

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19188

研究課題名（和文）母性因子を用いた新たな体細胞核リプログラミング法の開発

研究課題名（英文）Somatic cell nuclear reprogramming by maternal factors

研究代表者

中村 肇伸（Nakamura, Toshinobu）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：80403202

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：哺乳類成熟卵子は、最終分化した細胞のエピゲノム情報をリプログラミングし、全能性を再獲得させる能力を有している。本研究では、全能性細胞で特異的に発現する遺伝子群（全能性細胞特異的遺伝子）を用いた高品質iPS細胞作製法を開発することを目的とした。その結果、全能性特異的遺伝子の中には、iPS細胞の樹立効率を上昇させる遺伝子と低下させる遺伝子があることが明らかとなった。また、一部の遺伝子では、iPS細胞誘導初期にのみ発現させた場合に、Nanog陽性iPS細胞の割合が高くなることが示された。今後、作製したiPS細胞の分化能等の品質について検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、全能性を有する初期の着床前胚で特異的に発現する9個の遺伝子について、iPS細胞の樹立効率と品質に及ぼす影響を検討した。その結果、Pramef12をiPS誘導初期の4日間だけ発現させることにより、Nanog陽性iPS細胞の割合が高くなることを見出した。今後、作製したiPS細胞の分化能を含めた品質について検討することにより、従来のiPS細胞よりも品質の高いiPS細胞が樹立できる可能性がある。また、本研究で扱った遺伝子には全てヒトホモログが存在するため、Pramef12がヒトのiPS細胞の品質向上にも利用できる可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mammalian mature oocytes have the ability to reprogram the epigenomic information of the terminally differentiated cell to reacquire totipotency. In this study, we aimed to develop a method for generating high-quality iPS cells using a set of genes specifically expressed in totipotent cells (totipotent cell-specific genes). We revealed that some genes increase and some decrease the efficiency of iPS cell derivation. We found that some genes increased the percentage of Nanog-positive iPS cells compared to that of control iPS cells when they were expressed only in the early stages of iPS cell induction. In the future, we plan to investigate the quality of the generated iPS cells, including their differentiation ability.

研究分野：生殖細胞学

キーワード：母性因子 iPS細胞 体細胞核リプログラミング 品質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の個体発生は、精子と卵子が受精することにより開始される。精子と卵子は遺伝情報を次世代に伝えるために特殊化した細胞であるが、受精を経て体を構成するすべての細胞に分化する「全能性」と呼ばれる能力を再獲得する(図1)。研究代表者らは、全能性細胞に高発現する Tet3 と PGC7 (Stella, Dppa3) が、それぞれ受精後に生じる能動的 DNA 脱メチル化とその制御に関与することを明らかにしてきた (1-3)。さらに、これらの研究成果を発展させ、PGC7 を用いて人為的に DNMT3A の機能を抑制することにより、ES 細胞に近い遺伝子発現を示す高品質 iPS 細胞を誘導することに成功していた (4)。PGC7 と同様に卵細胞で高発現するヒストン変異体 TH2A/B が iPS 細胞誘導時に“卵細胞特異的のリプログラミング機構”を活性化することも明らかにされていた (5)。このように、全能性を有する初期の着床前胚で高発現あるいは特異的に発現する遺伝子の中には、受精後の全能性再獲得に重要な遺伝子が含まれ、これらの遺伝子が新たな体細胞核リプログラミング法の開発に極めて有用であることが明らかにされつつあった。

2. 研究の目的

哺乳類成熟卵子は、最終分化した細胞のエピゲノム情報をリプログラミングし、全能性を再獲得させる能力を有している。研究代表者らは、母性因子の一つである PGC7 (Stella, Dppa3) が、受精後の全能性再獲得に必須であることを明らかにしてきた。また、その過程において全能性が獲得される時期に高い発現を示す機能未知遺伝子を複数個同定してきた。本研究では、全能性細胞で特異的に発現する遺伝子群を用いた高品質 iPS 細胞作製法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

