

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21248039

研究課題名（和文）ES細胞から栄養膜幹細胞へのエピジェネティック制御

研究課題名（英文）Epigenetics on transdifferentiation of ES cells toward TS cells

研究代表者

田中 智（TANAKA SATOSHI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90242164

研究成果の概要（和文）：胚性幹（ES）細胞から栄養膜細胞への分化転換に伴うエピゲノムの形成機序を解析するために、BMP4 処理による分化転換における遺伝子発現動態の解析を行い、また、そこからの栄養膜幹（TS）細胞株の樹立を目指した。分化転換過程には TS 様細胞が存在することを明らかにしたが、得られた新規細胞株はむしろ胚体外胚葉由来幹細胞（EpiSC）に似た性質を有した。すなわち、本条件下での分化転換過程には、EpiSC 様細胞と TS 様細胞の両者が混在することが示唆される。

研究成果の概要（英文）：To elucidate if mESCs pass through TSC-like and/or EpiSC-like state during the process of BMP4-induced transdifferentiation, we investigated nature of intermediate cell population in the transdifferentiation process. Immunohistochemistry revealed the presence of TSC-like cell colonies only in the BMP4-treated cultures. We then subcultured BMP4-treated mESCs under the conditions for maintenance of TSCs, and consequently obtained a cell line. DNA microarray analysis revealed that the gene expression profile of then new cell line is more similar to that of EpiSCs compared to mTSCs and mESCs. These results suggest that BMP4-treated mESCs may transdifferentiate to TCs through two independent pathways. One is the pathway through mTSC-like state and the other through mEpiSC-like state.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2009年度 | 12,500,000 | 3,750,000 | 16,250,000 |
| 2010年度 | 11,200,000 | 3,360,000 | 14,560,000 |
| 2011年度 | 11,200,000 | 3,360,000 | 14,560,000 |
| 総計 | 34,900,000 | 10,470,000 | 45,370,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用分子細胞生物学

キーワード：胚性幹細胞、栄養膜細胞、細胞分化、分化転換

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、ゲノム DNA のメチル化状態に注目した解析を行い、任意のゲノム領域の DNA メチル化パターンは細胞種によって異なる場合があることを発見してきた。こうしたゲノム領域を細胞・組織特異的 DNA

メチル化領域（T-DMR）と命名し、多くの T-DMR のメチル化/非メチル化の組合せが細胞種に固有の「ゲノム DNA メチル化プロフィール」を形成することを提唱した（Shiota et al., *Genes Cells*, 7:961-9, 2002）。現在では、細胞種固有のゲノム DNA メチル化プロ

フィールとヒストン修飾パターンからなる「エピゲノム情報」が細胞種固有のトランスクリプトーム形成と維持の基盤になっているという考え方は広く受け入れられている。

全ての体細胞と生殖細胞に分化する能力を有する胚性幹細胞 (ES 細胞) は、胚盤胞の内部細胞塊 (ICM) より樹立される。一方、本研究代表者は、ICM を取り囲む栄養外胚葉 (Trophectoderm; TE) から、胎盤を構成する栄養膜細胞への分化能を有する栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を樹立した (Tanaka et al., *Science*, 282:2072-5, 1998)。マウスキメラ胚において TS 細胞が ICM に由来する胚体に寄与することはなく、逆に、ICM 由来の ES 細胞が胎盤の栄養膜細胞に分化することもない。

ES 細胞、および、TS 細胞の分化運命の制限には、エピゲノム情報をもとにした細胞記憶の関与が予想される。実際、我々は、ES 細胞と TS 細胞の比較によりそれぞれが特有の DNA メチル化プロファイルを有していることを明らかにしている (Shiota et al., *Genes Cells*, 7:961-9, 2002)。さらに、TS 細胞では、ES 細胞の多能性維持に重要な Oct4 と Nanog 遺伝子が DNA メチル化を含むエピジェネティック機構によって抑制されている事も発見した (Hattori et al., *JBC*, 279:17063-9, 2004; Hattori et al., *Genes Cells*, 12:387-96, 2007)。しかし、これらのエピゲノム情報は in vivo の細胞におけるそれを反映しているのか、またそうだとした場合の胚発生過程におけるエピゲノム形成機序は明らかにされていない。

