資料4

第７５回生命倫理専門調査会

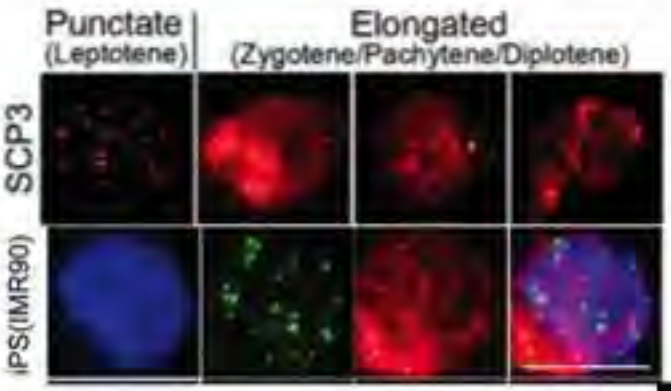
２０１３年9月２０日

慶応義塾大学 先導研究センター
野瀬　俊明

Gametes from human pluripotent stem cells (PSCs) の進捗

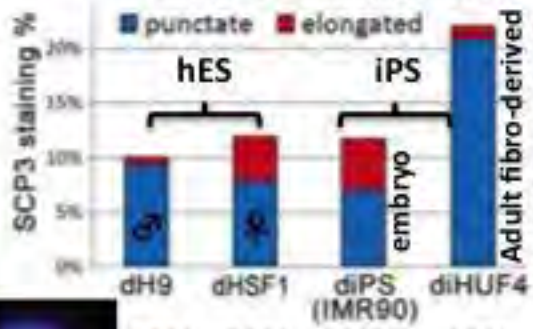
Kee et al, Nature, 2009 --- DAZ family 強制発現によって hES細胞 から精子細胞分化

① Panula et al, Human Mol. Genetics , 2011 (Stanford Univ, USA)

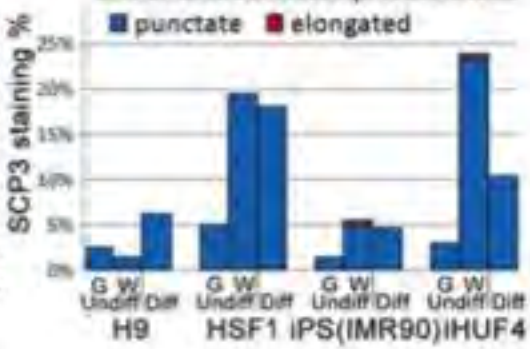


2-3wks culture

BMPs, with overexpression of DAZ family genes

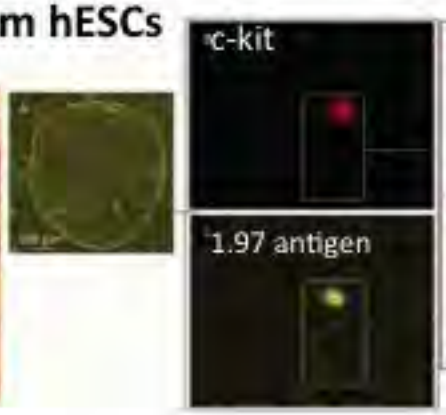


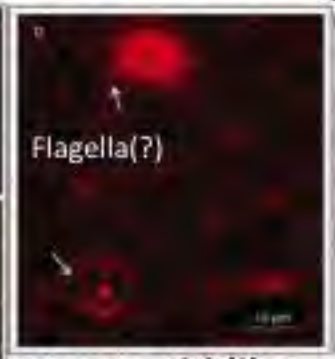
+ BMPs
Without overexpression



② Aflatoonian et al, Human Reprod, 2009 (Sheffield Univ, UK)

14 day-EBs (+BMP) from hESCs





Spermatid-like

Some EBs produced oocyte-like cells

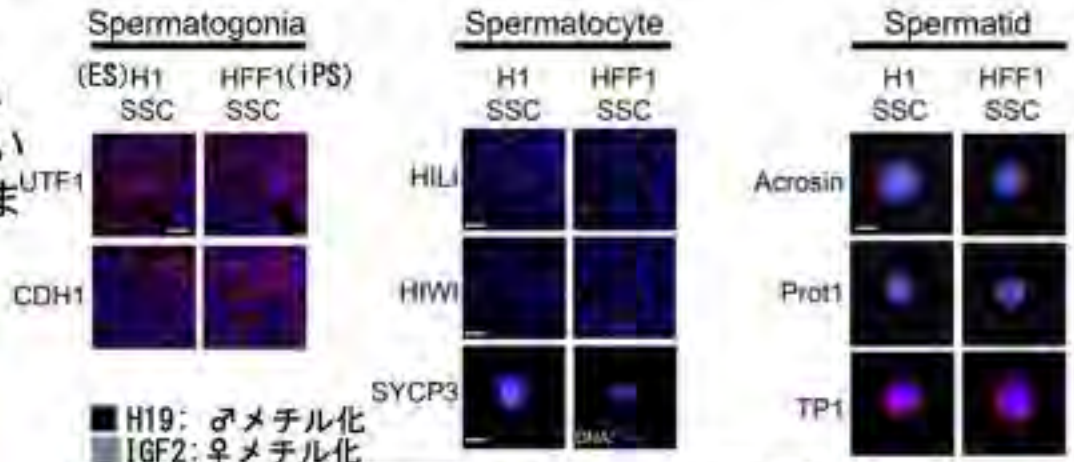
Oocyte-like (no ZP)

