

ES細胞やiPS細胞から始原生殖細胞を体外培養で作製

生殖細胞の謎に迫る

生殖細胞は体細胞に比べるとはるかに数は少ないが、すべての細胞に分化する能力を秘め、染色体が半数というユニークな特色を備えている。そんな“特別”な細胞である生殖細胞の謎を解き、医療に役立てようとしている研究者の軌跡に迫る。

研究分野としては マイナーな存在だった生殖細胞

生殖細胞とは何か。この質問には15歳の中学生でも答えられる。中学の理科の教科書を開けば、「生物が自らの子孫を残すことを生殖といい、生殖のために必要な特別な細胞のことを生殖細胞という」などと記されているのだ。

確かに生殖細胞はさまざまな点で“特別”な細胞だ。生物の体を作る細胞には体細胞と生殖細胞の2種類がある。しかし、そのほとんどは体細胞で、生殖細胞は、オスならば精子(または精細胞)、メスならば卵(または卵細胞)しかあてはまらない。ところが、精子と卵が受精してできる受精卵には、体のあらゆる

細胞へと分化する「全能性」という、子孫を残すためのキーとなる“特別”な能力が備わっている。もう1つ“特別”なのは染色体の数で、1つの生殖細胞には通常の半分、ヒトの場合は46本のうち半分の23本の染色体しかない。しかし、半数しかないからこそ、精子と卵が受精することで46本となり、その結果、生まれてくる子は両親の遺伝子を半分ずつ

受け継ぐことになる。教科書のそんな記述に、生命の神秘を感じた人も少なくないだろう。

では、生殖細胞にはどのようにして“特別な働きが備わるのか——この質問には、実は、中学生はおろか、最先端の研究者も答えられない。生殖細胞の役割が広く知られている一方で、その実態やメカニズムはいまだに多くの謎に包まれているのだ。

そんな生殖細胞の謎というチャレンジングなテーマに挑み、画期的な成果を上げているのが京都大学の斎藤通紀さんだ。原点は、今から約20年前、医学部の大学院生時代にある。「一生かけて打ち込める研究をしたい」と考えていた斎藤さんにとって、生命の根幹ともいえるほど重要な存在ながら謎に満ちている生殖細胞は大いに魅力的なテーマだった。しかし、生殖細胞は医学の研究分野としてはマイナーな存在だった。

「がんや糖尿病など、治療が求められる病気のほとんどは体細胞に関するものばかり。生殖細胞の研究は、医療には直結しないものとして敬遠されがちだったのです」

生殖細胞を知らずして リプログラミングは理解できない

はたして、生殖細胞というマイナーな研究分野に進んで、研究者としての将来はあるのか——。そんな不安を払うきっかけとなったのが、ゲノムインプリンティング(*)に関する研究成果だった。

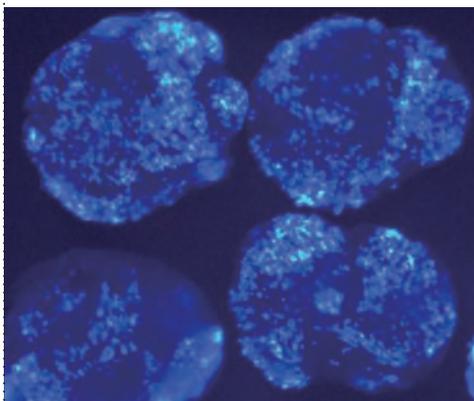
*ゲノムインプリンティング

哺乳類において、ゲノムが両親のどちらに由来するものが記憶されている現象。

子には両親のゲノムが半分ずつ受け継がれている。しかし、ゲノムには父親由来か母親由来かの区別はないというのが、メンデルの時代からの遺伝学の常識だった。ところが、哺乳類にはそんな常識があてはまらないことがわかった。哺乳類のゲノムには、両親のどちら由来のものなのかを区別するマークが存在する。受精卵から母親(父親)由

