

令和元年5月21日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04796

研究課題名(和文) エピジェネティック修飾による初期化プログラムとキメラ形成分子機構の解明

研究課題名(英文) Epigenetic modifications for reprogramming and chimeric competency of cells.

研究代表者

岡村 大治 (Okamura, Daiji)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：80393263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々は、エピジェネティック修飾分子として機能する種々の低分子化合物を培養下に添加することで、マウス始原生殖細胞から従来のEG細胞とは大きく異なる性質を持つ多能性幹細胞を作製することに成功した。今回の我々の結果は、始原生殖細胞が従来の「再プログラム化」のみならず、「多様な多能性スペクトル」を研究する上でも高い潜在性を持つことを示しており、今後その有用なモデルになることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「細胞の再プログラム化」に目を向けてみると、現在までのところ、iPS細胞への初期化プロセスにはエピジェネティック修飾の変化が大きな役割を担っていることが示唆されている。しかしこれまでに「エピジェネティック修飾の変化を誘発する」ことのみで細胞の初期化を実現した例は無く、今回のDNA脱メチル化に機能するビタミンCの添加のみによるマウス始原生殖細胞の再プログラム化という現象は、まだその多くが謎に包まれている。「細胞の初期化プログラム」を理解する上で、非常に有用なモデルに成るものと期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the effect of Vitamin-C on freshly isolated PGCs. Vitamin-C, also known as L-ascorbic acid, has recently gained considerable attention largely due to its role in a Tet-dependent manner. This promoted us to test Vitamin-C's direct effect on freshly isolated in vivo PGCs. To our surprise, while there was no visible colony observed in control culture, Vitamin-C supplementation alone led to the emergence of alkaline phosphatase positive colonies and subsequently the derivation of stable cell line from freshly isolated PGCs. We designated this newly derived cell line as VcPGCs. To our surprise, these cells can be propagated indefinitely in vitro and demonstrated pluripotency using teratoma formation assay. More interestingly, the pluripotent cell lines generated with Vitamine-C share distinct features compared to conventional EGCs and thus may represent a distinct pluripotent state arising from the germline.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス 始原生殖細胞 エピジェネティック 再プログラム化 多能性幹細胞 EG細胞 ビタミンC メ
チル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多能性とは、生体内のあらゆる種類の細胞を生み出す能力を持っていることを示し、*in vivo* においては初期胚発生の非常に一過的な時期にのみ存在する性質であり、*in vitro* においてはES細胞に代表される多能性幹細胞が安定に保持する性質であり、また体細胞がiPS細胞誘導による初期化プロセスによって獲得する性質でもある。一般的に多能性幹細胞は、その性質の違いから二つに大別される。一つは、マウスES/iPS細胞のように着床前の胚の性質に似た「ナイーブ型」。もう一つは、マウスEpi幹細胞 (EpiSCs: epiblast stem cells) やヒトES/iPS細胞などの着床後の胚の性質に似た「プライム型」である。両者共に、三胚葉の分化細胞を生み出す能力を保持していることから多能性幹細胞と呼ばれるが、胚盤胞注入によるキメラ形成の有無などから、両者には明確な相違があることが示されている。

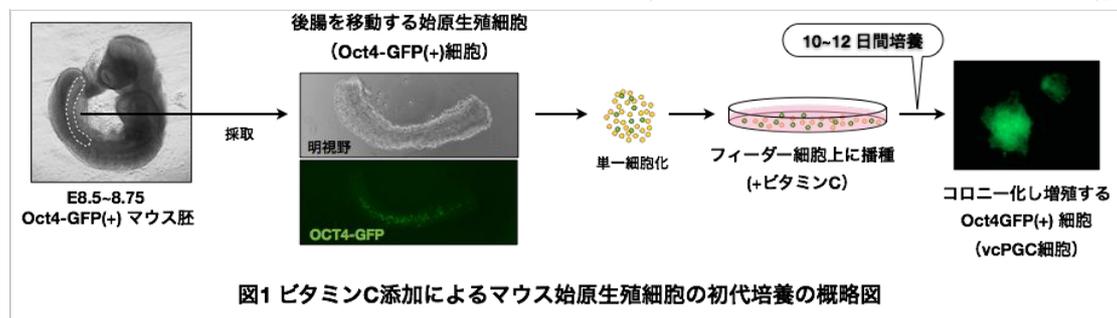
一方、近年になって培養条件や初期化プロセスの変更により、従来の「ナイーブ型」や「プライム型」とは大きく異なる性質を持つ多能性幹細胞が作製可能であることが認識され始めている。我々は従来の培養条件を変更することで、マウスならびに異種間キメラ形成能を持つヒトやサルの新規多能性幹細胞を生み出すことに成功した (Okamura* et al., *Nature*, 2015) (*筆頭共著者)。また別のグループは、成熟細胞に対し初期化因子を高レベルに発現させることで従来のマウスiPS細胞とは全く性質の異なる「F-Class (Fクラス)」型の多能性幹細胞を生み出せることを報告している (Tonge et al., *Nature*, 2014; Hussein et al., *Nature*, 2014)。このように一言に多能性と言っても、実際には多様な多能性状態が存在することが理解され始めており、その細胞特性や利用価値が注目されている。

