

10) Matalliotakis IM, Cakmak H, Mahutte N, Fragouli Y, Arici A, Sakkas D. :Women with advanced-stage endometriosis and previous surgery respond less well to gonadotropin stimulation, but have similar IVF implantation and delivery rates compared with women with tubal factor infertility. *Fertil Steril.* 2007, 88:1568-1572.

11) Coccia ME, Rizzello F, Camilli F, Bracco GL, Scarselli G. Endometriosis and infertility Surgery and ART: An integrated approach for successful management. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008 Feb.

12) Nakagawa K, Ohgi S, Kojima R, Sugawara K, Ito M, Horikawa T, Irahara M, Saito H. :Impact of laparoscopic cystectomy on fecundity of infertility patients with ovarian endometrioma. *J Obstet Gynaecol Res.* 2007, 33:671-676.

13) Garrido N, Navarro J, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis. *Hum Reprod Update.* 2000, 6:67-74.

14) Arici A, Oral E, Bukulmez O, Duleba A, Olive DL, Jones EE. The effect of endometriosis on implantation: results from the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril.* 1996, 65:603-607.

15) Carlberg M, Nejaty J, Fröysa B, Guan Y, Söder O, Bergqvist A. Elevated expression of tumour necrosis factor alpha in cultured granulosa cells from women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2000, 15:1250-1255.

16) Bergendal A, Naffah S, Nagy C, Bergqvist A, Sjöblom P, Hillensjö T. Outcome of IVF in patients with endometriosis in comparison with tubal-factor infertility. *J Assist Reprod Genet.* 1998, 15:530-534.

17) Olivennes F, Feldberg D, Liu HC, Cohen J, Moy F, Rosenwaks Z. Endometriosis: a stage by stage analysis—the role of in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1995, 64:392-398.

18) 柳田 薫, 藤倉洋子: 不妊・生殖医療のインフォームド・コンセント 体外受精・顕微授精. 産婦人科の実際: 54: 1805-1816, 2005

19) Ozmen B, Diedrich K, Al-Hasani S: Hydrosalpinx and IVF: assessment of treatments implemented prior to IVF. *Reprod Biomed Online.* 14: 235-241, 2007

20) Hart R, Hickey M, Maouris P, Buckett W, Garry R. :Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata: a Cochrane

Review. *Hum Reprod.* 2005, 20:3000-3007.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yanagida K, Fujikura Y, Katayose H, The present status of artificial oocyte activation in assisted reproductive technology. *Reprod. Med. Biol.* 2008, 7:133-142.

柳田薫, 猪鼻達仁, 藤倉洋子, 片寄治男, エキスパートに学ぶ体外受精実践講座, 顕微授精, 臨床婦人科産科. 2008, 62:951-966.

柳田薫, 体外受精・顕微授精, 日本医師会雑誌. 2008, 137: 31-34.

柳田薫, 高田智美, 顕微授精での受精障害, 不妊症—臨床と研究の最前線, 医学のあゆみ. 2008, 別冊: 85-89.

柳田薫, ICSIの位置づけ, 日産婦誌. 2008, 60:377-381.

片寄治男, 岩本晃明, 柳田薫, ARTにおける受精・発生障害, 産科と婦人科. 2008, 75: 1242-1250.

Yazawa H, Yanagida K, Sato A, Human round spermatids from azoospermic men exhibit oocyte-activation and Ca²⁺ oscillation-inducing activities. *Zygote.* 2007, 15: 337-346

柳田薫, 藤倉陽子, 片寄治男, 岩本晃明, 不妊因子からみたARTの成績. へるす出版. 2007, 33: 825-829.

柳田薫, 高田智美, 顕微授精での受精障害. 医学の歩み. 2007, 223: 85-89.

柳田薫, 片寄治男, 藤倉洋子, 岩本晃明, 顕微授精 産婦人科診療Data Book. 産婦人科の実際. 2007, 56: 1639-1644.

柳田薫, 不妊治療と遺伝子異常ARTで認識すべき遺伝子異常. 臨床婦人科産科. 2007, 61: 1482-1487.

片寄治男, 高山智子, 菅沼 亮太, 林章太郎, 柳田薫, 佐藤章, 精子核の質的評価と体外胚発生能.

J.Mamm.Ova.Res. 2007, 24: 153-160

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

症例	年齢	r-ASRM 分類	主病変	ARTの 実施	妊娠 の有 無	腹腔鏡手 術後妊娠 までの経 過月数	腹腔鏡後 の経過月 数(再妊 娠例)
1	39	4	chocolate cyst	IVF	-	-	44
2	37	3	chocolate cyst	IVF	-	-	39
3	26	3	chocolate cyst	IVF	+	12	-
4	30	3	chocolate cyst	IVF	+	9	-
5	29	3	chocolate cyst	-	-	-	36
6	30	3	chocolate cyst	-	-	-	35
7	32	3	chocolate cyst	-	-	-	30
8	35	2	膜嚢内変	IVF	-	-	-
9	32	3	chocolate cyst	-	-	-	29
10	33	4	chocolate cyst	IVF	-	-	-
11	35	2	卵巣周囲癒着	-	-	-	18
12	35	2	膜嚢内変	-	-	-	16
13	39	4	chocolate cyst	IVF	+	10	-
14	32	3	chocolate cyst	-	-	-	14
15	36	4	chocolate cyst	-	-	-	11
16	32	3	chocolate cyst	-	-	-	10
17	27	4	chocolate cyst	-	-	-	8
18	33	3	chocolate cyst	-	-	-	6
19	37	3	chocolate cyst	-	-	-	5
20	39	4	chocolate cyst	-	-	-	3

表1 腹腔鏡手術で子宮内膜症を認めた20例の臨床的背景

症 例 番 号	ART の 種 類	r-ASRM 分 類	COS ¹⁾	採 卵 数	成 熟 卵 数	受 精 卵 数	day3 胚 数	移 植 胚 数	妊 娠 の 有 無	良 好 胚 数 (day3)	良 好 胚 ⁴⁾ の 割 合 (day3) %
1	IVF	4	clomid	2	2	2	2	2	-	1	50
1	IVF	4	long ²⁾	2	2	2	2	2	-	1	50
2	IVF	3	long	3	3	2	2	2	-	0	0
2	IVF	3	Antagonist ³⁾	4	4	0	0	0	-	0	0
3	IVF	3	long	7	6	6	6	2	妊 娠	5	83
3	IVF	3	clomid	1	1	1	1	1	-	0	0
4	IVF	3	clomid	4	4	4	4	1	妊 娠	1	25
8	IVF	2	long	4	2	2	1	1	-	1	100
10	IVF	4	long	1	1	1	1	1	-	1	100
10	IVF	4	clomid	1	1	1	1	1	-	0	0
13	IVF	4	long	2	1	1	1	1	妊 娠	1	100

