

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08267

研究課題名(和文) ヒトES/iPS細胞の多能性維持におけるPRDM14の作用機序の解明

研究課題名(英文) The role of PRDM14 in human ES/iPS cells for pluripotency maintenance

研究代表者

小島 洋児 (KOJIMA, YOJI)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：70720811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトのiPS細胞を用いてPRDM14遺伝子の機能を探索し、多能性の維持には必須であることが分かった。さらにマウスではPRDM14が多能性幹細胞から生殖細胞系列への分化にも必須であるが、ヒトの生殖細胞への分化ではマウスとは異なる遺伝子セットが必要であることがわかり、PRDM14ではなく、SOX17が重要など、ヒト特異的な分子機序を明らかにすることができた。これまで哺乳類の発生学で主に使用されてきたマウスの系では分かり得なかったことがヒトiPS細胞を用いて明らかとなり、発生異常などの理解に向けた研究の基盤となる知見と考えられる。

研究成果の概要(英文)：By utilizing human iPS cells, we have identified that PRDM14 gene function is necessary for the maintenance of pluripotency in human. In mice, PRDM14 is known to function and required for the differentiation of pluripotent cells towards germ cell lineage. Therefore, we next studied the molecular mechanisms involved in human germ cell specification, and identified that PRDM14 is not the regulator of germ cell specification, but SOX17 and other factors that are distinctive from those in mice were necessary. We have first elucidated the human specific mechanisms of germ cell specification using human iPS cells and believe that this finding forms the basis of the research of human germ cell development and developmental abnormality.

研究分野：多能性幹細胞

キーワード：iPS細胞 多能性 生殖細胞 分化機序

1. 研究開始当初の背景

PRDM14 は転写調節因子で、マウスでは初期胚や ES 細胞の多能性の維持に必須な他、精子や卵子の元となる、始原生殖細胞への分化にも不可欠な因子であることが知られている[1]。

マウスでは EpiS 細胞と呼ばれる、胎生 4.5 日胚に相当する ES 細胞に比べ、胎生 7.5 日頃に相当する、分化の進んだ多能性状態で維持可能な細胞があり、この細胞では PRDM14 が発現されていない[2]。前者をナイーブ型多能性、後者をプライム型多能性と呼ぶが、このプライム型の EpiS 細胞に PRDM14 を強制発現させることでナイーブ型の ES 細胞様に若返る[3]。このように PRDM14 はナイーブ型多能性からプライム型多能性への移行を防ぐ因子として作用する。

一方でヒト ES/iPS 細胞はプライム型とされるが、PRDM14 を発現しており、多能性の中心的遺伝子 POU5F1(OCT4)の発現を制御し、多能性の維持に関わっている[4]。ヒト ES 細胞において PRDM14 の発現を低下させると早期の分化マーカーの発現が増加し、多能性が不安定になることも報告された[5]。しかしこれらの研究はいずれも遺伝子のノックダウンの系で行われており、細胞のばらつきや、オフターゲットなどの影響も考えられ、正確な機序は明らかになっていない。

またマウスでは PRDM14 は生殖細胞の運命決定に必須の因子として知られている。PRDM14 のノックアウトマウスでは始原生殖細胞を含め、生殖細胞系列の細胞が出現しない[6]。また ES 細胞を用いた系でも、PRDM14 を強制発現させることで生殖細胞系列への分化を誘導することができ、PRDM14 の発現が必要十分な条件であることが示されている[7]。

対してヒトの始原生殖細胞の分化機序は未解明であり、胎生 4 週頃に羊膜で認められる[8]が、それ以前に、どの部位でどのような刺激で運命決定がなされるのかは不明であった。所属研究室で、ヒト iPS 細胞を用いた生殖細胞系列への誘導系が樹立されつつある状況であり、ヒトの始原生殖細胞分化における PRDM14 の作用も検証することが可能であると考えられた。

