

第134回内閣府生命倫理専門調査会

2022年11月17日(木) 14:00~16:00

第134回生命倫理専門調査会
資料2

多能性幹細胞からの生殖細胞をつくる研究と課題

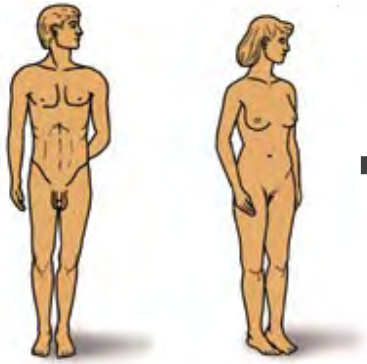
林 克彦

大阪大学大学院医学系研究科・生殖遺伝学分野

本日の内容

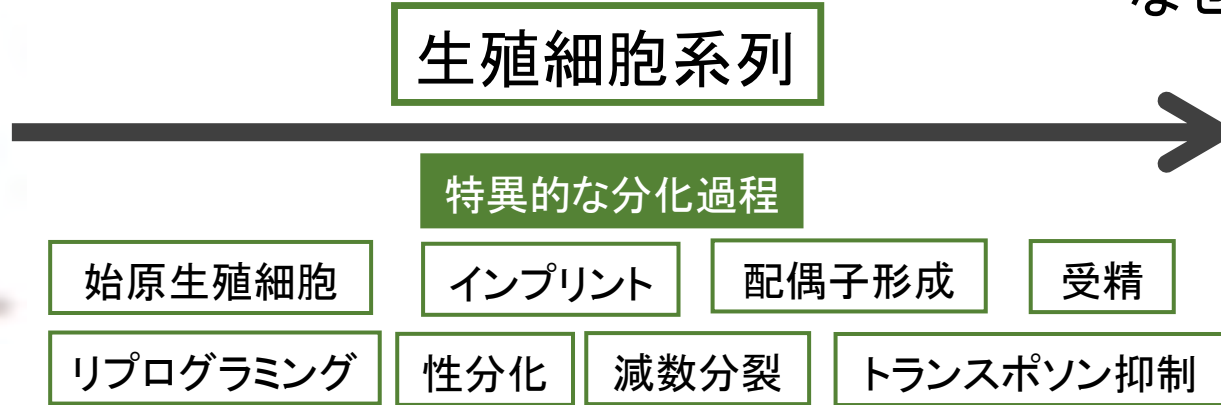
- 生殖細胞をつくる意義
- 研究の最前線
- 今後の課題

生殖細胞研究の概要



生殖細胞系列

なぜ個体ができるのか？



生殖細胞系列の異常

不妊

次世代の発生・成長異常

性腺機能低下

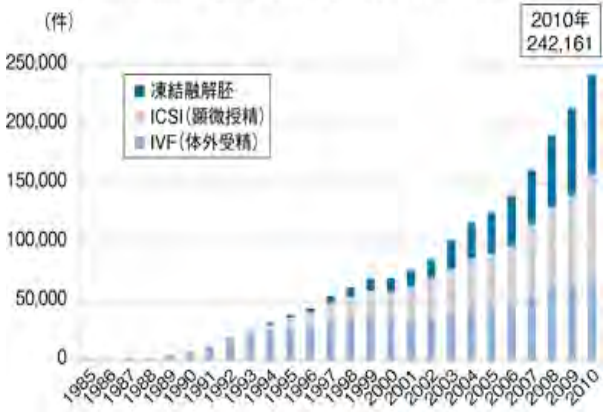
生殖細胞系列の利用

不妊治療

生物資源の保存

有益動物の産生

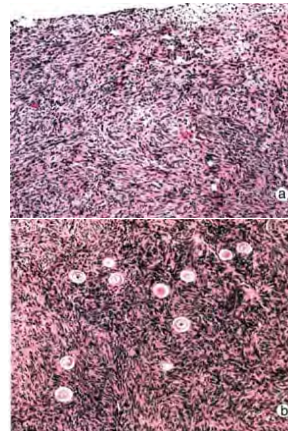
不妊治療の実施件数の年次推移 (1985~2010年)



インプリンティング遺伝子の異常



卵胞の喪失



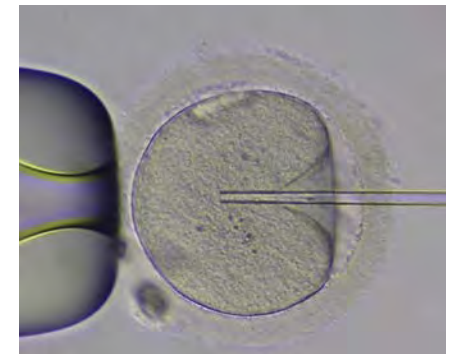
「体外受精技術の開発」

2010年ノーベル医学・生理学賞

Dr. Robert Edwards



生殖補助医療の発達



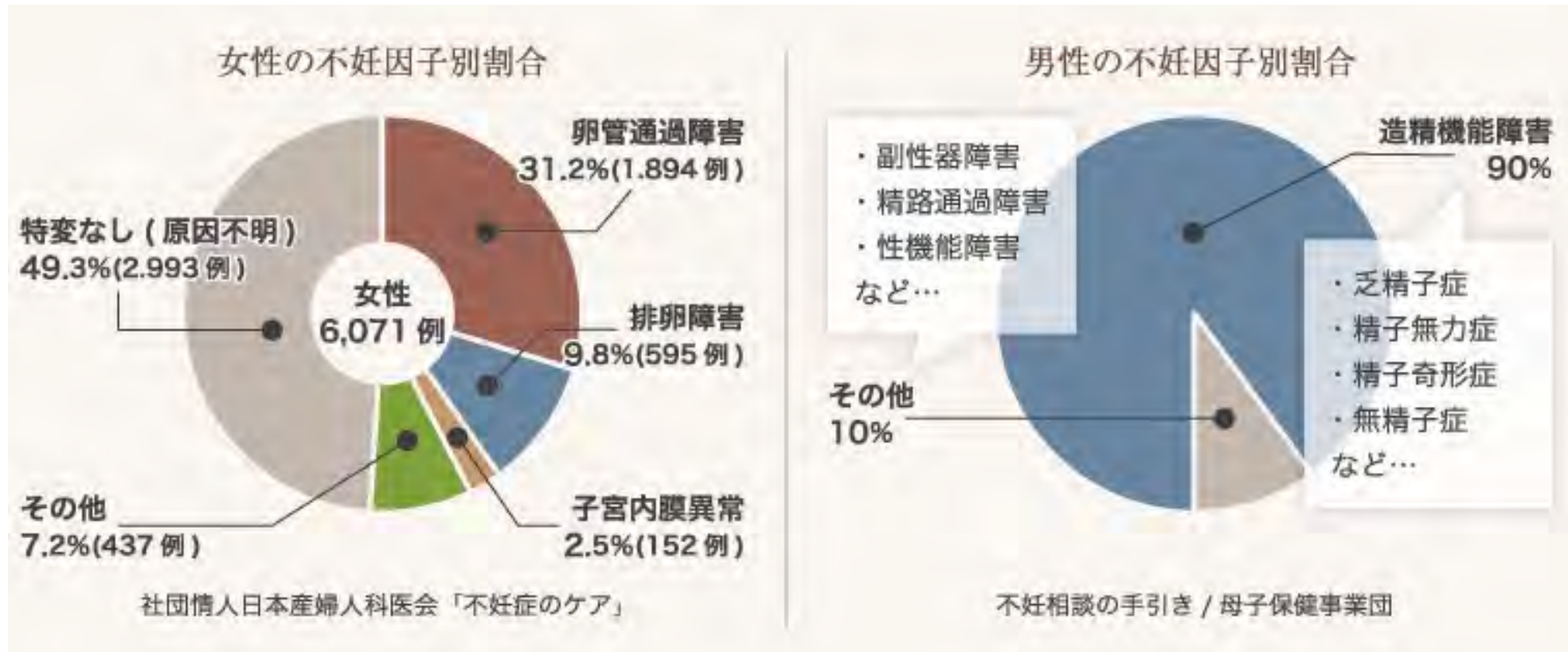
セントマザー産婦人科医院

日本における不妊とその原因

「**不妊**」とは、妊娠を望む健康な男女が性交をしているにもかかわらず、一定 期間妊娠しないものをいいます。日本産科婦人科学会では、この「一定期間」について「1年というのが一般的である」と定義しています。

