

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390312

研究課題名（和文） 生命始動と分化全能性獲得の遺伝子カスケード

研究課題名（英文） Gene cascades for starting development and generating totipotency

研究代表者

浜谷 敏生 (HAMATANI TOSHIO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60265882

研究成果の概要（和文）：*in silico* 解析により着床前期胚特異的新規遺伝子を抽出し、ノックアウトマウス(KO)を作成し機能解析を行った。*Kzpi*(KRAB-zinc finger)の KO は成獣まで発生し、生殖能も維持されていたが、有意な産仔数の減少、早期死亡傾向、膈閉鎖などの異常が認められた。*Kzpi* 欠失 ES 細胞では異常な表現型は認められなかったが、インプリンティング遺伝子の発現異常、アレル特異的メチル化領域 (differentially methylated region: DMR) の低メチル化が認められた。*Kzpi* は、初期胚でのゲノムワイドな脱メチル化から、DMR 特異的なメチル化を維持すると考えられた。*Zfpi*(SCAN-zinc finger) KO は成獣まで発生し、生殖能も維持されていたが、脾細胞の核型解析 Q-band で多数の不完全断裂部位が認められた。*Zfpi* 欠失 ES 細胞についても解析中である。

研究成果の概要（英文）：Zygotic genome activation (ZGA) leads to the totipotent state in preimplantation embryos. Genes that are specifically expressed at the ZGA stages would be expected to have important roles in establishing pluripotency or preimplantation development. This study found a novel mouse Krüppel-associated-box zinc-finger gene (*Kzpi*) exclusively and zygotically expressed in preimplantation embryos during the ZGA to the blastocyst stage and embryonic stem (ES) cells. Intercrosses between heterozygote transgenic mice harboring a loss-of-function allele of *Kzpi* generated viable homozygotes, but litter sizes from homozygote crosses were significantly smaller than those from wild-type crosses. Interestingly, most imprinted genes were down regulated and the methylation levels of differentially methylated regions (DMRs) were decreased in homozygous ES cells. *Kzpi* was thus suggested to maintain DMRs against genome-wide demethylation in preimplantation embryos. The study of another novel gene (*Zfpi* encoding SCAN-zinc finger) is ongoing.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2010 年度 | 6,700,000  | 2,010,000 | 8,710,000  |
| 2011 年度 | 4,000,000  | 1,200,000 | 5,200,000  |
| 2012 年度 | 4,000,000  | 1,200,000 | 5,200,000  |
| 総計      | 14,700,000 | 4,410,000 | 19,110,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：生殖医学、再生医学

### 1. 研究開始当初の背景

着床前期胚においては、受精、胚性ゲノムの活性化 (Zygotic genome activation, ZGA)、と分化全能性の獲得、コンパクトン、胚盤胞腔の形成、内細胞塊と栄養外胚葉への分化、着床など、ドラマティックな生物学的事象が存在するが、これらを制御する分子生物学的機構については未だ解明されていないことが多い。また、少子高齢化社会となり益々重要となっている生殖補助医療において、卵の質的向上および着床前期胚の長期体外培養システムの改良は体外受精の最重要課題であり、着床前期胚発生のメカニズムの解明が急務となっている。

一方、最近では iPS 細胞の臨床応用への期待が膨らんでいるが、多分化能獲得までに要する時間やその多様性を考えれば、iPS 細胞の研究はその質的評価や安全性の確立が先決であり、樹立過程における多分化能獲得の分子メカニズムの解明が重要である。また、体細胞核移植による核の初期化では、クローン胚の核が着床前期と同様の発生経路をたどる中で初期化され、未分化性を獲得する。従って、正常対照群として、着床前期胚発生の分化全能性獲得における遺伝子発現動態の変化を解析することが非常に重要となる。

### 2. 研究の目的

我々は、分化全能性の獲得に ZGA とそれが誘起する胚性遺伝子発現が重要であると考えた。また、これまでのマウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングから、ZGA で発現する遺伝子にはステージ特異的な発現パターンを示す遺伝子が多数存在し、その中には新規遺伝子も多く含まれていることが明らかとなった (Hamatani T et al., Dev Cell 2004)。しかし、これらの新規遺伝子のうち機能遺伝子として報告があるものはごくわずかである。我々は、着床前期で機能する転写因子と予想された新規遺伝子に着目し、発現解析およびノックアウト (KO) マウスを用いた機能解析を行った。