2. 研究の目的

1. ヒト ES/iPS 細胞における PRDM14 の役割

PRDM14 をノックアウトした細胞で薬剤依存性に発現量を調節できる系を作成し、細胞の形態や遺伝子発現から、影響を受けている細胞内の機能を探索する。

2. ヒト ES/iPS 細胞における PRDM14 の作用機序の解明

上記の系を用い、他の多能性に関連したタンパクとの結合や、ゲノム上での結合部位の変化の特定から、PRDM14 による調節機序を明らかにする。

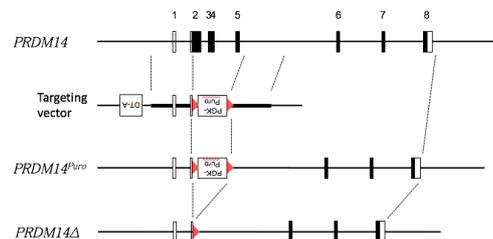
3. ヒト ES/iPS 細胞から生殖細胞への誘導系を用いた分化機序の解明

所属研究室で開発された誘導系を用いて種々の遺伝子のノックアウトを作成し、PRDM14 を含め、ヒトの始原生殖細胞への運命決定の分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト ES/iPS 細胞で PRDM14 のノックダウンにより多能性が不安定となる可能性が示唆されているため[5]、まず PRDM14 を薬剤(ドキシサイクリン)依存性に発現を調節できる系を作成した。PRDM14 の cDNA 配列を piggyBac のベクターに挿入し、rtTA 配列とともに細胞に導入した。この方式ではゲノムに複数コピー導入されるため、コロニーピッキングをした後、適切な発現量が得られたクローンを選抜した。

その後、ドキシサイクリンで PRDM14 の発現を保ったまま、PRDM14 のゲノム領域を TALEN による相同組み換えを利用してノックアウトした[図 1]。



【図 1】PRDM14 ノックアウトのデザイン

PRDM14 の第 2 エクソンにある転写開始点から第 5 インtron までをピューロマイシン耐性遺伝子カセットで置換した。

遺伝子導入の成否を PCR やサザンブロットングで確認し、最終的に Cre 発現ベクターを感染させ、ピューロマイシン耐性遺伝子カセットを切除し、iPS 細胞株を樹立した。

当初のドキシサイクリン依存性に発現させるシステムでは培養とともに外来遺伝子の発現量の低下を認めたため、ゲノム上で発現が減らないようにインシュレーター配列 D4Z4 を持つ DNA ベクターに変更して再度樹立しなおした。

ここで得られた細胞株を用い、ドキシサイクリンによる PRDM14 の発現量の変動と、それによる多能性遺伝子発現の変動を観察した。

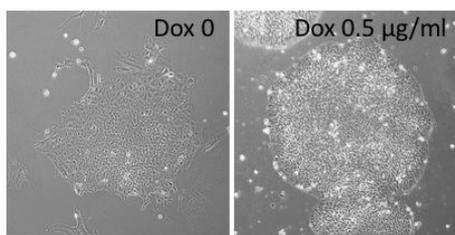
ヒト iPS 細胞から始原生殖細胞への誘導は所属研究室から発表された論文に従って行った[9]。継代の際にファイブロネクチンでコーティングした培養皿に撒き、アクチピンと WNT シグナルの賦活剤の CHIR99021 を加え、2 日間培養して初期中胚葉様細胞 (iMeLCs) と命名された状態を経由し、その後 BMP などのサイトカインを添加して浮遊培養を 4~6 日行うことで始原生殖細胞様細胞 (PGC-like cells; PGCLCs) の誘導を行った。

遺伝子欠損株の作製は、CRISPR/Cas9 システ

ムを用いた。標的とした遺伝子 (SOX17, T, MIXL1, EOMES, TFAP2C) の機能性部位を欠損させるため、その上流に当たる DNA 配列にガイド RNA を設計した。その後 CRISPR/Cas9 とガイド RNA を発現するベクターをヒト iPS 細胞に感染させ、Cas9 の下流に付加した傾向レポーターを用いて好発現の細胞のみを FACS でソートし、1 ウェルに 1 細胞ずつ撒き、増殖してきたコロニーを回収し、それらの細胞株のゲノム配列をシークエンスすることで、フレームシフト突然変異が両アレルに認められた細胞株を選抜した。遺伝子の欠損は mRNA の発現を認める時期のサンプルを用い、ウェスタンブロットングで確認した。

4. 研究成果

ヒト iPS 細胞において、PRDM14 遺伝子を欠損させた上で、外来の PRDM14 タンパクを薬剤の濃度依存性に発現できる系を作製し、その多能性維持の作用の解明を目指した。この系を作製して検証したところ、PRDM14 の発現をなくすとコロニー形態が変化することが確認された [図 2]。短期的には多能性維持の鍵となる POU5F1、NANOG といった代表的な遺伝子発現に著明な変動は見られなかったが、多能性維持に関わる細胞表面タンパクの発現が変化しており、PRDM14 の関与が示された。この原因となる機序に関しては網羅的な遺伝子発現にて探索中である。