表2 腹腔鏡手術後の子宮内膜症例でIVFを実施したケースの結果

1) COS: controlled ovarian stimulation

2) long: long protocol

3) antagonist: antagonist 法

4) 7-9細胞で細胞質の断片化の割合が10%以下の胚を形態良好胚とした。

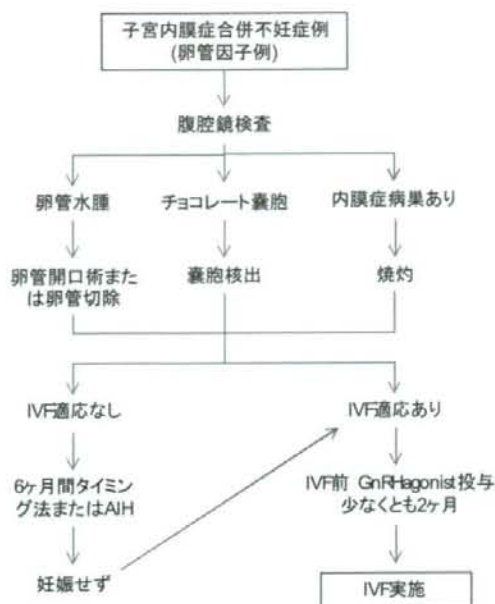


図1 子宮内膜症合併不妊症例の卵管因子での治療指針

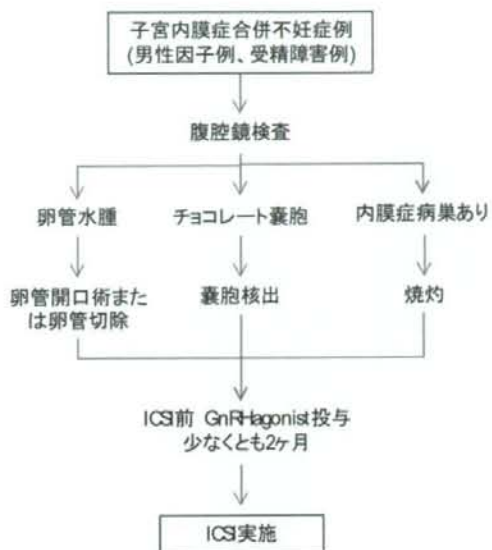


図2 子宮内膜症合併不妊症例の男性因子・受精障害例での治療指針

卵細胞の質に係わる分子機構の解明に関する研究

研究分担者 岡部 勝 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨

平成19年度は染色体異常の仔が産まれたり、産仔数が少なかったりする表現形を持つXY型性転換雌マウスの卵子を老齢卵子モデルとして、卵細胞の「質」について研究を行った。平成20年度は受精時に卵子と密接に関係する因子として、精子側からのアプローチを我々が同定したIZUMOに注目し、IZUMOのN結合型付加糖鎖の役割について明らかにした。

A. 研究目的

我が国において少子化が問題となっているが、生殖研究は不妊の原因を突き止め、解決法を探るために欠かすことができない。平成19年度は不妊の原因の一つに妊娠する女性の高齢化に伴う妊娠率の低下を挙げ、卵細胞の「質」が受精後の発生・分化に影響を与えるのではないかと考え、マウスを材料に研究を行うことにした。直接老齢マウスを使用した実験では材料の調整と実験の円滑な遂行が難しいため、人工的に細胞質に問題があると考えられるマウスの実験系を作出したうえで、卵細胞の質にかかわる分子機構の解明を目指した。

卵子の質の評価は、卵子が成熟し、精子と受精して、個体として発生・誕生するまでが対象になると考えられる。平成20年度は特に受精時の卵子の質に密接に関わる精子側の因子を明らかにしようと試みた。受精は卵子と精子が融合して初めて成立するが、その融合メカニズムはほとんど分かっていない。我々は生体内でさまざまな細胞間相互作用において重要な役割を持つことが知られている糖鎖修飾に着目し、受精時に卵子と精子の相互作用への役割を明らかにすることを目指した。

B. 研究方法

平成19年度は、老齢卵子のモデルとして、XY型卵子を用いて、研究を行った。Y染色体上のSry遺伝子を欠損したY染色体であるY^{tdym1}をもつXY^{tdym1}型のマウスは性分化に異常をきたし雌となる。この性転換マウスは生殖能力を持つがこのXY^{tdym1}型雌マウスから生まれてくる仔にはXO型やXXY型、XYY型と言った性染色体の異常が頻繁にみられることが報告されている。またこのマウスは野生型の雌マウスに比べ産仔数が少ないばかりでなく、生殖期間も短くなると報告されていることから、XY^{tdym1}雌マウスの卵子は老齢卵子に代えて、卵細胞の「質」を研究するための材料として適していると考えた。

XY^{tdym1}雌マウスはX染色体上にGFP遺伝子が挿入されたX^{GFP}トランスジェニックマウスを利用し、これをY^{tdym1}のSry欠損をトランスジェニックSryでレスキューしたマウスと交配させたものを野生型の雌と交配させることによって得た。この方法を用いることにより、目的とするXY型性転換マウスを容易に選別できるように工夫した。また、XY^{tdym1}雌マウ

スから得られる産仔の性染色体の組合せをPCR法で容易に検出できるようにX染色体上の系統間の多型を利用したプライマー設計を行い、性染色体異常の検出に用いた。

マウスの選別が簡便になることから、これまでの報告を再確認するとともに、3週齢で過排卵処理を行ったXY^{tdym1}雌マウスと野生型のXX雌マウスを野生型の雄マウスと交配させ、2細胞期胚を回収して、初期発生の比較解析を行った。

平成20年度は卵子との融合に重要な精子上に存在する分子であるIZUMOに注目して、研究を行った。細胞間の相互作用に重要と言われている糖鎖がIZUMOに付加しているかどうかを知るために、*in silico*で予測される糖鎖付加配列を検索した。実際、精子上のIZUMOに糖鎖が付加しているかどうかを調べるために、グルコシダーゼ処理した後、ウエスタンブロットで分子量の変化を調べた。グルコシダーゼによりタンパク質に付加している糖鎖は外れるので、IZUMOに糖鎖が付加されていれば、野生型に比べ低分子量にバンドがシフトするという手法である。

また、IZUMOにおける糖鎖の役割を調べるために、糖鎖付加配列を欠損したミュータントIZUMOを精巣特異的なカルメジンプロモーターで発現するトランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの遺伝的背景をIzumoノックアウトにすることで、糖鎖修飾をうけないIZUMO精子が作られる。このマウスを用いて交配実験を行い、妊孕性を調べた。さらに、膜透過性のHoechst33342を卵子に封入して、糖鎖欠損IZUMOをもつ精子を媒精し、卵子と融合するかどうかを検討した。

また、IZUMOのモノクローン抗体を作製し、糖鎖の付加がなくなったとき蛋白質質量や分子量に変化が無いかどうかをウエスタンブロッティングによって調べた。

(倫理面への配慮)

マウスを使用する実験であるので倫理面での配慮は動物実験を適正に行っていることに限定することができる。本研究では大阪大学に動物実験計画書を提出し、その審査を経たうえで実験を行っており、倫理的な問題をクリアしている。

