

平成30年6月12日現在

機関番号：12102

研究種目：国際共同研究加速基金（国際活動支援班）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21736

研究課題名（和文）世界最先端の解析システムの構築による配偶子産生研究の国際展開

研究課題名（英文）International joint research on gamete formation through the cutting-edge analysis system

研究代表者

小林 悟（Kobayashi, Satoru）

筑波大学・生命領域学際研究センター・教授

研究者番号：90225508

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 27,000,000円

研究成果の概要（和文）： 始原生殖細胞（PGC）や配偶子幹細胞（GSC）に焦点を当て、配偶子産生システムの制御機構を明らかにすることを目的とする新学術領域研究（研究領域提案型）「動物における配偶子産生システムの制御」（平成25-29年度）で得られた成果を基盤にして、国際共同研究を展開することで、1）精子形成過程のin vitro ライブイメージング・システムの構築、2）精子形成過程におけるエピジェネティック制御の解析手法の開発、3）国際シンポジウム等の開催を行うことができた。本研究により、海外研究者との連携や共同研究を推進し、国際的に注目される研究者コミュニティを創生することができた。

研究成果の概要（英文）： International joint research was performed, based on the research supported by Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovation Area "Mechanisms regulating gamete formation in animals", which aimed to find the regulatory mechanisms of primordial germ cell (PGC) formation and gamete stem cell (GSC) function in animals. This international joint research consisted of constructing an in vitro live-imaging system for spermatogenesis, developing the method to analyze epigenetic regulation of spermatogenesis, and encouraging and supporting tight interaction with oversea researchers through international meetings. This research grant enabled us to establish a novel world-leading research community.

研究分野：発生生物学

キーワード：配偶子産生 配偶子幹細胞 精子形成

1. 研究開始当初の背景

平成 25-29 年度 新学術領域研究（研究領域提案型）「動物における配偶子産生システムの制御」の前半期間において、以下に示す成果が得られた。

- ・マイクロ流体デバイスを用いることで数ヶ月間という極めて長い期間にわたって継続して精子を作り続けるマウス精巣の器官培養法を開発した。

- ・精子幹細胞と不可逆的に分化を開始した前駆細胞の間で、ゲノムのエピジェネティック状態が大きく変化することを発見し、これによって分化の可逆性と不可逆性が説明出来ること(エピジェネティックチェックポイントの存在)を示した。

- ・PGC から成熟卵を産生する新規 *in vitro* 系を構築し、仔マウスを誕生させることに世界で初めて成功した。

- ・*in vitro* において、マウス多能性幹細胞(ES細胞)を出発材料とし、PGC を経て卵子を産生し、それに由来する受精卵から再び ES 細胞を樹立することに成功した。

以上の成果は、世界的に極めてユニークであり、当該分野の研究に強いインパクトを持つ。そこで、これら成果を基盤として、世界トップの海外研究者と国際共同研究を推進する。

2. 研究の目的

上記のように、本領域において、精子形成や卵形成を *in vitro* で再現することに成功している。これは、世界に誇るべきユニークな成果である。これを基盤としたライブイメージングなどの解析により配偶子形成のダイナミクスを解析することを国際共同研究の目標とする。これにより、領域の研究レベルを向上させ、国際的プレゼンスを高め、将来にわたる我が国の学術水準を向上させることができる。以下に本研究の具体的な目標を記す。付した番号は、方法、成果の項の番号と対応する。

- (1) 培養下で精子形成および卵形成の過程を超長期間(週～月単位)ライブイメージングし、観測結果を数理解析や画像解析することで配偶子形成のダイナミクスを解明する。この国際共同研究グループを求心力に、国際ネットワークが構築される。

- (2) 本領域の強化すべき点として、エピジェネティック制御が指摘されている。そこで、細胞の分化制御などゲノムの高次機能につ

ながる新しい解析手法を、国際共同研究として導入する。また、領域内で得られる研究成果を国際共同研究として発展させる。

(3) 若手支援・研究支援

国際活動を通して、若手研究者の国際的に通用する研究力、ディスカッション力、コミュニケーション力を養う。シニア研究者は、国際共同研究チームをマネジメントし国際コミュニティをリードする力を養う。さらに、国際共同研究にかかる研究のサポートを行う。