MEF に山中因子 (Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc) と各全能性細胞特異的遺伝子 (Klf17, Btg4, Trim61, Pramef12, Rfp14, Zc3h6, Zbed3、および Zfp92) を発現させ、個々の遺伝子が iPS 細胞の誘導効率に及ぼす影響を検討した。iPS 細胞の誘導時のリプログラミングは、“開始”、“成熟”、および“安定化”(initiation, maturation, stabilization) の3つの段階を経て、確率論的に生じることが明らかにされている (6)。したがって、リプログラミングの開始に働く遺伝子が成熟や安定化にはむしろ阻害的に働くことが考えられる。そこで、MEF に山中因子を恒常的に発現させ、各全能性細胞特異的遺伝子を“開始”、“成熟”、および“安定化”の時期特異的に発現させ、個々の遺伝子が iPS 細胞の誘導効率に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

MEF に Btg4, Fbxw14, Klf17, Pramef12, Rfp14, Trim61, Zbed3, Zc3h6, Zfp92 または 9 つの全能性幹細胞特異的遺伝子を OKSM (Oct3/4, Klf4, Sox2 および c-Myc) と共にテトラサイクリン誘導プロモーターを有する PiggyBac Vector21 を用いて遺伝子導入し、4 日間または 14 日間 Dox を添加し、14 日目に iPS 細胞のコロニー数をカウントした (図1)。

その結果、Pramef12 を 4 日間発現させた場合には ALP (Alkaline phosphatase) 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が有意に増加し、14 日間発現させた場合には減少する傾向にあることが明らかとなった (図1)。

Btg4 を 4 日間と 14 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が有意に減少することが明らかとなった (図2)。

Trim61 を 4 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が増

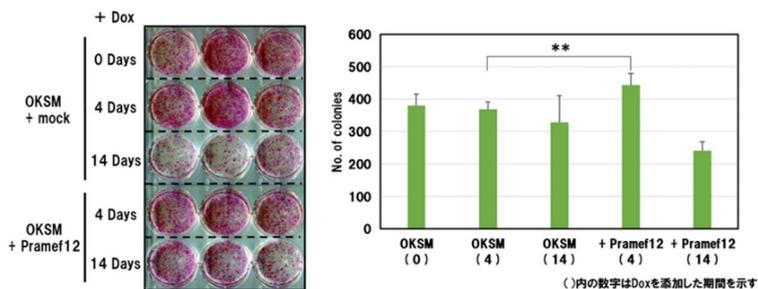


図1. Pramef12がiPS細胞の樹立効率に及ぼす影響
MEFにOKSMおよびPramef12を4日間、または14日間発現させ、14日後にALP染色を行った。

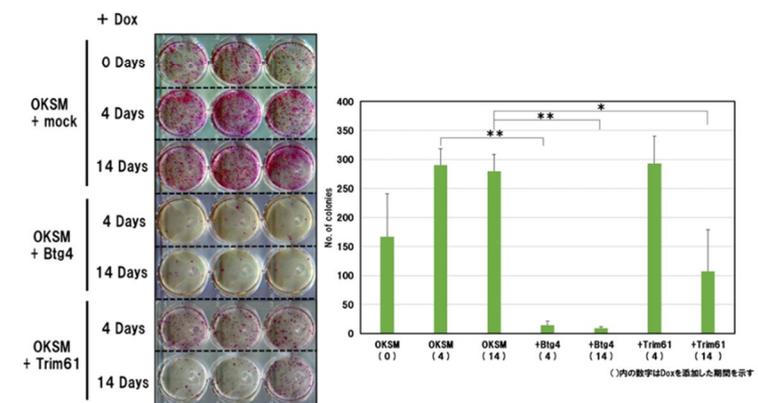


図2. Btg4およびTrim61がiPS細胞の樹立効率に及ぼす影響
MEFにOKSMおよびBtg4またはTrim61を4日間、または14日間発現させ、14日後にALP染色を行った。