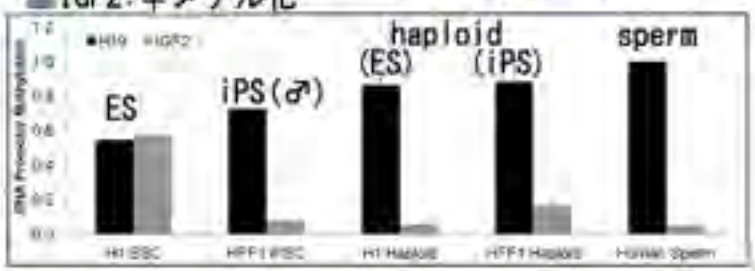
③ Easley et al, Cell Reports, 2012 (Pittsburgh univ. USA)

SSC (Spermatogonium Stem Cell)
精子幹細胞用培地 (+GDNF)を用いた胚様体培養(10日間)において、高い生殖細胞分化率と半数体精子細胞までの分化が確認された (~ 4 %).

Sample	% Haploid
H1 hESC	0%
HFF1 hiPSC	0%
Human Sperm	97.5%
H1 SSC	4.5%
HFF1 SSC	3.9%

Sertoli細胞不全による不妊患者への適用の可能性を示唆.



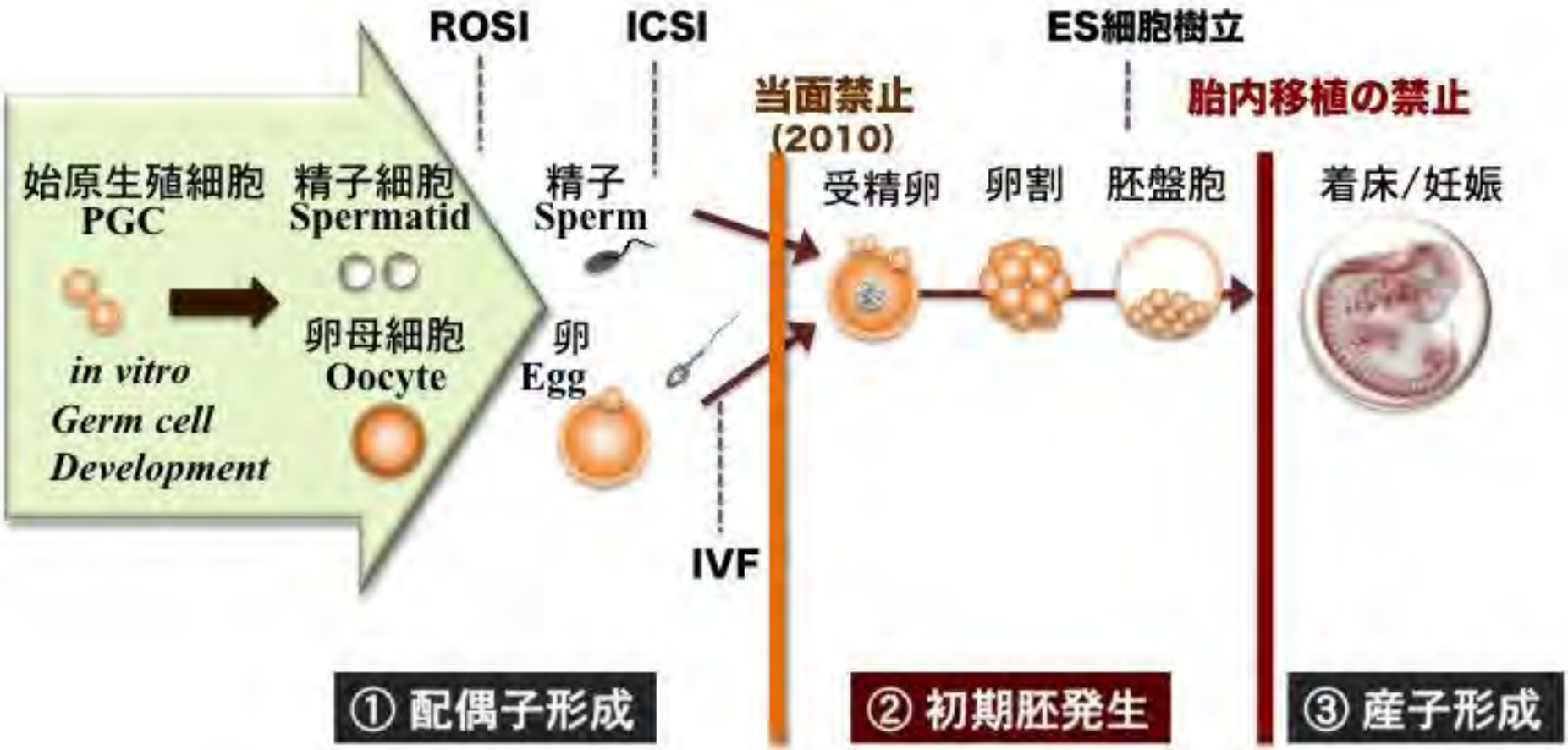


♂型インプリントへの転換

- 霊長類ES/iPS細胞に胚盤胞キメラ形成能はないが、生殖系譜への分化効率は高い.
  マウス: ICM ≒ ES ≠ Epiblast vs ヒト: ICM ≠ ES ≒ Epiblast