### 3. 研究の方法

本研究では、*in silico* 解析において Krüppel-associated box (KRAB) あるいは SCAN ドメインに続いて C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-zinc finger ドメインがコードされるため、転写因子として予想された新規遺伝子 *Kzpi* あるいは *Zfpi* を研究対象とした。定量的逆転写 PCR や免疫染色を用いて着床前期各ステージの胚や未分化細胞での発現解析を行い、全長 cDNA をクローニングし、シーケンシングすることによって *Kzpi* あるいは *Zfpi* の全長塩基配列を解読した。機能解析のためにノックアウトマウスを作成し、着床前期胚発生の観察、受精率・胚盤胞発生率の検討、産仔数のカウント、

さらに長期的な継代観察を行った。また、*Kzpi* (あるいは *Zfpi*) 欠損胚盤胞より ES 細胞を樹立し、未分化性、多分化能、自己複製能について検討し、マイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。さらに、*Kzpi* 欠損 ES 細胞におけるディング遺伝子の DNA メチル化可変領域 (DMR) のメチル化レベルについて、Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBLA) 法および Bisulfite Adaptor-Tagging (PBAT) 法を用いて検討した。

### 4. 研究成果

リアルタイム定量 PCR の結果、着床前期の 2 細胞期から胚盤胞期にかけて *Kzpi* の発現を認め、その発現動態はマウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイルデータと一致していた。 $\alpha$  アマニチンにより受精後の転写を抑制すると 2 細胞期からの *Kzpi* 発現上昇はほぼ完全に抑制されたため、*Kzpi* は卵性 RNA に由来するものではなく、受精後に新たに転写された胚性遺伝子であることが明らかとなった。また成獣マウスでは、精巣以外の組織からは発現を認めなかった。免疫組織化学染色の結果から、2 細胞期胚から胚盤胞に KZPI の発現を認めた。*Zfpi* の発現解析でも同様の結果が得られた。しかし、KZPI では、胚盤胞期および ES 細胞では核への局在が確認されたが、ZFPI では、8 細胞期および ES 細胞で核に局在することが明らかとなった。

機能解析のために作成した *Kzpi* ノックアウトマウスは、成獣まで発生し、生殖能も維持されていた。体外受精による受精率・胚盤胞発生率は、野生型 (WT) と KO 両群の間で有意な差は認められなかった。一方、平均産仔数は WT と比較して KO で有意に減少し ( $P < 0.01$ )、ヘテロ接合体同士の交配では KO の出生数が有意に減少した ( $P < 0.01$ )。低体重、早期死亡傾向、脾腫、膈閉鎖など様々な表現型が観察されたが、その表現型は同腹子でも個体差が大きかった。

次に、*Kzpi* 欠損 ES 細胞を用いて、*Kzpi* の機能と標的分子を検討した。野生型 ES 細胞に比し、増殖速度は遅い傾向を示したが長期継代は可能であり、未分化マーカー遺伝子の発現解析、胚様体および奇形腫の作製による多分化能性評価では、*Kzpi* 欠損 ES 細胞に異常は認められず、*Kzpi* は多能性幹細胞の維持に必須ではないと考えられた。

しかし、トランスクリプトーム解析では多数のインプリンティング遺伝子の発現異常を認めた。使用したマイクロアレイにおいて有意な発現シグナルが観察されたインプリンティング遺伝子 27 個のうち、*Kzpi* 欠損 ES 細胞では 18 個 (66.7%) のインプリンティング遺伝子が有意な発現変化を示していた。そこで、COBRA 解析により DNA メチル化可変領域 (DMR) のメチル化レベルを検討したところ、