加する傾向にあり、14日間発現させた場合にはALPで染色されるコロニーの数が有意に減少することが明らかとなった(図2)。

Klf17を4日間発現させた場合にはALP陽性のiPS細胞と推定されるコロニーの数が有意に減少し、14日間発現させた場合にはALPで染色されるコロニーの数が減少する傾向にあることが明らかとなった(図3)。Rfp14を4日間発現させた場合にはALP陽性のiPS細胞と推定されるコロニーの数が増加する傾向があり、14日間発現させた場合にはALPで染色されるコロニーの数が減少する傾向にあることが明らかとなった(図3)。

Fbxw14を4日間と14日間発現させた場合にはALP陽性のiPS細胞と推定されるコロニーの数が減少する傾向にあることが明らかとなった(図4)。Zfp92を4日間と14日間発現させた場合にはALP陽性のiPS細胞と推定されるコロニーの数が有意に減少することが明らかとなった(図4)。

Zbed3を4日間発現させた場合にはALP陽性のiPS細胞と推定されるコロニーの数が有意に減少し、14日間発現させた場合にはALPで染色されるコロニーの数が減少する傾向にあることが明らかとなった(図5)。Zc3h6を4日間と14日間発現させた場合にはALP陽性のiPS細胞と推定されるコロニーの数が減少する傾向にあることが明らかとなった(図5)。

次に、iPS細胞誘導初期の4日間だけPramef12を発現させて作製したiPS細胞(Pramef12(4)-iPS)について、多能性幹細胞のマーカであるOct3/4とNanogのタンパク質の発現について検討した。その結果、Pramef12(4)-iPSでは、コントロールのiPS細胞よりNanog陽性細胞の割合が有意に増加することが明らかとなった。今後、他の遺伝子を用いたiPS細胞のNanog陽性細胞の割合を検討するとともに、分化能を含めたiPS細胞の品質についても検討する予定である。

<引用文献>

1. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, Tanaka S, Shiota K, Nakano T.
PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis.
Nat Cell Biol. 2007 Jan;9(1):64-71.
2. Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J.
5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic

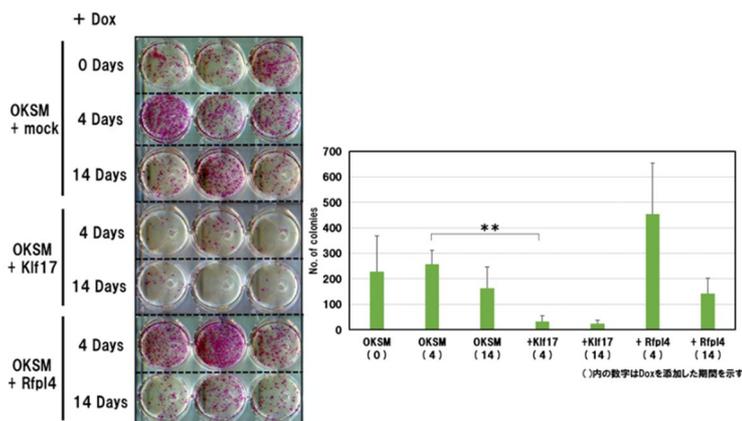


図3. Klf17およびRfp14がiPS細胞の樹立効率に及ぼす影響
MEFにOKSMおよびKlf17またはRfp14を4日間、または14日間発現させ、14日後にALP染色を行った。

