

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06459

研究課題名(和文) 転写因子Esrrbを介した129系統マウスES細胞の安定な自己複製機構

研究課題名(英文) Robust self-renewal in 129 strain derived ESCs established by Esrrb

研究代表者

大塚 哲(OHTSUKA, SATOSHI)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40360515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまで血清条件下においてNOD系統に由来するES細胞は樹立と自己複製の維持することができなかった。本研究により129系統特異的に発現が維持される転写因子としてEsrrbを同定した。このEsrrbの発現維持により、これまで阻害剤フリーの血清条件下においてES細胞株の樹立ができなかったNOD系統に由来するES細胞株の樹立に成功した。ChIP-qPCR法により、このES細胞においてLIF-Stat3経路の活性化の亢進が認められた。血清条件下におけるES細胞の自己複製には129系統型のStat3のゲノム結合パターンが重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果をもとに、ナイーブ型幹細胞の樹立と維持が、ヒトを含む哺乳類からも可能となり、再生医学へ大きく貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Mouse embryonic stem cells (mESCs) have been established in conventional serum culture. mESCs derived from 129 mouse strain are stably self-renewing in serum culture. In contrast, mESCs from non-obese diabetic (NOD) mouse strain is not yet maintained in serum culture. In this project, we tried to explore why ESCs from 129 strain were stably established and continued to self-renew in serum culture. We identified transcription factor Esrrb which was specifically retained in 129-ESCs. Maintaining the expression of Esrrb in 2i-established NOD-ESCs allowed self-renewal in an inhibitor-free serum condition. Esrrb enhanced LIF-Stat3 activity in NOD-ESCs at a similar level to that in 129-ESCs. These results indicate that Esrrb supports 129-ESCs self-renewal in serum through enhancing LIF-Stat3 as well as Tfcp2l1 does.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ES細胞 LIFシグナル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マウス ES 細胞は、マウスの 3.5 日胚(胚盤胞)の内部細胞塊に由来し、サイトカイン LIF(Leukemia inhibitory factor)存在下で自己複製する多能性幹細胞である。この ES 細胞において、これまで様々なマウス系統に由来する細胞株の樹立が試みられ、ES 細胞の樹立と維持は、培養条件および遺伝的背景(マウス系統)に強く依存することが分かった。例えば、血清条件下において ES 細胞の自己複製が可能なマウス系統(129 系統が代表)と、そうでないマウス系統(NOD 系統など)が知られている。しかし、なぜ ES 細胞において、血清条件下での自己複製にマウス系統差があるのか、その原因は分かっていなかった。

そこで、この原因を明らかにするために、GSK3 および MAPK に対する 2 個の阻害剤を含んだ無血清 2i 培養法を用いて、我々は様々なマウス系統から ES 細胞を独自に樹立した。そして、129Sv、C57BL/6、Balb/c、CBA/ca、FVB/N、Msm および NOD 系統に由来する ES 細胞株の間での比較を行い以下の 2 点が判明した。

(1) 異なったマウス系統に由来する ES 細胞は、LIF に対して異なった応答をする。すなわち、129 系統 ES 細胞(129-ES)においては、LIF への応答性が高く、一方で NOD 系統由来 ES(NOD-ES)細胞では LIF 応答性が低い。

(2) ES 細胞の血清条件下での自己複製には、129-ES 型の LIF 応答性を示すことが必須である。

これらのことから、ES 細胞で 129-ES 型の LIF 応答性と血清条件下での自己複製能の相関を見出していた。しかしながら、依然として血清条件下において、129 系統に由来する ES 細胞が安定に自己複製できる機構に関して、その詳細については不明のままであった。

### 2. 研究の目的

以前の我々の結果から、129 系統と NOD 系統に由来する ES 細胞において、LIF による Stat3 の活性化に違いがあり、Stat3 が強く活性化されることが血清条件下における自己複製を支えていることを報告した。本研究課題では、血清条件下の 129 系統 ES 細胞に特異的に発現維持される転写因子 Esrrb に着目し、129 系統 ES 細胞における自己複製の安定性が、どのように支持されているのかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

血清条件で短期間培養した 129-ES 細胞と NOD-ES 細胞においてマイクロアレイによる遺伝子発現比較を行い、これらの各々を NOD-ES 細胞へ導入し、血清条件下での自己複製が可能かどうかを検討したところ、本研究の中心となる Esrrb を同定した。この Esrrb は ES 細胞を血清条件下で培養すると、129 系統 ES 細胞ではその発現が維持できたが、NOD 系統由来 ES 細胞においては 2 日以内にタンパクと転写レベルで消失してしまう。そこで、本研究課題において、この転写因子 Esrrb による血清条件下における自己複製の維持について解析を行なった。