  一方、in vitro分化産物からの胚形成を検討した報告はない.

- 2010年指針改訂以降もヒト細胞系を用いた国内研究は立ち遅れている.
  マウス実験系に準ずる範疇において、ヒト細胞を扱う先行研究の進展は迅速.
  国内では海外からの分与を含め、既存のhES/hiPS株を用いることができない.

ヒトiPS由来配偶子（人工配偶子）の作成



① 配偶子形成

学術的意義

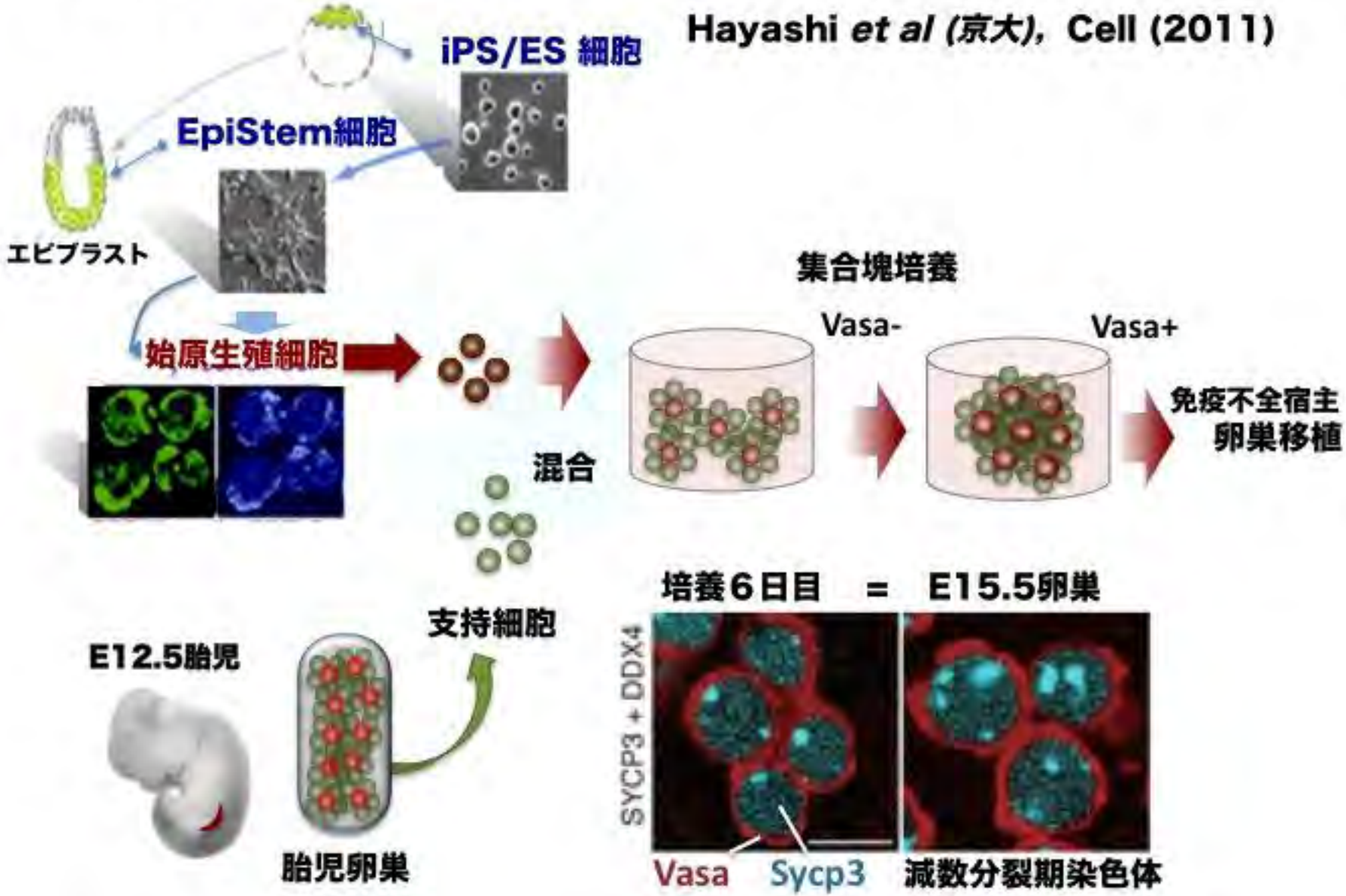
- (生殖関連)ヒト疾病iPS細胞の作成と *in vitro* 生殖分化誘導
  減数分裂に起因する染色体不分離等の染色体異常、卵子老化 etc.
  (Down症, Turner症 などの疾患iPS細胞の樹立報告)
- 生殖細胞の発生や配偶子形成に対する薬剤効果や毒性評価
  (環境ホルモン etc.)
- 遺伝子改変を含む、ヒト遺伝子の機能解析の場を提供
  (約15%の遺伝子は精巣特異的発現を示す)