C. 研究結果

卵細胞の質を調べる研究で用いたXY^{tdym1}雌マウスはC3H系統の雌とB6系統のコンジュニックのXGFP Y^{tdym1} Sryトランスジェニックマウスから誕生させた。このXY^{tdym1}雌マウスはこれまでの報告と同様にXO型、XXY型、XYY型の性染色体の組合せを持つ仔を生み、産仔数も約半数であった。

3週齢で過排卵処理を行った場合の排卵数はXY^{tdym1}雌とXX雌マウスで著しい違いは認められなかった。しかし、XX雌由来の胚では80%以上が胚盤胞になる培養条件下でXY^{tdym1}雌由来の胚は55%以上が2細胞期で発生を停止し、胚盤胞期まで発生したものは15%未満と低率になることがわかった(図1)。

図.1 XXとXY^{tdym1}雌マウス由来胚の初期発生における発生率の比較

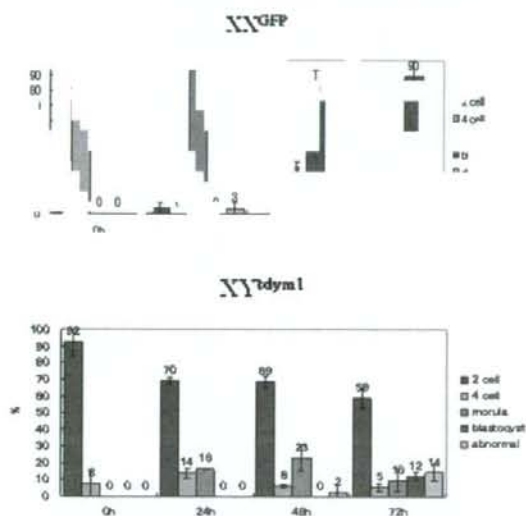
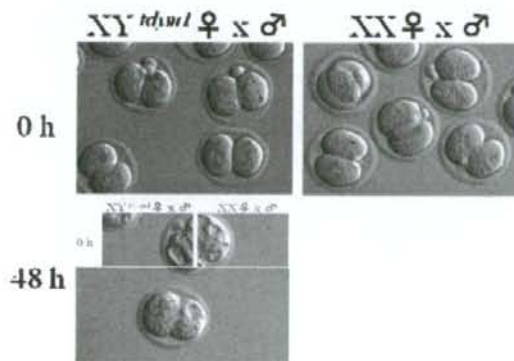


図.2 XY^{tdym1}雌マウス由来胚の脆弱性



精子に存在し卵子との融合に密接にかかわる分子であるIZUMOには4か所のO結合型糖鎖付加配列の存在が予測された。しかし、O結合型グリコシダーゼ処理を行っても、分子量に変化がなかったことから、O結合型糖鎖は付加されていないことが示された。また、免疫グロブリン様ドメイン内には、動

物種間で高度に保存されているN結合型糖鎖付加配列が存在し、N結合型グリコシダーゼ処理によって、分子量が減少し、N結合型糖鎖が付加されていることが明らかになった(図3)。

次に、IZUMOのN結合型糖鎖の役割を調べるために、204番目のアスパラギンをグルタミンに変異させたミュータントを精巣特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、これらマウスをIzumoノックアウトバックグランドに置き換えることで、精子上に存在するIZUMOのN結合型糖鎖を完全に欠失させた(N204Q-IZUMO)。

N204Q-IZUMOの雄からの妊孕性は野性型の約30%であった(図4)。この原因を探るために精子-卵子の融合解析を行ったところ、N204Q-IZUMOの精子はほとんど融合が成立していないことが分かった。

また、モノクローン抗体を用いてN204Q-IZUMOの精子のウエスタンブロット解析を行うと、野性型に比べ有意にタンパク質量が減少していることに加え、30 kDaと35 kDaのフラグメント化したバンドが検出された。

図.3 グリコシダーゼ処理後のIZUMO

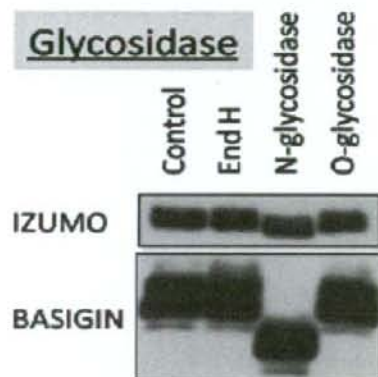
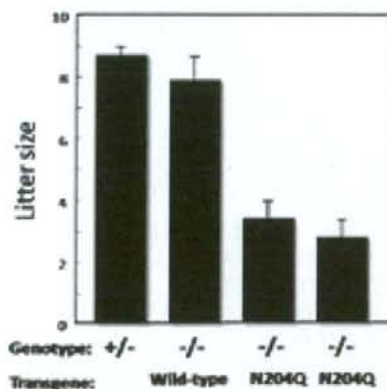


図.4 N204Q-IZUMOの妊孕性への影響



D. 考察

これまで、XY^{AKR}やXY^{TIR} などY染色体以外をB6のコンジェニックにするXY型性転換になり、雌性不妊になるという報告があるが、本研究によりXY^{tdym1}雌マウスにおける、少ない産仔数や産仔の染色体異常といった表現形は遺伝的なバックグラウンドに依存せず、より直接的に性染色体に依存していることが示された。

また、本研究ではXY^{tdym1}雌由来の胚の発生率が著しく悪いということだけでなく、その差が産仔数の差よりも大きいことが示された。このことは過排卵処理によって、強制的に成熟させたXY^{tdym1}卵のほとんどが個体として発生する能力を有していないことを示した。

細胞融合には糖鎖修飾が重要な役割を担っていることが報告されている。卵子との融合に必要な精子側の分子であるIZUMOの糖鎖について調べたところ、N結合型糖鎖が精子上のIZUMOに存在しており、これを欠損させると受精能や融合能に影響することが示された。しかし、糖鎖をなくした精子上のIZUMOは精巣上体尾部において、一部がフラグメント化され、機能するIZUMOの絶対量が減少するために受精能や融合能に影響したと考えられた。すなわち、IZUMOのN結合型糖鎖の役割は精巣上体尾部でIZUMOをプロテアーゼ等から保護し、安定化することであり、膜融合機構に直接関与しているわけではないことが示唆された。

E. 結論

XY^{tdym1}雌マウス由来の卵子について、これまでの報告と同様に系統に関係なくXO型やXXY型、XYY型の産仔が得られることを確認した。また、過排卵処置をしたXY^{tdym1}卵子は受精もでき、2細胞期胚までは野生型と一見区別できない(図2)が、ほとんどは胚盤胞にまで発生できず、卵細胞そのものの「質」は見た目だけの判断では難しいことが分かった。

糖鎖をもたないN204Q-IZUMOの精子の解析により、IZUMOの卵子との膜融合機構に糖鎖修飾は直接関与しているわけではないことが明らかになった。また、糖鎖をもたないIZUMOは精巣上体にて、一部がフラグメント化していたことから、IZUMOのN結合型糖鎖修飾は精巣上体尾部で精子が成熟していく過程で、IZUMOをプロテアーゼ等から保護し、安定化する役割をもつことが明らかになった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