来のゲノムを取り除き、別の受精卵から父親(母親)由来のゲノムをもってきて、母親もしくは父親由来のゲノムだけの状態になると、受精卵は正常に成長せず、死んでしまうのだ。

そして、受精卵が分裂を繰り返し、体の各部分の体細胞とともに生殖細胞が形成される過程でも、興味深い現象が指摘された。どうやら、ゲノムが両親のどちら由来なのかを表すマークがいったん消去され、その後で、女性の場合は母親由来のマークが、男性の場合は父親由来のマークがつけられて、生



殖細胞の謎解明のキーとなる始原生殖細胞。ここから精子や卵へと分化する、すべての生殖細胞の源といえる細胞だ(写真は斎藤さんらがES/iPS細胞から作製した始原生殖細胞様細胞)。

殖細胞からそれぞれに卵や精子が形成されていくようなのだ。

「生体内では、人知を超えた面白い現象がいろいろと起きているのだと、驚かされました。そして、生殖細胞について克明に理解できれば、ゲノムリプログラミング(**)を引き起こす分子機構の解明など、再生医療につながるさまざまな価値が生み出されることが見えてきたのです」

**ゲノムリプログラミング

分化した体細胞のゲノムが、受精卵のゲノムと同じような初期段階にリセットされること。これにより、細胞がさまざまな体細胞に

分化する能力(多能性)をもった状態へと戻ると考えられている。

ゲノムリプログラミングは、近年、体細胞由来の人工多能性幹細胞であるiPS細胞の作製などでも注目される現象で、再生医療分野の最重要テーマの1つだ。斎藤さんの大学院生時代には、まだiPS細胞が樹立されておらず、主に胚由来の多能性幹細胞であるES細胞の作製に関する研究が進められていた頃だった。生殖細胞が生体内でどのように形作られるかを解き明かせば、それを人為的なリプログラミングにも生かせるはずだと考えたのだ。

生殖細胞を知らずして、リプログラミングを理解することはできない——そんな確信をもって、斎藤さんは生殖細胞の謎解明への道に踏み出した。

始原生殖細胞形成の キーとなる遺伝子を同定

謎解明の入り口としてまず目指したのが、始原生殖細胞(***)形成のメカニズムの解明だ。

***始原生殖細胞

発生の過程において、すべての生殖細胞(精子や卵)の源として形成される細胞。発生の初期、マウスの場合は胚齢6.5日前後に分化する。この段階では男女差はなく、その後、オスの場合は精子へ、メスの場合は卵へと分化する。

そして、始原生殖細胞形成のメカニズム解明のためには、キーとなる遺伝子の同定が欠かせないと考えた斎藤さんは、大学院修了の翌年、インプリンティング現象の発見者でもある英国ケンブリッジ大学のアジム・スラーニー教授のもとに留学した。そこで、始原生殖細胞形成の際に必須な遺伝子としてBlimp1を同定した。斎藤さんが特に注目したのは、Blimp1の働きだ。

「Blimp1は、リンパ球の一種で抗体を作る細胞に分化することで知られるB細胞の形成の最終段階にもかかわっている遺伝子です。それまで働いてきたさまざまな遺伝子の発現をストップさせる役割もっています。始原生殖細胞形成の際にもこの遺伝子が発現しているのは、始原生殖細胞以外のさまざまな体細胞へと分化するのをストップさせる役割を果たしているからではないかと、考えられました」

研究総括

斎藤通紀

さいとう・みちのり

1999年京都大学大学院医学研究科博士課程修了。理化学研究所発生・再生科学総合研究センターのチームリーダーなどを経て、2009年から京都大学大学院医学研究科教授。JST戦略的創造研究推進事業では、さきがけ「単一細胞での網羅的遺伝子発現解析によるマウス生殖細胞決定機構の解明」、CREST「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」を経て、今年度から同事業ERATO「斎藤全能性エピゲノムプロジェクト」研究総括。

