

# In vitro卵子誘導系を駆使した妊孕性拡張創薬

Drug discovery for fertility enhancement via *in vitro* oogenesis

奈良県立医科大学医学部 発生・再生医学講座 助教 長岡 創

## 要 約

女性が生涯に産出できる卵子の総数は出生前に決まり、そのメカニズムを理解することは妊孕性の形成・喪失機序を理解する上で重要であるが、胎生期に起こる細胞形成プロセスの多くが未だ理解されていない。近年、代表者は多能性幹細胞を用いて生殖細胞を分化誘導する培養系を用いて、転写因子の発現により卵形成プロセスが始動できることを示し、妊孕性形成に関わる様々な仮説検証を効率良く行える実験基盤を完成させた<sup>1</sup>。本研究では、開発した実験基盤を利用して、妊孕性の根幹を担う卵母細胞の「数」の成立機構を理解し、その応用から妊孕性延長を可能にする創薬基盤を創出することを目指した。まず、胎生期卵母細胞における網羅的な遺伝子発現解析から、卵形成の基盤構築に寄与すると考えられる遺伝子群を選定した。次に、ゲノム編集技術を用いて多数の遺伝子変異ES細胞株を作製し、*in vitro*卵形成系を用いた機能スクリーニングを行い、卵母細胞の「数」に多大な影響を与える遺伝子群を同定した。*In vitro*誘導系における遺伝子発現解析から、新規の遺伝子群は大別すると、(i) 減数分裂進行、(ii) 原始卵胞形成、(iii) 転写後RNA制御、(iv) トランスポゾン制御、などに関わることが明らかになり、胎児期卵形成における重要因子の新規発見に多能性幹細胞を起点とした*in vitro*卵子誘導系が有用であることが確認できた。今後、同定された遺伝子・シグナル経路に対する摂動実験を行い、卵母細胞数の拡張可能性を探索する。また、複数の遺伝子に関してはノックアウトマウスを作製中であり、生理的な他臓器との連関の中での作用機序を明らかにし、薬剤投与等による妊孕性拡張の可能性を探る。

## 諸 言

卵子は生命継承の要であり、その形成異常は不妊や先天性疾患の原因となる。卵形成は胎生期から開始し、「全能性の附与」を支える卵子の機能は段階的に獲得されていく。また、卵子の前駆細胞である卵原細胞は胎生期に有糸分裂を止め、減数分裂へと移行するため（卵母細胞へと分化する）、女性が生涯作ることができる卵子の総数が出生前に決まる<sup>2</sup>。この卵母細胞プール（卵巣予備能）の構築機構を理解することは妊孕性の形成・維持・喪失機序を理解する上で基盤となるが、胎生期に起こるプロセスの分子機序の多くが不明瞭である。研究代表者は、多能性幹細胞を起点とした*in vitro*生殖細胞誘導系を用いて、卵形成プログラムの誘導に必要な十分因子である転写因子ZGLP1の同定に成功し<sup>1</sup>、卵形成プロセスの分子機序解明を行うための独自の実験基盤を創出した。本研究では、この実験基盤から得られた知見を活用し、妊孕性の根幹を担う卵母細胞の「数」の成立機構を理解し、その応用から妊孕性延長を可能に

する創薬基盤を創出することを目指した。

## 方 法

本研究は「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守するため、奈良県立医科大学にて設置されている遺伝子組換え安全委員会、動物実験委員会の承認を受けた上で実施した。

### (1) 胎児期卵形成における遺伝子発現のプロファイリング

胎児期卵母細胞形成の分子機序を理解するために胎齢9.5日～出生後2日齢までの胎仔雌マウスから始原生殖細胞および卵母細胞を採取し、次世代シーケンスを行った。生殖細胞の回収はStella-EGFP（胎齢9.5～13.5日）、または、Ddx4-RFP（胎齢14.5～生後2日）を指標としてFACS Aria IIを用いて行った。細胞回収後、3'側をエンリッチしてmRNAを増幅してシーケンス用ライブラリを作製し、次世代RNA-seqに供試した<sup>3</sup>。また、ZGLP1の強制発現により*in vitro*

