



TITLE:

Ex vivo reconstitution of fetal
oocyte development in humans
and cynomolgus monkeys(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Mizuta, Ken

CITATION:

Mizuta, Ken. Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13537>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	水田 賢
論文題目	<i>Ex vivo</i> reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys (ヒト及びカニクイザル胎児卵母細胞発生過程の体外再構成)		
(論文内容の要旨)			
<p>生殖細胞は、卵子もしくは精子に分化し、それらの融合により次世代の個体を生み出すことのできる唯一の細胞系譜であり、種の存続や進化において極めて重要な役割を担っている。雌性生殖細胞の発生機構の解明には、胎児期の卵母細胞発生過程を含む卵子全形成過程の試験管内再構成技術の開発が重要であり、マウスにおいてはこの技術がすでに確立されている。一方で、ヒトにおいては、多能性幹細胞から卵原細胞様細胞への分化誘導法がこれまでに確立されたが、以降の卵母細胞発生過程を進行させる体外培養技術が存在しない。そこで、霊長類であるカニクイザル（以下、サル）の生体での卵母細胞発生機構の理解、及びその発生過程を再現可能とする体外培養法の開発により、ヒトを含む霊長類の卵母細胞発生過程の体外再構成を試みた。</p> <p>胎生 8 週のサル胎児卵巣では、殆どの生殖細胞が卵原細胞であったが、その後、徐々に減数分裂へと移行し、卵母細胞への分化を開始した。また、胎生 18 週では、生殖細胞の約半数が原始卵胞を構成する卵母細胞へと分化していることが明らかとなった。この間の胎児卵巣に対する免疫組織化学的解析により、主要な卵母細胞分化マーカーの発現および減数分裂進行の動態を明らかにした。これらの解析で得られたサルの卵母細胞発生動態のデータを基に、サルにおけるこの発生過程の体外再構成を試みた。</p> <p>初めに、胎生 8 週の卵巣由来細胞を再凝集させることでサル再構成卵巣を作製し、マウスの体外培養法で使用する気相液相境界面培養を実施したところ、再構成卵巣はその形態を維持できずに崩壊することが示された。そこで、浮遊培養法へと切り替え、種々の培養条件検討を実施したところ、Advanced MEM を基礎培地とした 12 週間超の培養により、サル原始卵胞を体外で作出できることを見出した。生体卵巣と再構成卵巣に対し、卵母細胞の分化状態を評価するための解析を実施した結果、再構成卵巣内の生殖細胞は生体と同様の卵母細胞発生過程を経て分化していることが明らかとなった。</p> <p>次に、サルで確立した体外培養法を用い、ヒト胎児の卵母細胞発生過程の体外再構成を試みた。妊娠 11 週のヒト胎児卵巣では、胎生 8 週のサル卵巣と同様に、殆どの生殖細胞が卵原細胞であった。ヒト再構成卵巣を作製し体外培養を行ったところ、14 週目に約 3% の生殖細胞が原始卵胞を構成する卵母細胞へと分化していることが明らかとなった。また、生体と同様の卵母細胞発生過程を進行していることに加え、成人卵巣中の卵母細胞に近い遺伝子発現パターンを有する細胞が得られることも示された。</p> <p>最後に、ヒト・サル・マウスの三種に対し、単一細胞遺伝子発現データの種間比較解析を実施した。その結果、卵母細胞発生過程における霊長類特異的な現象（例：減数分裂移行期の遺伝子発現パターンの著明な変化、<i>PAX6</i> や <i>CLGN</i> などの卵母細胞発生過程で霊長類特異的に発現する 83 遺伝子の同定）と、種間で保存された現象（例：X 染色体の再活性化における遺伝子発現動態）を見出した。</p> <p>本研究により、霊長類の卵母細胞発生過程の再構成を可能とする体外培養法を新規に確立した。この培養法は、将来的にヒト多能性幹細胞から卵母細胞の作出を目指す際の基盤技術となると考えられ、ヒト雌性生殖細胞研究の推進への貢献が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)
<p>次世代に遺伝情報を伝達する生殖細胞の発生機構の解明は、生物学のみならず発生工学や生殖医学における重要な課題である。哺乳類の雌性生殖細胞は、胎児期に卵母細胞へと分化し第一減数分裂前期を進めるという特徴的な発生様式をとり、ヒト雌性生殖細胞の発生機構を解明するためには、この過程の試験管内再構成が鍵となる。これまでに、ヒト多能性幹細胞から卵原細胞への分化誘導法が確立されたが、卵母細胞発生過程の体外再構成法は存在していなかった。</p> <p>本研究では、ヒトと近縁なカニクイザルの胎児卵巣を用いて、組織学的実験と単一細胞遺伝子発現解析を行うことで、卵母細胞の発生動態を明らかにした。次に、種々の培養条件を比較検討し、カニクイザル胎児卵巣の再凝集体を用いて、卵母細胞発生過程の体外再構成を可能とする培養法を確立した。本培養で得られた卵母細胞は、生体の卵母細胞と同等の組織学的特徴と遺伝子発現状態を有していた。さらに、本培養法をヒト胎児卵巣の再凝集体に適用することで、ヒト卵母細胞発生過程の体外再構成も可能であることを示した。また、本培養で得られた霊長類卵母細胞の遺伝子発現データの解析から、卵母細胞発生過程における霊長類特異的な現象を見出した。</p> <p>以上の研究は、ヒト及びカニクイザル雌性生殖細胞の試験管内再構成技術の開発に貢献し、ヒトを含む霊長類の雌性生殖細胞の発生機構の解明に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 1 月 20 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降