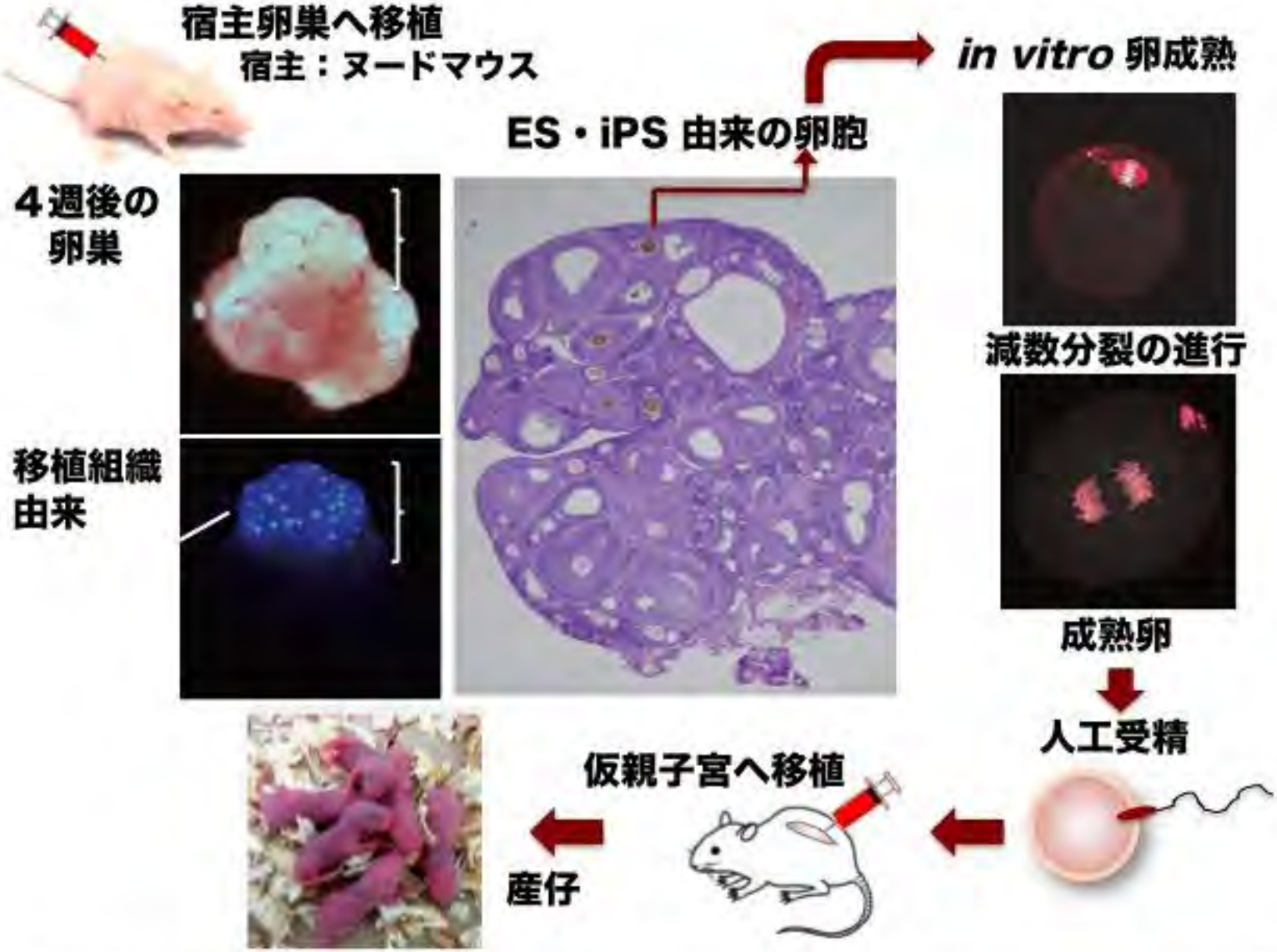
正常性を追求する場合、生体内移植操作(異個体間、異種間移植)が優先
しかし、ヒト生殖細胞の生体移植操作には倫理的課題の検討が必要。