初期胚やiPS誘導における成熟体細胞の他に、多能性幹細胞へとその性質を変えるもの一つに生殖細胞がある。生物としての永続性を担う生殖細胞は、マウス胚発生過程において始原生殖細胞 (PGCs: primordial germ cells) として運命決定を受け、その後配偶子として分化し、後に全能性を獲得出来る唯一の細胞である。しかしこれまでの我々の国際共同研究の結果から、始原生殖細胞はES/iPS細胞とは違い、いずれの発生の始原生殖細胞にも胚盤胞注入によるキメラ形成能はなく、配偶子への分化過程で全能性を獲得することが分かっている (Leitch et al., *Dev Biol.*, 2014)。一方で始原生殖細胞は、外来性遺伝子の導入非依存的に3つの成長因子 (SCF, LIF, bFGF) の添加のみでマウスES様の細胞 (Embryonic Germ cells; EG細胞) へと再プログラム化 (初期化) を受けることが知られている細胞であり (Matsui et al., *Cell*, 1992)、派生するEG細胞は、その増殖がLIF依存的事であることや胚盤胞注入によるキメラ形成能を含む多くの性質がES/iPS細胞と共通しているナイーブ型多能性幹細胞である。以上のことから、マウス始原生殖細胞は、機能的に特化された配偶子への分化の方向性が決まっていながらも、潜在的に再プログラム化を発動されやすい特性を持つと考えられている。

2. 研究の目的

我々は「エピジェネティック修飾による初期化プログラム」を考える中で、この始原生殖細胞の潜在性に注目した。そもそも始原生殖細胞はmonopotent (単分化能性) でありながら、Oct4やSox2などの多能性関連分子の発現の全てを持っていることから、再プログラム化におけるエピジェネティック修飾の一部を人為的に誘導するだけで、始原生殖細胞からの多能性幹細胞化が実現するのではないかと考えた。

L-Ascorbic Acid という名前でも知られるビタミンCは、従来の抗酸化作用のみならず、近年はiPS細胞誘導の促進や質の向上に非常に効果的であることが報告され注目を集めている (Esteban et al., *Cell Stem Cell*, 2010; Stadtfeld et al., *Nature Genetics*, 2012)。さらにビタミンCはDNA脱メチル化酵素として機能するTetタンパク質と協調的に、マウスES細胞内DNAをより胚盤胞内の内部細胞塊に近い低メチル化状態に変化させることも報告されており (Blaschke et al., *Nature*, 2013)、DNA脱メチル化を介したエピジェネティック修飾分子として機能していることが知られている。我々はマウス始原生殖細胞の初代培養におけるビタミンC添加の効果を探った (以下、未発表データ)。驚くべきことに、ビタミンCを添加することで、始原生殖細胞からアルカリフォスファターゼ活性ならびにOct4-GFP陽性のコロニーが形成され、継代後も安定的に維持することに成功した (図1、以下vcPGC細胞またはvcPGCs)。



本研究課題は、この新規多能性幹細胞株の細胞特性を探ると共に、始原生殖細胞のエピゲノム修飾による初期化プログラムの分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

vcPGCs, EG 細胞, in vivo 始原生殖細胞を用いた RNA シーケンス

新規 PGC(始原生殖細胞)由来細胞は新規性の高い多能性幹細胞であると考えられるので、RNA シーケンスを行い遺伝子プロファイルの比較解析が必須であると考えられた。しかしここで重要となるのが、比較対象である EG 細胞や新規 PGC 由来細胞株の元となる始原生殖細胞の発生ステージの違いも含めた解析である。そこで、始原生殖細胞の運命決定から間もない 8.5 日胚から生殖巣へと移動した 12.5 日胚の PGCs まで、複数の発生ステージの新規 PGC 由来細胞と EG 細胞の樹立を行なった。さらに、各細胞株(新規 PGC 由来細胞と EG 細胞)の由来する発生ステージによる発現遺伝子の変化を、RNA シーケンスによってプロファイリングを行なった。

vcPGCs, EG 細胞の樹立過程ならびに樹立後におけるゲノムワイドなメチル化解析

in vivo から採取した始原生殖細胞をフィーダー上で初代培養すると、分裂しながらも時間と共にアポトーシスによって細胞死が引き起こされることが分かっている(Matsui et al., *Cell*, 1992)。vcPGCs や EG 細胞として樹立してくる細胞は、それを回避し且つ、再プログラム化が成されたごく一部の細胞である。これまでの予備実験から、大量に始原生殖細胞が採取可能な 12.5 日胚を用い、且つビタミン C の添加による初代培養後 2 日後であれば、十分な数の初期化プロセス過程にある始原生殖細胞が採取出来ることが分かっている。(1)培養前、(2)培養 2 日後、(3)樹立後の 3 点で SSEA-1 の表面抗原を用いた免疫的採集を行い、EG 細胞ならびに vcPGC 細胞樹立過程におけるゲノムワイドなメチル化解析に十分な数の細胞を採取しようと考えている。