マウス初期胚の場合、利用できるゲノム DNA が微量であるため、ゲノムワイドな DNA メチル化解析は非常に困難である。そのため、マウス ES 細胞を TE 細胞系列に分化転換し、かつ TS 細胞として維持することができれば、初期胚におけるエピゲノム形成過程の研究に有用な実験系となり得る。世界で最初に報告されたマウス ES 細胞の TS 細胞への分化転換には遺伝子操作が必要であった (Niwa et al., *Nat Genet*, 24:372-6, 2000; Niwa et al., *Cell*, 123:917-29, 2005)。その後、Wnt3a の添加や、Collagen IV 上での培養で遺伝子操作を施さずに ES 細胞の栄養膜細胞への分化転換を誘導できることが示されたが (He et al., *Stem Cells*, 26:842-9, 2008; Schenke-Layland et al., *Stem Cells*, 25:1529-38, 2007)、これらの条件で得られた TS 様細胞のキメラ形成能は示されていない。一方、連携研究者である古江らは、無血清培地で維持されたマウス ES 細胞が、BMP4 添加によって効率よく栄養膜細胞へと分化することを見出している (Hayashi et al., *In vitro Cell Dev Biol Anim*, 46:416-30, 2010)。古江らはこの条件下での TS 細胞株の樹立に

は至っていないが、分化誘導後の細胞を胚盤胞に注入することで、ES 細胞由来の細胞が胚体にほとんど分布せずほぼ胎盤のみに分布することを確認している。すなわち、BMP4 添加により、TS 細胞様の性質を獲得した細胞が得られている可能性は非常に高い。

2. 研究の目的

本研究計画では、古江らの分化誘導条件を用いて ES 細胞の栄養膜細胞への分化転換を誘導し、そこからの TS 細胞 (eTS 細胞) 樹立を目的とした。ただし、マウス ES 細胞からも誘導可能な原始外胚葉由来幹細胞 (EpiSC) も栄養膜細胞に分化するという報告がある。よって、BMP4 による分化転換の過程が、TS 細胞様の性質を持つ状態を介するのか、あるいは、EpiSC 様の性質を持つ状態を介するのかの解明も目的とした。そのために、BMP4 による分化転換過程における各種マーカー遺伝子およびタンパク質の発現動態の詳細な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞の分化転換誘導

マウス ES 細胞は、古江らの無血清培養条件 (Kusuda-Furue et al., *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 41:19-28, 2005) に従って継代維持培養した。無血清培養条件に馴化した ES 細胞をラミネンコートしたディッシュに播種後、10 ng/ml BMP4 存在化で維持することで、栄養膜細胞への分化転換を誘導した。

(2) 分化転換を誘導した ES 細胞からの新規細胞株樹立

無血清馴化 ES 細胞の分化転換誘導 24 時間後に、培地を TS 細胞維持培地 (RPMI1640, 20% FBS, 25 ng/ml FGF4, 1 µg/ml heparin) に交換した。細胞がコンフルエントに達した時点で 10 倍希釈の継代をくり返し、新規細胞株を得た。

(3) RT-PCR

常法に従い細胞から抽出した RNA から cDNA を合成し PCR を行った。反応には BIOTAQ HS DNA Polymerase を使い、1 反応につき酵素 1 U を使用した。変性反応は 94°C で 1 分間、伸長反応は 72°C で 2 分間とした。

(4) 免疫染色

ディッシュ上の細胞に 4%パラホルムアルデヒド/PBS(-)溶液を加え、室温で 15 分間固定した。PBS(-)による洗浄後、0.1% Triton X-100 溶液を加えて室温で 30 分間透過処理を施した。その後、ブロッキング緩衝液 (5% BSA, 0.1% Tween20 in PBS(-)) を加えて、4°Cで一晩放置した。一次抗体には抗 Oct4 マ