*Kzpi* 欠損 ES 細胞では複数の DMR が低メチル化状態であった。さらに、次世代シーケンサーを用いたメチローム解析 PBAT 法により、全 CpG アイランド (CGI) のうち *Kzpi* 欠損細胞株で変化を認めた CGI は 1% にも満たないものの、そのうち 70% が既知・新規の DMR であることが明らかとなった。以上の結果より、*Kzpi* は胚性産物として初期胚におけるゲノムワイドな脱メチル化から、DMR 特異的なメチル化維持に寄与する可能性が示唆された。

一方、*Zfp1* 欠損マウスは、成獣まで発生し、生殖能も維持されていた。体外受精による受精率・胚盤胞発生率は、野生型 (WT) と KO 両群の間で有意な差は認められなかった。継代長期観察を行っているが、今のところ、明らかな異常 (表現型) は認められていない。核型解析では 40XY/40XX であるものの、不特定多数の染色体領域で不完全断裂あるいは染色体凝縮不全と考えられる所見が認められた。しかし、*Zfp1* 欠損 ES 細胞も、未分化性維持、自己複製能、多分化能に異常は認められなかった。

〔考察〕

*Kzpi* 欠損マウスでは、産仔数の減少に加え、早期死亡傾向、脾腫、膈閉鎖などの表現型が散発的に確認されているが、これらは DMR メチル化レベルの変化によりインプリンティング遺伝子の発現異常が背景にあると考えられた (例えば、膈閉鎖には p57Kip2 の発現異常が寄与すると考えられる)。今後は、*Kzpi* 欠損マウスから得られた各発生段階の細胞 (精子、胚盤胞、胎仔) を用いて、DMR のメチル化レベルを検討する必要がある。さらに、*Kzpi* 欠損 ES 細胞を用いて、免疫沈降 (による結合タンパクの同定、クロマチン免疫沈降による DMR 結合部位の同定も試みる予定である。また、*Zfp1* 欠損マウスにおける染色体不完全断裂 (凝縮不全) の生理的意義についても検討を進める予定である。

## 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 20 件)

(1) Hiura H, Toyoda M, Okae H, Sakurai M, Miyachi N, Sato A, Kiyokawa N, Okita H, Miyagawa Y, Akutsu H, Nishino K, Umezawa A, Arima T. Stability of genomic imprinting in human induced pluripotent stem cells. *BMC Genet.* 査読有. 2013;14(1):32.

(2) Okumura N, Akutsu H, Sugawara T, Miura T, Takezawa Y, Hosoda A, Yoshida K, Ichida JK, Yamada M, Hamatani T, Kuji N, Miyado K, Yoshimura Y, Umezawa A.  $\beta$ -Catenin functions pleiotropically in differentiation and

tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells. *Plos One* 査読有. 2013 *in press*.

(3) Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med.* 査読有. 2013;2(4):265-73.

(4) Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Soga T, Umezawa T, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Scientific Reports* 査読有. 2012; 2:930..

(5) Nishio M, Yoneshiro T, Nakahara M, Suzuki S, Saeki K, Hasegawa M, Kawai Y, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Tobe K, Yuo A, Kubota K, Saito M, Saeki K. Production of functional classical brown adipocytes from human pluripotent stem cells using specific hemopoietin cocktail without gene transfer. *Cell Metab.* 査読有. 2012;16(3):394-406.

(6) Sugawara T, Nishino K, Umezawa A, Akutsu H. Investigating cellular identity and manipulating cell fate using induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 査読有. 2012;3(2):8.

(7) 久慈直昭, 山田満稔, 井上治, 福永朝子, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 浜谷敏生, 吉村泰典. 【不妊と周産期医療】 ART 妊娠児の長期予後研究. *周産期医学* 査読無. 42(8): 991-1000 (2012.08).

(8) Hamatani T. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril* 査読有. 2012;97(2):275-81.

(9) Gokoh M, Nishio M, Nakamura N, Matsuyama S, Nakahara M, Suzuki S, Mitsumoto M, Akutsu H, Umezawa A, Yasuda K, Yuo A, Saeki K. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram.* 査読有. 2011;13(4):361-70.

(10) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time.

PLoS Genet. 査読有. 2011;7(5):e1002085.