ES 細胞の自己複製における Esrrb の機能解析の実験系として、2i 培養法を用いて樹立した ES 細胞における Esrrb の機能を検討する。NOD 系統 ES 細胞において Esrrb の安定発現株を樹立し Gain-of-function の表現型を明らかにする。安定発現株作製には、まず Esrrb cDNA を 2 個の loxP 配列で挟み込み、Cre リコンビナーゼにより人為的に除去できる発現系として、pCAG-flox- Esrrb - DsRed-IRES-pacpA プラスミドを導入する。この ES 細胞において MerCreMer 安定発現株を樹立する。この ES 細胞において、タモキシフェン (Tx) の培地への添加によって外来性 Esrrb を除去でき、外来性 cDNA 除去後は DsRed 陽性となる ES 細胞実験系を用いた。この系を用いて Esrrb により血清条件下において、NOD 系統 ES 細胞の自己複製が可能かどうかを検討する。さらに外来性 Esrrb を NOD 系統マウス由来の前核期受精卵へ注入し、その後胚盤胞期まで発生した初期胚を用いて血清条件下において ES 細胞樹立が可能かどうかを検討した。

#### 4. 研究成果

NOD 由来 ES 細胞において外来性 Esrrb 安定発現株は血清条件下において自己複製を維持することができるようになった。この細胞を血清条件下において1ヶ月間継代した後、Tx 添加により外来性 Esrrb を除去すると NOD 由来 ES 細胞は自己複製を維持することができなかった。そのため外来性 Esrrb 除去後の ES 細胞を 2i 培養条件下においてクローニングし、1個の ES 細胞を1個の胚盤胞へ注入し多能性を検討したところキメラ胚が高効率で確認できた。このことから、Esrrb の発現を維持することで NOD 由来 ES 細胞は長期間、阻害剤フリーの血清条件下において自己複製を維持できることが明らかとなった。この結果は、2i を用いて一旦樹立された ES 細胞における知見で、一旦ナイーブ状態に捕捉された ES 細胞において、Esrrb の発現を維持することで自己複製を支持できることを示した。

さらに、Esrrb の前核期受精卵への導入によって、NOD 由来初期胚から 2i フリーな血清条件下においてもナイーブ状態の ES 細胞を捕捉することができた。これらの結果から、Esrrb によって NOD 系統に由来するナイーブ型 ES 細胞は血清条件下において樹立と自己複製を維持することができることが明らかとなった。

これらの NOD 由来 ES 細胞において LIF 添加による下流遺伝子群の発現誘導を検討したところ、Socs3、Klf4 など LIF 標的遺伝子の誘導効率が 129 由来 ES 細胞における効率と同等になっていることが明らかとなった。

本研究課題で実施した一連の研究から Esrrb の ES 細胞の自己複製における機能の一旦を明らかにすることができた。これまで血清条件下において ES 細胞の樹立と自己複製の維持ができなかった NOD マウス系統 ES 細胞を阻害剤フリーな血清培養条件下において維持でき、その時 Stat3 のゲノム占有パターンは 129-ESC と同じパターンを示すことが明らかとなった。これらの結果について現在投稿準備を進めている。また、本研究課題において新たな課題が得られた。129 系統由来 ES 細胞とは大きく異なり、NOD 系統に由来する ES 細胞の血清条件下での自己複製は厳密に外来性遺伝子依存性である。今後はこの依存性についてその原因を明らかにすることを目標として研究を進めていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 大塚哲	4. 巻 11
2. 論文標題 動物実験施設の新築に際して決めておく基本事項	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 クリーンテクノロジー	6. 最初と最後の頁 61-65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 大塚哲	4. 巻 27
2. 論文標題 動物実験施設新設に際して（金沢医科大学のケース）	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験動物と環境	6. 最初と最後の頁 31-38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Kime Cody, Kiyonari Hiroshi, Ohtsuka Satoshi, Kohbayashi Eiko, Asahi Michio, Yamanaka Shinya, Takahashi Masayo, Tomoda Kiichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Induced 2C Expression and Implantation-Competent Blastocyst-like Cysts from Primed Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 485 ~ 498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshida Junko, Watanabe Hitomi, Yamauchi Kaori, Nishikubo Takumi, Isotani Ayako, Ohtsuka Satoshi, Niwa Hitoshi, Akutsu Hidenori, Umezawa Akihiro, Suemori Hirofumi, Takashima Yasuhiro, Kondoh Gen, Takeda Junji, Horie Kyoji	4. 巻 2021.06.22.
2. 論文標題 Inhibition of <i>myristoyltransferase</i> Promotes Naive Pluripotency in Mouse and Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 449326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.06.22.449326	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大塚哲
2. 発表標題 129系統マウス由来ES細胞における安定な自己複製の遺伝的な要因
3. 学会等名 実験動物技術者協会関東支部 R E G 部会第20回特別講演会（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------