

日本医療研究開発機構
再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム事業
再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 多能性幹細胞から生殖系列への種を越えた運命決定機構の解明
(英 語) Conserved mechanisms in germline specification from pluripotent stem cells

研究開発実施期間: 令和 4 年 7 月 25 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 小林 俊寛
(英 語) Toshihiro Kobayashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人東京大学 医科学研究所幹細胞治療研究センター 特任准教授
(英 語) Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute for Medical Science
The University of Tokyo, Project associate professor

II 研究開発の概要

(日本語)

本研究開発課題では多能性幹細胞から生殖系列への運命決定機構の解明を目指した。特にマウス-ヒト間の大きなギャップを埋めるモデル動物としてラットとウサギを扱い、多能性幹細胞からの生殖細胞作出に不可欠な分化メカニズムの解明と評価系の整備を行った。研究手法として申請者らが近年開発したラット、ウサギの始原生殖細胞様細胞 (Primordial Germ Cell-like cell: PGCLC) 誘導系 (Kobayashi et al., Cell Reports (2021), Oikawa et al., Science (2022)) を活かし、生殖細胞への分化過程で最も重要な岐路である生殖細胞への運命決定に焦点を当てて研究を進めた。具体的な内容として、生殖系列への運命決定を担う転写因子の決定 (研究①)、胚発生中一過的に PGC 分化能を有する Formative 型多能性状態の維持と理解 (研究②) を進めた。またウサギではラットに比べ PGCLC の機能評価系が未発達であるためその整備も行った (研究③)。さらにそれら知見がヒトに適応できるか、ヒト多能性幹細胞を用いて検証した (研究④)。各研究項目の詳細は以下に示す。

研究① 生殖系列への運命決定を担う転写因子の決定

生殖細胞の分化誘導に必須である BMP に代わってラット・ウサギ PGCLC 誘導できる転写因子の同定を試み、スクリーニングを行った。その結果、それぞれの動物種で BMP 非依存的に PGCLC を誘導することのできる転写因子およびその組み合わせを明らかにすることに成功した。特にラットではこれまでマウスで報告のあった転写因子に加え、新たな転写因子が TF-PGCLC の誘導に重要であることを明らかにした。次にこれら転写因子で誘導した

PGCLC (TF-PGCLC) の特性解析および機能評価を行った。遺伝子発現解析の結果、誘導された TF-PGCLC は BMP で誘導された PGCLC と極めて近い遺伝子発現プロファイルを示すことが明らかになった。またラット TF-PGCLC (雄) の機能評価として、生殖細胞欠損 *Prdm14* ノックアウト (KO) ラット新生仔の精巣に移植したところ、TF-PGCLC 由来の精子形成が確認できた。得られた精子細胞を用いて顕微授精を行ったところ個体作出にも成功したことから、転写因子により誘導された TF-PGCLC が正常な機能を持つことが明らかとなった。以上より、今回同定された新たな転写因子を含め、本研究により生殖細胞の運命決定機構の一端を明らかにすることができた (Oikawa et al., Stem Cell Reports (2025))。

研究② Formative 多能性状態の維持と理解

ラット、ウサギにおいて Formative 型多能性状態を維持できる培養系を開発した。それらの培養系で培養された細胞の特性および機能評価を進めたところ、遺伝子発現プロファイルや機能評価の結果から、ラット、ウサギともに本課題で開発された培養系は原腸陥入開始前の Formative 型多能性状態を試験管内で安定的に再現できていることが明らかになった。また機能評価として、ラットでは Formative 型多能性幹細胞から PGCLC を直接、従来よりも短時間で誘導できることを明らかにし、誘導された PGCLC が精子形成能および個体作出能を持つことを明らかにした (Iwatsuki et al., Cell Rep Methods (2023))。これらの結果から、本研究で開発された Formative 型多能性状態を維持できる培養系は、生殖細胞への運命決定機構を理解する上で有用なツールになることが期待される。

研究③ ウサギ PGCLC 評価基盤の整備

ウサギ PGCLC を評価するため、生殖細胞欠損ウサギ作製を試みた。本研究では特にこれまで開発が遅れていたウサギ受精卵における効率的な遺伝子編集条件の決定から取り組み、初期胚を用いて変異導入効率を比較し、ウサギ受精卵における最適なパラメーターを決定した。またこれらを用いて生殖細胞発生に重要な遺伝子を標的とした遺伝子編集により生殖細胞欠損ウサギの作製を行った。今後は本研究で開発された生殖細胞欠損ウサギを用いて研究①②で誘導されたウサギ PGCLC の機能を着実に評価できると期待される。

研究④ ラット・ウサギから得られた知見のヒトへの応用

研究①② で得られた知見をヒト ES 細胞を使って評価するため、PGC 特異的に光る NANOS3-T2A-tdTomato レポーターをもつヒト ES 細胞を樹立した。WiCell research institute から新たに入手した H9 株を用いレポーター株を樹立し、遺伝子型、核型が正常なものを選抜し、BMP による PGCLC 分化誘導能も確認することができた。本レポーターをもつ細胞株は国内で生殖細胞研究に扱えるヒト ES 細胞として有用であると期待される。また研究①、②で得られた成果をそれらヒト ES 細胞に応用し、その種を越えた保存性もしくは種ごとの違いを明らかにしようと試みた。研究②の応用では PGCLC の分化誘導系の一部をヒトに応用したところ、あるサイトカインがラット、ウサギ、ヒトに共通して効率的な PGCLC に重要であることを示唆する結果が得られた。

(英 語)

This project aimed to elucidate the mechanisms of germline specification from pluripotent stem cells (PSCs), using rats and rabbits as model organisms to bridge the gap between mice and humans. By leveraging recently developed PGCLC (primordial germ cell-like cell) induction systems in these species (Kobayashi et al., Cell Reports (2021), Oikawa et al., Science (2022)), we first investigated key transcriptional factor(s) involved in germ cell fate determination. Secondly, we developed culture systems capturing “formative” pluripotency in pre-gastrulating embryos of these species. Thirdly, we tried to establish a platform to functionally evaluate PGCLCs, especially in rabbits. Finally, we also explored the applicability of these findings to human PSCs.

Project 1: Identification of Transcription Factors Important for Germline Specification

We screened for transcription factors capable of inducing PGCLCs independently of BMP signaling. In both rats and rabbits, we identified some factors and combinations. In rats, we discovered novel factors beyond those known in mice. The induced PGCLCs closely resembled BMP-induced PGCLCs in gene expression and successfully contributed to sperm formation and offspring generation, demonstrating their functionality (Manuscript is in revision).

Project 2: Understanding and Maintenance of the Formative Pluripotent State

We established stable culture conditions to maintain the formative-type pluripotent state in rats and rabbits. These cultures reproduced the pre-gastrulation state in vitro, and allowed efficient PGCLC induction with full germline competence, including the ability to generate offspring (Iwatsuki et al., Cell Rep Methods (2023)).

Project 3: Establishment of a System to Evaluate Rabbit PGCLCs

We optimized gene-editing conditions in rabbit embryos and generated gene-edited rabbits lacking germ cells. These models, along with validated transplantation techniques, now enable functional evaluation of rabbit PGCLCs.

Project 4: Application of Findings Discovered in Model Animals to Human PSCs

We established a human ESC line carrying a NANOS3-T2A-tdTomato reporter for PGC-specific expression. The line showed proper differentiation into PGCLCs. Applying insights from rats and rabbits revealed that certain cytokines may play conserved roles in PGCLC induction across species, including humans.