例)
マウス生殖巣外への(ヒトiPSを含む)ヒト生殖巣組織の移植は合法か? (精子の体外放出はない)
ヒトiPSを移植した(サル、ヒト)精巣・卵巣組織の器官培養は合法か?
ES/iPS, 組織幹細胞からではなく、組織細胞から直接誘導する場合の規制は?

マウス iPS /ES細胞由来生殖細胞からの正常な産仔形成

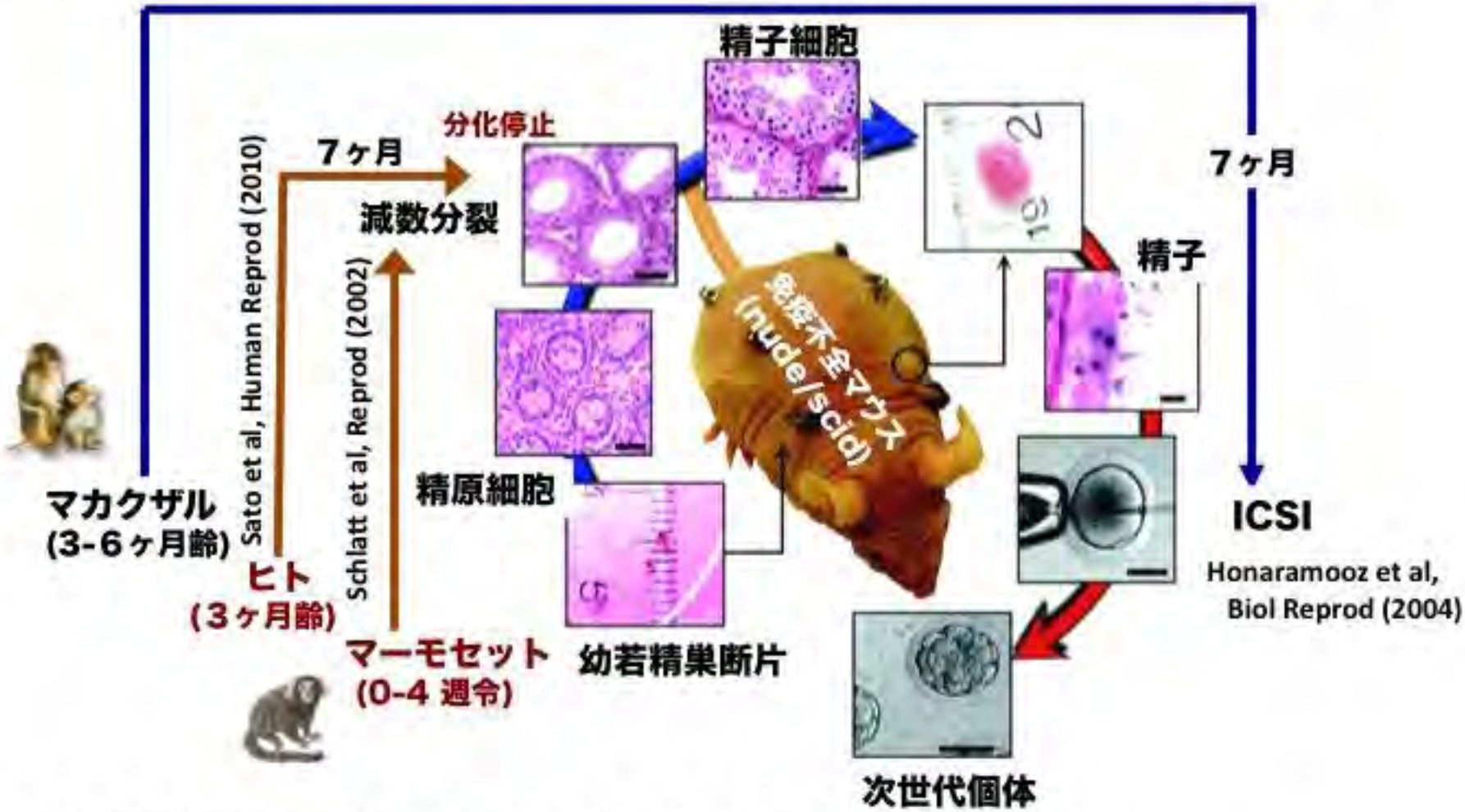
Hayashi *et al* (京大), Cell (2011)





生体生殖腺の発育環境のなかで、iPGCsは正常な配偶子分化を果たす.