ウスモノクローナル抗体 (1:200 希釈)、抗 Eomes ラビットポリクローナル抗体 (1:100 希釈)、抗 Cdx2 マウスモノクローナル抗体 (1:200 希釈) を用い、遮光して 4°C で一晩反応させた。二次抗体には Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG を用いた。最終的に、1 ng/ml DAPI 溶液を加えて室温で 15 分間反応させ、VECTASHIELD Mounting Medium を用いてマウントした後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(5) 発現アレイ解析

発現アレイ解析は、北海道システム・サイエンス株式会社のマイクロアレイ受託解析サービス (Agilent Technologies, Whole Mouse Oligo 44K×4pack) を利用した。得られたデータは Agi4x44Preprocess, Pedro Lopez-Romero を参考に解析し、公開データベース上に登録されている ES 細胞、TS 細胞、EpiSC のデータと比較した。

4. 研究成果

(1) 栄養膜細胞はほ乳類に特徴的な細胞で、胚体には寄与せず胎盤を構築する。マウス ES 細胞は、栄養膜細胞系列が出現した後の胚の胚体細胞系列から樹立される細胞株で、通常、分化誘導しても栄養膜細胞には分化しない。しかし近年、上述の様に、無血清培養条件で維持したマウス ES 細胞を BMP4 で処理することにより、効率的に栄養膜細胞への分化転換が誘導されることが発見されているこの報告では、8 日間の BMP4 処理が用いられていた。そこで、まず、栄養膜細胞への分化転換に必要な BMP4 処理時間の検討を行った。BMP4 処理開始後、24 時間おきに BMP4 非添加培地に交換し、8 日目に栄養膜細胞マーカー遺伝子の発現を解析した。その結果、最初の 24 時間の処理だけでも栄養膜細胞の分化が見られることが分かった。これは、少なくとも一部の細胞では、24 時間の BMP4 処理の間に胚体細胞系列から栄養膜細胞系列への分化運命の転換が起こっていることを示す。

(2) 未分化栄養膜細胞は、FGF4 と Activin A の存在化で TS 細胞として継代培養することが可能である。そこで、BMP4 処理 24 時間後に TS 細胞培養条件に移して、eTS 細胞の樹立を試みた。その過程で、ドーム状に盛りあがる特徴的な形態を示す細胞集団が BMP4 処理群特異的に出現したが、数回の継代を重ねるうちにそれらの細胞は徐々に消滅し、最終的に BMP4 処理の有無にかかわらず同様の形質を持つ細胞集団が得られた。この細胞では Oct4 や Nanog といった ES 細胞のマーカー遺伝子の発現が認められたが、その維持に LIF やその他のサイトカインは必要とせず、TS 細

胞や ES 細胞とは異なる性質を有することが明らかとなった。この細胞は、幹細胞の簡易的な判別方法であるアルカリホスファターゼ活性が陽性で、原始外胚葉由来幹細胞 (EpiSC) のマーカー遺伝子である Oct4、Eomes、T などの遺伝子を発現していた。さらに、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析によっても、これらの細胞のトランスクリプトームは、ES 細胞よりも EpiSC に類似していることが判明した。

