

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08578

研究課題名(和文) 1倍体ES細胞の半数性・多能性維持関与因子の同定および可逆的な倍数性制御の検討

研究課題名(英文) Identification of factors involved in the maintenance of haploidy and pluripotency of haploid ES cells

研究代表者

李 知英 (LEE, Jiyong)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：20402860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では1倍体ES細胞の半数性維持に関連するシグナルカスケードを解明することを目指し、半数性維持効率上昇のための新規ターゲット探索と効果検証を行ない、14-3-3 蛋白質の阻害剤R18が高効率な細胞増殖性を示すとともに半数性維持能力を示すこと、ROCK inhibitorであるY27632が1倍体ES細胞の細胞死を防ぐことを明らかとした。さらに、ES細胞においてインプリンティング領域のDNAメチル化状態の安定的な維持のために、FBS+2i培地が有効であることを見だした。したがって、半数性維持のための培養条件の最適化及びエピジェネティックに安定なES細胞の培養条件が確立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物に見られる多様な表現型の解明には限界があるため、希望の表現型をもたらす遺伝子変異をスクリーニングするフォワードジェネティクスの方がより根本的な解決策となるため、1倍体ES細胞はこの実験系に大変有効である。本研究では半数性維持に効果的な阻害剤を見出すとともにエピジェネティックに安定なES樹立と維持条件を確立したため、これらの安定的な培養条件は幅広い有用性を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the signal cascade related to the maintenance of haploidy of haploid ES cells, and performed search for new targets to increase the haploid maintenance efficiency. As a result, it was revealed that the 14-3-3 protein inhibitor R18 exhibits high efficiency of cell proliferation and haploid maintenance ability, and that the ROCK inhibitor, Y27632 prevents the apoptosis of haploid ES cells. Thus, stable establishment of haploid ES cells and optimal culture conditions were established.

Also, the instability of epigenetic states such as DNA methylation in ES cells is one of the problems in using ES cells for regenerative medicine. In this study, we demonstrated that FBS+2i condition is particularly effective in preventing epigenetic instability during both ES establishment and maintenance. Therefore, this condition is useful as the culture condition of epigenetically stable ES cells.

研究分野：生物学

キーワード：1倍体ES細胞 ES細胞 半数性

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

### 1. 研究開始当初の背景

生物の生存に有益である2倍体の核型は、特定の表現型をつかさどる未知の遺伝子を探索するフォワードジェネティクス研究においてヘテロ変異体では表現型が見られないため弱点となる。そこで、近年 Leebら (Leeb & Wutz Nature 2011) はマウス単為発生胚のプラストシストからES細胞を樹立し、FACSにより1倍体 (haploid) ES細胞樹立に成功し、これらの細胞は遺伝的なスクリーニングに有効であると考えられた。しかし、1倍体ES細胞は培養すると2倍体になってしまうことで、半数性 (haploidy) 維持のための改善が必要であった。そこで、申請者はparthenogenetic haploid ESC (phESC; パルセノジェネティック1倍体ES細胞)が2倍体化する理由として、1倍体細胞の細胞周期の一時的破綻 (G2 arrest、S・G2重複) 考え、G2 arrest阻害剤であるPD166285 (Wee1 kinase inhibitor) を用いて半数性維持機構を明らかにした (Takahashi & Lee et al. Development 2014)。遺伝子の機能を決定する方法論の主流は、既存の遺伝子の変異体を作成 (KOマウス等) するリバースジェネティクスであるが、生物に見られる多様な表現型の解明には限界があるため、希望の表現型をもたらす遺伝子変異をスクリーニングするフォワードジェネティクスの方がより根本的な解決策となるため1倍体ES細胞の安定な維持は重要な点であると考えられた。

### 2. 研究の目的

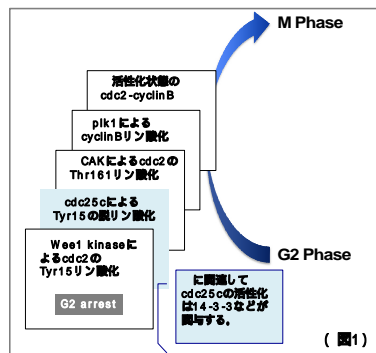
本研究では半数性・多能性維持・分化に関与する細胞周期関連分子機構を明らかにすることで、より安定でフォワードジェネティクスに効果的な細胞株の作成・維持することを目的とする。これまでの研究成果をもとに、本研究では1倍体ES細胞の半数性・多能性維持に関連するシグナルカスケードを明らかにするための基礎的研究を重点的に行い、可逆的な倍数性の制御が可能か検討し、将来的には1倍体ES細胞を用いた再生医療やフェノタイプスクリーニングに役に立つ基盤知識を見出すことを目指す。具体的な研究項目は下記の通りである。