X. Sun, H. Wang, M. Okabe, K. Mackie, P. J. Kingsley, L. Marnett, B. Cravatt and S. K. Dey, Genetic Loss of Faah Compromises Male Fertility in Mice, *Biol Reprod*, 2008, (in press)

N. Inoue, M. Ikawa and M. Okabe, Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(3), (910-4)

R. Yamaguchi, K. Yamagata, H. Hasuwa, E. Inano, M.

Ikawa and M. Okabe, Cd52, known as a major maturation-associated sperm membrane antigen secreted from the epididymis, is not required for fertilization in the mouse, *Genes Cells*, 2008, 13(8), (851-61)

D. Y. Youn, D. H. Lee, M. H. Lim, J. S. Yoon, J. H. Lim, S. E. Jung, C. E. Yeum, C. W. Park, H. J. Youn, J. S. Lee, S. B. Lee, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Tsujimoto and J. H. Lee, Bis deficiency results in early lethality with metabolic deterioration and involution of the spleen and thymus, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 295(6), (E1349-57)

K. Tokuhira, M. Hirose, Y. Miyagawa, A. Tsujimura, S. Irie, A. Isotani, M. Okabe, Y. Toyama, C. Ito, K. Toshimori, K. Takeda, S. Oshio, H. Tainaka, J. Tsuchida, A. Okuyama, Y. Nishimune and H. Tanaka, Meichroacidin containing the membrane occupation and recognition nexus motif is essential for spermatozoa morphogenesis, *J Biol Chem*, 2008, 283(27), (19039-48)

K. Miyado, K. Yoshida, K. Yamagata, K. Sakakibara, M. Okabe, X. Wang, K. Miyamoto, H. Akutsu, T. Kondo, Y. Takahashi, T. Ban, C. Ito, K. Toshimori, A. Nakamura, M. Ito, M. Miyado, E. Mekada and A. Umezawa, The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(35), (12921-6)

S. Kuramochi-Miyagawa, T. Watanabe, K. Gotoh, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Ikawa, N. Asada, K. Kojima, Y. Yamaguchi, T. W. Ijiri, K. Hata, E. Li, Y. Matsuda, T. Kimura, M. Okabe, Y. Sakaki, H. Sasaki and T. Nakano, DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes, *Genes Dev*, 2008, 22(7), (908-17)

M. Ikawa, N. Inoue and M. Okabe, Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals, *Int J Dev Biol*, 2008, 52(5-6), (657-64)

N. Inoue and M. Okabe, Sperm-egg fusion assay in mammals, *Methods Mol Biol*, 2008, 475, (335-45)

T. Sato, M. Kurokawa, Y. Nakashima, T. Ida, T. Takahashi, Y. Fukue, M. Ikawa, M. Okabe, K. Kangawa and M. Kojima, Ghrelin deficiency does not influence feeding performance, *Regul Pept*, 2008, 145(1-3), (7-11)

Y. Ueda, R. Yamaguchi, M. Ikawa, M. Okabe, E. Morii, Y. Maeda and T. Kinoshita, PGAP1 knock-out mice show otocephaly and male infertility, *J Biol Chem*, 2007, 282(42), (30373-80)

H. Umehara, T. Kimura, S. Ohtsuka, T. Nakamura, K. Kitajima, M. Ikawa, M. Okabe, H. Niwa and T. Nakano, Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3, *Stem Cells*, 2007, 25(11), (2705-11)

M. Okabe and J. M. Cummins, Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals, *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(15), (1945-58)

磯谷綾子, 岡部 勝, X-linked GFPマウスを用いた雌雄分別と生殖細胞の動態, 蛋白質 核酸 酵素, 2007, 52(16), (2060-66)

2. 学会発表

岡部 勝, 平成20年度日本生殖医学会中部支部学術集会, 遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム, 名古屋(2008)

岡部 勝, 特定領域研究「性分化機構の解明」(第5回)「生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク

ーク」(第1回)合同領域会議,精子の機能不全にかかわる種々因子とそれらの相互作用, 熊本(2008)

岡部 勝, 第13回日本生殖内分泌学会学術集会, 遺伝子操作動物を通してみる受精のメカニズム, 大阪(2008)

磯谷 綾子、中西 友子、小林 慎、李 知英、中馬新一郎、中辻 憲夫、石野 史敏、岡部 勝 第54回日本実験動物学会総会 雌雄キメラマウス用いた生殖細胞における性分化の解析, 横浜(2007)

Masaru Okabe, Factors Involved in Sperm-Egg Interactions Examined by Gene-manipulated Animals. The 32nd ASA Annual Meeting Tampa, Florida, USA

(2007)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
該当事項なし
2. 実用新案登録
該当事項なし
3. その他
該当事項なし

Ⅲ 研究成果に関する一欄表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
柳田薫	無月経の検査・治療法	鈴木光明	産婦人科診療指針第2版	中外医学社版	東京	2008	380-93
柳田薫	卵細胞質内精子注入法(ICSI)	鈴木光明	産婦人科診療指針第2版	中外医学社版	東京	2008	539-46
阿久津英憲、梅澤明弘	ES細胞を用いた生殖医療	鈴木光明、吉村泰典	産婦人科—専門医にきく最新の臨床	中外医学社版	東京	2007	225-8
井ノ上逸朗	ゲノム科学の臨床へのインパクト—多因子病の遺伝子要因をどの様に考えるべきか		最新医学62巻9月増刊号(別冊)	最新医学者	大阪	2007	140 (2124) -9 (33)
柳田薫	顕微授精	日本生殖医学会	生殖医療ガイドライン2007	金原出版	東京	2007	302-10
吉村泰典、苛原稔、柳田薫	最適な不妊治療の選択指針	日本生殖医学会	生殖医療ガイドライン2007	金原出版	東京	2007	230-32
柳田薫	顕微授精	鈴木光明 吉村泰典	産婦人科専門医に聞く最新の臨床	中外医学出版	東京	2007	181-2
柳田薫、片寄治男、藤倉洋子	ICSIの実際	柴原浩章、森本義晴、京野廣一	臨床不妊症学入門	中外医学出版	東京	2007	213-23

柳田薫	ICSIの基礎研究	柴原浩章、森本義晴、京野廣一	臨床不妊症学入門	中外医出版	東京	2007	28-40
-----	-----------	----------------	----------	-------	----	------	-------