3. 研究の方法

海外研究者との研究打ち合わせ、会議、招聘、さらに本領域の研究者の派遣により下記の諸点を実現する。

- (1) 精子形成および卵形成の過程を超長期間(週～月単位)ライブイメージングし、観測結果を数理解析や画像解析するという新規システムを開発する。

- (2) エピジェネティック制御など本領域が一層発展するために強化すべき課題に関して、海外で先行している優れた研究手法を導入する。

また、領域内で進行している他の国際水準の研究の一層の発展のために、国際共同研究を推進する。

- (3) 領域の研究者の海外派遣、海外研究者の招聘等により、国際的に活躍できる研究者を育成するとともに、国際共同研究にかかる費用をサポートする。

4. 研究成果

年度ごとの成果を以下に記す。

平成 27 年度

- (1) これまでに、本領域において、精子形成や卵形成を *in vitro* で再現することに成功している。これを基盤としたライブイメージングにより、配偶子形成のダイナミクスを解析することを国際共同研究の目標とする。この目標を達成するために、理論物理学、数理解析生物学の世界的リーダーであるイギリスの海外研究者との会議を国内で開催するとともに、本領域の研究者が共同研究先へ渡航し入念な研究打ち合わせを行い、解析システムの構築を行った。

- (2) エピジェネティック制御などゲノムの高次機能制御につながる新しい解析手法を有する海外研究者との共同研究を推進する

ため、ドイツの海外研究者と会議、およびスイスの海外研究者と国内で研究打ち合わせをおこない、国際共同研究体制を整えた。

(3) 国際的に通用する若手研究者の育成支援として、若手研究者を海外研究者の研究室に派遣し共同研究の打ち合わせを行った。また、国際共同研究の基盤となる領域内における研究推進支援として、次世代シーケンサーを用いた解析のサポートも計6件行った。

平成28年度

(1) ライブイメージングに基づく精子幹細胞の動態の数理生物学的解析(イギリス)、その成果をヒトの精子幹細胞の挙動の解析に応用する試み(イギリス、デンマーク)、さらに、新たに開発された実験系を用いた生殖細胞の動態解析(ドイツ)に関する共同研究を進めた。また、共同研究の基盤となる技術開発として、器官培養ライブイメージングシステムの開発を、本研究分担者3グループが共同して推進した。

(2) 精子幹細胞動態のエピジェネティック制御の解析などに関し、研究者が海外に渡航し(スイス、イギリス)、共同研究を行った。さらに、シロサイの種の保存の目的で、シロサイにおいてiPSを作成し、PGC様細胞に分化させる国際共同研究を遂行した(ドイツ)。

(3) 海外の研究者を招聘、あるいは本領域の若手研究者が海外に渡航し、綿密な研究打ち合わせを行った。国際共同研究の推進の基盤となる研究の支援として、次世代シーケンサーを用いた解析のサポートも5件行った。

平成29年度

(1) ライブイメージングに基づく精子幹細胞の動態の数理生物学的解析(イギリス)、その成果をヒトの精子幹細胞の挙動の解析に応用する試み(イギリス)。さらに、本年度に新たに開発された細胞系譜解析系を用いた生殖細胞の動態解析に関する共同研究(ドイツ)を推進した。

(2) 精子幹細胞動態のエピジェネティック制御に関する共同研究(イギリス)を行った。さらに、絶滅危惧種であるシロサイを保全する目的で、シロサイiPSおよびミナミシロサイとキタシロサイのハイブリッドES細胞を作成し、それをPGC様細胞に分化させる国際共同研究(ドイツ)を継続して遂行した。

(3) 本領域の研究者が海外共同研究機関を訪問したり、海外の研究者を招聘するなどにより、データの共有、情報交換、および詳細な議論を行った。また、国際共同研究推進の基盤となる次世代シーケンサーを用いた解析の支援を7件行った。

平成29年度は本領域の最終年度にあたり、林(本研究分担者)がオーガナイザーとして、国際研究集会を開催した(7月26-27日、九州大学)。国際的に本領域を牽引する研究者を招聘し、本領域の研究成果を国際的に発信するとともに、本研究分野の今後の方向性を議論した。また、プラナリアの配偶子産生制御に関して、小林一也(本領域の公募研究代表者)がオーガナイザーとなり、国際研究集会を開催した(3月29日、弘前大学)。動物種横断的な配偶子産生システムについて議論を深め、国際共同研究に発展させつつある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件) (全て査読あり)