生殖細胞が形成される過程で起きる現象

遺伝子がネットワークのように働く姿が見えてきた

遺伝子の同定が始原生殖細胞形成のメカニズムの解明を前進させるとの手応えを得た斎藤さんは、同時に、新しい手法の開発の必要性を感じていた。英国留学時代に採用していた従来の手法では遺伝子を1個1個同定していくため、効率が極端に悪いのだ。

「網羅的な遺伝子解析法も開発されていましたが、それには大量の細胞が必要です。数が少ない始原生殖細胞の場合は遺伝子を増幅する必要がありますが、その当時用いられていた方法では、それぞれの遺伝子の発現量のバランスが崩れてしまい、どの遺伝子がどのくらい働いているのか、正確なデータを得ることができなかったのです」

そこで帰国後、理化学研究所に勤務しながら、JST戦略的創造研究推進事業さきがけの研究課題「単一細胞での網羅的遺伝子発現解析によるマウス生殖細胞決定機構の解明」を通してこのテーマに取り組み、1個の細胞の中で発現している遺伝子を定量的かつ網羅的に解析できる「単一細胞マイクロアレイ法」を開発した。これにより、Blimp1以外に重要な遺伝子としてPrdm14が同定されるとともに、始原生殖細胞が形成する過程で起きているさまざまな興味深い現象が見えてきた。

「始原生殖細胞は、はじめ体細胞へと分化する細胞とかわらないエピゲノム(*)をもって

います。Blimp1やPrdm14の発現によって作られたたんぱく質が、そうした化学的な修飾にかかわる遺伝子の発現を制御しながら、体細胞への分化を抑制し、始原生殖細胞を形成していく。そんなネットワークのような複雑な働きが見えてきたのです」

*エピゲノム

ゲノム全体にわたる化学的な修飾(エピジェネティック修飾)の状態のこと。ゲノムが巻きつくように結合している「ヒストン」とよばれるたんぱく質やDNAの化学的修飾は、発現する遺伝子の選択やゲノムの安定性などに重要な働きをもち、細胞ごとにそのパターンが異なるため、各細胞の機能的な差異の一因となる。

斎藤さんがとくに注目したのが、始原生殖細胞が形成される際に、さまざまなマークや化学的修飾が、きれいさっぱりとぬぐい去られていることだ。

「従来、父親もしくは母親由来のマークがはがれるのは、始原生殖細胞の形成からかなり後だと考えられていました。しかし、始原生殖細胞が形成されると同時に、マークを外す分子機構が働きはじめることがわかったのです。それだけでなく、ゲノムが受けたさまざまな化学的な修飾が、始原生殖細胞の形成と同時に、いったんもとに戻されていました。これは、生体内でほかに存在しないというくらい、「つるん」とした状態なんですよ(笑)。これは、ゲノムリプログラミングの解明にもつながると期待されます」

始原生殖細胞の人工的な作製に成功

こうして遺伝子レベルの解析が順調に進む一方で、新たな課題も見えてきた。

「研究をさらに進めるには、生殖細胞が形成される過程を実際に観察することが重要です。しかし、生殖細胞のもとになる始原生殖細胞は、初期胚のある場所で作られてから1個1個、原腸の壁をすり抜けるように移動して将来の生殖巣(卵巣もしくは精巣)にたどり着くため、その過程を実際に観察することは難しいといわざるを得ません。そこで、1つの解決策として考えたのが、生体内の環境を試験管内で再現することです」

斎藤さんは、2009年に京都大学大学院医学研究科教授となった後、JST戦略的創造研究推進事業CRESTの研究課題「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」を通してこのテーマに取り組み、ES細胞やiPS細胞からの始原生殖細胞の作製を目指してきた。Blimp1などの遺伝子とともにカギとなったのが、理化学研究所時代に取り組んだ、始原生殖細胞形成に至るシグナルに関する研究だ。