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Chen AE, Egli D, Niakan K, Deng J, Akutsu H, Yamaki M, Cowan C, Fitz-Gerald C, Zhang K, Melton DA, Eggan K.	Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines.	Cell Stem Cell.	4	103-106	2009
Asai S, Asada H, Furuya M, Ishimoto H, Tanaka M, Yoshimura Y.	Pseudoaneurysm of uterine artery after laparoscopic myomectomy.	Fertil Steril.	91	929e1-3	2009
Hirata T., Osuga Y., Fujimoto A., Oishi H., Hiroi H., Fujiwara T., Yano T., Taketani Y.	Conjoined twins in a triplet pregnancy after ICSI and blastocyst transfer: Case report and review of the literature.	Fertil Steril.	91	e9-12	2009
Hasegawa A., Osuga Y., Hirota Y., Hamasaki K., Kodama A., Harada M., Tajima T., Takemura Y., Hirata T., Yoshino O., Koga K., Yano T., Taketani Y.	Tunicamycin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand (TRAIL)-induced apoptosis in endometrial stromal cells.	Hum Reprod.	24	408-14	2009
Hirota Y., Osuga Y., Hasegawa A., Kodama A., Tajima T., Hamasaki K., Koga K., Yoshino O., Hirata T., Harada M., Takemura Y., Yano T., Tsutsumi O., Taketani Y.	IL-1 β stimulates migration and survival of first trimester villous cytotrophoblast cells through endometrial epithelial cell-derived IL-8.	Endocrinology	150	350-6	2009
Fu L., Osuga Y., Yano T., Takemura Y., Morimoto C., Hirota Y., Schally AV., Taketani Y.	Expression and possible implication of GHRH receptor splice variant 1 (SV1) in endometriosis.	Fertil Steril.			(in press)
X. Sun, H. Wang, M. Okabe, K. Mackie, P. J. Kingsley, L. Marnett, B. Cravatt and S. K. Dey	Genetic Loss of Faah Compromises Male Fertility in Mice	Biol Reprod.	80	235-42	2009
Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A, Akutsu H.	Nuclear reprogramming and the control of differentiation in mammalian embryos. Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach.	Reprod Biomed Online	16	41-50	2008
Tanigawa M, Miyamoto K, Kobayashi S, Sato M, Akutsu H, Okabe M, Mekada E, Sakakibara K, Miyado M, Umezawa A, Miyado K.	Possible involvement of CD81 in acrosome reaction of sperm in mice.	Mol Reprod Dev.	75	150-5	2008

Hamatani T, Yamada M, Akutsu H, Kuji N, Mochimaru Y, Takano M, Toyoda M, Miyado K, Umezawa A, Yoshimura Y.	What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes?	Reproduction.	135	581-92	2008
Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A.	The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice.	Proc Natl Acad Sci USA	105	12921-6	2008
Maruyama T, Yoshimura Y.	Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium.	Endocr J.	55	795-810	2008
Masuda H, Okano HJ, Maruyama T, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y.	In vivo imaging in humanized mice.	Curr Top Microbiol Immunol	324	179-96	2008
Ohta K, Maruyama T, Uchida H, Ono M, Nagashima T, Arase T, Kajitani T, Oda H, Morita M, Yoshimura Y.	Glycodelin blocks progression to S phase and inhibits cell growth: a possible progesterone-induced regulator for endometrial epithelial cell growth.	Mol Hum Reprod.	14	17-22	2008
浅田弘法、古谷正敬、西尾浩、升田博隆、内田浩、丸山哲夫、梶谷宇、木挽真慈、吉村泰典	異所性子宮内膜症	産婦人科治療	96	241-7	2008
丸山哲夫、梶谷宇、小田英之、西川明花、荒瀬透、内田浩、浅田弘法、吉村泰典	子宮内膜症関連遺伝子同定のための新しいアプローチ	エンドメトリーシス研究会誌	29	42	2008
OuYang Z., Hirota Y., Osuga Y., Hamasaki K., Hasegawa A., Tajima T., Hirata T., Koga K., Yoshino O., Harada M., Takemura Y., Nose E., Yano T., Taketani Y.	Interleukin-4 stimulates proliferation of endometriotic stromal cells.	Am J Pathol.	173	463-9	2008
Yanai Y., Hiroi H., Osuga Y., Fujimoto A., Momoeda M., Yano T., Taketani Y.	Androgen insensitivity syndrome with serous gonadal cyst.	Fertil Steril.	90	2018	2008
Hirota Y., Tranguch S., Daikoku T., Hasegawa A., Osuga Y., Taketani Y.	Deficiency of Immunophilin FKBP52 Promotes Endometriosis.	Am J Pathol.	173	1747-57	2008
Osuga Y.	Novel therapeutic strategies for endometriosis: a pathophysiological perspective.	Gynecol Obstet Invest.	66 Suppl 1	3-9	2008
Osuga Y, Hirota Y, Taketani Y.	Basic and translational research on proteinase-activated receptors: proteinase-activated receptors in female reproductive tissues and endometriosis.	J Pharmacol Sci.	108	422-5	2008

Hirata T., Osuga Y., Hamasaki K., Yoshino O., Ito M., Hasegawa A., Takemura Y., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Koga K., Tajima T., Saito S., Yano T., Taketani Y.	Interleukin (IL)-17A Stimulates IL-8 Secretion, Cyclooxygenase-2 Expression, and Cell Proliferation of Endometriotic Stromal Cells.	Endocrinology	149	1260-7	2008
Fu L., Osuga Y., Morimoto C., Hirata T., Hirota Y., Yano T., Taketani Y.	Dienogest inhibits BrdU uptake with G(0)/G(1) arrest in cultured endometriotic stromal cells.	Fertil Steril.	89	1344-7	2008
Hasegawa A., Yoshino O., Osuga Y., Hirata T., Yano T., Taketani Y.	High soluble CD44 concentration in peritoneal fluid in endometriosis.	Fertil Steril.	89	1267-8	2008
Osuga Y., Koga K., Hirata T., Hiroi H., Taketani Y.	A case of hydrosalpinx associated with the menstrual cycle.	Fertil Steril.	90	199	2008
Yanagida K., Fujikura Y., Katayose H	The present status of artificial oocyte activation in assisted reproductive technology.	Reprod. Med. Biol.	7	133-42	2008
柳田薫、猪鼻達仁、藤倉洋子、片寄治男	エキスパートに学ぶ体外受精実践講座、顕微授精	臨床婦人科産科	62	951-6	2008
柳田薫	体外受精・顕微授精	日本医師会雑誌	137	31-4	2008
柳田薫、高田智美	顕微授精での受精障害、不妊症-臨床と研究の最前線	医学の歩み	別冊	85-9	2008
柳田薫	ICSIの位置づけ	日産婦誌	60	377-81	2008
片寄治男、岩本晃明、柳田薫	ARTにおける受精・発生障害	産科と婦人科	75	1242-50	2008
N. Inoue, M. Ikawa and M. Okabe	Putative sperm fusion protein IZUMO and the role of N-glycosylation	Biochem Biophys Res Commun	377	910-4	2008
R. Yamaguchi, K. Yamagata, H. Hasuwa, E. Inano, M. Ikawa and M. Okabe	Cd52, known as a major maturation-associated sperm membrane antigen secreted from the epididymis, is not required for fertilization in the mouse	Genes Cells	13	851-61	2008
D. Y. Youn, D. H. Lee, M. H. Lim, J. S. Yoon, J. H. Lim, S. E. Jung, C. E. Yeum, C. W. Park, H. J. Youn, J. S. Lee, S. B. Lee, M. Ikawa, M. Okabe, Y. Tsujimoto and J. H. Lee	Bis deficiency results in early lethality with metabolic deterioration and involution of the spleen and thymus	Am J Physiol Endocrinol Metab.	295	E1349-57	2008
K. Tokuhira, M. Hirose, Y. Miyagawa, A. Tsujimura, S. Irie, A. Isotani, M. Okabe, Y. Toyama, C. Ito, K. Toshimori, K. Takeda, S. Oshio, H. Tainaka, J. Tsuchida, A. Okuyama, Y. Nishimune and H. Tanaka	Meichroacidin containing the membrane occupation and recognition nexus motif is essential for spermatozoa morphogenesis	J Biol Chem.	283	19039-48	2008
M. Ikawa, N. Inoue and M. Okabe	Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals	Int J Dev Biol.	52	657-64	2008

