 8. 5 1面《iPS細胞で精子⇒マウス誕生》
中日新聞 H23. 8. 5 1面《iPSでマウス誕生》
Nature ダイジェスト 2011年10月号 《ES細胞やiPS細胞から精子を作り、マウスを誕生させた理由》等多数。

(6)成果展開事例

①社会還元的な展開活動

文部科学省 科学技術・学術審議会専門委員(生命倫理・安全部会・特定胚及びヒト ES 細胞等研究専門委員会)(平成23年2月8日-平成25年1月31日まで)として活動中である。

§ 6 結び

本研究提案とその発展研究は、平成23年8月よりERATO 研究に採択された。そのため CREST 研究は平成24年3月までの2年半にて終了となった。当初の研究計画は概ね計画通り進行中であるが、平成24年3月の時点では、それぞれの計画が実験系・方法論の開発を伴う挑戦的なものであることもあり、実験系の構築中・実験結果の解析中等、未完成となっているものが多い。それぞれの計画の速やかな完成を目指している。

CREST 研究期間中の2年半の間の研究成果の中で、特に ESCs から PGCLCs の誘導に成功した仕事は国内外で大きな反響を起こした。この仕事は今後の始原生殖細胞研究及び生殖細胞発生過程の試験管内再構成研究の基盤となる。継続中の研究成果も現在論文投稿中の数報を含め、今後随時発表する。

本研究は、その目的達成に、様々な実験材料の構築と方法論の開発を必要とするものであったが、これまでの研究にて、実験材料として、EGFP-Blimp1ホモノックインマウス、BT-Blimp1:ピオチンリガーゼダブルホモマウス、EGFP-Blimp1ホモノックインESCs、BT-Blimp1:ピオチンリガーゼダブルホモESCs、BVSC:: ROSA26::rtTA ESCsの作成に成功し、方法論として、ESCsを用いた生殖細胞形成過程の試験管内再構成、少数細胞からのChIP-seq法(少数細胞からのChIP-seq法に関しては、次世代シーケンスによるゲノムワイドなプロファイル解析を行うまでは予断を許さず、現在その解析を遂行中である。)を開発した。これらの実験材料、方法論とともに本研究の当初の目標を達成し、さらに発展させるべく研究・開発を推進したい。