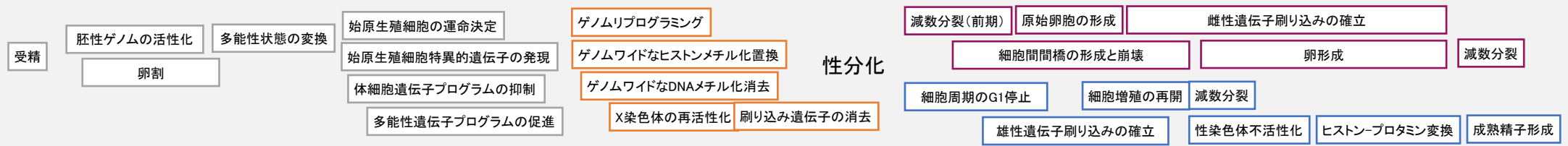
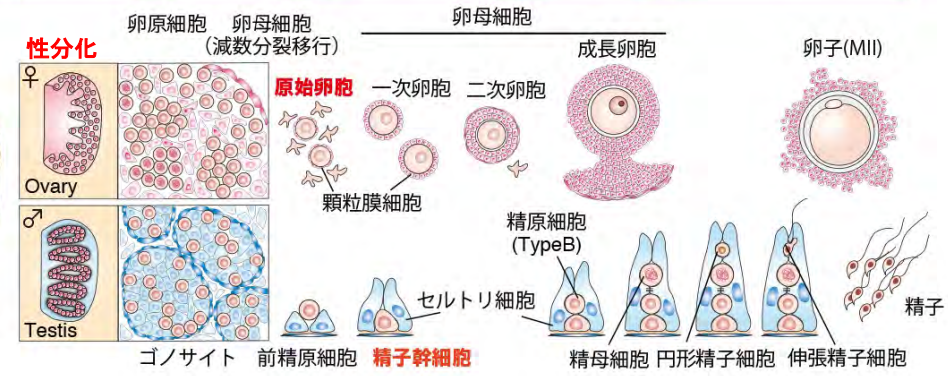
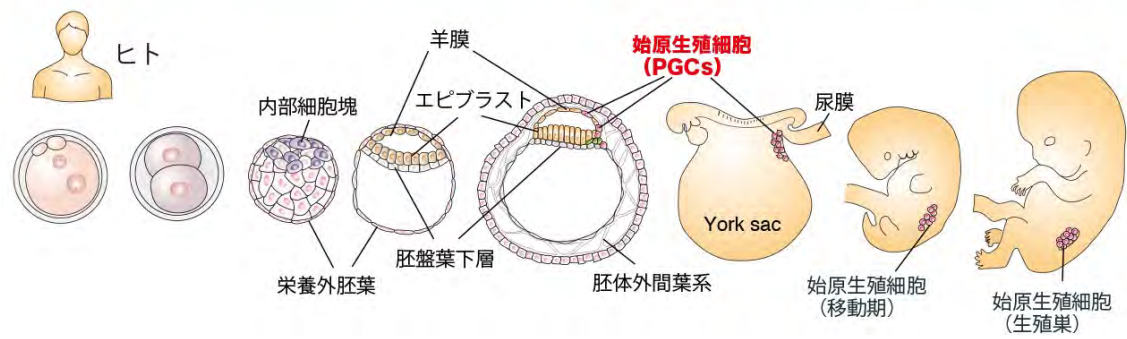
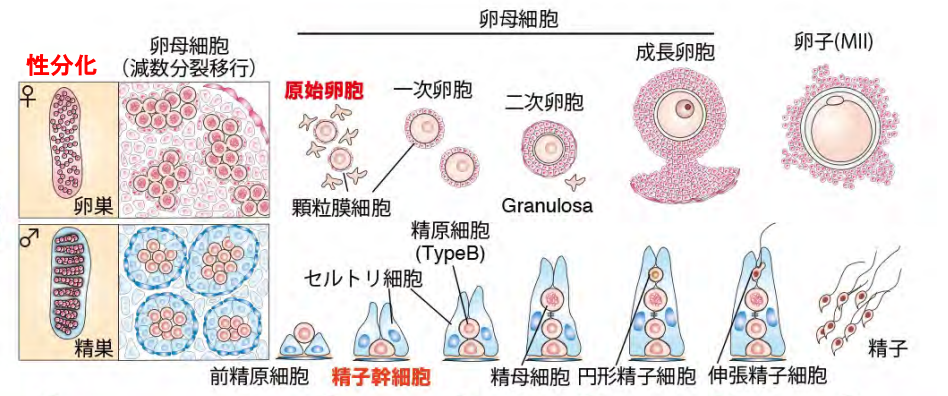
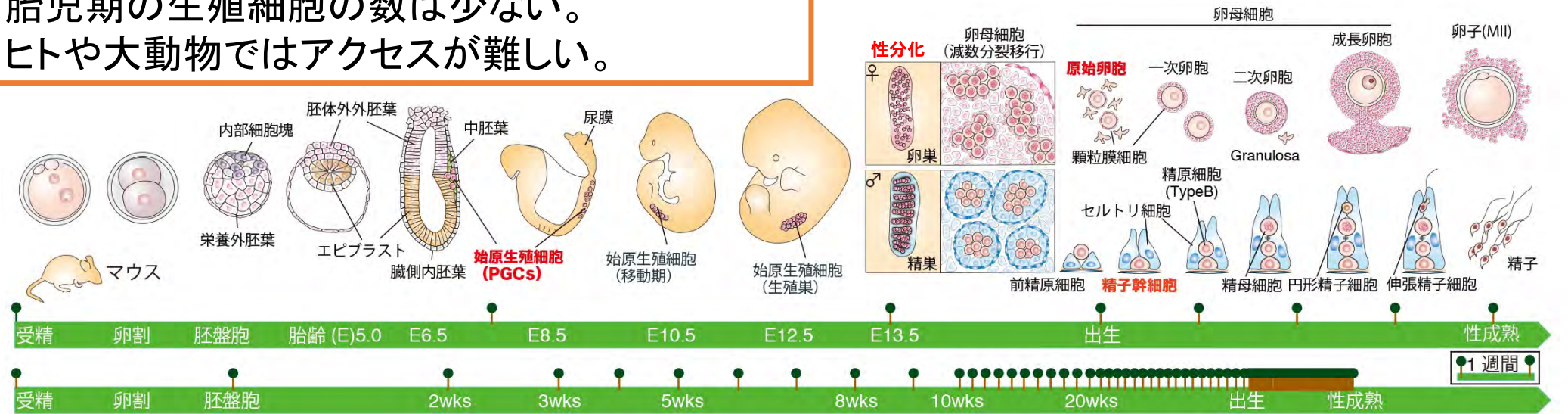
日本では、実際に不妊の検査や治療を受けたことがある(または現在受けている)夫婦は18.2%となり、これは夫婦全体の約5.5組に1組の割合になります。

「不妊治療と仕事の 両立サポートハンドブック - 厚生労働省」



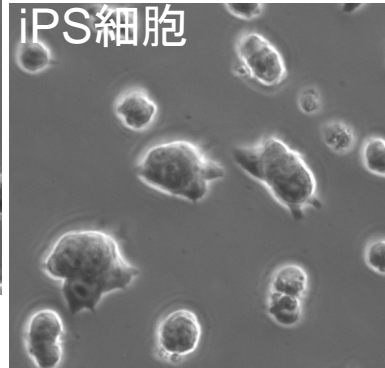
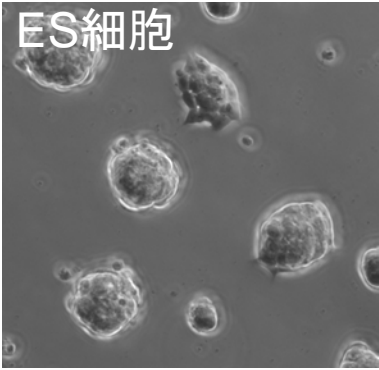
生殖細胞系列の発生過程の詳細

- 大事な生殖細胞の分化過程は胎児期に多い。
- 胎児期の生殖細胞の数は少ない。
- ヒトや大動物ではアクセスが難しい。

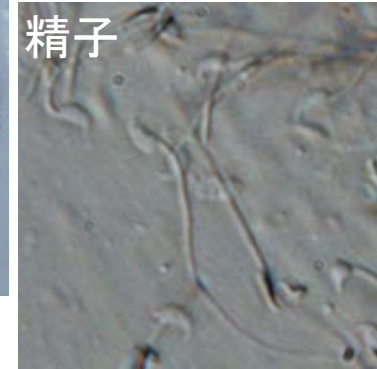
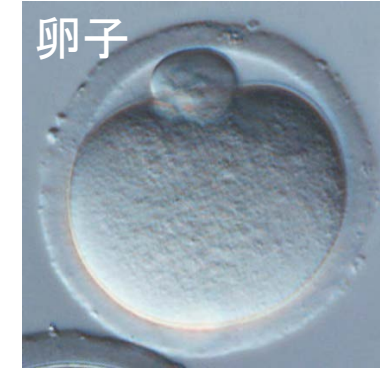
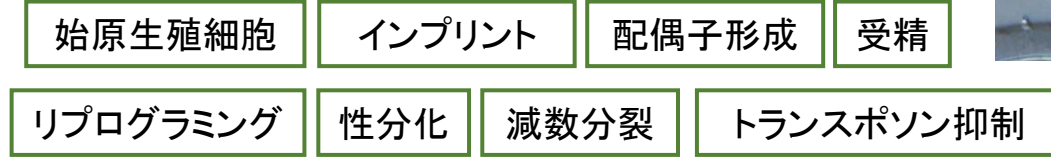


in vitro gametogenesis:

体外培養で生殖細胞の分化を再構築する＝生殖細胞をつくる



特異的な分化過程



- 生殖細胞の分化メカニズムの理解
不妊原因や治療法の開発
- 体外培養による配偶子の供給
不妊治療？
絶滅危惧種の保護
有用産業動物の育種



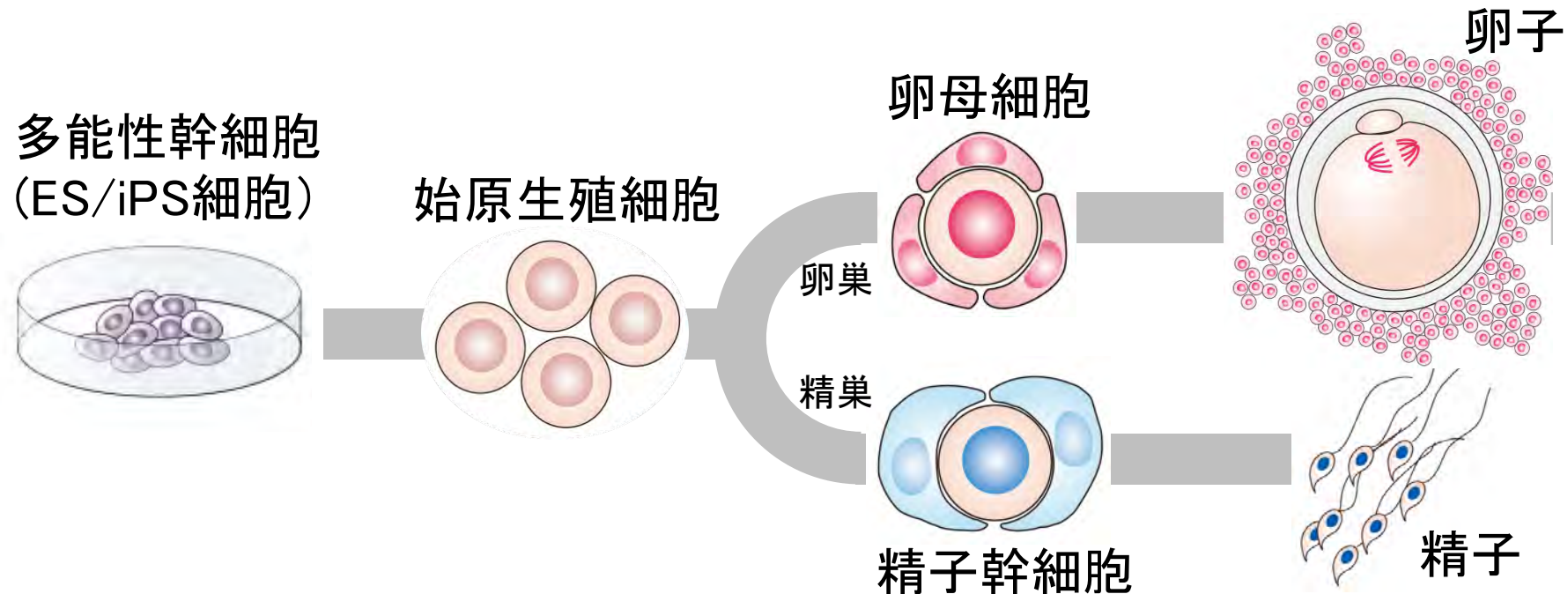
HANDMADE



本日の内容

- 生殖細胞をつくる意義
- ☑ 研究の最前線
- 今後の課題

多能性幹細胞から生殖細胞をつくるステップ



ステップ1

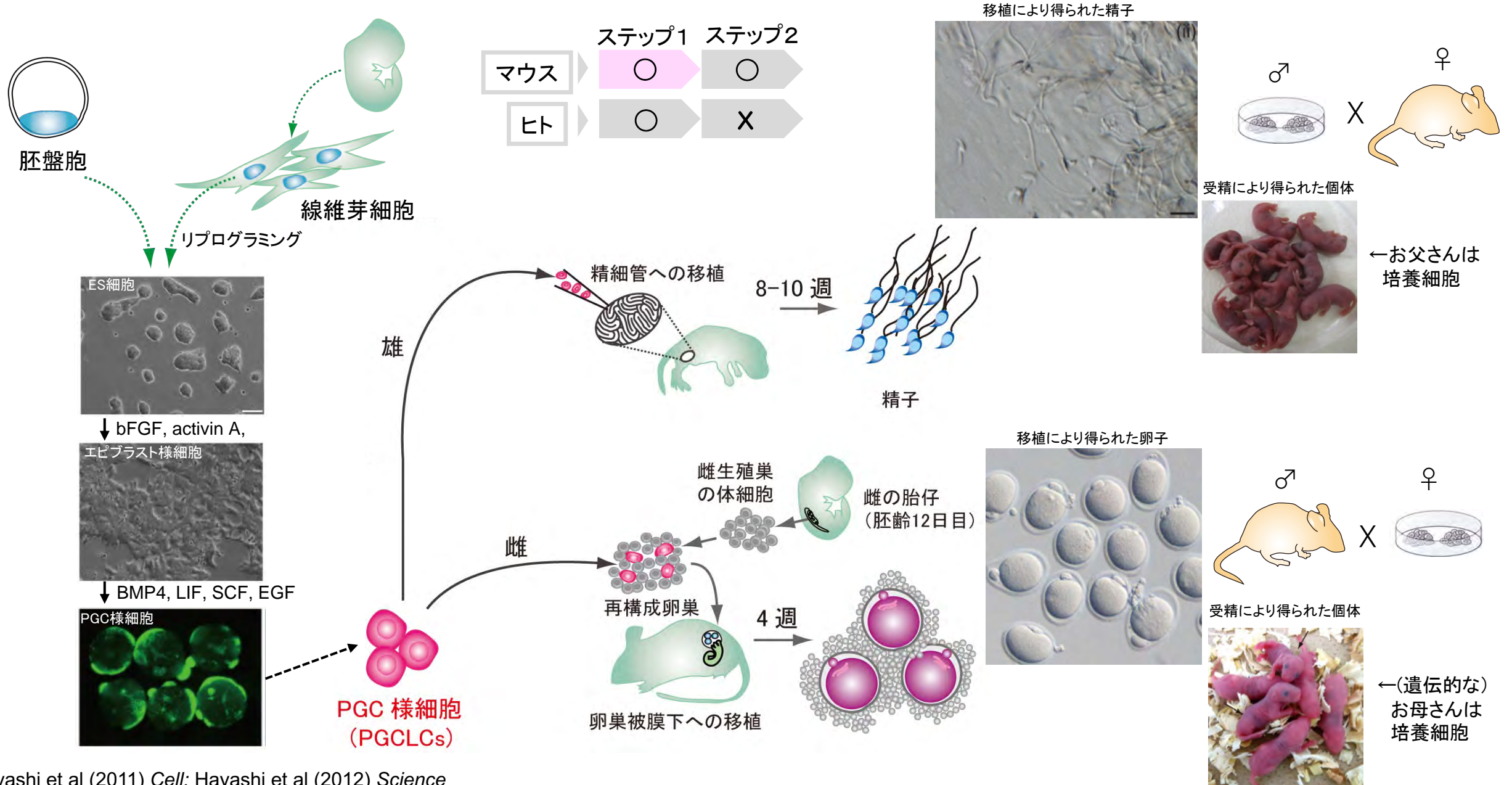
始原生殖細胞をつくる。
(性非特異的)

ステップ2

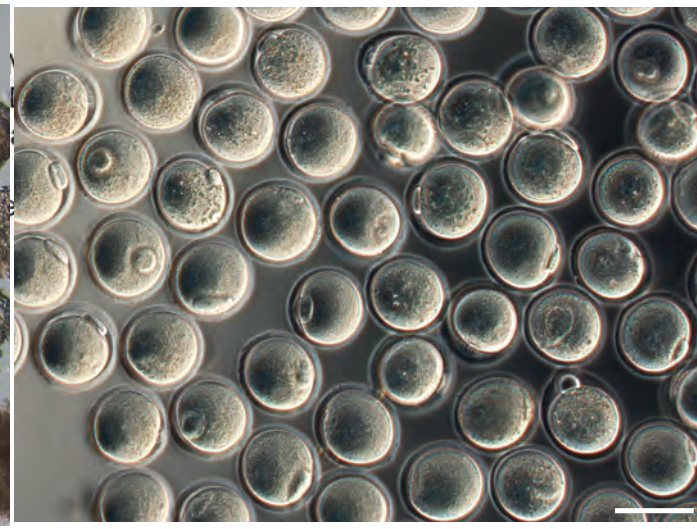
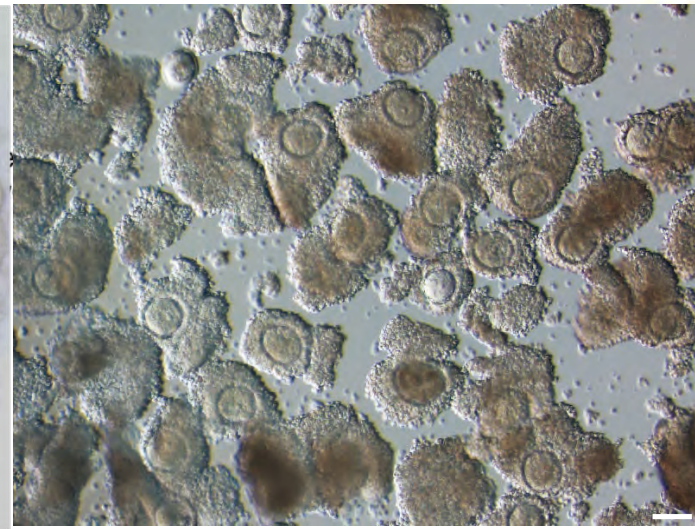
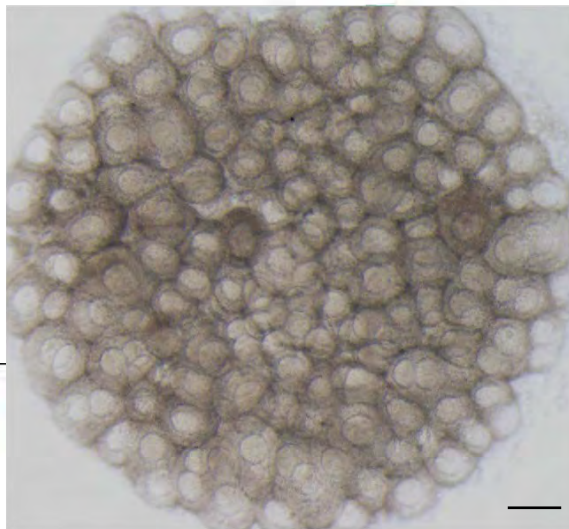
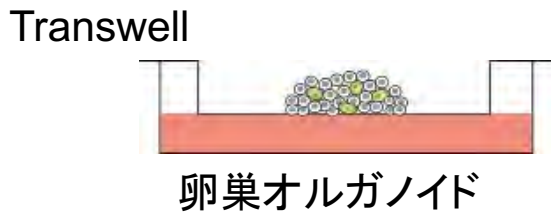
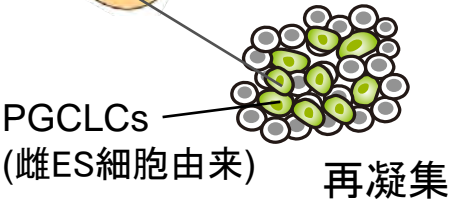
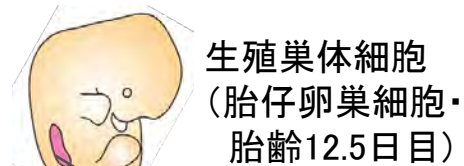
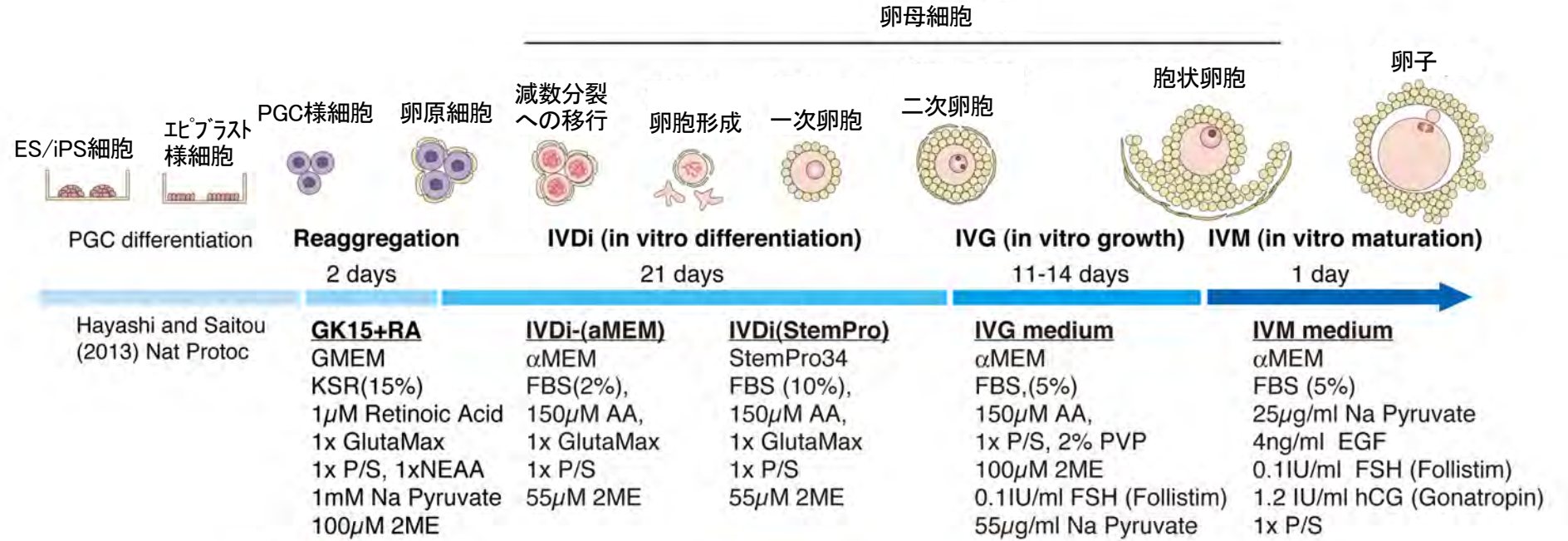
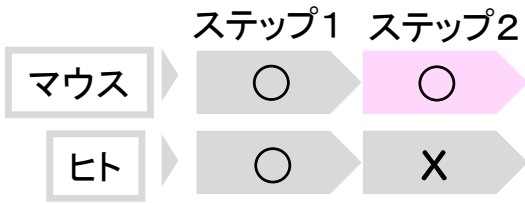
始原生殖細胞から卵子や精子をつくる。
(性特異的・周囲の体細胞依存的)

マウス	○	○
ヒト	○	X

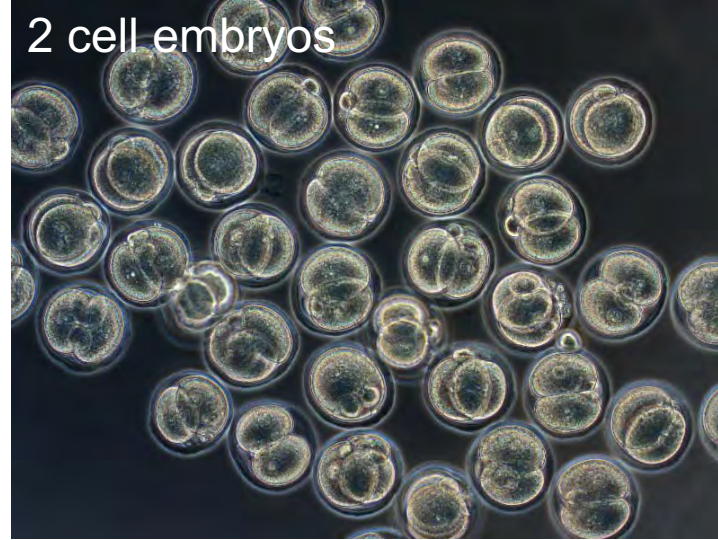
ステップ1 (マウス): ES/iPS細胞から始原生殖細胞様細胞(PGCLCs)の誘導



ステップ2 (マウス) : 体外培養系によるPGCLCsからの卵子の誘導



in vitro gametogenesisで作られた卵子は受精により個体にまで発生する。



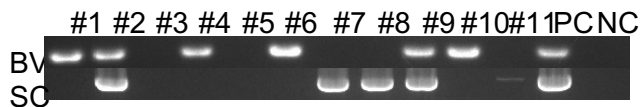
ES/iPS細胞由来の卵子は受精により個体にまで発生するが...