S. Kuramochi-Miyagawa, T. Watanabe, K. Gotoh, Y. Totoki, A. Toyoda, M. Ikawa, N. Asada, K. Kojima, Y. Yamaguchi, T. W. Ijiri, K. Hata, E. Li, Y. Matsuda, T. Kimura, M. Okabe, Y. Sakaki, H. Sasaki and T. Nakano	DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes	Genes Dev.	22	908-17	2008
N. Inoue and M. Okabe	Sperm-egg fusion assay in mammals	Methods Mol Biol	475	335-45	2008
Sullivan S, Dieter E, Akutsu H, DouglasAM, Kevin E, ChadA.Cowan	Derivation of human embryonic stem cell lines	Human Embryonic Stem Cells		35-51	2007
Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Akutsu H, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Nakajima H, Okita H, Umezawa A, Hata J, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N.	Preferential localization of SSEA-4 in interfaces between blastomeres of mouse preimplantation embryos.	Biochem Biophys Res Commun	364	838-43	2007
阿久津英憲、梅澤明弘	アメリカでのヒト胚性幹細胞事業	医学のあゆみ	217	582-6	2007
阿久津英憲、梅澤明弘	核移植による多能性誘導	実験医学	25	468-73	2007
阿久津英憲	核移植クローニング技術の進歩	産婦人科の世界	59	9-14	2007
Takemura Y., Osuga Y., Yoshino O., Hasegawa A., Hirata T., Hirota Y., Nose E., Morimoto C., Harada M., Koga K., Tajima T., Yano T., Taketani Y.	Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometrial stromal cells.	J Clin Endocrinol Metab.	92	3213-8	2007
Hirota Y., Osuga Y., Nose E., Koga K., Yoshino O., Hirata T., Yano T., Tsutsumi O., Sakuma S., Muramatsu T., Taketani Y.	The presence of midkine and its possible implication in human ovarian follicles.	Am J Reprod Immunol	58	367-73	2007
Takemura Y., Osuga Y., Koga K., Tajima T., Hirota Y., Hirata T., Morimoto C., Harada M., Yano T., Taketani Y.	Selective increase in high molecular weight adiponectin concentration in serum of women with preeclampsia.	J Reprod Immunol	73	60-5	2007
Yazawa H, Yanagida K, Sato A	Human round spermatids from azoospermic men exhibit oocyte-activation and Ca ²⁺ oscillation-inducing activities.	Zygote	15	337-46	2007
柳田薫、藤倉陽子、片寄治男、岩本晃明	不妊因子からみたARTの成績	へるす出版	33	825-9	2007
柳田薫、高田智美	顕微授精での受精障害	医学の歩み	223	85-9	2007
柳田薫、片寄治男、藤倉陽子、岩本晃明	顕微授精 産婦人科診療Data Book	産婦人科の実際	56	1639-44	2007
柳田薫	不妊治療と遺伝子異常 ARTで認識すべき遺伝子異常	臨床婦人科産	61	1482-7	2007

		科			
片寄治男, 高山智子, 菅沼亮太, 林章太郎, 柳田薫, 佐藤章	精子核の質的評価と体外胚発生能	J.Mamm. Ova.Res	24	153-60	2007
Ueda Y, Yamaguchi R, Ikawa M, Okabe M, Morii E, Maeda Y, Kinoshita T.	PGAP1 knock-out mice show otocephaly and male infertility.	J Biol Chem.	282	30373-80	2007
Umehara H, Kimura T, Ohtsuka S, Nakamura T, Kitajima K, Ikawa M, Okabe M, Niwa H, Nakano T.	Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3.	Stem Cells.	25	2705-11	2007
磯谷綾子, 岡部勝	X-linked GFP マウスを用いた雌雄分別と生殖細胞の動態	蛋白質核酸酵素	52	2060-6	2007
Tanaka TS, Lopez de Silanes I, Sharova LV, Akutsu H, Yoshikawa T, Amano H, Yamanaka S, Gorospe M, Ko MS	Esg1, expressed exclusively in preimplantation embryos, germline, and embryonic stem cells, is a putative RNA-binding protein with broad RNA targets.	Dev Growth Differ.	48	381-90	2006
Akutsu, H. Cowan, CA. and Melton, D.	Human embryonic stem cells.	Methods Enzymo.	418	78-92	2006
丸山哲夫, 浅田弘法, 小野政徳, 荒瀬透, 吉村泰典	【内分泌症候群(第2版) その他の内分泌疾患を含めて】女性性機能 子宮筋腫.	日本臨床 (内分泌症候群II)		477-84	2006
浅田弘法, 羽田智則, 升田博隆, 小野政徳, 梶谷宇, 内田浩, 浜谷敏生, 丸山哲夫, 吉村泰典, 岸郁子, 木挽貢慈	妊孕能温存のための内視鏡下手術】子宮腺筋症に対する内視鏡手術.	産婦人科の世界	58	337-45	2006
浅田弘法, 羽田智則, 梶谷宇, 内田浩, 浜谷敏生, 丸山哲夫, 吉村泰典, 岸郁子, 木挽貢慈	【月経困難症に対する治療戦略】子宮腺筋症の疼痛対策.	産婦人科の世界	58	647-54	2006
Yasushi Hirota, Yutaka Osuga, Kaori Koga, Osamu Yoshino, Tetsuya Hirata, Chieko Morimoto, Miyuki Harada, Yuri Takemura, Emi Nose, Tetsu Yano, Osamu Tsutsumi, Yuji Taketani.	The expression and possible roles of chemokine CXCL11 and its receptor CXCR3 in the human endometrium.	J Immunol.	177	8813-21	2006
Koga K., Takemura Y., Osuga Y., Yoshino O., Hirota Y., Hirata T., Morimoto C., Harada M., Yano T., Taketani Y.	Recurrence of ovarian endometrioma after laparoscopic excision.	Hum Reprod	21	2171-4	2006
Takemura Y., Osuga Y., Yamauchi T., Kobayashi M., Harada M., Hirata T., Morimoto C., Hirota Y., Yoshino O., Koga K., Yano T., Kadowaki T., Taketani Y.	Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. Endocrinology.	Endocrinology	147	3203-10	2006