[図 2] ドキシサイクリン依存性のヒト iPS 細胞株 ドキシサイクリンなしでは多能性が維持できない。

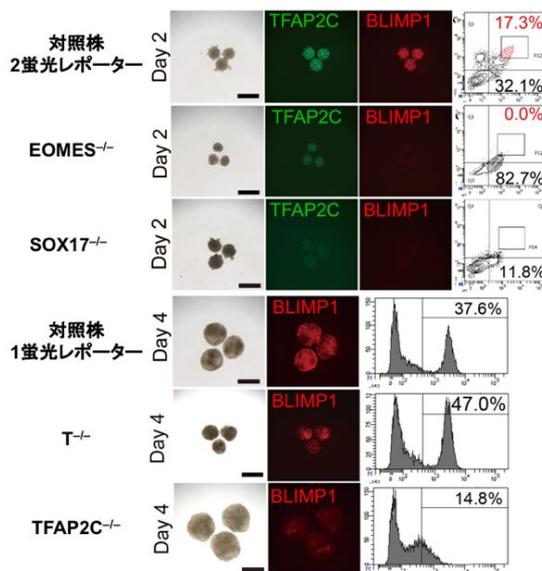
一方で、ヒト生殖細胞の初期分化機構における PRDM14 の役割はノックアウト株でも少数の PGCLCs は形成されることが見られ、マウスのように不可欠ではないと考えられた。そこで、他にどのような分子が関与しているか、候補遺伝子を欠損させた細胞株を分化させた際の反応を詳細に検討することで明らかにした。

近年、他の研究室から、ヒトの生殖細胞系列は SOX17 遺伝子を発現することが、ES 細胞を用いた研究で示された [10]。同研究室の開発した手法は所属研究室の手法とは異なるため、まず当研究室の手法でも SOX17 が最初に機能するかどうかを探索した。当研究室で開発した生殖細胞の蛍光レポーター株 (TFAP2C-EGFP; BLIMP1-tdTomato) は、PGCLCs が形成されたら蛍光の発現で検出できる系であるが、この細胞株に前記の手法により SOX17 遺伝子の欠損ヒト iPS 細胞株を作製し

た。これを用いて PGCLC への分化を試みたところ、蛍光の発現が全く見られず、分化能が阻害されることが示された。続いて、SOX17 遺伝子の発現を制御する、上流の因子の探索を行った。

まずマウスで最初に機能する T 遺伝子をヒト iPS 細胞で欠損させ、これを PGCLCs に分化させたところ、野生株と同様の分化が見られ、T 遺伝子はヒトでは関与していないことが明らかになった。続いて胚発生で同じ部位に発現する MIXL1 遺伝子を欠損させた。こちらも野生株と同様に分化能が保たれており、ヒトの生殖細胞分化には不要であることが示された。

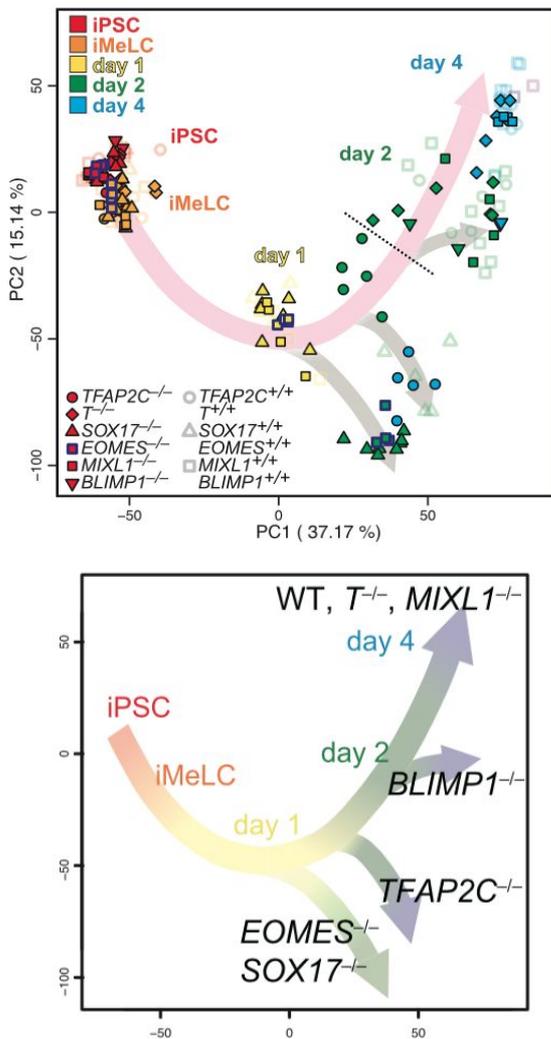
続いて EOMES 遺伝子を欠損させたところ、SOX17 遺伝子の欠損株と同様に、PGCLC への分化を完全にブロックできた遺伝子発現パターンを確認すると、SOX17 欠損株では EOMES 遺伝子の発現は野生株と同様に見られたが、EOMES 欠損株では SOX17 遺伝子の発現が見られず、EOMES が SOX17 を上流で制御していることが明らかになった [図 3]。