(11) Sato B, Katagiri YU, Miyado K, Okino N, Ito M, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Toshimori K, Kiyokawa N. Lipid rafts enriched in monosialylGb5Cer carrying the stage-specific embryonic antigen-4 epitope are involved in development of mouse preimplantation embryos at cleavage stage. BMC Dev Biol. 査読有. 2011;11:22.

(12) Nishi M, Akutsu H, Masui S, Kondo A, Nagashima Y, Kimura H, Perrem K, Shigeri Y, Toyoda M, Okayama A, Hirano H, Umezawa A, Yamamoto N, Lee SW, Ryo A. A distinct role for Pin1 in the induction and maintenance of pluripotency. J Biol Chem. 査読有. 2011;286(13): 11593-603.

(13) Inamura M, Kawabata K, Takayama K, Tashiro K, Sakurai F, Katayama K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Hayakawa T, Furue MK, Mizuguchi H. Efficient generation of hepatoblasts from human ES cells and iPS cells by transient overexpression of homeobox gene HEX. Mol Ther. 査読有. 2011;19(2): 400-7.

(14) Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Itakura Y, Kuno A, Ogawa T, Yamada M, Akutsu H, Takahashi Y, Kanzaki S, Narimatsu H, Hirabayashi J, Umezawa A. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. Genes Cells. 査読有. 2011;16(1):1-11.

(15) Takezawa Y, Yoshida K, Miyado K, Sato M, Nakamura A, Kawano N, Sakakibara K, Kondo T, Harada Y, Ohnami N, Kanai S, Miyado M, Saito H, Takahashi Y, Akutsu H, Umezawa A.  $\beta$ -catenin is a molecular switch that regulates transition of cell-cell adhesion to fusion. Sci Rep. 査読有. 2011;1:68.

(16) Hamatani T. Spermatozoal RNA profiling towards a clinical evaluation of sperm quality. Reprod BioMed Online 査読有. 22(2): 103-105, 2011.

(17) Sasaki N, Hirano T, Kobayashi K, Toyoda M, Miyakawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A, Nishihara S. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読有. 2010;401(3):480-6.

(18) Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M,

Makino H, Fukawatase Y, Chikazawa E, Takahashi Y, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Akutsu H, Umezawa A. Defining hypo-methylated regions of stem cell-specific promoters in human iPS cells derived from extra-embryonic amnions and lung fibroblasts. PLoS One. 査読有. 2010;5(9):e13017.

(19) Tarin JJ, Hamatani T, Cano A. Acute stress may induce ovulation in women. Reprod Biol Endocrinol. 査読有. 26;8:53, 2010.

(20) Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. Nature. 査読有. 2010;465(7295): 175-81.

〔学会発表〕(計 15 件)

(1) 浜谷敏生 : シンポジウム : 生殖内分泌における酸化ストレスとエイジング : マウス卵における酸化ストレスとエイジング 第 17 回日本生殖内分泌学会学術集会, 東京, 2012 年 12 月 8 日

(2) Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Okumura N, Chikazawa N, Kuji N, Umezawa A, Tomita M, Yoshimura Y. Metabolomic analysis of culture media by CE-TOF/MS suggests a medium-chain fatty acid as an alternative energy source of mouse preimplantation embryos. 28th annual meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Istanbul, July 1-4, 2012.

(3) 小川誠司, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 山田満稔, 奥村典子, 菅原かな, 井上治, 福永朝子, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典. 着床前期胚発生に関わる新規遺伝子 Zfp1 の発現解析. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会, 大阪, 2012 年 4 月 13 日

(4) 浜谷敏生, 山田満稔, 阿久津英憲, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 福永朝子, 井上治, 梅澤明弘, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典. 着床前期初期から発現し多分化能細胞に特異的に発現する新規転写因子 Kzpi の機能解析. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会, 大阪, 2012 年 4 月 13 日

(5) 浜谷敏生. シンポジウム : 卵巣機能異常に起因する不妊治療の最前線 : マウス卵の加齢メカニズム 第 56 回日本生殖医学会学術講演会, 横浜, 2011 年 12 月 9 日

(6) Hamatani T. Metabolomic analysis of culture

media by CE-TOF/MS suggests a medium-chain fatty acid as an alternative energy source of mouse preimplantation embryos. The 2nd international symposium of CHA fertility Center on reproductive science, Seoul, Korea, Oct. 28, 2011.