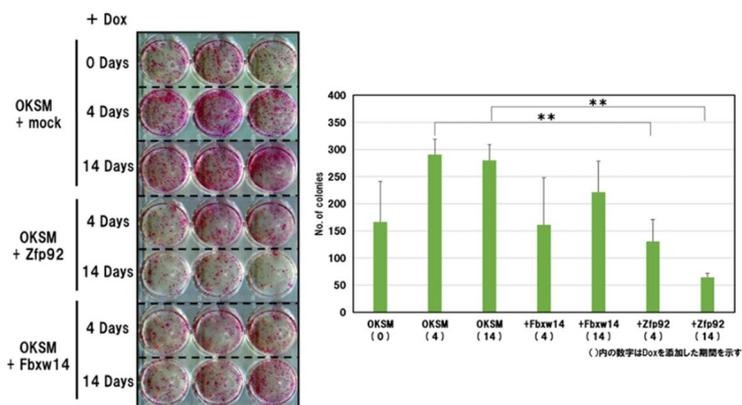


図4. Zfp92およびFbxw14がiPS細胞の樹立効率に及ぼす影響
MEFにOKSMおよびZfp92またはFbxw14を4日間、または14日間発現させ、14日後にALP染色を行った。

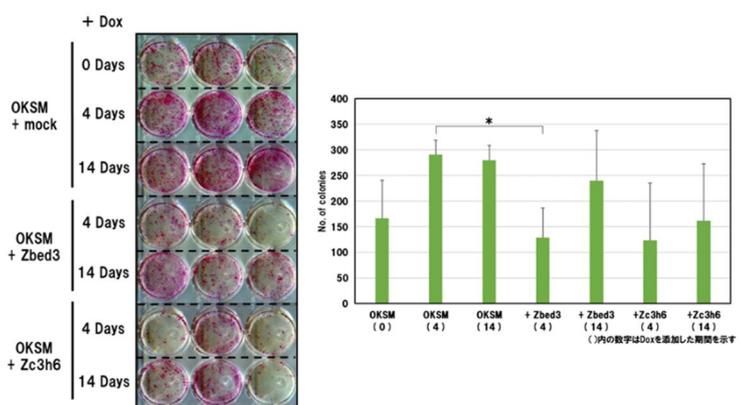


図5. Zbed3およびZc3h6がiPS細胞の樹立効率に及ぼす影響
MEFにOKSMおよびZbed3またはZc3h6を4日間、または14日間発現させ、14日後にALP染色を行った。

reprogramming.
Nat Commun. 2011;2:241.

3. Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T.
PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos.
Nature. 2012 Jun 3;486(7403):415-9.
4. Xu X, Smorag L, Nakamura T, Kimura T, Dressel R, Fitzner A, Tan X, Linke M, Zechner U, Engel W, Pantakani DV.
Dppa3 expression is critical for generation of fully reprogrammed iPS cells and maintenance of Dlk1-Dio3 imprinting.
Nat Commun. 2015 Jan 23;6:6008.
5. Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K, Ishii S.
Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells.
Cell Stem Cell. 2014 Feb 6;14(2):217-27.
6. Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, Klemm SL, van Oudenaarden A, Jaenisch R.
Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase.
Cell. 2012 Sep 14;150(6):1209-22.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中村肇伸	4. 巻 69
2. 論文標題 タンパク質・核酸の分子修飾～ヒドロキシメチル化～	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 386-387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.11477/mf.2425200841	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 水上 民夫、小野 公輔、細井 美穂、土田 美江、西郷 甲矢人、中村 肇伸、長谷川 慎、佐々木 隆造、根本 茂、岸本 克己
2. 発表標題 「細胞の見える化」技術による幹細胞の未分化・分化識別法の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原口 大生、中村 肇伸
2. 発表標題 Pramef12がiPS細胞誘導過程に与える影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoichi Sekita, Yuki Sugiura, Akari Matsumoto, Yuki Kawasaki, Toshiaki Ito, Kazuya Akasaka, Terushi Yamazaki, Ryo Konno, Toshinobu Nakamura, Fumitoshi Ishino, Yoshio Kodera, Takashi Kohda, Tohru Kimura
2. 発表標題 AKT signaling promotes epigenetic reprogramming through transcriptional and metabolic shift during iPSC generation
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	鳥山 敬祐、Au Yeung Wan Kin、井上 梓、大石 裕晃、中村 肇伸、仲野 徹、Zhang Yi、佐々木 裕之
2. 発表標題	卵子および着床前胚のDNAメチル化リプログラミングにおけるStellaの役割
3. 学会等名	第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	古田 明日香、中村 肇伸
2. 発表標題	ES細胞は代謝シフトを介して全能性細胞へと変化する
3. 学会等名	第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	小野 公輔、細井 美穂、土田 美江、西郷 甲矢人、中村 肇伸、長谷川 慎、佐々木 隆造、根本 茂、岸本 克己、水上 民夫
2. 発表標題	「細胞の見える化」技術による幹細胞の未分化・分化識別法の開発
3. 学会等名	第10回スクリーニング学研究会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	細井 美穂、小野 公輔、土田 美江、西郷 甲矢人、中村 肇伸、長谷川 慎、佐々木 隆造、根本 茂、岸本 克己、水上 民夫
2. 発表標題	「細胞の見える化」技術による胚様体の未分化率定量法の開発
3. 学会等名	第10回スクリーニング学研究会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名 古田 明日香、中村 肇伸
2. 発表標題 ES細胞は代謝シフトを介して全能性細胞へと変化する
3. 学会等名 第112回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Asuka Furuta, Toshinobu Nakamura
2. 発表標題 Energy metabolism in ESCs and early embryonic-like cells
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原口 大生、中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞特異的遺伝子を用いた高品質iPS細胞の作製
3. 学会等名 第13回エビジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村 七海、井上 有香、水上 民夫、細井 美穂、土田 美江、中村 肇伸、神波 誠治、近藤 孝志、長谷川 慎
2. 発表標題 金属メッシュデバイスによる細胞および細胞塊の膜分離技術の開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞で高発現する遺伝子群の機能解析
3. 学会等名 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」成果取りまとめ公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 志津江、劉 琳琳、伊川 正人、中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞で高発現するZc3h6の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原口 大生、中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞特異的遺伝子を用いた高品質iPS細胞の作製
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥山 敬祐、Au Yeung Wan Kin、井上 梓、大石 裕晃、中村 肇伸、仲野 徹、Zhang Yi、佐々木 裕之
2. 発表標題 卵子および着床前胚発生のDNAメチル化リプログラミングにおけるStellaの役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関田 洋一、杉浦 悠毅、松元 愛香里、川崎 佑季、伊藤 駿瑛、赤坂 和哉、山崎 瑛司、紺野 亮、中村 肇伸、石野 史敏、小寺 義男、幸田 尚、木村 透
2. 発表標題 Aktシグナルは、iPS細胞誘導過程で、転写と代謝のシフトを介してエピジェネティックリプログラミングを促進する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshinobu Nakamura
2. 発表標題 Critical function of Klf17 for the zygotic genome activation in mice
3. 学会等名 The 6th International Conference on Biology and Pathobiology of KLF/Sp Transcription Factors (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Asuka Furuta, Toshinobu Nakamura
2. 発表標題 Glycolysis metabolic pathway was repressed in totipotent fraction in ES cell cultures
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 比留田 圭佑、古田 明日香、武藤 真長、伊川 正人、中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞で高発現するTrim61の機能解析
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小畑 駿吾、中田 健太、武藤 真長、伊川 正人、中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞で特異的に発現するRfpl4の機能解析
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新地 葵、稲岡 京介、古田 明日香、武藤 真長、伊川 正人、中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞で高発現するPramef12の機能解析
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 志津江、劉 琳琳、伊川 正人、中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞で高発現するZc3h6の機能解析
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞野 友裕、宮木 杏菜、伊川 正人、中村 肇伸
2. 発表標題 全能性細胞で特異的に発現するZbed3の機能解析
3. 学会等名 第111回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----