幼若精巣を免疫不全マウスへ異所移植した場合の精子形成



異種生体内でも精子形成は進行し、移植によって
精子形成までの性成熟期間は著しく短縮される.

ヒト原始卵胞から異種移植による成熟卵の作成

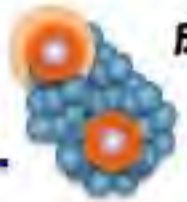
Li et al, PNAS (2010)

iPS由来卵原細胞

発育誘導処理
(P-TEN 阻害因子)

NOD/SCID免疫不全マウス
腎臓皮下に移植

原始卵胞



成熟卵

マウス休眠原始卵胞

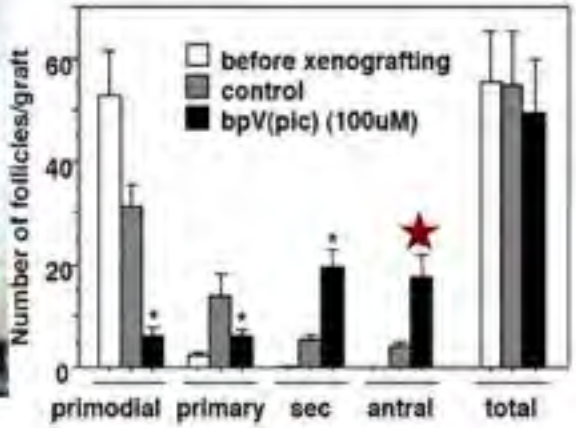
正常産仔

ヒト原始卵胞(癌患者)の Xeno-Transplantation

誘導処理

なし

あり



ヒト早発卵巣不全
残存原始卵胞

自家卵巣移植

成熟卵?
(聖マリアンナ大：臨床試験)