丸山哲夫、浅田弘法、小野政徳、荒瀬透、吉村泰典	【内分泌症候群(第2版) その他の内分泌疾患を含めて】 女性性機能 子宮筋腫.	日本臨 別冊 (内 分 症 候 群 II)	477-84	2006
浅田弘法、羽田智則、升田博隆、小野政徳、梶谷宇、内田浩、浜谷敏生、丸山哲夫、吉村泰典、岸郁子、木挽貢慈	妊孕能温存のための内視鏡下手術】 子宮腺筋症に対する内視鏡手術.	産婦人 科の世 界	58 337-45	2006
浅田弘法、羽田智則、梶谷宇、内田浩、浜谷敏生、丸山哲夫、吉村泰典、岸郁子、木挽貢慈	【月経困難症に対する治療戦略】 子宮腺筋症の疼痛対策.	産婦人 科の世 界	58 647-54	2006

IV 研究成果の刊行物・別冊

2. ES 細胞を用いた生殖医療

● ES 細胞の生殖細胞への分化に関する新知見を解説して下さい

■回答■

阿久津英憲・梅澤明弘

胚性幹細胞 (embryonic stem cells 以下 ES 細胞) は胚盤胞の内部細胞塊より樹立される細胞で、幅広い分化能力をもちつつ体外培養系で無限に増殖できる希有な細胞である。ES 細胞は実験動物のマウスで約 25 年前に樹立され、98 年にヒト ES 細胞が米国ウイスコンシン大学のグループにより報告され、一気に再生医療の分野で注目されるようになった。ES 細胞の分化多能性を証明する方法として、マウスでは ES 細胞を免疫不全マウスへ移植し奇形腫形成を確認する方法と ES 細胞を胚盤胞へ注入し得られた個体で三胚葉組織へ寄与するキメラ個体が得られることと体外培養系で ES 細胞から分化した細胞の集合体 (胚様体: embryoid body 以下 EB) を作成し三胚葉組織への分化を確認する方法がある。これまで、ES 細胞から EB へ分化する過程では *in vivo* で起こる発生の多面性や遺伝子発現と細胞分化のタイミング、*in vivo* のイベントが同様に起きているとされている。つまり、初期発生の再現が培養ディッシュ上でできていることになる。キメラ個体の産仔は ES 細胞由来の形質を示すことより ES 細胞が *in vivo* では生殖細胞へ分化することが示されるが、体外培養系で ES 細胞から生殖細胞への分化に関する報告はごくわずかである。生殖細胞の発生を鑑み、最近の ES 細胞由来生殖細胞から産仔に至った報告を検討していきたい。

A. 生殖細胞の成り立ち

生殖細胞は種の保存・進化を担う主役の細胞である。胎生期に始原生殖細胞 (primordial germ cells; 以下 PGC) が形成され、減数分裂を経て染色体が一組の一倍体細胞 (精子または卵子) となる。減数分裂期には相同遺伝子の組換え (meiotic recombination) が起こり遺伝情報の多様化に寄与する。通常の発生では、体細胞が生殖細胞になるまでに 3 つの大きなイベントを経ている。① PGC の形成、② 減数分裂の完遂、③ 精子・卵子への形態成熟で、特に①から②の間に親のエピゲノム情報が消去され、新たに付与されるエピゲノムリプログラミングが起こる。

生殖細胞への分化系譜は、発生のごく初期より体細胞の分化成熟とは異なった非常にユニークな道を歩む (図 1)。マウスでは受精後 7 日目頃には生殖細胞の起源となる細胞がエピプラスト上縁部に現れる。将来生殖細胞となるグループの中に、6.25 日頃 Blimp 1 遺伝子を発現する細胞が現れ、体細胞特徴的な Hox 遺伝子群の発現を抑制していく。周囲の細胞からの BMP-Smad シグナリングを介した調和の中、Flagilis, Stella, Oct 4 を発現した細胞は生殖堤へと移動し、真の生殖細胞になるために必要な一大イベントであるエピゲノムのリプログラミングが始まる。これは、親由来のメチル化情報や刷り込み遺伝子の刷り込み因子が消されて自身の新たなエピゲノム情報が刻み込まれていく、それとともに性の分化が始まり、発生の進行に差が出てくる。精原細胞は出生第 2 日目まで減数分裂期へ入らず有糸分裂停止期となるが、卵原細胞は卵母細胞となり第一減数分裂前期で細胞周期はいったん休止するが刷り込みの確立や遺伝子の転写は活発に行われている。