にて卵形成を誘導した生殖細胞からも同様に遺伝子発現解析を行った。

#### (2) 標的遺伝子の遺伝子改変ES細胞作製

標的遺伝子の機能検証を行うために、遺伝子破壊が効率よく起きるようにデザインされたMouse CRISPR KO pooled library (Brie) を用いて、Blimp1-mVenus; Stella-ECFPの二つの蛍光タンパク質レポーターを保持するES細胞にてゲノム編集を行った。

#### (3) ES細胞からの始原生殖細胞誘導、および、再構成卵巣作製

(2)にて作製したゲノム編集ES細胞をまずエピソード様細胞へと分化させ、その後、BMP刺激により始原生殖細胞へと分化させる。Blimp1-mVenusを蛍光指標に細胞を分取し、胎仔マウス卵巣由来の体細胞と共培養して再構成卵巣を作製した。胎仔卵巣体細胞は妊娠12日齢ICRマウスから雌胎仔を取り出し、MACS (表面抗原: CD15<sup>+</sup>とCD31<sup>+</sup>)により内在性の生殖細胞を取り除き採集した。再構成卵巣をコラーゲンコートしたPTFEメンブレンに静置し、気相-液相界面培養法にて卵巣培養を行った<sup>4</sup>。卵巣培養を21日間行い、Stella-ECFPの蛍光を指標に卵母細胞の数を観測した。また、再構成培養の5、7、9日目にてStella-ECFPを指標に細胞を分取し、次世代シーケンスに供試した。

#### (4) 標的タンパク質の細胞内局在解析

標的因子のCoding sequenceを胎仔期卵母細胞由来のcDNA libraryよりPCRクローニングし、CMVプロモーター下での過剰発現ベクターを構築した。発現ベクターをHEK細胞にて強制発現し、標的タンパク質の発現局在パターンを確認した。

#### (5) 標的タンパク質に対する抗体作製

コスモバイオ社の抗原解析サービスを利用し、抗体作製に最適な部位を予測し、その部位に対するペプチドを合成、ウサギに免疫した。ELISAにて抗体形成を確認し、精製した抗体を用いて胎仔期マウス卵巣、および、卵巣オルガノイドにおいて免疫染色に用いた。

## 結果

#### (1) 胎児期卵形成における遺伝子発現のプロファイリング

始原生殖細胞形成から出生後までの胎生期卵母細胞

の網羅的な遺伝子発現解析の結果、胎仔期卵形成過程で活性化された遺伝子群は(i) 妊娠中期に一過性に活性化される遺伝子群、(ii) 妊娠中期から出生前にかけて発現のある遺伝子群、(iii) 妊娠後期から出生後にかけて発現上昇のある遺伝子群に大別することができた。またこれら遺伝子群の多くがZGLP1によって制御を受けることも明らかになり、ZGLP1によって減数分裂、RNA制御、クロマチン・転写制御、トランスポゾン抑制、卵胞形成などの卵形成プログラムの基盤を構成する遺伝子群が活性化されることが明らかになった。

#### (2) 標的遺伝子の遺伝子改変ES細胞作製、*in vitro*卵形成による表現型解析

卵形成過程における機能が未知の遺伝子に着目して、Mouse CRISPR KO pooled library (Brie) を元にゲノム編集を行い、遺伝子破壊ES細胞株を作製した。標的遺伝子の中には欠損マウスにおいては生殖系列以外の器官発生異常による胚性致死または生後致死をきたす遺伝子も含まれているが、それら遺伝子のノックアウトES細胞株は正常に樹立でき、始原生殖細胞への誘導にも異常は観察されなかった。これは胚性致死により表現型解析が難しかった遺伝子群の生殖系列における機能検証を行うために、*in vitro*誘導系が有用であることを示す結果である。遺伝子改変ES細胞株から誘導した始原生殖細胞を用いて卵母細胞誘導を行い、Stella-ECFPを指標に卵母細胞の形成および成長を観察したところ、標的遺伝子群の中には、欠損させると卵形成に顕著な異常をきたす遺伝子が含まれていることが明らかになった。培養系における卵母細胞の顕著な喪失は培養6~13日目(マウスにおける妊娠中期から出生直前にあたる胎齢11.5~18.5日に相当)にて起きていたため、培養5、7、9日目にて細胞を回収して遺伝子発現解析を行った。遺伝子破壊によって変動のあった遺伝子群はクロマチン制御、転写後RNA制御、レトロトランスポゾン制御、減数分裂機構の制御、タンパク質の維持機構などのプロセスに関与することが明らかになった。顕著な卵形成異常が確認された新規遺伝子群に対しては、新たな抗体の作製、3xFLAG-HAタグを挿入したES細胞株の作製を行い、ChIP-seqやIP-Mass Specなどを通した更なる分子機序の解明を進めている。また、遺伝子破壊した標的遺伝子群の中には、二次卵胞の形成までには顕著な表現型を示さない遺伝子も見つかったが、母型エピゲノムの