1. Fukunaga H, Kaminaga K, Sato T, Usami N, Watanabe R, Butterworth KT, Ogawa T, Yokoya A, Prise KM. Application of an ex vivo tissue model to investigate radiobiological effects on spermatogenesis. *Radiat Res.*, 189, 661-667 (2018). doi: 10.1667/RR14957.1.
2. Sanjo H, Komeya M, Sato T, Abe T, Katagiri K, Yamanaka H, Ino Y, Arakawa N, Hirano H, Yao T, Asayama Y, Matsuhisa A, Yao M, Ogawa T. In vitro mouse spermatogenesis with an organ culture method in chemically defined medium. *Plos One*, 13, 1-13 (2018). doi.org/10.1371/journal.pone.0192884
3. Komeya M, Hayashi K, Nakamura H, Yamanaka H, Sanjo H, Kojima K, Sato T, Yao M, Kimura H, Fujii T, Ogawa T. Pumpless microfluidic system driven by hydrostatic pressure induces and maintains mouse spermatogenesis in vitro. *Sci. Rep.* 7, 1-8 (2017). doi:10.1038/s41598-017-15799-3
4. Hayashi K, Hikabe O, Obata Y, Hirao Y. Reconstitution of mouse oogenesis in a dish from pluripotent stem cells. *Nat. Protocol*, 12, 1733~1744 (2017). doi: 10.1038/nprot.2017.070
5. Miyauchi H, Ohta H, Nagaoka S, Nakaki F, Sasaki K, Hayashi K, Yabuta Y, Nakamura T, Yamamoto T, Saitou M. *EMBO J.*, 36, 3100~3119 (2017). doi: 10.15252/embj.201796875
6. Nagamatsu G, Hayashi K. Stem cells, in vitro gametogenesis and male fertility. *Reproduction*, 154, F79-F91 (2017). doi: 10.1530/REP-17-0510
7. Shawki H H., Oishi H, Usui T, Kitadate Y, Basha W A, Abdellatif A M,

- Hasegawa K, Okada R, Mochida K, El-Shemy H A, Muratani M, Ogura A, Yoshida S, Takahashi S. MAFB is dispensable for the fetal testis morphogenesis and the maintenance of spermatogenesis in adult mice. *Plos One*, 13, e0190800 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190800>
8. Saragusty J, Diecke S, Drukker M, Durrant B, Friedrich Ben-Nun I, Galli C, Goritz F, Hayashi K, Hermes R, Holtze S, Johnson S, Lazzari G, Loi P, Loring JF, Okita K, Renfree MB, Seet S, Voracek T, Stejskal J, Ryder OA, Hildebrandt TB. Rewinding the process of mammalian extinction. *Zoo Biology*, 35, 280-292 (2016). doi: 10.1002/zoo.21284

[学会発表] (計 51 件)