[図 3] 各遺伝子のノックアウト細胞株を用いた PGCLC 誘導 EOMES と SOX17 のノックアウトでは PGCLCs への分化が全く見られなかったが、T のノックアウトでは見られた。一方で TFAP2C のノックアウトでは 2 日目までは PGCLCs になりかけるが 4 日目になると特徴的な遺伝子発現を失い、PGCLCs への分化が進まない。

さらに SOX17 の下流でどのような因子が作用するかを探索を行った。マウスでは BLIMP1, PRDM14, TFAP2C の順に発現が見られるため、続いて TFAP2C 欠損株を作製した。TFAP2C 欠損株を PGCLCs に分化させたところ、BLIMP1 の発現は最初見られるが、4 日目には低下し、ほとんど検出できなくなる [図 3]。この結果から、TFAP2C は BLIMP1 の発現の誘導には関与しないが、その発現の維持に不可欠である

ことがわかった。



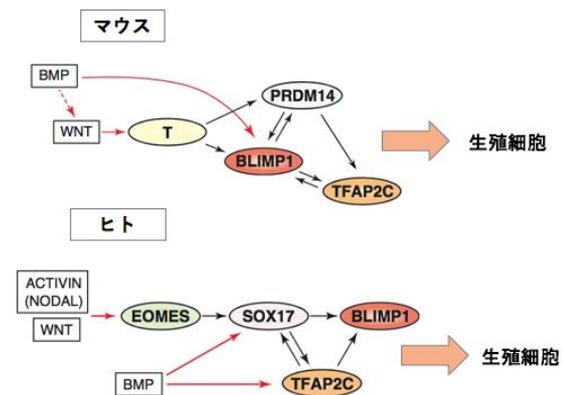
[図 4]主成分分析による遺伝子欠損株の動態評価(上)と株ごとの動態を要約した図(下) それぞれの遺伝子欠損株と対照群の野生株とを、時系列に沿って細胞を採取し、RNA シーケンスで評価した。iPS 細胞が左端に位置し、時系列に沿って、iMeLC、1 日目、2 日目、4 日目、と放物線状に並んだ。T と MIXL1 欠損株は野生株と同じ線上に並び、BLIMP1 欠損株は 4 日目、TFAP2C 欠損株は 2 日目、EOMES と SOX17 欠損株は 1 日目から逸れることが明らかになった。

続いてそれぞれの遺伝子の機能をより詳細に検討するために、分化経過を RNA シーケンスによるトランスクリプトーム解析で網羅的に評価した[図 4]。その結果、蛍光レポーターから判明したことと一致し、まず EOMES と SOX17 が必要で、その後 TFAP2C、さらには BLIMP1 の順で PGC 分化に必要なことが明らかになった。さらに詳細に検討すると、SOX17 欠損株では EOMES の発現には全く影響がないが、EOMES 欠損株では SOX17 の

発現が全く見られず、EOMES が SOX17 の上流で制御することが明らかになった。

これらの結果から、ヒトの生殖細胞の運命決定機構として、胚に存在する NODAL(または ACTIVIN)と栄養膜が発現している WNT のシグナルを受けて、まず EOMES を発現することが始まりであることが示唆された。実際、ヒトと同じく霊長類のサルの着床後胚では羊膜において EOMES が一時的に発現し、その部位から生殖細胞が発生することが明らかになっており、ヒトでも同様の部位で同じシグナルの下で分化が進むと考えられた。さらに、羊膜で発現している BMP シグナルを受けて、ヒトでは SOX17、TFAP2C、BLIMP1 の順に機能することが今回の系で新たに判明した。