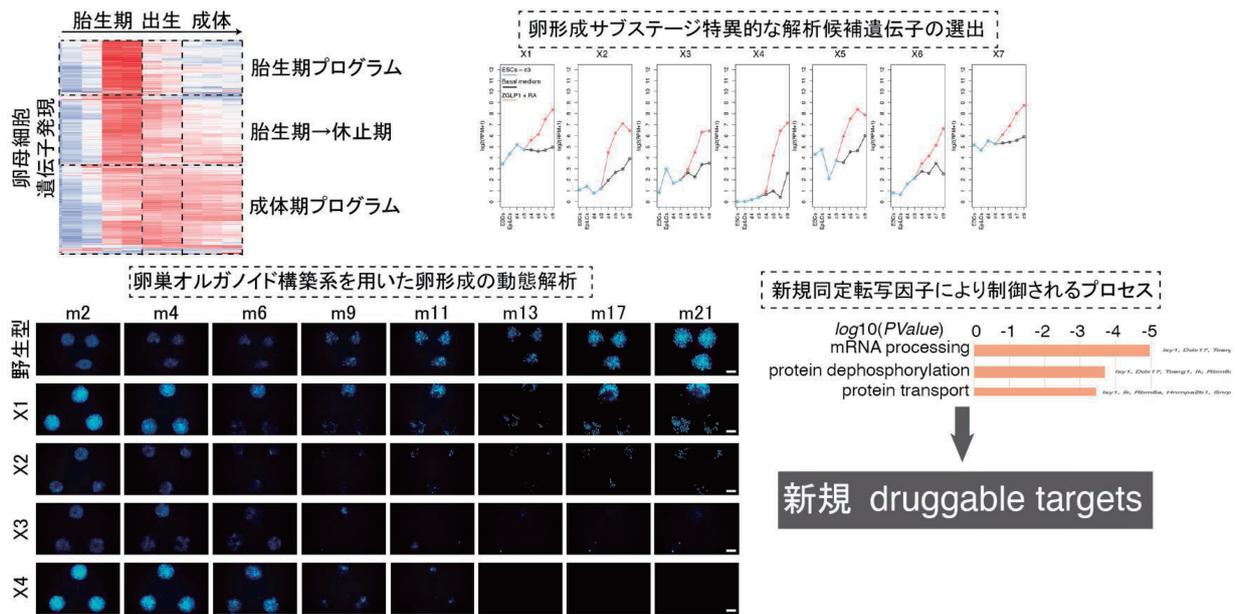
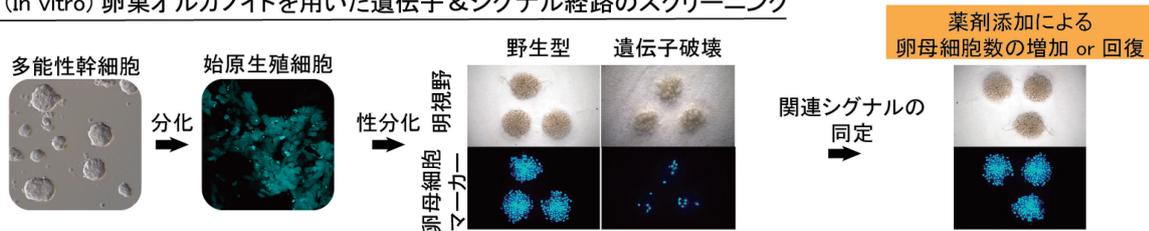