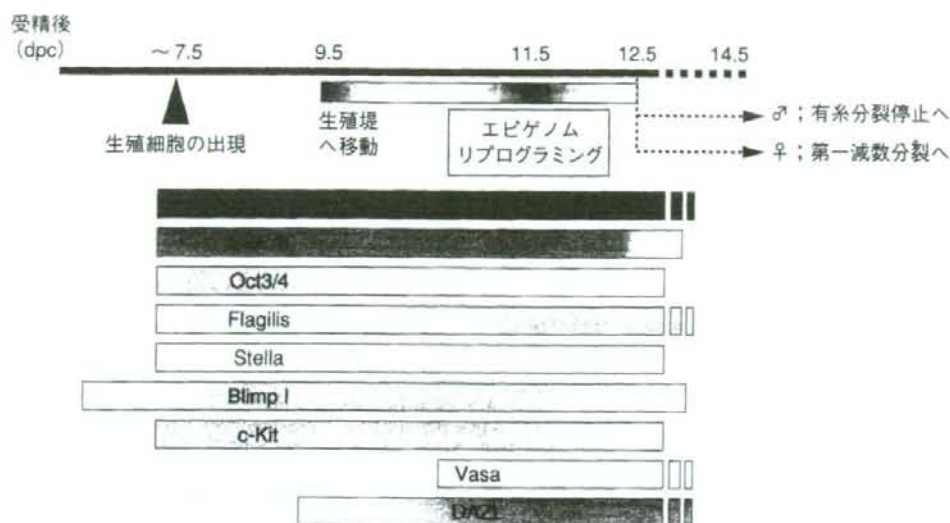


図1 マウス生殖細胞発生

B. ES 細胞から生殖細胞へ

03年にHubnerらが、ES細胞から生殖細胞(卵子)への分化をはじめて報告した¹⁾(表1)。彼らは、*in vivo*で起きているPGCの遺伝子発現パターンからES細胞由来PGCを選別し培養を継続していき、卵子特異的遺伝子ZP-2、ZP-3の発現が確認できる卵子様細胞を得ることができた。興味深いのは、XY型のES細胞からも卵子が分化できていることである。もう一つは、このES細胞分化培養系では、減数分裂期の休止が認められず単為発生胚となり胚盤胞期まで発生している。通常、卵子形成過程では第一減数分裂前期と第二減数分裂中期で休止しているが、ES細胞分化系では減数分裂停止機構が機能していなかった。筆者らは、出生1日目のマウス卵巣器官培養系でも成熟した卵子が単為発生してしまうのを確認しているので、ES細胞特異的というより全体的な培養システムの中で起こる問題かもしれない。ToyookaらはES細胞よりPGC細胞まで分化を進行させた後、胎仔精巣再構成凝集塊との共培養下で精子への発生を初めて報告した²⁾。GeijesenらはES細胞より精子細胞への分化に成功し、刷り込み遺伝子(Igf2rとH19)のDNAメチル化状態が精子特異的に付与されていると報告した³⁾。さらに、ICSIにより野生型卵子に注入すると胚盤胞までの発生が認められたが、産仔までは得られていない。ヒトES細胞培養系でも生殖細胞分化がClarkらにより初めて報告された⁴⁾。ヒトES細胞分化ではEBを形成後3日目にはVASA発現が認められている。その他、DAZL、STELLARなど生殖細胞特異的遺伝子発現と減数分裂期発現遺伝子であるSCP1、SCP3、GDF9などの発現が認められた。しかし、減数分裂を完了した一倍体細胞は認められなかった。最近、NayerniaらはマウスES細胞からPGCそして一倍体精子細胞を分化させ、ICSIにより産仔にいたったと報告した⁵⁾。ついに、ES細胞由来生殖細胞が産仔発生能力のあることを初めて示した。彼らの培養システムでは、ACROSINや先体膜タンパクのOAM、精子核タンパクPROTAMINEそして精子尾部特異的タンパクPHGPxが認められる細胞が得られている。精子形態形成の途上まで発生したこれらの精子細胞では、3つの刷り込み遺伝子(H19、Igf2r、Snrpn)のDNAメチル化状態を解析したところ、親のメチル化パターンが消去されまた新

表1 ES細胞の生殖細胞分化に関する報告

	文献	種	ES細胞の性染色体型	分化生殖細胞	コメント
1	Hubner, et al. 2003	マウス	XY, XX	卵子 (一倍体)	単為発生胚盤胞
2	Toyooka, et al. 2003	マウス	XY	精子細胞 (一倍体)	胎仔精巣再構成凝集塊との共培養下で精子へ発生
3	Geijesen, et al. 2004	マウス		精細胞 (一倍体)	ICSIにより胚盤胞
4	Clark, et al. 2004	ヒト	XY, XX	PGC	減数分裂未完了
5	Nayernia, et al. 2006	マウス	XY	精細胞 (一倍体)	ICSIで産仔まで発生

たに付与されるエピジェネティックリプログラミングが行われていた。ICSIを行った結果、得られた65個の2細胞期胚から7匹の産仔が得られた。しかし、7匹全て正常な大きさの個体はなく生後5日から5カ月の間に全て死亡してしまった。さらに、ICSI産仔では、刷り込み遺伝子のメチル化パターンはまちまちであった。ES由来精子細胞では、減数分裂を完了するが、エピジェネティックリプログラミングは不完全でありICSIで得られた産仔も正常な個体は得られなかった。

C. ES細胞由来生殖細胞の課題と展望

これまでの報告よりES細胞からPGCへの分化は可能であり、減数分裂が開始し一倍体の生殖細胞を培養ディッシュ上で産生することができている。ES由来精子細胞からICSIにより産仔獲得まで至ったが、生殖細胞発生系譜で特異的に起こるエピジェネティックリプログラミングは不完全な状態で一倍体細胞となっていた。そのICSI産仔で刷り込み遺伝子領域のDNAメチル化状態は異常であり、5カ月以内に全て死んでしまった。これまでの、ES細胞由来生殖細胞に関する研究より、以下の課題があげられる。

- ・体外培養系でPGCのDNAメチル化を含めたエピゲノムのリプログラミングがどの程度行われているのか、数個の刷り込み遺伝子領域だけでなく、ゲノムワイドで解析する必要がある。
- ・通常のマウス雄個体では数週間かけて起こる精細胞発生が体外培養系ではPGCの出現から一倍体細胞への分化が数日で起こってしまう。培養方法の検討が必要である。
- ・卵細胞分化では、通常起こる減数分裂期での休止がみられず、分化細胞はさらに単為発生を進めてしまう。卵子発生において、体外培養系での詳細な減数分裂進行のメカニズム解析が必要である。
- ・XX染色体型の個体では卵子、XY個体では精子が発生してくるわけだが、マウスおよびヒトES細胞分化系ではXY型ES細胞からでの卵子発生が引き起こされる。これには、SRYの作用有無または、作用の時期が大きくかかわっているようであるが、体外培養系での性分化決定メカニズム解析は非常に興味深い。

現在の時点ではES細胞由来生殖細胞の臨床応用を考慮する段階ではない。それ以前に、これま

でのわずかな成功例が示唆している点は、発生生物学や基礎医学的にも非常に興味深い。ほ乳類生殖細胞発生の重要な以下の事象が体外培養系で解明できる可能性が出てきた。① PGC の分化発生メカニズム、②クロマチンの再構築および精細胞でのヒストン・プロタミン変換メカニズム、③減数分裂開始・進行機構、④ PGC エピゲノムリプログラミング機構、⑤刷り込み遺伝子樹立メカニズム、⑥性分化メカニズムなどである。最近、Saitou らは、マウス PGC 細胞一つから cDNA ライブラリーを構築し、網羅的遺伝子発現解析を可能にした⁶⁾。この ES 細胞由来生殖細胞分化誘導系と最新の遺伝子発現解析を応用すれば未解明現象に一気に分子レベルで解明できる可能性が大にある。Nayernia らの結果から、ES 細胞由来生殖細胞分化系で PGC エピゲノムリプログラミングを正常に近づける培養システムの開発が必要である。この体外培養系でのエピゲノム環境への脆弱性改善の研究は、生殖医療における未熟卵子体外培養系の卵細胞質向上に非常に有用と考えられる。

1981 年にマウス ES 細胞樹立が報告されて 25 年になるが、ES 細胞から生殖細胞分化の知見を得たのは最近である。今後、ヒト ES 細胞を用いた生殖細胞分化の知見も得られればヒト初期発生のメカニズムの解明に大きく寄与すると思われる。【注：本邦でヒト ES 細胞を用いた生殖細胞分化研究を行うことは現時点で許可されていない（「ヒト ES 細胞の樹立及び使用に関する指針（平成 13 年文部科学省告示第 155 号）」）】。

●文献

- 1) Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. 2003; 300: 1251-6.
- 2) Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, et al. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 11457-62.
- 3) Geijsen N, Horoschak M, Kim K, et al. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*. 2004; 427: 148-54.
- 4) Clark AT, Bodnar MS, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet*. 2004; 13: 727-39.
- 5) Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, et al. In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell*. 2006; 11: 125-32.
- 6) Kurimoto K, Yabuta Y, Ohinata Y, et al. An improved single-cell cDNA amplification method for efficient high-density oligonucleotide microarray analysis. *Nucl Acids Res*. 2006; 34: e42.