卵巣異所移植

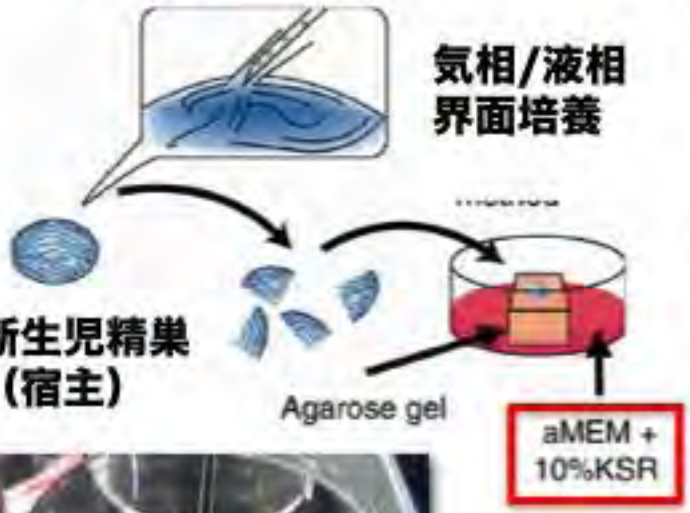
サル卵巣断片 ➡ 同一個体サル皮下 ⟶ 成熟卵 ⟶ 産子

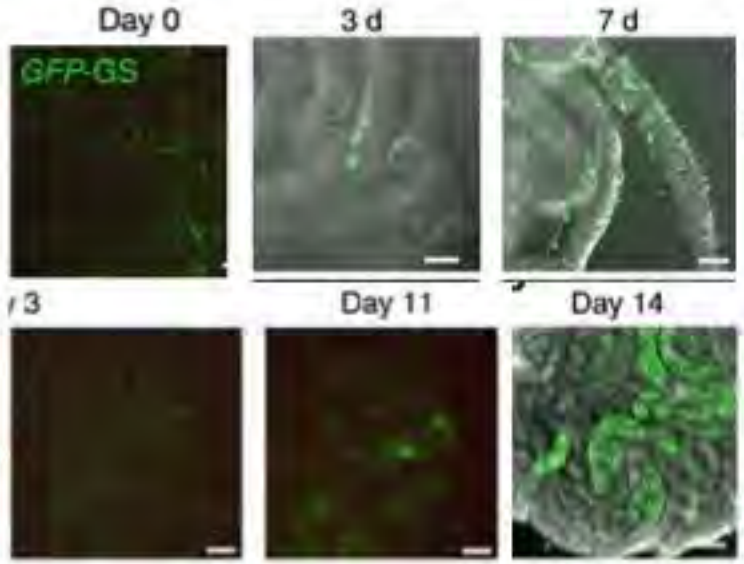
成熟卵子を用いた人工授精による産子

in vitro 器官培養によって受精能を持つ精子分化は起こる

Sato et al (横市大、小川) Nature Comms, 2011

精子幹細胞 移植

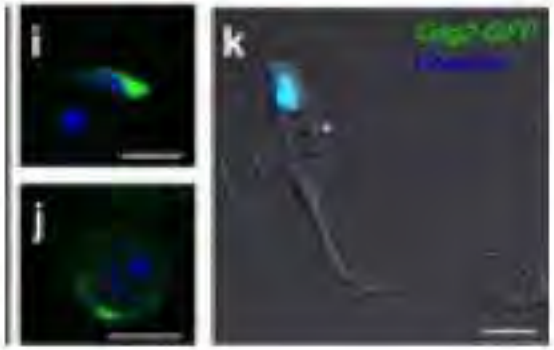




移植後１週目
移植幹細胞の生着

移植後２週目
精子形成の開始

移植後４週目
成熟精子

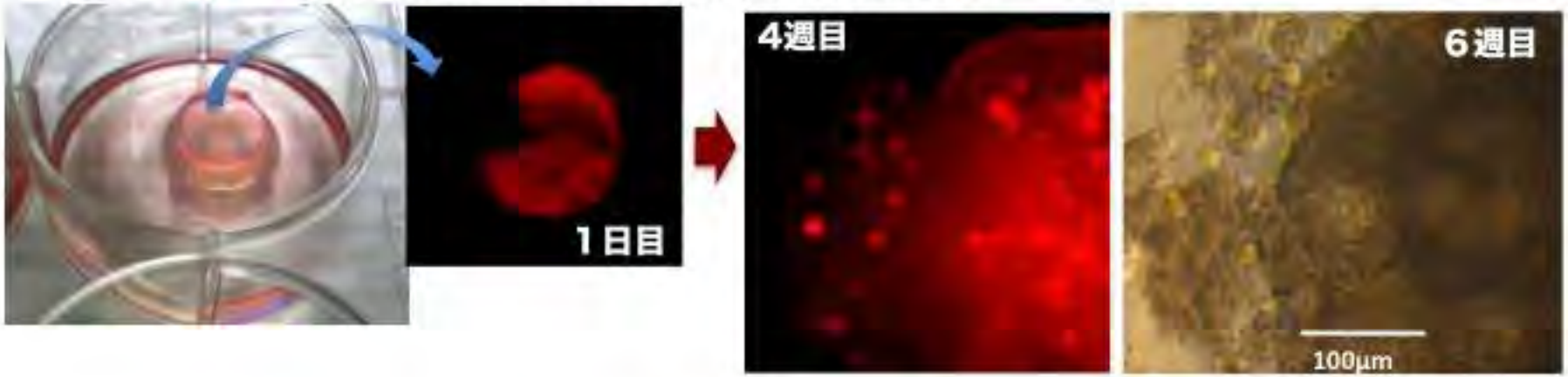


顕微授精

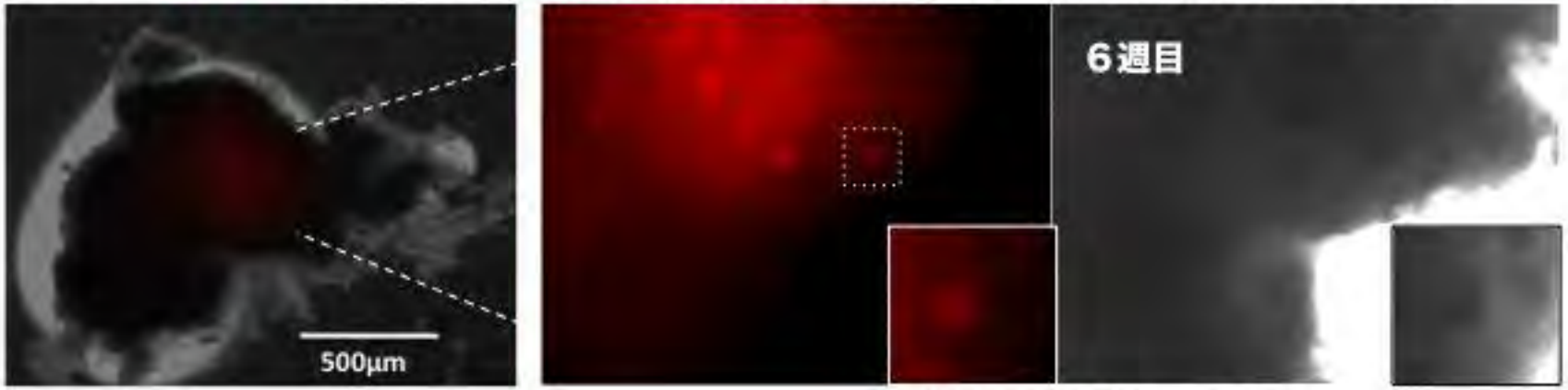
産仔

マウス卵巣の器官培養

Vasa- RFPマウス新生児卵巣断片の器官培養



Vasa- RFPマウスiPS由来生殖細胞と新生児卵巣の混合器官培養



成熟卵胞様の分化

② 初期胚発生

人工配偶子による授精・初期発生を検定する意義
必ずしも正常発生能の確証にはならない.