これまで哺乳類の生殖細胞発生モデル動物として主に用いられてきたマウスでは、BMP と WNT のシグナルによって、まず T 遺伝子の転写が起こり、そこに BMP シグナルが加わることで、まず BLIMP1 が、引き続いて PRDM14 が転写され、これらの 2 因子によって TFAP2C が転写されて、3 因子によって生殖細胞への分化が進むことが明らかにされてきた[図 5]。また、マウスにおいてはこれら 3 因子を強制発現させることで、BMP などの刺激なしに生殖細胞へ誘導可能であることも示された。すなわちこれら 3 因子の存在が必要十分条件であることが知られている。



[図 5]マウスとヒトの生殖細胞分化メカニズムの違い マウスの発生 6 日目頃から見られる生殖細胞の運命決定機構と、ヒトの 2 週齢頃に見られる運命決定における分子機序の違いを示した。

このように、今回のヒト iPS 細胞を用いた研究により、ヒトとマウスにおいて、多能性の維持機構だけでなく、生殖細胞への分化機構も、その分子機序は大きく異なることが明らかとなった。現段階ではヒトで明らかとなった 3 因子が必須であることが示されているが、3 因子の発現でシグナル分子による刺激がなくても生殖細胞に分化するか、これらの存在が十分条件であるかは示せていない。そのため、今回同定した因子を強制発現させる系を用いて、iPS ないしは iMeLC の状態

でこれらの遺伝子を発現させた際にどのように振る舞うかを検討する必要がある。これが今後の課題と考えられる。

これまでに胚だけでなく、ES細胞やiPS細胞を用いて、様々な臓器の発生機序が調べられてきたが、着床直後に起こる生殖細胞の運命決定においては、生体試料が入手不可能なため、研究が進んでいなかった。今回、所属研究室で開発された、ヒトiPS細胞からPGCLCsへと分化させる系を用いて、世界で初めて、ヒトの生殖細胞系列への運命決定がどのような分子機序で進むのかを明らかにすることができた。普段はあまり意識されていないが、生殖細胞に由来する発生異常、流産は全受精の2/3程度と見積もられ、非常に数多く見られている。ヒトにおける正常な生殖細胞発生の機序を解明し、さらには発生異常の原因を究明することは極めて重要である。今回の研究ではその扉を開く大きな一歩となったと考える。

<参考文献>

- [1] Yamaji M, et al. 2013. Cell Stem Cell 12: 368-82
- [2] Kojima Y, et al. 2013. Cell Stem Cell 14(1): 107-20
- [3] Gillich A, et al. 2012. Cell Stem Cell 10: 425-39
- [4] Chia NY, et al. 2010. Nature 468: 316-20
- [5] Tsuneyoshi N, et al. 2008. Biochem Biophys Res Commun 367: 899-905
- [6] Yamaji M, et al. 2008. Nat Genet 40: 1016-22
- [7] Nakaki F, et al. 2013. Nature 501:222-6
- [8] Fuss A.1911. Anat Am 39:407-9
- [9] Sasaki K, et al. 2015. Cell Stem Cell 17(2):178-94
- [10] Irie N, et al. 2015. Cell 160:1-15

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 1 件)

Kojima Y, Sasaki K, Yokobayashi S, Sakai Y, Nakamura T, Yabuta Y, Nakaki F, Nagaoka S, Woltjen K, Hotta A, Yamamoto T, Saitou M. (2017) Evolutionarily Distinctive Transcriptional and Signaling Programs Drive Human Germ Cell Lineage Specification from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 21(4):517-532.e5. doi: 10.1016/j.stem.2017.09.005.

[学会発表](計 2 件)

1. 第39回分子生物学会 (2016)
シンポジウム 2AS9-3 日本語口頭発表

2. International Society of Stem Cell Research Annual Meeting (2018) 英語口頭発表

[図書](計 1 件)

葛岡桜、小島洋児、斎藤通紀
病理と臨床 35(12): 1084 -1089 2017
「ヒト生殖細胞の発生機構とその試験管内再構成」

[産業財産権] 該当なし

[その他]

ホームページ等

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/171006_1.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

小島 洋児 (KOJIMA, Yoji)
京都大学 iPS 細胞研究所
特定拠点助教
研究者番号: 70720811

(2)研究分担者 該当なし

(3)連携研究者 該当なし

(4)研究協力者 該当なし