- (1) 細胞周期調節による半数性維持のための培養条件の最適化を実現するために、
  - 1倍体ES細胞におけるG2/M期移行に関連した因子の解析  
:cdc2及びcyclinB複合体のリン酸化制御を重点的に調査  
半数性維持効率上昇のための新規ターゲット探索と効果検証する。  
:Wee1阻害剤によるG2/M期移行の制御以外に、14-3-3の阻害剤やantagonistの1倍体ES細胞の半数性維持に関連した役割を調べる。
- (2) ES細胞のインプリンティング領域DNAメチル化揺らぎと幹細胞活性における培養条件の影響を調べるために、ES細胞の培地条件によるDNAメチル化の変化、細胞性質、*in vivo* stem cell activityについて検討し、多能性幹細胞のDMRのメチル化を安定に維持する条件を見出す。

### 3. 研究の方法

- (1) 細胞周期調節による半数性維持のための培養条件の最適化  
申請者の前回の研究で細胞周期のG2期からM期への変換を抑制するWee1阻害剤はPD166285とMK1775両方とも1倍体ES細胞の半数性維持に有効であることが明らかとなったが、その因子の作用は100%ではなかったため、より安定な培養条件の最適化が必要である。

#### a. 1倍体ES細胞におけるG2/M期移行に関連した因子の解析



G2/M期移行に必要なcyclinBとcdc2の複合体が活性化するには色々な細胞周期関連因子、脱リン酸化酵素、リン酸化酵素が作用する(図1)。特に、chk25によってSer216がリン酸化されたcdc25は14-3-3との結合によって不活性化状態になる。これはplx1によって14-3-3が放出されることや新たにThr48がリン酸化された活性化状態のcdc25cになる。したがって、本研究では1倍体ES細胞において、G2からM期への変換におけるcyclinB、cdc2複合体のリン酸化及びそれに関連した因子のリン酸化を詳細に調べる。実験としてはリン酸化抗体を用いた免疫染色による定性解析を行った。

#### b. 半数性維持効率上昇のための新規ターゲット探索と効果検証

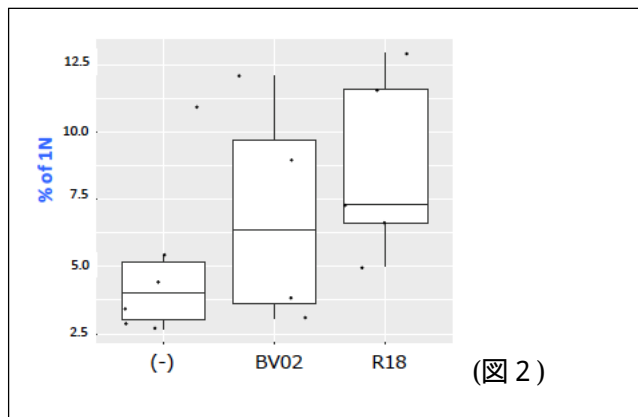
Wee1阻害剤によるcyclinB、cdc2複合体の制御だけではなくその近傍で働く因子もターゲットとする。たとえば、14-3-3の阻害剤(R18)やantagonistであるBV02の効果を検証した。ES細胞樹立時に上記のWee1阻害剤(PD166285、MK1775)、14-3-3阻害剤・antagonist(R18・BV02)を添加して1倍体ES細胞樹立効率が上昇するか否かを確認した。1倍体ES細胞の培養中に14-3-3阻害剤・antagonist(R18・BV02)を添加して1倍体ES細胞効率が上昇するか否かを確認した。ソーティング後の1倍体ES細胞の生存率が急激に下がる(細胞死; apoptosisが増加する)ことを防ぐために、ROCK inhibitorであるY27632の効果について検討を行った。

## 2. ゲノムインプリンティング領域の正常な DNA メチル化維持に有効な ES 細胞培養条件探索

エピジェネティック修飾の代表的な DNA メチル化は遺伝子発現調節に重要なエピジェネティック機構であり、特に哺乳類の発生に必須なゲノムインプリンティングの消去と再確立のリプログラミング過程で重要な役割を果たす。インプリンティング遺伝子の制御領域に存在する differentially methylated region (DMR) の正常な DNA メチル化パターンは体細胞において維持される。一方で、増殖、自己複製、多能性細胞である ES 細胞のメチル化状態は培地条件、培養期間によって影響され、エピジェネティックな不安定性を示す。したがって、多能性を維持したままインプリンティング領域の DNA メチル化を安定にする培養条件を探す必要がある。そこで、本研究では多能性幹細胞の DMR のメチル化を安定に維持する条件を見出すために、ES 細胞の培地条件による DNA メチル化の変化、細胞性質、*in vivo* stem cell activity について検討した。具体的には、KSR ( Knockout serum replacement ) 培地と FBS ( Fetal bovine serum ) 培地を用いて、2i ( Gsk3 、 Mek1/2 阻害剤 ) を添加した条件、添加しない条件で ES 細胞のメチル化状態を長期的に調べた。さらに、ES 細胞樹立時から DNA のメチル化状態が不安定な状態であることから、より安定なメチル化状態の ES 細胞を樹立できる条件を探索した。