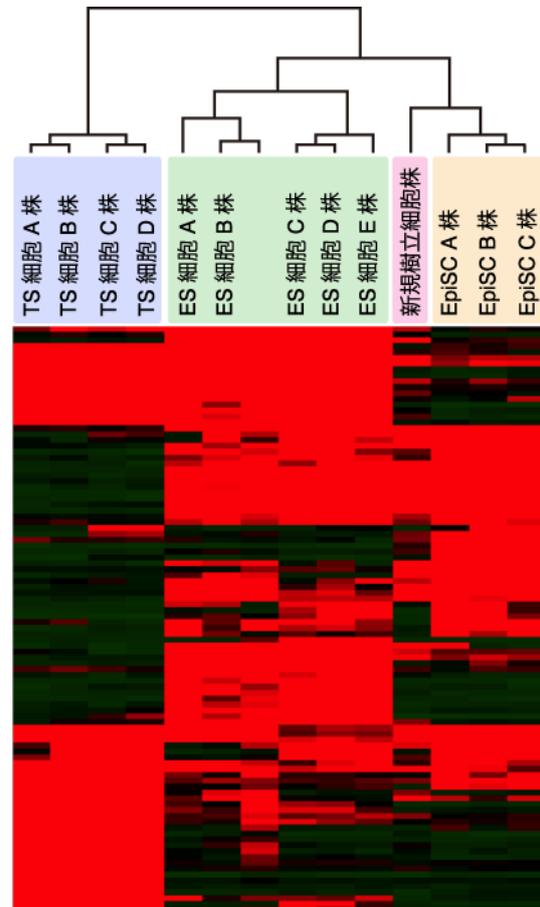


図1 発現アレイによるトランスクリプトーム解析。分化転換誘導後に樹立された細胞株は、TS 細胞や ES 細胞よりも EpiSC により近い遺伝子発現プロファイルを有することが明らかになった

EpiSC は BMP4 処理によって栄養膜細胞へ分化誘導できることを踏まえ、得られた細胞集団を BMP4 処理したところ、栄養膜細胞様の遺伝子発現と形態を示す細胞に分化した。これは、ES 細胞から栄養膜細胞への分化転換過程に、EpiSC 様の状態を経る経路が存在することを示している。

(3) 免疫染色法により、分化転換誘導後の細胞集団におけるマーカータンパク質の発現解析を行ったところ、BMP4 依存的に上記 EpiSC 様細胞が確認されたのに加え、混在す

る細胞の中に TS 細胞様の細胞集団 (Cdx2、Eomes 陽性) も認められた。すなわち、BMP4 処理による分化転換の初期には、EpiSC 様細胞と共に TS 様細胞も存在していることが明らかとなった。この TS 様細胞は dish 全体を継代するだけでは株化できず、また、単離培養や様々な接着因子上での培養によっても株化を試みたが樹立には至らなかった。樹立できない理由の1つとして、これまでの分化転換条件では TSC 様細胞株の誘導効率が 10% 前後と低いことが関係していると考え、TSC 様細胞の誘導効率を向上させる方法を検討した。その結果、BMP4 で 24 時間処理後、Activinシグナルを阻害する薬剤と BMP4 の共存下に置くことで、出現したコロニーの 80% 近くが TSC 様細胞となる条件を確立した。さらに、ここで誘導した細胞は分化誘導によって TC 特異的なマーカー遺伝子を強く発現することも確認した。

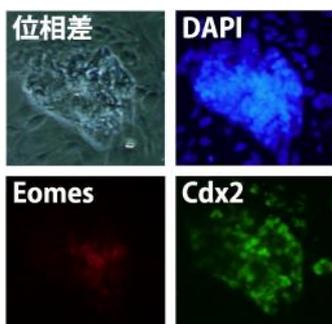


図 2 免疫染色により検出された TS 様細胞コロニー。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 田中智、TS 細胞をもちいたトロホブラスト研究-クローン胚のトロホブラストは異常か?、第 17 回日本胎盤学会学術集会、2009 年 10 月 16 日、東京ミッドタウン (東京都)
- ② Fuyuki Adachi, Kunio Shiota and Satoshi Tanaka, Study on a BMP4-induced transdifferentiation process of mouse embryonic stem cells toward trophoblast cell fate. The 2nd World Congress on Reproductive Biology, Oct 10/2011, Cairns, Australia.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 智 (TANAKA SATOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：90242164

(2) 研究分担者

大鐘 潤 (OHGANE JUN)

明治大学・農学部・講師

研究者番号：50313078

(3) 連携研究者

塩田 邦郎 (SHIOTA KUNIO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80196352

古江 美保 (FURUE MIHO)

独立行政法人医薬基盤研究所・生物資源研究部門・研究員

研究者番号：80257310