1. Katsuhiko Hayashi 「Development of a model culture system to produce eggs in vitro」 KEY Forum 2018 (招待講演) (2018)
2. Katsuhiko Hayashi 「In vitro reconstitution of oogenesis in the mouse: how to establish the culture system, mostly empirical」 Asia-Pacific Bioinformatics Conference(招待講演) (2018)
3. Y Kobayashi, S Tomizawa, M Ono, K Ohbo 「Role of a mammalian histone H3K4me3 methyltransferase Kmt2b for spermatogonial stem cell differentiation and migration」 第 123 回日本解剖学会総会全国学術集会 (2018)
4. S Tomizawa, Y Kobayashi, T Shirakawa, I Hoshi, K Nakajima, H Royo, AHFM Peters, K Anastassiadis, AF Stewart, K Ohbo 「Role and priming activity of Kmt2b for the spermatogonial stem cell epigenome」 第 123 回日本解剖学会総会全国学術集会 (2018)
5. 尾野道男、小林裕貴、富澤信一、大保和之「Kmt2b(H3K4 メチル化酵素)遺伝子欠損マウスにおける精細管の微細形態」 第 123 回日本解剖学会総会全国学術集会 (2018)
6. Shosei Yoshida 「Dynamical regulation of spermatogenic stem cells in homeostasis and after transplantation」 CDB Sympojium 2018 Dynamic Homeostasis From Development to Aging (招待講演) (2018)
7. 吉田松生 「精子幹細胞の謎に挑む」 日本生殖発生医学会第 13 回学術集会 (招待講演) (2018)
8. 吉田松生 「マウス精子幹細胞の組織内挙動の解明」 生物学技術研究会 (招待講演) (2018)
9. 吉田松生 「精子形成を支える幹細胞のリアルな姿とその制御メカニズム」 新学術領域先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 2017 (招待講演) (2018)
10. 吉田松生 「マウス精子幹細胞の動態と制御」 第 22 回日本生殖内分泌学会学術集会(招待講演) (2017)
11. 吉田松生 「精子幹細胞から生殖細胞の諸問題に挑戦する」 認識と形成 2017 (2017)
12. Shosei Yoshida 「Population dynamics of sperm stem cells: cell fate decision in an open niche」 IRCMS mini-symposium 2 Cell Fate in Development (招待講演) (2017)
13. 吉田松生 「組織恒常性を支える幹細胞の動的不均一性をマウス精子形成に学ぶ」 日本生物物理学会第 55 回年会シンポジウム「動的不均一性がもたらす多細胞社会の秩序形成」(招待講演) (2017)
14. Shosei Yoshida 「Hierarchy and microenvironmental control of mouse spermatogenic stem cells in vivo」 The International Research Symposium on Regulation of Germ Cell Development in vivo and in vitro (招待講演) (2017)
15. M Tokue, S Yoshida 「Cell-intrinsic mechanism underlies the SSC fate selection between differentiation and self-renewal in an open niche environment of seminiferous tubules」 50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (国際学会) (2017)
16. Shosei Yoshida 「Dynamics of Spermatogenic Stem Cells in the Open Niche Environment」 Germinal Stem Cell Biology, Gordon Research Conference (招待講演) (2017)
17. Shosei Yoshida 「Competition for FGFs yields robust homeostasis in the density of mouse spermatogenic stem cells」 Advances in Stem Cells and Regenerative Medicine, EMBO Conference (招待講演) (2017)
18. 吉田松生 「マウス精子形成の時空間ダイナミクスとそれを支える幹細胞ホメオスタシス」 MIMS 共同研究集会 (招待講演) (2017)
19. Y Kitadate, S Yoshida 「Density homeostasis of spermatogenic stem cells through competition for FGFs」 The annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (2017)
20. Y Nakamura, Y Kon and S Yoshida 「Homing efficiency and behavior of mouse spermatogenic stem cells following transplantation」 The annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (2017)
21. Shosei Yoshida 「Stem cell dynamics and its regulation underlying the persistent mouse spermatogenesis」 The annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (招待講演) (2017)