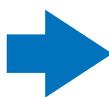
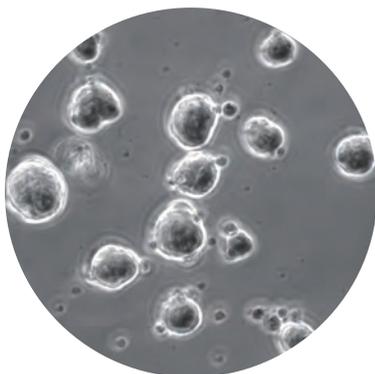
「始原生殖細胞は、エピブラスト(**)とよばれる状態から分化して形成されます。その過程で、どんなたんぱく質が重要な因子として働くのかを調べた結果、シグナルとなるいくつかの重要な因子の組み合わせを特定しました」

**エピブラスト

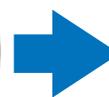
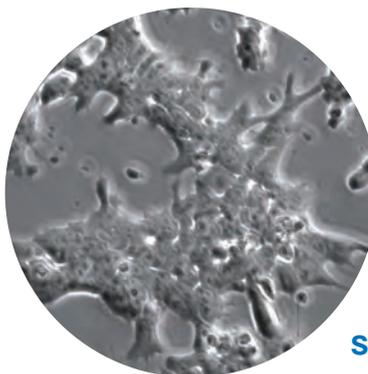
発生の過程の初期において形成される将

生殖細胞形成の再構築

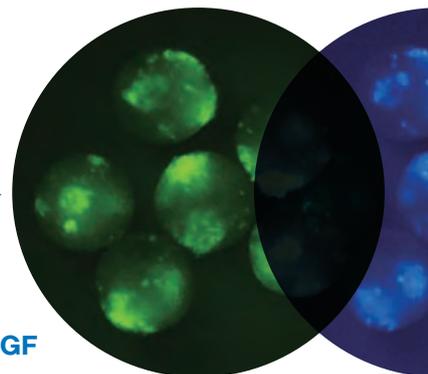
..... ES/iPS細胞 エピブラスト様細胞(EpiLCs) 始原生殖細胞様細胞(PG)



Activin
bFGF
KSR



BMP4
BMP8b
SCF/LIF/EGF



を体外培養系で再構築する！

来胚となる一層の組織。原始外胚葉。マウスの場合は胚齢4.5～6.5日前後に形成される。この段階では、生殖細胞だけでなくすべての体細胞へと分化する可能性をもつ。

こうして得られた知見を用いて最適な環境を再現し、ES細胞やiPS細胞から作製したエピブラスト様細胞を、まるごと始原生殖細胞様細胞にすることに成功。作製した細胞をマウスの精巣内に移植し、得られた精子を体外受精することで健常なマウスが得られたことから、正常な生殖機能をもっていることも確かめられた。

「これまでもES細胞から始原生殖細胞様細胞を作製した例はありましたが、正常な生殖機能をもっていることが示されたことはありませんでした。生体内での始原生殖細胞の発生メカニズムの研究にもとづいて細胞を作製した今回の成果は、始原生殖細胞はもちろん、さらに発生のすすんだ卵子・精子様細胞作製技術の開発にも役立つと考えています」

本質を突き詰めることが ブレイクスルーにつながる

順調に成果を積み重ねてきた齋藤さんは、次のステップとして、今年度からJST戦略的創造研究推進事業ERATO「齋藤全能性エピゲノムプロジェクト」を立ち上げた。目指すのは、生殖細胞発生メカニズムのさらなる解明と、医療応用に向けた研究の発展だ。

「これまではマウスを用いて、主に始原生殖細胞形成までのメカニズムの解明に取り組



京都大学大学院医学研究科内の培養室にて。遺伝子発現解析などの研究成果をもとに最適な環境を再現したことが、ES細胞やiPS細胞からの始原生殖細胞様細胞作製という成果につながった。正面右は齋藤さんとともに研究にあたった同大学院講師の林克彦さん。左はJSTのERATO担当者・米澤崇礼さん。