(7) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Kuji N, Aoki D, Yoshimura Y. Identification of a novel gene encoding a high mobility group box protein and its specific expression and essential role during preimplantation development. The 67th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine (ASRM), Orland, USA, Oct. 21-24, 2011.

(8) 福永朝子, 浜谷敏生, 山田満稔, 阿部宏之, 阿久津英憲, 井上治, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 久慈直昭, 青木大輔, 吉村泰典. マウス卵子の排卵後加齢における遺伝子発現と酸素消費量との関連. 第63回日本産科婦人科学会学術講演会, 東京, 2011年8月30日.

(9) 近澤奈々, 浜谷敏生, 山田満稔, 阿久津英憲, 奥村典子, 小川誠司, 菅原かな, 井上治, 福永朝子, 久慈直昭, 吉村泰典. 着床前期および未分化維持に関わる新規 C2H2-zinc finger 遺伝子の解析 第52回日本哺乳動物卵子学会, 大田原, 2011年5月21日.

(10) 山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 井上治, 福永朝子, 小川誠司, 菅原かな, 奥村典子, 近澤奈々, 浅田弘法, 久慈直昭, 吉村泰典. マウス卵子における加齢によるテロメア長短縮とテロメラーゼ活性の変化 第55回日本生殖医学会・学術講演会, 徳島, 2010年11月11日

(11) 近澤奈々, 浜谷敏生, 山田満稔, 阿久津英憲, 奥村典子, 久慈直昭, 吉村泰典. 着床前期胚に特異的な発現が予想された新規 zinc finger 遺伝子の発現・機能解析 第55回日本生殖医学会・学術講演会, 徳島, 2010年11月11日

(12) 浜谷敏生. シンポジウム: 発生・生殖生物学の最前線: 着床前期に特異的に発現する新規遺伝子 Hmgpi の発現および機能解析 第51回日本組織細胞化学会学術集会, 東京, 2010年9月5日

(13) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Identification of a novel gene encoding a high mobility group box protein and its specific expression and essential role during preimplantation development. The 26th Annual

meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Rome, Italy, June 28-30, 2010.

(14) 山田満稔, 浜谷敏生, 阿久津英憲, 小川誠司, 奥村典子, 持丸佳之, 高野光子, 浅田弘法, 久慈直昭, 青木大輔, 梅澤明弘, 吉村泰典. 着床前期胚特異的新規遺伝子 Hmgpi による着床周辺期発生の制御機構. 第51回日本哺乳動物卵子学会, 新潟, 2010年5月30日

(15) Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Chikazawa N, Kuji N, Yoshimura Y, Umezawa A. Identification of a novel gene encoding a high mobility group box protein and its specific expression and essential role during preimplantation development. The First SKLRB Symposia on Frontiers in Periimplantation Biology, the Beijing Friendship Hotel, Beijing, May 8-12, 2010.

〔図書〕(計1件)

菅原かな, 浜谷敏生. 生殖卵巣学—基礎知識と臨床の進展(編集:石塚文平、鈴木秋悦). 第2章(9) 卵巣の老化. 医歯薬出版, 東京. 2011.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.obgy.med.keio.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浜谷 敏生 (HAMATANI TOSHIO)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号: 60265882

### (2) 研究分担者

阿久津 英憲 (AKUTSU HIDENORI)  
国立成育医療研究センター・生殖・細胞医療研究部・室長  
研究者番号: 50347225

津村 秀樹 (TSUMURA HIDEKI)  
国立成育医療研究センター・実験動物管理室・室長  
研究者番号: 20180052

山田 満稔 (YAMADA MITSUTOSHI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号: 40383864

小川 誠司 (OGAWA SEIJI)  
国立成育医療研究センター・生殖・細胞医  
療研究部・研究員  
研究者番号：10573371

(3)連携研究者

梅澤 明弘 (UMEZAWA AKIHIRO)  
国立成育医療研究センター・生殖・細胞医  
療研究部・部長  
研究者番号：70213486