- ✓ 卵子間の質的なばらつきが大きい。
- ✓ 遺伝子発現がやや異なる。
- ✓ ミトコンドリアDNAの量が少ない。
- ✓ 染色体の異数体が多い。
- ✓ 物理的刺激に弱い。
- ✓ 発生率が低い: 生体由来の卵子(60-70%)と比較して、約1/20(3-5%)。



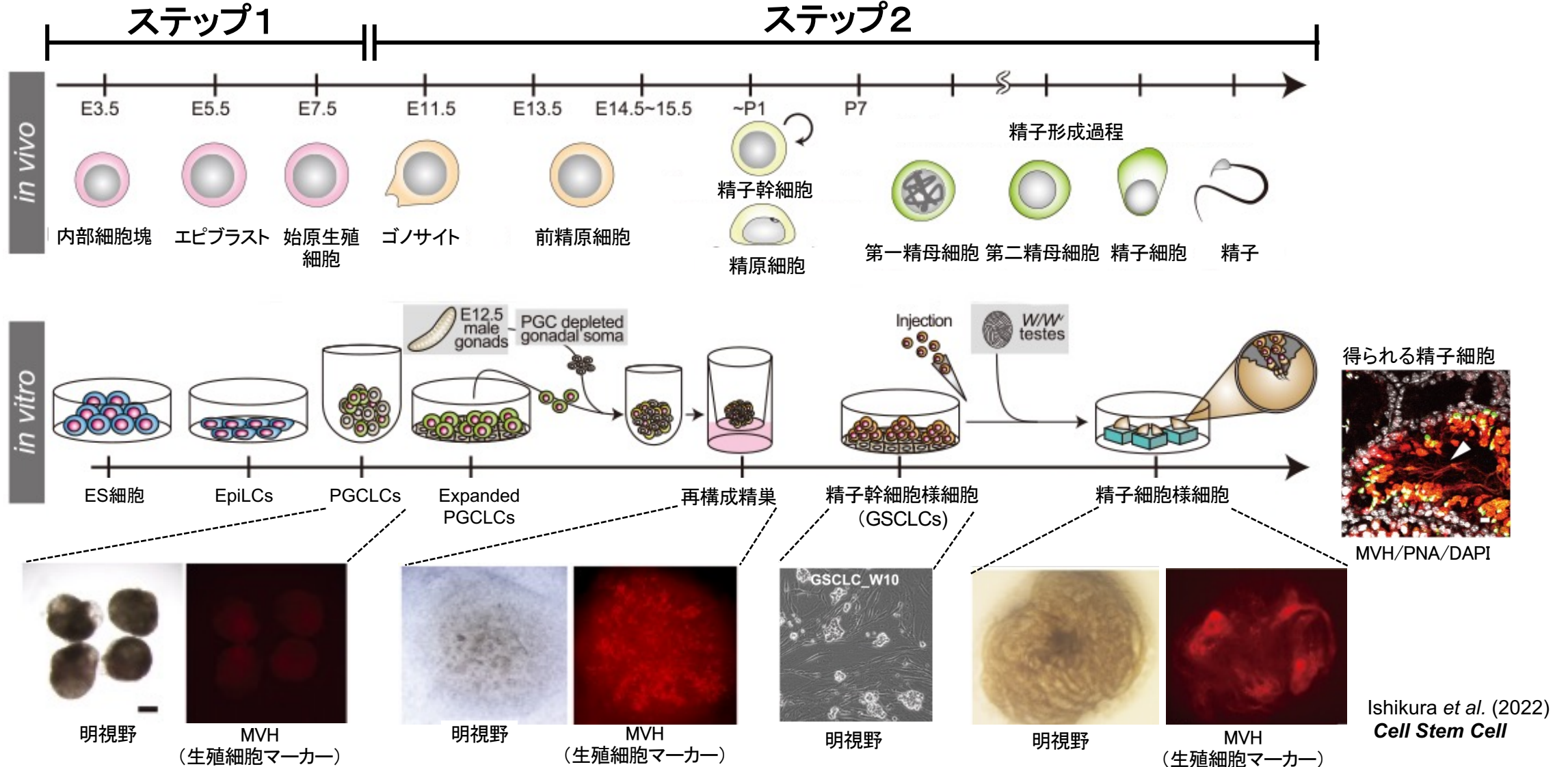
これから取り組むべき課題

- ✓ 培養条件の再検討
- ✓ 良質な卵子の選択



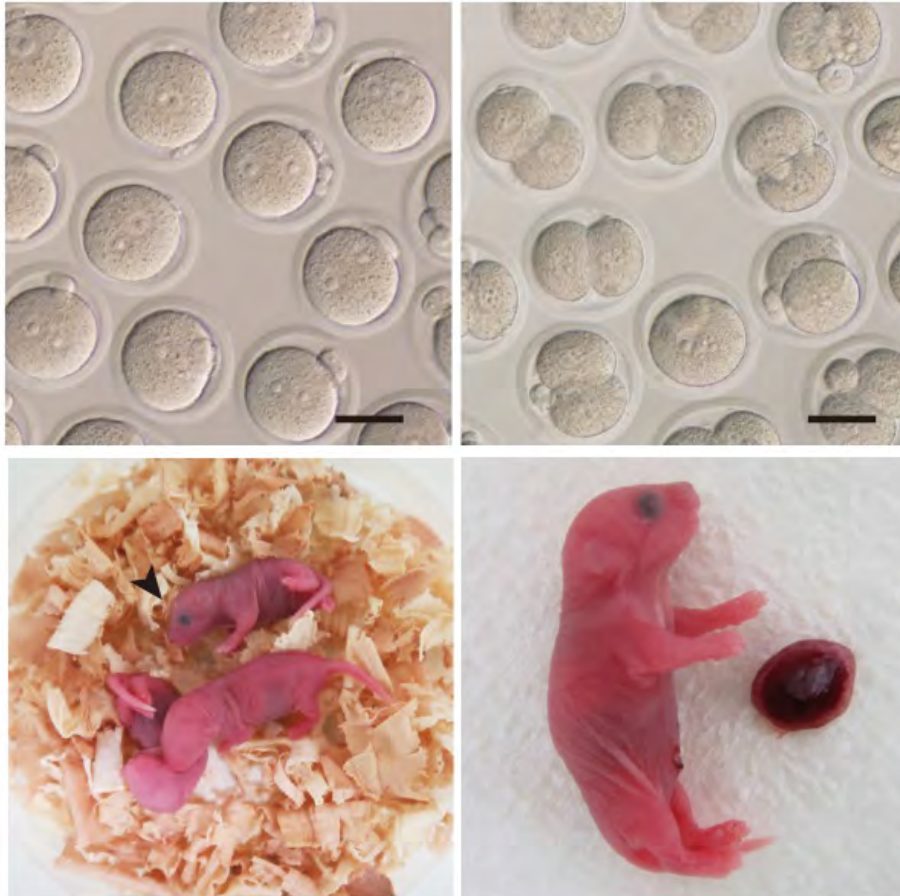
Hikabe et al. (2016) *Nature*

ステップ2 (マウス) : 体外培養系によるES細胞からの精子の誘導



マウスでは複数の培養システムの組み合わせで、精子をES細胞から分化誘導できる。

in vitro gametogenesisで作られた精子は受精により個体にまで発生する。

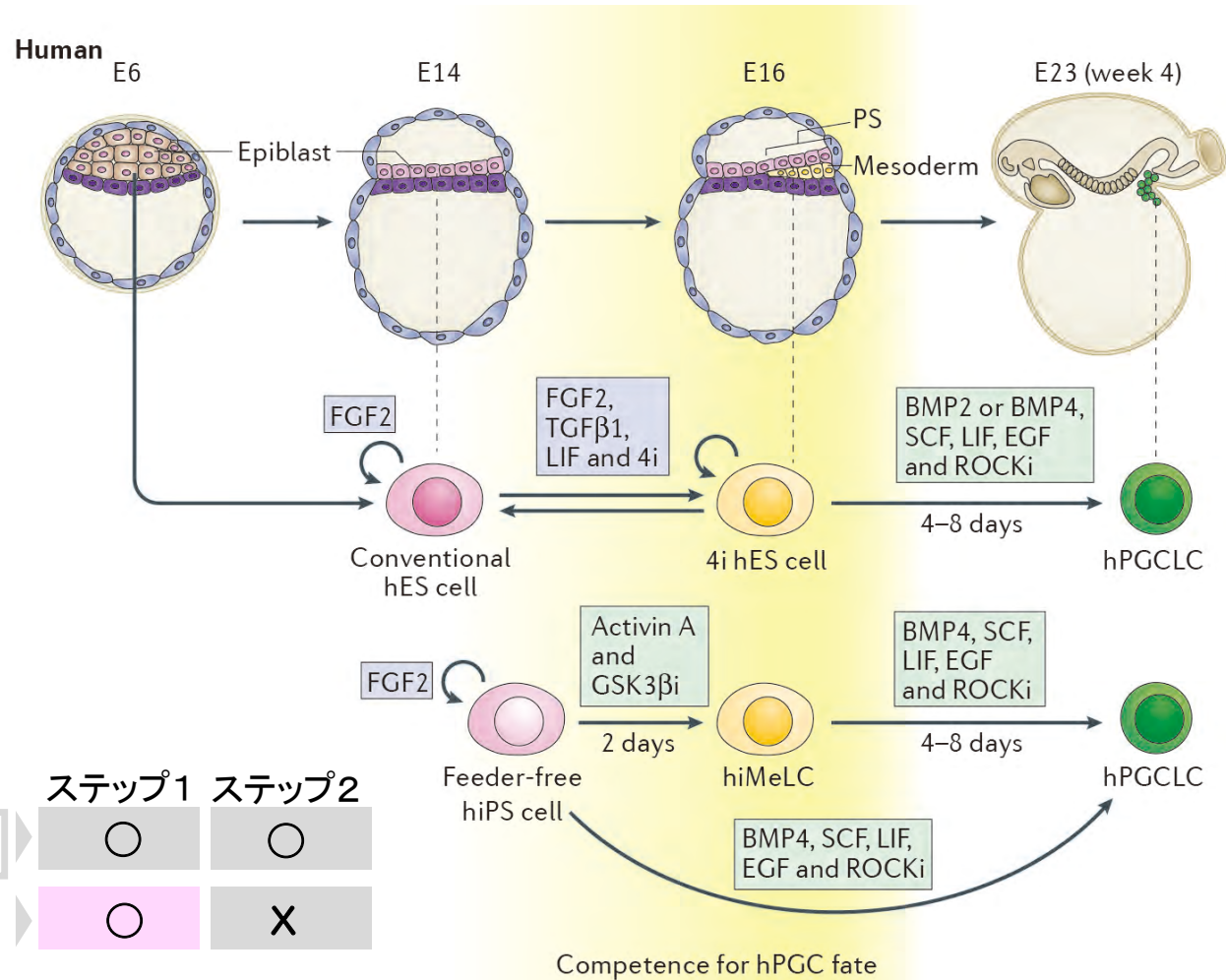


生体由来の精子幹細胞と比べて、ES/iPS細胞由来の精子幹細胞は概ね遺伝子発現等は似ているが...