### 4. 研究成果

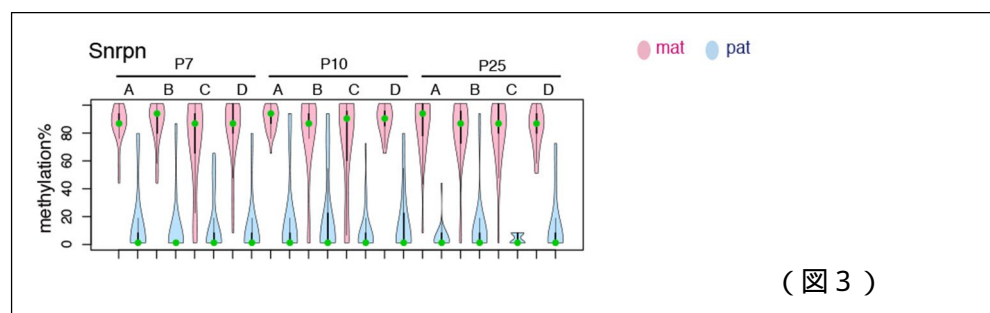
(1) 本研究では 1 倍体 ES 細胞の半数性および多能性維持に関連するシグナルカスケードを解明することを目指し、半数性維持効率上昇のための新規ターゲット探索と効果検証を行った。Wee1 阻害剤による cyclinB, cdc2 複合体の制御だけではなくその近傍で働く因子 (14-3-3) もターゲットとして、それらの阻害剤や antagonist (R18, Difopein, BV02) の効果を検証した結果、14-3-3 蛋白質の阻害剤 R18 添加培地は、高効率な細胞増殖性を示すとともに半数性維持能力を示すことが明らかとなった。特に、R18 を添加して培養した 1 倍体 ES 細胞は Oct3/4, Nanog, SSEA1 などの幹細胞マーカーを発現し、1 倍体としての核型を示したので、R18 は半数性維持および多能性維持に有効であることが明らかとなった。また、R18 と BV02 を用いて 14-3-3 を阻害することで 1 倍体 ES 細胞の樹立初期の 1 倍体細胞の比率が著しく上昇した ( 図 2 ) 。



( 図 2 )

さらに、最初のソート後の 1 倍体 ES 細胞に ROCK inhibitor である Y27632 を添加することによってソート後の 1 倍体 ES 細胞の細胞死を防ぐことができた。したがって、本研究では多様な阻害剤を用いることで 1 倍体 ES 細胞の半数性・多能性維持に関連する細胞周期を調節可能にし、1 倍体 ES 細胞の安定的な樹立及び最適な培養条件を確立した。本研究で改善された培養法は、1 倍体 ES 細胞株を用いたフォワードジェネティクス研究の推進には欠かせないものであり、フェノタイプスクリーニングの拡大の道を開くなど非常に高い実用性も持っている。近年、2 倍体細胞でも CRISPR/Cas9 法でホモ欠失体を分離できるようになり、リバースジェネティクス研究は多に進んだが、フォワードジェネティクスにおける 1 倍体細胞の優位性は変わらないため、本研究で半数性の維持をより完璧に制御できる実験系を構築したのはフェノタイプスクリーニングを基盤とした多様な疾患の原因遺伝子解明などに大変貢献できると考えられる。

(2) ES 細胞において DNA メチル化などのエピジェネティック状態が不安定であることは、再生医療に ES 細胞を利用する際の問題点として挙げられる。



( 図 3 )

特に、1倍体、2倍体ES細胞において、哺乳類の発生に重要なエピジェネティック機構であるゲノムインプリンティング遺伝子のメチル化領域のDNAメチル化状態が不安定であることから、ES細胞のエピジェネティックな安定性を保つ培養条件を探索した。KSR+2i, KSR, FBS+2i, FBSの条件と培養期間を検討した所、培地と培養期間によって様々なDNAメチル化の動的変化(脱メチル化、高メチル化を含む)が検出された。また、これらの細胞における遺伝子発現解析から、phase specificな脱メチル化はKSR+2iによるTet1およびParp1遺伝子の発現上昇と関連していることが明らかとなった。さらに、これらの研究からFBS+2i培地を使うことで、ES細胞のDNAメチル化維持と正常なDNAメチル化を保つES細胞の樹立ができた(図3)ので、この条件はエピジェネティックに安定なES細胞の培養条件としてES細胞やiPS細胞の再生医療へ応用する際に大変有用であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Lee J\*, Matsuzawa A, Shiura H, Sutani A, Ishino F. Preferable in vitro condition for maintaining faithful DNA methylation imprinting in mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells* 2018, 23, 146-160 (\* corresponding author)  
DOI: 10.1111/gtc.12560

〔学会発表〕(計 1件)

Lee J, Matsuzawa A, Shiura H, Sutani A, Ishino F. Epigenetic instability of imprinting regions in mouse embryonic stem cells caused by in vitro environments.  
KEY Forum: The 3rd International Symposium on Stem Cell Traits and Developmental Systems  
口頭、2018年1月11日-12日、熊本

〔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。