22. S Tomizawa, Y Kobayashi, T Shirakawa, I Hoshi, K Nakajima, H Royo, AHFM Peters, K Anastassiadis, AF Stewart, K Ohbo 「Kmt2b is required for spermatogenesis through both bivalent and monovalent priming of the spermatogonial stem cell epigenome」 EMBO conference: Nuclear structure and dynamics L'Isle sur la Sorgue (2017)
 23. 小川毅彦 「精巣組織器官培養の可能性」 第 105 回日本泌尿器科学会総会(招待講演)(2017)
 24. Takehiko Ogawa 「Production of Gamete in Testis Organ Culture」 Germinal Stem Cell Biology Gordon Research Conference(招待講演)(2017)
 25. 小川毅彦 「精巣組織培養の進歩と課題」 第 39 回中部生殖医学会学術集会(招待講演)(2017)
 26. 小川毅彦 「精巣組織培養の工夫と可能性」 第 48 回精子研究会(招待講演)(2017)
 27. 小川毅彦 「精巣器官培養法を用いた精子形成」 生命科学系学会合同年次大会 (2017)
 28. Katsuhiko Hayashi 「Molecular mechanisms underlying differentiation from primordial germ cells to oocytes」 Japanese Society of Developmental Biologists (2017)
 29. 林 克彦 「精巣組織培養の進歩と課題」 第 15 回幹細胞シンポジウム(招待講演)(2017)
 30. Katsuhiko Hayashi 「Functional eggs created in a dish from mouse pluripotent stem cells」 ISSCR (招待講演)(2017)
 31. Katsuhiko Hayashi 「Validation of artificial oocytes from stem cells」 Germinal Stem Cell Biology Gordon Research Conference(招待講演)(2017)
 32. Katsuhiko Hayashi 「Reconstitution as a tool for better understanding of germ cell development」 Society for the Study of Reproduction (招待講演)(2017)
 33. 林 克彦 「卵母細胞の形成機構の解明と再生」 第 35 回日本受精着床学会 (招待講演)(2017)
 34. Katsuhiko Hayashi 「Understanding of PGC-oocyte differentiation using in vitro reconstitution system」 World Congress of Reproductive Biology (招待講演)(2017)
 35. 林 克彦 「皮膚からの卵子作製 マウス知見をもとに」 日本 IVF 学会 (招待講演)(2017)
 36. 林 克彦 「卵子の再生技術から見えるもの」 第 62 回日本生殖医学会学術集会 (招待講演)(2017)
 37. Katsuhiko Hayashi 「Gamete reconstitution in vitro」 Foundation for Reproductive Medicine (招待講演)(2017)
 38. 林 克彦 「卵母細胞の再構築系で見えてくるもの」 生命科学系学会合同年次大会 (2017)
 39. Katsuhiko Hayashi 「Development of a model culture system to produce eggs in vitro」 Ovarian Club X (招待講演)(2017)
 40. 吉田松生 「精子形成幹細胞の集団動態とそれを支える“開放型”ニッチ」 千里ライフサイエンスセミナー[組織を支える幹細胞と微小環境(ニッチ)] (招待講演)(2017)
 41. 吉田松生 「マウス精巣における精子幹細胞の動態とその制御機構」 第 6 回 Multidisciplinary meeting on atherosclerosis (招待講演)(2017)
 42. Katsuhiko Hayashi 「Artificial oocyte production from pluripotent stem cells in mice.」 Epigenetic Penetrance of Reproductive Technologies (招待講演)(2016)
 43. Katsuhiko Hayashi 「Artificial gametes derived from pluripotent stem cells」 AAAP Animal Science Congress (招待講演)(2016)
 44. Katsuhiko Hayashi 「Derivation of Germ Cells from Stem Cells」 IFFS2016 (招待講演)(2016)
 45. Katsuhiko Hayashi 「A model of functional egg production in a dish」 KOSAR (招待講演)(2016)
 46. 北舘祐 「精子幹細胞の数を決める機構の解明」 第 61 回日本生殖医学会学術講演会 (招待講演)(2016)
 47. Shosei Yoshida 「In vivo dynamics of mouse spermatogenic stem cells and its microenvironmental control」 The annual conference of Korean Society of Molecular Cell Biology, COEX (招待講演)(2016)
 48. Shosei Yoshida 「Density regulation of spermatogenic stem cells by FGFs in the mouse seminiferous tubules」 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Germ Cells, Cold Spring Harbor (招待講演)(2016)
 49. 北舘祐、吉田松生 「精子幹細胞の数を決める仕組み」 認識と形成 2016 (2016)
 50. Shosei Yoshida 「Density regulation of spermatogenic stem cells in the mouse testis」 The Stem Cell Niche - Development and Disease (招待講演)(2017)
 51. Y. Kitadate and S. Yoshida 「Density control of spermatogenic stem cells by FGF5」 19th European Testis Workshop (2016)
- 〔図書〕 (計 2 件)
分担著書
1. Yoshida S. Regulatory mechanism of spermatogenic stem cells in mice: their dynamic and context-dependent behavior (Chapter 4) In **Reproductive & Developmental Strategies**, edited by Kobayashi K, Kitano T, Iwao Y, Kondo M. Springer (2018).

2. Ogawa T. In vitro differentiation of Spermatogonia (Chapter 13). In *The Biology of Mammalian Spermatogonia*, edited by Oatley J, Griswold M. Springer (2017).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

動物における配偶子産生システムの制御

<http://www.nibb.ac.jp/adventures-in-germline-wonderland/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 悟 (SATORU KOBAYASHI)
筑波大学・生命領域学際研究センター・教授
研究者番号：90225508

(2) 研究分担者

小川 毅彦 (TAKEHIKO OGAWA)
横浜市立大学・生命医科学研究科・教授
研究者番号：50254222

吉田 松生 (SHOSEI YOSHIDA)
基礎生物学研究所・生殖細胞研究部門・教授
研究者番号：60294138

林 克彦 (KATSUHIKO HAYASHI)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号：20287486

大保 和之 (KAZUYUKI OHBO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：70250751

(3) 連携研究者

松居 靖久 (YASUHISA MATSUI)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：40241575

吉崎 悟朗 (GORO YOSHIZAKI)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：70281003

尾畑 やよい (YAYOI OBATA)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：70312907