- ✓ 精子形成能が低い。
- ✓ 細胞株間のばらつきが大きい。
- ✓ ヒストン修飾パターンが異なる
(H3K9me2 ↑、H3K27me3 ↑)
- ✓ ゲノムのInsulationの残留がある。
- ✓ 核内のB-compartmentの増加
- ✓ 得られる精子由来の受精卵の発生率が悪い。

Cell line	No. of oocyte survived after ROSI	No. of zygotes with 2PN (%)	No. of 2-cell embryos (%)	No. of embryos transferred	No. of pups (% · sex)
GSCLC_W3 [1]	48	23(47.9%)	23(100%)	23	1 (4.3% · Female)
GSCLC_W3 [2]	33	21(63.6%)	20(95.2%)	20	1 (5.0% · Male)

ヒトのステップ1: ヒトES/iPS細胞からの始原生殖細胞様細胞 (PGCLCs) の分化

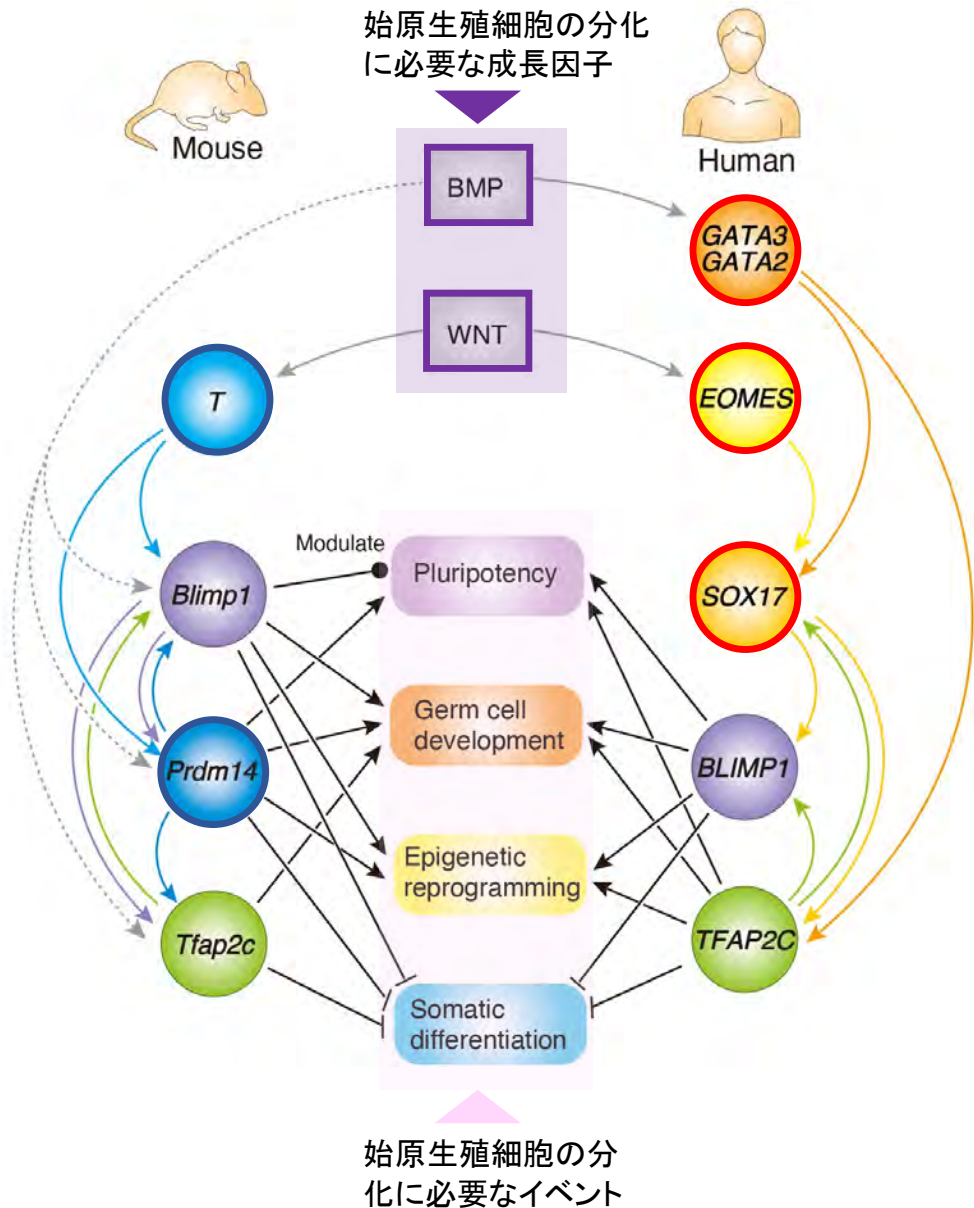


- ヒトES/iPS細胞からマウスと同じような培養条件でPGCLCsが簡便かつ高効率に誘導できる。
- ヒトPGCLCsの遺伝子発現は生体内のPGCsのものによく似ている。
- ヒトPGCLCsと生体内のPGCsではよく似たエピゲノムリプログラミングを起こしている。

ヒトの生殖細胞の分化を制御する遺伝子のスクリーニングには極めて有効

ゲノム編集技術によりヒトPGCs/PGCLCsの分化に必要な遺伝子が複数同定された。
SOX17、EOMES、PRDM1、GATA3など

始原生殖細胞の分化(ステップ1)の解析でわかったマウスとヒトの違い



マウスとヒトの共通点

- PGCLCsを誘導する成長因子
→ BMP4, WNT3/3A
- 始原生殖細胞の分化に必須な一部の転写因子
→ PRDM1/BLIMP1、TFAP2C
- 体細胞プログラムの抑制
- ゲノムワイドリプログラミングの特徴

マウスとヒトの相違点

- 成長因子の直下で機能する転写因子
→ EOMES(ヒト)、T(マウス)
→ GATA2、GATA3(ヒト)
- 始原生殖細胞の分化に必須な一部の転写因子
→ SOX17(ヒト)、SOX2(マウス)
- PGCLCsの増殖能
→ ヒトではほぼ無限に増える？

ヒトES/iPS細胞を用いた配偶子形成(ステップ2)はいまのところできない。

ステップ1 ステップ2

マウス

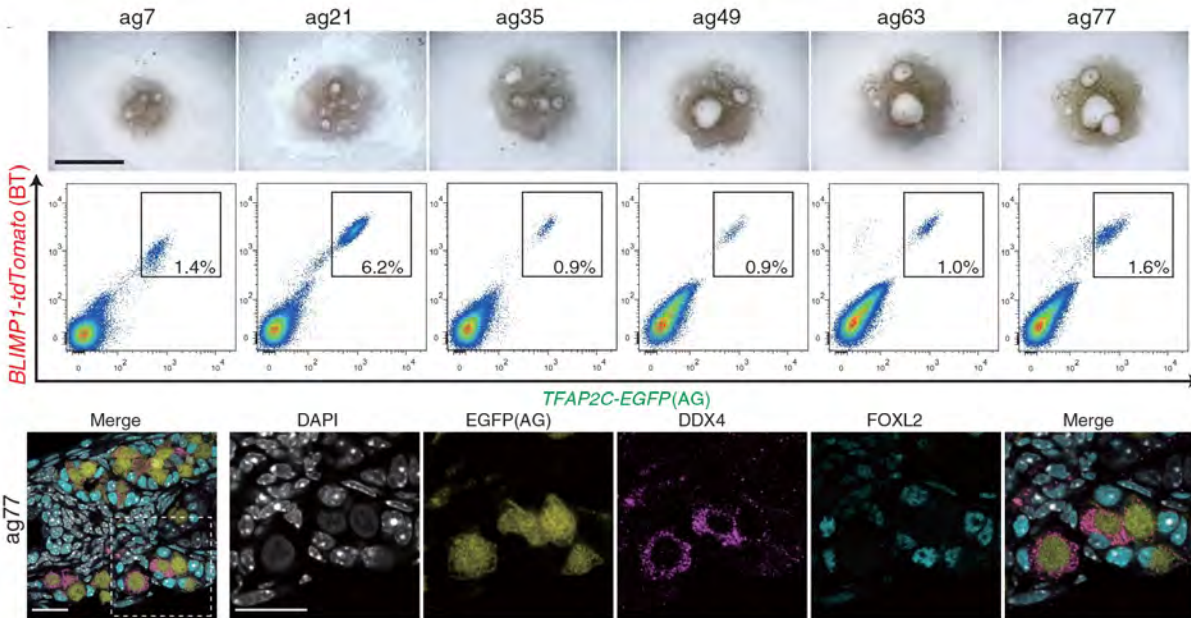


ヒト



ヒトPGCLCsから配偶子を分化させた成功例はない。

ヒトPGCLCsとマウスの卵巣の体細胞を用いた
異種間混合卵巣オルガノイドの結果



Yamashiro et al. (2018) *Science*

培養約12週間後に卵原細胞ができた。

ヒトのステップ2の技術的な問題点と解決策

- ① 胎児の卵巣・精巣の体細胞の調達が困難
- ② 長時間の培養時間が必要
卵母細胞の成熟期間: マウス3週、ヒト4-6ヶ月
- ③ 培養液の組成がマウスのもとは異なる。