4. 研究成果

我々は上記 vsPGC の細胞特性の解析を進めた結果、三胚葉から成るテラトーマ形成が認められたことから多能性幹細胞であることが明らかになる一方、従来の ES/EG 細胞と異なり、vcPGC 細胞株は樹立・維持いずれにおいても LIF などの成長因子への依存性が無く、通常マウス繊維芽細胞などに用いられる 10%血清入り基本培地のみで、多能性および自己増殖能を維持出来ることが分かった。加えて、ES/EG 細胞の特性である胚盤胞注入によるキメラ形成能を全く持っていない一方で、小分子化合物(2i)の添加によってまるでスイッチを切り替えるかのようにキメラ形成能を獲得するという、従来のいかなる多能性幹細胞も持ち合わせていない特性を持つことから、我々はこの vcPGC 細胞が新規ナイブ型多能性幹細胞であるとの結論に至った。

当該研究課題において我々は、エピジェネティック修飾分子として機能する種々の低分子化合物を培養下に添加することで、マウス始原生殖細胞から従来の EG 細胞とは大きく異なる性質を持つ多能性幹細胞を作製することに成功した。当該研究においてエピジェネティック修飾分子の添加によるマウス始原生殖細胞の「再プログラム化」を報告し、そのようにして樹立された多能性幹細胞が従来のナイブ・プライム型の多能性とは大きく異なる性質を持っていることを、細胞生物学的な解析のみならず、RNA シーケンスを含めた大規模解析の結果も合わせて報告する。

上記の結果は、EG 細胞樹立に代表される従来型の再プログラム化とは異なるアプローチを用いることで、マウス始原生殖細胞から様々な多様な性質を持つ多能性幹細胞が樹立されたことから、マウス始原生殖細胞の再プログラム化を目的とした培養は「多様な多能性スペクトル」を研究する上でも高い潜在性を持つことを示しており、今後その有用なモデルになることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- 1) Yuri An, Tamotsu Sekinaka, Yukiko Tando, Daiji Okamura, Keiko Tanaka, Yumi Ito-Matsuoka, Asuka Takehara, nobuo yaegashi, Yasuhisa Matsui., Derivation of pluripotent stem cells from nascent undifferentiated teratoma. *Dev Biol.*, 2019 Feb 1;446(1):43-55 (査読有り)
- 2) Efficient derivation of stable pluripotent bovine embryonic stem cells. Yanina Soledad Bogliotti, Jun Wu, Marcela Vilarino, Okamura D, Delia Soto, Masahiro Sakurai, Rafael Vilar Sampaio, Keiichiro Suzuki, Juan Carlos Izpisua Belmonte, Pablo Juan Ross. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 27; 115 (9) 2090-2095, 2018 (査読有り)
- 3) CRISPR-Cas9 mediated one-step disabling of pancreatogenesis in pigs. Wu J, Vilarino M, Suzuki K, Okamura D, Bogliotti YS, Park I, Rowe J, McNabb B, Ross PJ, Belmonte JCI. *Sci Rep.* 2017 Sep 5;7(1):10487. (査読有り)

- 4) Interspecies Chimerism with Mammalian Pluripotent Stem Cells.
Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, Sugawara A, Gil MA, Yamauchi T, Suzuki K, Bogliotti YS, Cuello C, Morales Valencia M, Okamura D, Luo J, Izpisua Belmonte JC.
Cell. 2017 Jan 26; 168(3):473-486 (査読有り)
- 5) Loss of MAX results in meiotic entry in mouse embryonic and germline stem cells.
Suzuki A, Hirasaki M, Hishida T, Wu J, Okamura D, Ueda A, Nishimoto M, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Matsui Y, Izpisua Belmonte JC*, Okuda A*.
Nat Commun. 2016 Mar 30;7:11056 (査読有り)

〔学会発表〕(計2件)

- 2018年 分子生物学会・ワークショップ(口頭発表)
「多能性幹細胞のエネルギー代謝による制御」
岡村大治, 田中法子, 佐渡敬
2017年 分子生物学会年会・ワークショップ(口頭発表)
「マウス始原生殖細胞が生み出す多様な多能性スペクトル」
岡村大治, 鴻原葵, 佐渡敬

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。