例）マウスの場合、単為発生でも9.5日胚まで発生
　　染色体異常胚でも胚盤胞までは発生する.

Q: 検定実験に学術研究上の意義はあるのか?
A: 正常性の充分条件にはならないが、
　以下の必要条件を検証する価値があるのではないか?
　また, 現状の余剰胚を用いた基礎研究との整合性は？

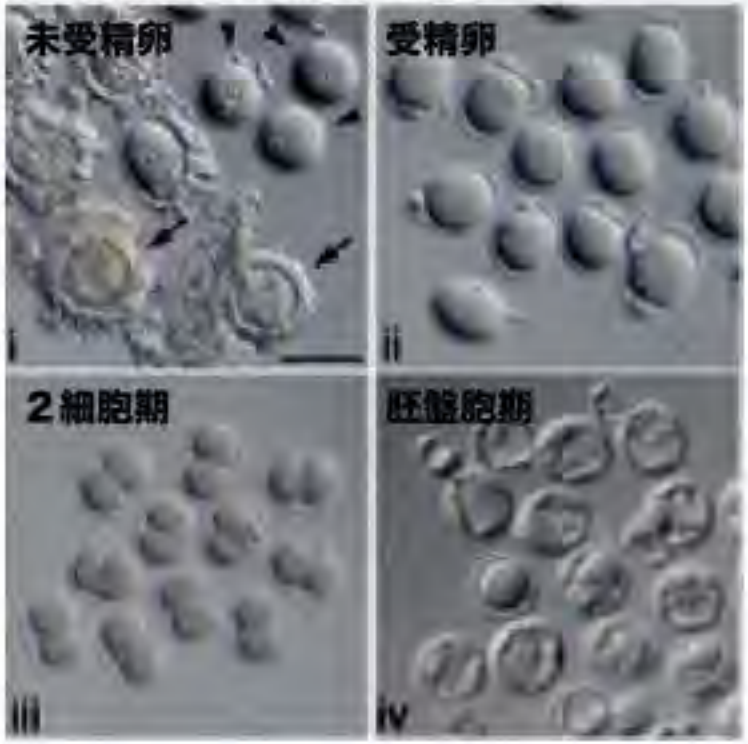
胚盤胞までの発生率・異常の確認
前核形成の検討
染色体数異常（頻度）
miRNA等の（trans-generation）エピゲノム変異の検証

包括的分子遺伝学的解析に必要なヒト胚の供給
→ 新規遺伝子診断技術の開発

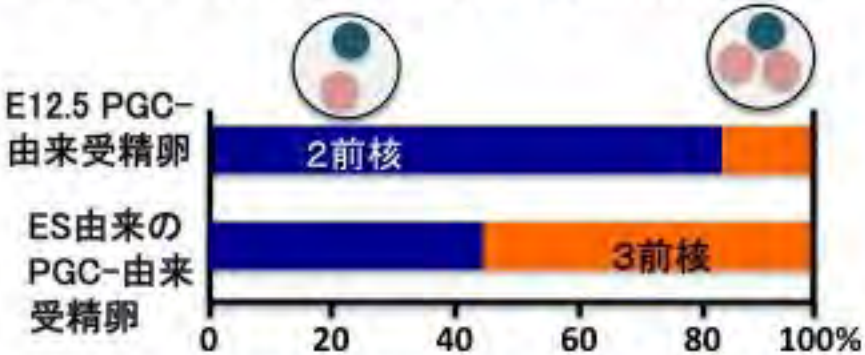
移植卵子の受精・産仔形成の成功率

IVF Donor Oocytes from	Fertilized	2-cell	Pups
Normal Ovary (3week)	96.6 %	96.5	12.7 %
E12.5 PGCs	57.0	75.2	17.3
ES-derived PGCs	84.0	62.3	3.9
iPS-derived PGCs	67.5	69.1	8.6

ES細胞由来卵子からの発生



ES由来は前核が3つある受精卵が多い



第2極体が雌性前核として残るのが原因

③ 産子形成

人工初期胚の生体（子宮内）移植は禁止：現時点での臨床応用はない.

【生殖補助医療と関連する課題】

「人為的配偶子操作による発生異常のリスク」は、生体生殖細胞にも共通する.

精子/卵子幹細胞からの作成、未成熟配偶子を成熟操作した精子・卵の場合?
ROSI/ICSI（減数分裂を超えた半数体雄性核を卵細胞質へ移植）の基準?
・卵細胞質（ミトコンドリア等）移植による卵子治療

・核移植クローン胚由来hES細胞への利用　Tachibana et al, Cell, 2013（ヒトクローンES細胞技術の成功）