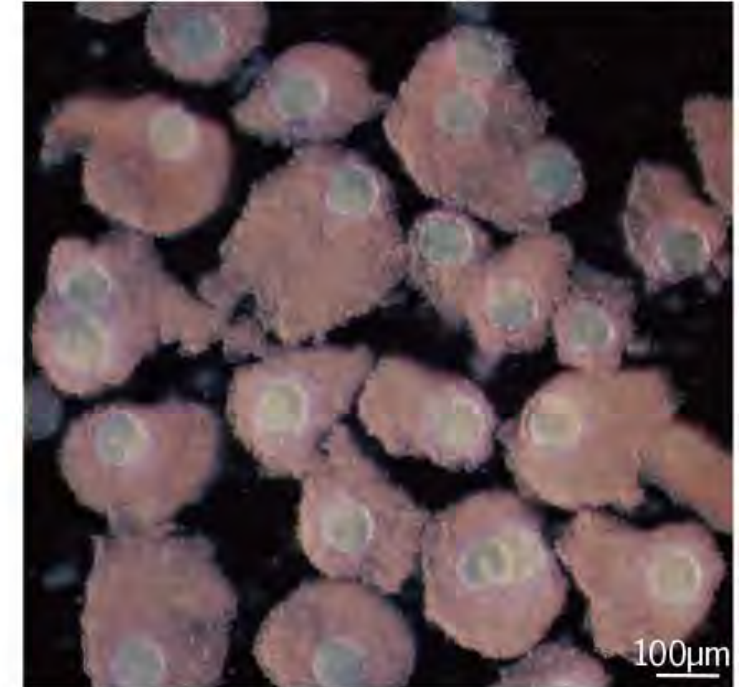
→ 解決策

- ① ヒトES/iPS細胞から胎児の卵巣・精巣の体細胞と同等の細胞を分化誘導する。
- ② } ヒトの未成熟卵胞などの材料を用いて条件検討を行う。
- ③ }

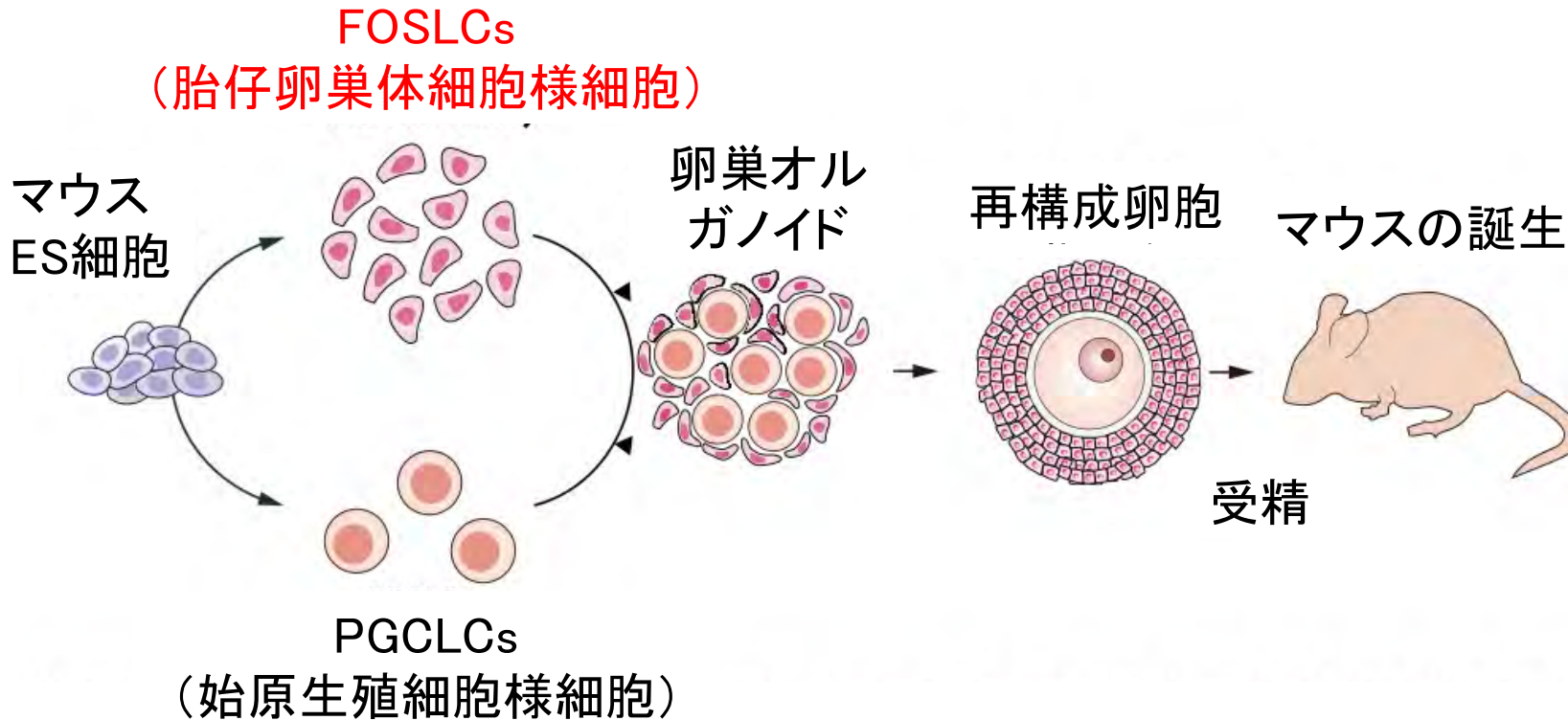
胎仔卵巣体細胞はマウスES/iPS細胞から分化誘導できる。

- ✓ 機能的な胎仔卵巣体細胞の分化誘導
- ✓ 性分化過程を含めた分化過程の再現

再構成卵胞

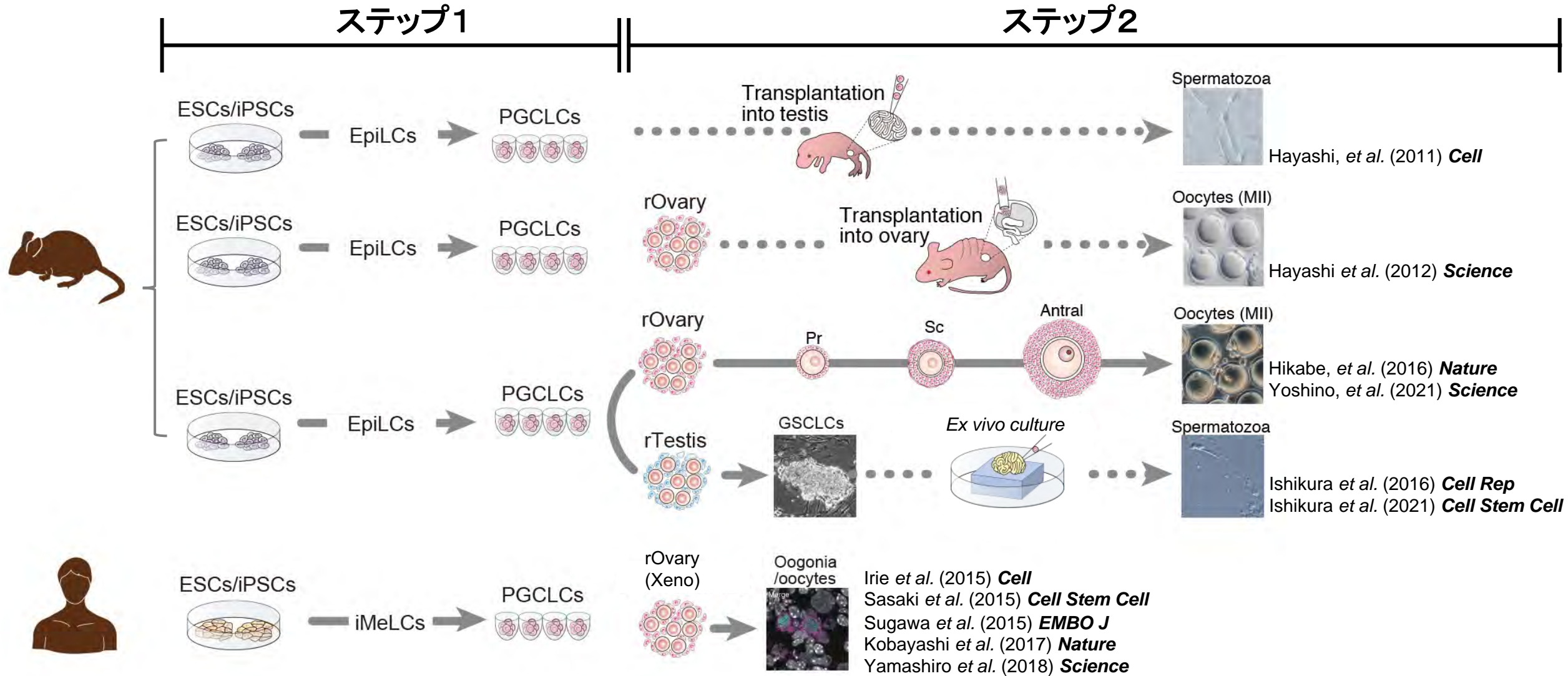


Yoshino et al. (2021) *Science*



概念実証(マウス): 生体組織を必要としない卵子産生系を構築できる

これまでの *in vitro* gametogenesis のまとめ



世界的な絶滅危惧種の急速な増加と遺伝的多様性の喪失

地球上には500万～3,000万種の生物が存在すると言われている。
確認されているだけで約140～180万種類（6～35%?）。



IUCN（国際自然保護連合）のレッドリストではこのうち
65,518種について種の絶滅の危険度を評価

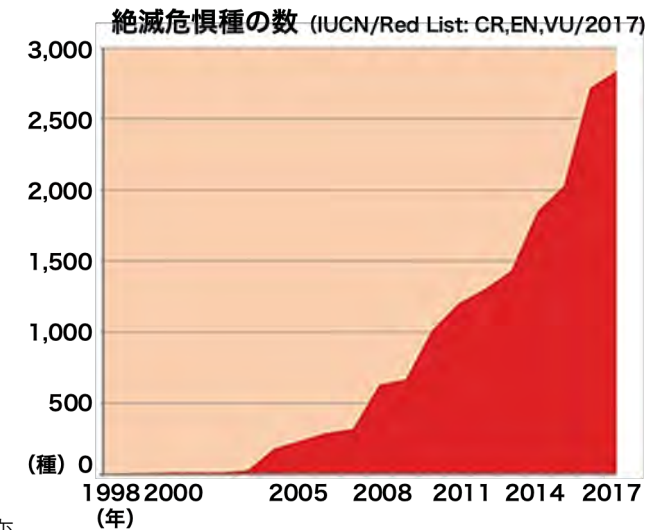
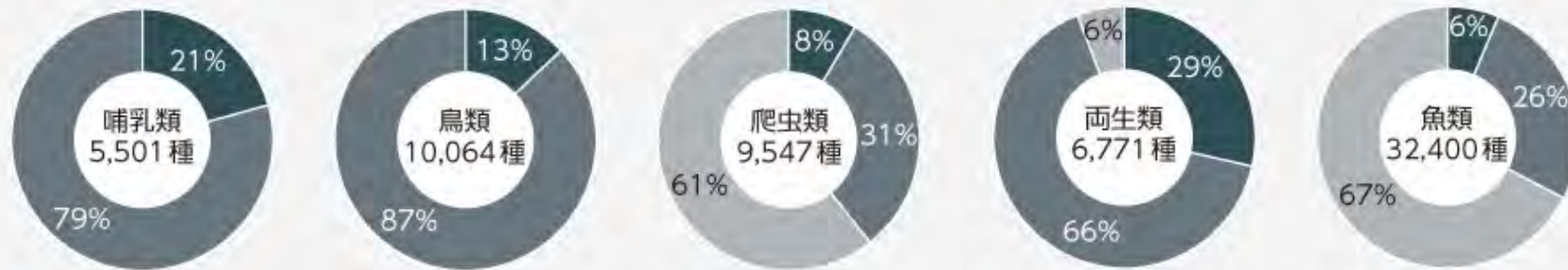
このうち約3割（20,219種）が絶滅危惧種として選定。約1%（858種）が絶滅。