図1 卵巣オルガノイドを用いた卵形成必須遺伝子のスクリーニング

(In vitro) 卵巣オルガノイドを用いた遺伝子 & シグナル経路のスクリーニング



(In vivo) 生体マウスを用いた妊孕性延長・回復の検証



図2 卵巣オルガノイドを用いた妊孕性拡張創薬への道筋

構築など、卵形成自体には必須でなくとも次世代個体の正常な発生に必須のプロセスに関わっている可能性もあるため、それら遺伝子群に関しては、母型インプリントの獲得、卵子成熟、胚盤胞発生、個体発生、胎盤形成、などに着目して解析を進めている。

考察

*In vitro* 卵子誘導系を用いて行った機能スクリーニングによって、(i) 性決定後の生殖細胞の早期喪失、(ii) 減数分裂進行の異常、(iii) 原始卵胞形成の阻害、

(iv) 卵母細胞数の増減を制御する卵形成必須遺伝子を新たに同定することができた。新規遺伝子の多くがZGLP1によって直接制御されることから、ZGLP1による雌性性決定直後から卵形成を構成する複数の機能モジュール（減数分裂期相同組換え形成、細胞周期、品質管理チェックポイント、レトロトランスポゾン制御、卵胞形成・成長、母型エピゲノム構築）が連動して活性化されていることを示唆している。現在、複数の遺伝子に関してはコンディショナルノックアウトマウスを作製中であり、生理的な他臓器と

の連関の中での卵形成制御における役割を明らかにすることで、胎児期から続く卵母細胞の数的制御の理解を深める。また、いくつかのシグナル経路に対してはドラッグリポジショニングのために構築されたFDA承認済み化合物ライブラリに含まれる経路も存在し、経路への摂動による卵母細胞数の拡張可能性が期待できる。本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました神澤医学研究振興財団に厚く御礼申し上げます。

#### 引用文献

1. Nagaoka S.I., Nakaki F., Miyauchi H., et al., ZGLP1 is a

determinant for the oogenic fate in mice. *Science*. 2020. 367, 1089.

2. Ruth K.S., Day F.R., Hussain J., et al., Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing. *Nature*. 2021. 596, 393-397

3. Nakamura T., Yabuta Y., Okamoto I., et al., SC3-seq: a method for highly parallel and quantitative measurement of single-cell gene expression. *Nucleic Acids Research*. 2015. 43, issue 9, Page e60.

4. Hikabe O., Hamazaki N., Nagamatsu G., et al. Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line. *Nature*. 2016. 539, 299-303.

#### Abstract

The oocyte provides the foundation for a totipotent zygote and ensures the inheritance of genetic and epigenetic information to successive generations, but how the finite source of the oocyte pool is established is poorly understood. Reconstitution of oogenic processes *in vitro* from pluripotent stem cells provides a versatile experimental platform for refining our understanding of oogenesis. In the current project, I used the *in vitro* system to screen for genes governing the embryonic oocyte development and searched for the possibility of using the acquired knowledge to establish the drug discovery scheme for fertility enhancement. With the establishment of CRISPR-mediated gene knockout ES cell lines and the subsequent *in vitro* oogenesis culture, I analyzed the effects of disrupting newly identified oogenic genes. Based on the gene expression analysis and the phenotypes observed, the new genes appear to regulate oogenesis in six key categories: (i) the formation of homologous recombination during meiotic prophase, (ii) retrotransposon repression, (iii) transcription and chromatin modification, (iv) RNA structural modification, (v) folliculogenesis, and (vi) DNA methylation. Some signaling pathways regulated by the newly identified genes are covered in FDA-approved drug repositioning chemical library, and thus the results offer interesting opportunities for drug intervention scheme to regulate the oocyte number. In future, I will perform *in vivo* analysis of several gene knockout mice and further elucidate the gene functions under the physiological conditions and test out the possibility of drug intervention for fertility enhancement.