んできました。ERATOでは、始原生殖細胞から精子や卵が形成されるメカニズムの解明とともに、よりヒトに近い動物を用いた研究に取り組んでいきます」

過去の研究から、マウスのES細胞や初期発生様式は非常に特殊で、ラットとも大きな違いがあることがわかっている。よりヒトに近い動物での研究を検討していた結果、滋賀医科大学動物生命科学センターの鳥居隆三教授とカニクイザルを用いた共同研究を行うことになった。カニクイザルは、月経の間隔が約30日など、ヒトと近いことで知られ、研究にはうってつけなのだ。

カニクイザルでの研究が進み、生殖細胞発生のメカニズムが解明されれば、それがゲノムプログラミングの理解にもつながり、不妊治療など、ヒトの医療への道筋もいよいよ

見えてくると期待される。そこで懸念されるのが倫理的な問題だ。

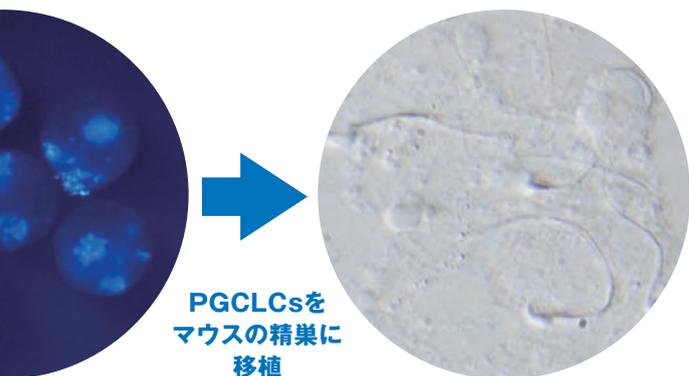
「生殖細胞発生の研究は、極端に言えば生命を作ることにもつながる恐れがあります。たとえばヒトの卵を作るのは、今の段階では不可能に近いといえますが、方向性については、十分な議論を重ね進めなければならないと肝に銘じています。カニクイザルを用いた研究でも、卵を採取する際にはできる限り母体に影響を与えない手法を用いるなど、倫理的な配慮を十分に行わなければならないと考えています」

行く手には、さまざまな困難が待ち受けているかもしれない。しかし、マウスで得られた経験や知見を生かし、チームの力を結集すれば、道は必ず開けてくると、齋藤さんは確信している。

「始原生殖細胞は、お腹の中の赤ちゃんの、それもごく初期にしか存在しない細胞で、医学的な観点からはまったく注目されていない存在でした。こんな研究をしていて大丈夫なのかと、不安に思ったこともあります。しかし、あれもこれもではなく、本質的なところを突き詰めれば、一気に新たな展開へと広がる可能性があります。これからも、それを見誤らずにいたいと思っています」

齋藤さんは、そんなブレない信念の先に、自らの研究が医療にと役立つ日が来ることを見据えている。その頃には、「生殖細胞には、どのようにして“特別”な働きが備わるのか」という今は回答不能な質問にも、中学生がスラスラと答えられるようになっているのかもしれない。■

CLCs) 精子



PGCLCsを
マウスの精巣に
移植

始原生殖細胞に特異的に発現する遺伝子Blimp1とStellaの発現を制御したマウスのES細胞、iPS細胞を、Activin、成長因子bFGF、培養用試薬KSRと培養すると、エピブラスト様細胞に分化した。ここにBMP4などの成長因子を加えると、始原生殖細胞様細胞が得られた。緑色はBlimp1、青色はStellaを発現していることを示す。これをマウスの精巣に移植すると精子が得られ、顕微鏡下で受精させた胚を仮親に移植したところ、マウスの産出に成功した。