図2-1-1 世界自然保護連合（IUCN）による絶滅危惧種の評価状況

■主な分類群の絶滅危惧種の割合

■ 絶滅のおそれのある種
■ 上記以外の評価種
■ 評価を行っていない種

資料：IUCNレッドリスト 2012.2



環境省HPより改変

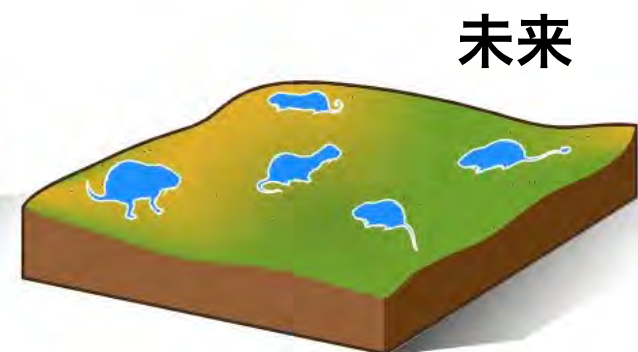
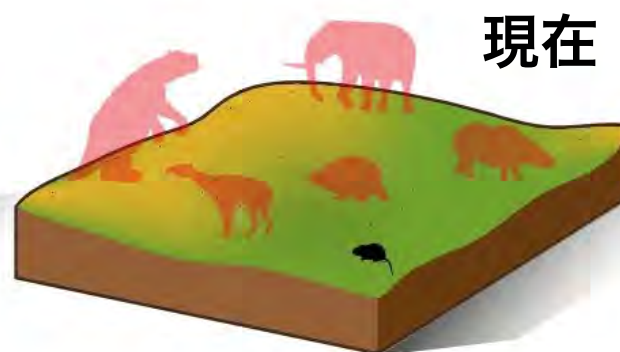
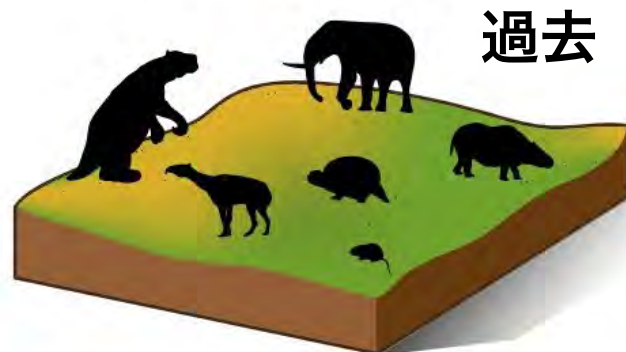
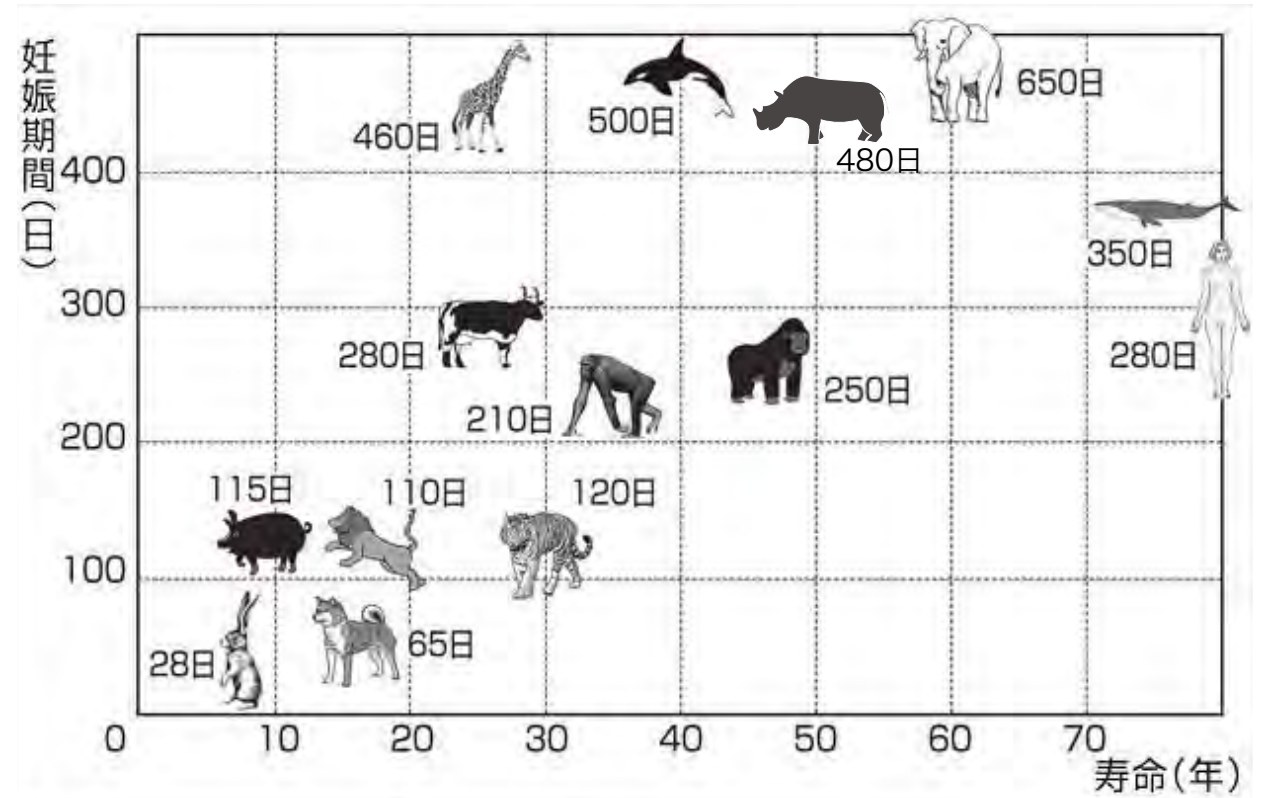
大型の哺乳類は絶滅しやすい。

大型の哺乳類

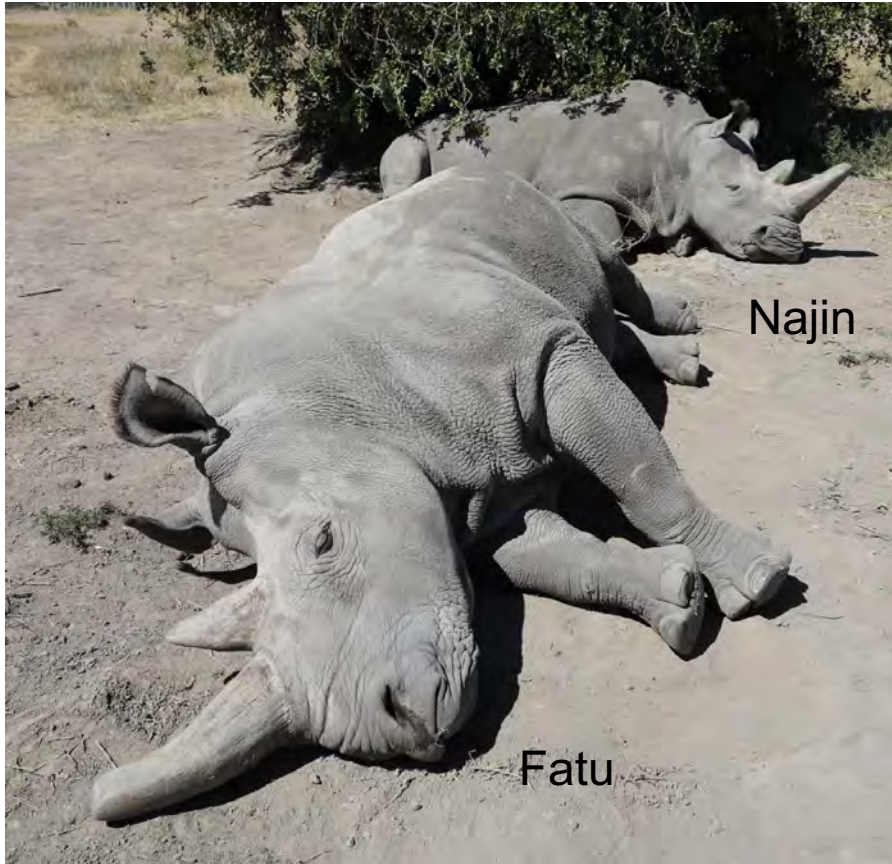
- 目立ちやすい。
- 生命の維持に大量のエネルギーが必要。
- 頭数が限られる。
- 長い妊娠期間を要する。
- 性成熟までに長い時間を要する



密猟や環境の変化に対して脆弱

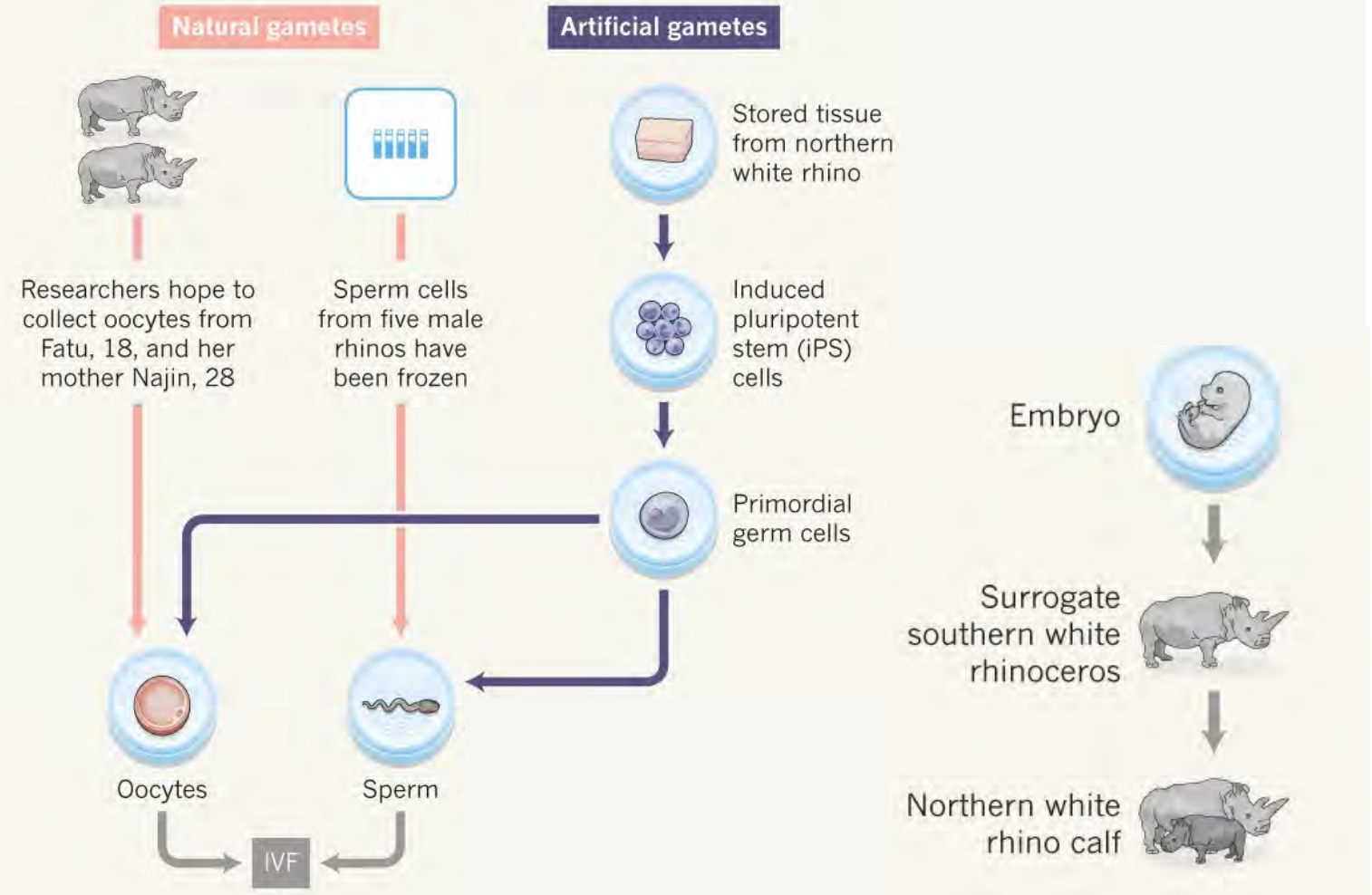


キタシロサイを救済するための国際プロジェクト



SAVING THE NORTHERN WHITE RHINO

Only two northern white rhinos are still alive, but Fatu and Najin cannot breed naturally. So researchers plan to develop in vitro fertilization (IVF) and advanced cellular techniques to establish a viable population.



キタシロサを救済するための国際プロジェクト

ステップ1

始原生殖細胞をつくる。
(性非特異的)

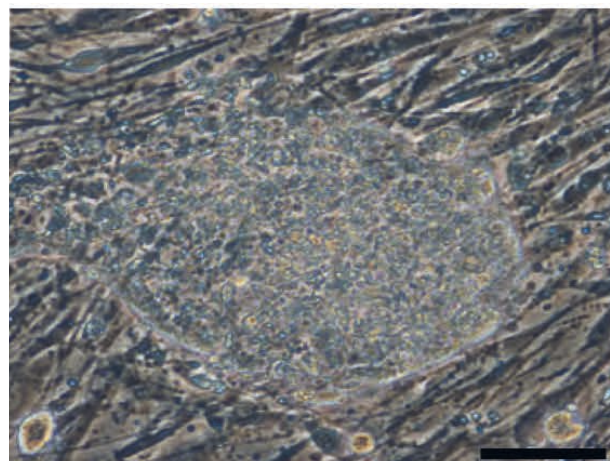
ステップ2

始原生殖細胞から卵子や精子をつくる。
(性特異的・周囲の体細胞依存的)

マウス	○	○
ヒト	○	×
サイ	○	×



材料の採取

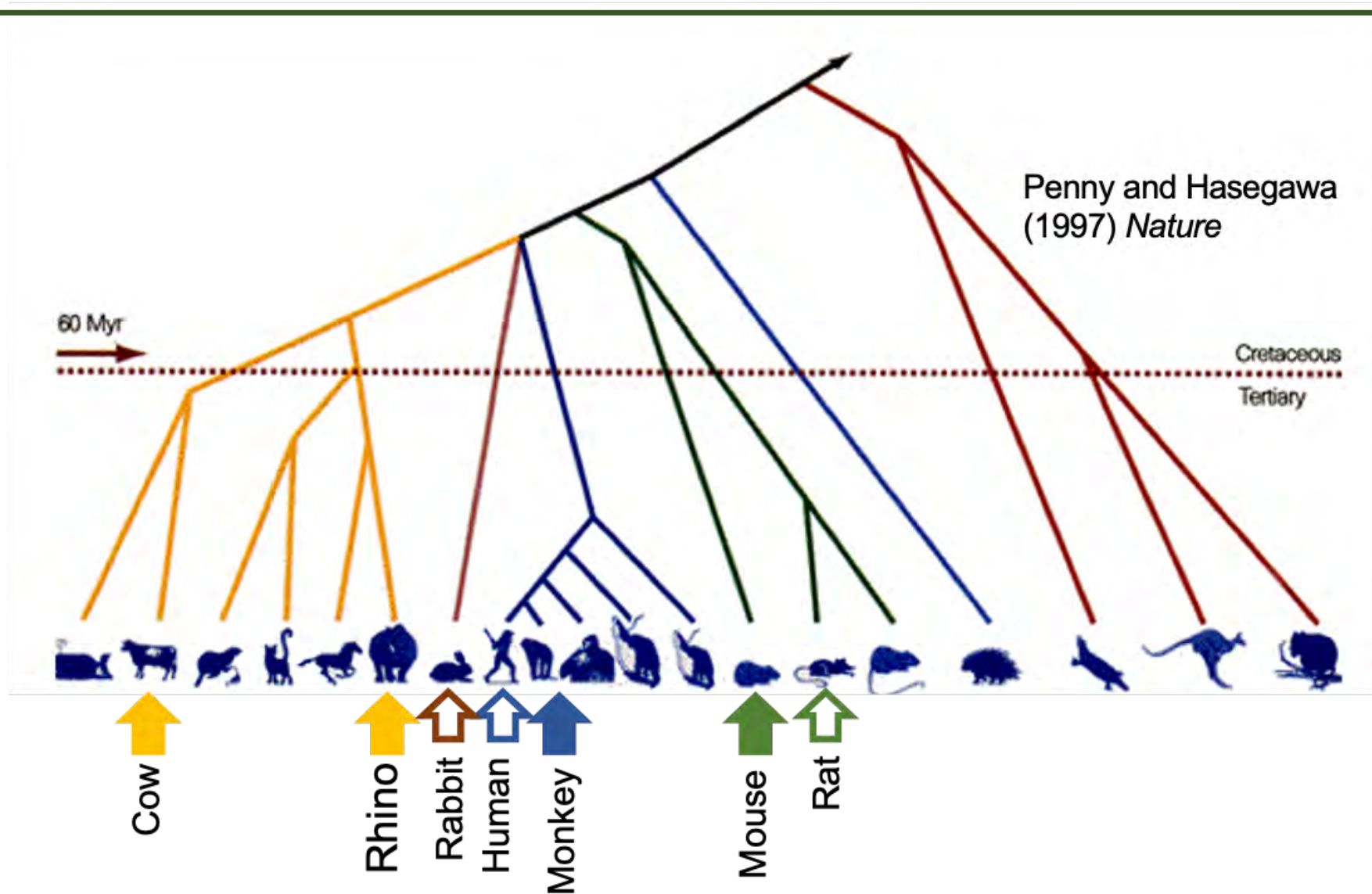


シロサイ多能性幹細胞



シロサイ始原生殖細胞
(移動能をもつ)

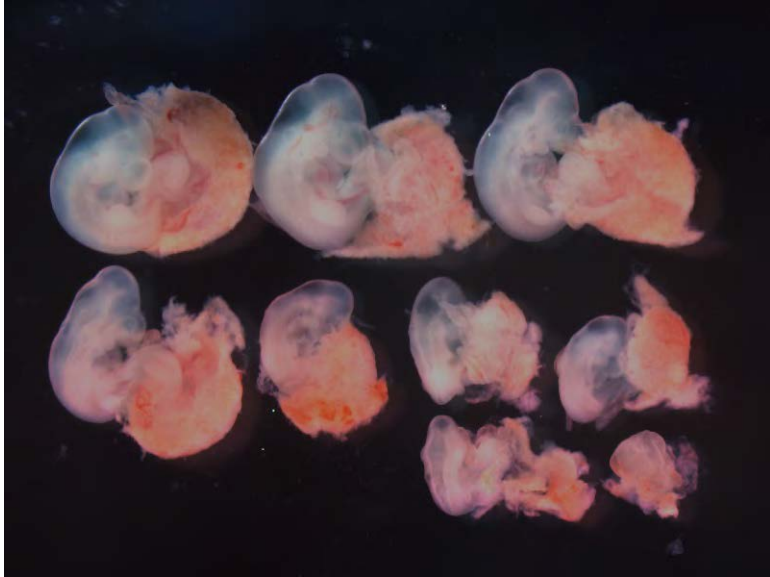
多能性幹細胞から生殖細胞を作る研究の広がり



本日の内容

- 生殖細胞をつくる意義
- 研究の最前線
- ☑ 今後の課題

マウス実験から見える技術的な課題



in vitro gametogenesis由来の配偶子を用いると様々な段階で発生が停止する。

Hikabe et al. (2016) *Nature*

in vitro gametogenesis由来配偶子の課題

- ✓ 発生率の低さ
- ✓ 配偶子の質的なばらつき
(染色体、遺伝子発現、エピゲノム)
- ✓ 産仔の健全性？
(ゲノム/エピゲノム変異、行動、寿命、疾患等)

[iPS細胞を*in vitro* gametogenesisに用いる場合]

- ✓ iPS細胞の質的なばらつき
- ✓ 体細胞核で起こるゲノム変異(体細胞系列では生殖細胞系列よりも10倍以上ゲノムの変異率が高い)

種間の違いに関する課題

- ✓ 分化培養条件の違い
- ✓ 分化にかかる時間の違い

ISSCRガイドラインと当面のヒト生殖細胞作製の課題

ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2021 update

Stem Cell Reports | Vol. 16 | 1398–1408 | June 8, 2021

Box 2. Categories of research

A brief summary of the categories of research from the 2021 ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation. For more detailed guidance, please see <https://www.isscr.org/guidelines>.

Category 1A—Exempt from review by a specialized oversight process

- Most *in vitro* pluripotent stem cell research
- Most *in vitro* organoid research
- Transfer of human stem cells into postnatal animal hosts

Category 1B—Reportable but not typically reviewed by a specialized oversight process

- Non-integrated stem cell-based embryo models
- *In vitro* culture of chimeric embryos (human cells into non-human embryos)
- *In vitro* gametogenesis without fertilization or generation of embryos

Category 2—Reviewed by a specialized oversight process

- Procurement of embryos, or gametes for the creation of embryos, for *in vitro* research
- Derivation of cell lines from human embryos
- Genetic alteration of embryos or gametes
- *In vitro* culture of human embryos for research until the formation of the primitive streak or 14 days from fertilization, whichever comes first
- Human cells transplanted into nonhuman embryos that are gestated in a non-human uterus
- Integrated stem cell-based embryo models
- Transferring human embryos following MRTs into a human uterus

Category 3A—Not allowed: Currently unsafe

- Heritable genome editing for reproductive purposes
- Transferring mtDNA-modified (not including MRTs) embryos into a uterus
- Using gametes differentiated from human stem cells for reproduction

Category 3B—Not allowed: Lacks compelling scientific rationale and/or is ethically concerning

- Gestating human stem cell-based embryo models
- Human reproductive cloning
- Breeding human-animal chimeras where there may be human germ cells.
- Transferring human-animal chimeric embryo(s) to a human or non-human primate uterus
- Transferring human embryo(s), irrespective of origins, to an animal uterus

In vitro-derived gametes

If, however, the research entails testing gametes derived after any period of *in vitro* culture by fertilization and/or the creation of embryos, this must be subject to review, approval, and ongoing monitoring, as appropriate, through a specialized oversight process capable of evaluating the unique aspects of the science and the associated ethical issues. This latter research is therefore firmly in Category 2.

- 生殖細胞の分化メカニズムの理解
→ *in vitro* gametogenesisは発生中のヒト生殖細胞を知る唯一の方法
→ ゲノム編集との組み合わせにより不妊の遺伝的要因が解明に期待
(今後)
→ 配偶子を作る分化培養系の開発が必要
→ 配偶子の機能評価には受精の可否が必要
- 体外培養による配偶子の供給源
→ 実験動物の結果からサルなどを用いた基礎研究が必要

結論

- 生殖細胞系列の発生過程は*in vitro* gametogenesisで再現できる: マウスではほぼすべての過程、ヒトでは始原生殖細胞、その他大動物は始原生殖細胞
- 始原生殖細胞の発生において、種特異的なメカニズムは存在する。
 - *in vitro* gametogenesisがそのメカニズムを探る唯一の方法
 - ゲノム編集技術と組み合わせることによりメカニズムの理解が加速
- *in vitro* gametogenesisで得られる配偶子には質的なばらつきがあり、生殖目的の利用には慎重な検討を要する。