

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390097

研究課題名(和文)生殖細胞と多能性幹細胞の相互転換機構

研究課題名(英文)Reciprocal conversion between germ cells and pluripotent stem cells

研究代表者

木村 透 (Kimura, Tohru)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：50280962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は次世代を作ることができる唯一の細胞系列である。生殖細胞は、培養条件下でES細胞と同等の分化多能性幹細胞へ初期化されることから、潜在的に多能性を持つ細胞である。本研究では、試験管内でES細胞から生殖細胞を作る研究と、生殖細胞を多能性幹細胞へ初期化させる研究を行った。まず、生体内では、生殖細胞は中胚葉細胞とともに分化することに着目し、ES細胞の中胚葉分化誘導系を用いて、試験管内で胎仔期の生殖細胞に似た細胞を作ること成功した。次に、生殖細胞の初期化機構を、シグナル伝達や小分子化合物を用いて解析し、体細胞からiPS細胞への初期化と共通の機構があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Germ cells are specialized cell types that produce next generations. Germ cells can be reprogrammed into the ES cell-like states, indicating that the cells retain pluripotency. In this study, we developed the in vitro germ cell differentiation system and explored the mechanisms how germ cells are reprogrammed into pluripotency. First, given the fact that germ cells differentiate with mesodermal cells in vivo, we succeeded to generate the fetal germ cell-like cells in vitro by using mesodermal differentiation culture system. Second, we analyzed the functions of signaling pathways and the effects of small molecule compounds in reprogramming of germ cells into ES cell-like cells and in reprogramming of somatic cells into iPS cells. Our results show that germ and somatic cells share the common molecular mechanisms in reprogramming toward pluripotency.

研究分野：幹細胞学、生殖細胞学

キーワード：生殖細胞 多能性 幹細胞 分化誘導 ES細胞 EG細胞 iPS細胞 シグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) 生殖細胞は、次世代にゲノムやエピゲノム情報を伝達する細胞である。生殖細胞自身は発生過程において分化多能性を発揮することはないが、受精卵になると分化の全能性を発揮できるようになる。

一方で、生殖細胞は、生体内では精子と卵にのみ分化するが、培養条件下では胚性幹細胞 (ES 細胞: Embryonic Stem Cell) と同等の分化多能性をもつ幹細胞へと「脱分化」する。例えば、始原生殖細胞 (PGC: primordial germ cell) は、胎仔期に存在する最初の生殖系列の細胞であるが、特定の増殖因子の存在下で培養することで、胚性生殖細胞 (EG 細胞: Embryonic Germ Cell) と呼ばれる多能性幹細胞へ脱分化させることが可能である。

また、生後の精子の幹細胞も、培養条件下において多能性幹細胞へ脱分化させることができる。このように、生殖細胞は、遺伝子操作なしに分化多能性幹細胞へと初期化させることができるため、細胞分化の可塑性やリプログラミングを研究する上でユニークな系となっている。

(2) 我々は、PI3K (phosphoinositide-3 kinase) /Akt シグナルの活性化が、PGC の脱分化を促進すること、その作用は癌抑制遺伝子 p53 の機能抑制を介すること、を明らかにしていた。さらに、Akt シグナルの活性化は、ES 細胞の自己複製を促進すること、ES 細胞と細胞融合させた時の体細胞核の初期化効率を上昇させること、なども示していた。

一方で、体細胞から人工多能性幹細胞 (iPS 細胞: induced Pluripotent Stem Cell) の初期化も、PGC からの脱分化同様に、p53 の機能抑制により促進されることが報告されていることから、PGC の脱分化と体細胞核の初期化には共通の分子基盤が存在することが窺える。

(3) 一方で、我々は、生殖系列への運命付けが中胚葉誘導の過程で生じることに着目し、ES 細胞の試験管内での中胚葉への分化誘導系において、分化を阻害すると、PGC 様の細胞を誘導できることを示していた。また、精巢に移植すると精子形成を再構築できる「機能的な PGC」を、ES 細胞から試験管内で分化誘導できたという報告がされた。生殖細胞の試験管内分化の研究は、端緒についたばかりであるが、これまで個体を用いた研究が主であった生殖細胞の研究を飛躍的に発展させる可能性をもち、生殖医療の基礎的研究にも応用することが可能である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、「生殖細胞から多能性幹細胞へのリプログラミング」と「多能性細胞から生殖細胞への試験管内分化誘導系の確立と解析」を二本柱として、生殖細胞と多能性幹細胞との相互転換の研究をおこなう。この

研究により、生殖細胞の分化と未分化性の分子メカニズムを解明すること、生殖細胞分化の試験管内再構成系の開発を行うこと、を本研究の目的とする。

(2) 具体的には、以下の研究を行った。

ES 細胞から生殖細胞を試験管内で分化誘導する条件を検討したところ、生殖細胞の運命づけに MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) シグナルの1つである ERK シグナルが重要なはたらきをもつことを示した。

複数の初期化遺伝子を遺伝子導入することで、体細胞は iPS 細胞へと初期化される。最近、これらの初期化遺伝子の機能を代替できる小分子化合物 (Kempauillone, SB431542 など) が報告され始めている。これらの小分子化合物により、生殖細胞の初期が影響を受けるか解析をおこなった。

PI3K/Akt シグナルの活性化は、PGC の初期化を促進することを報告してきた。Akt シグナルをコンディショナルに活性化することができる Akt-Mer マウスを用いて、初期化過程の詳細な解析をおこなった。

Akt シグナルの活性化が、体細胞から iPS 細胞への初期化に与える効果を調べた。Akt の下流で機能する候補遺伝子や候補 miRNA を同定した。

PGC の分化や未分化性に関する遺伝子をさらに検索するために、細胞の癌化に関する遺伝子に着目した。癌抑制遺伝子である Brca2 や Snf5、代謝シグナルである LKB1 や Ragulator が、PGC の発生で果たす機能を解析した。

3. 研究の方法

(1) 試験管内での生殖細胞の分化誘導

OP9 細胞は、ES 細胞から様々な中胚葉系の細胞 (血液、筋肉、内皮細胞など) を試験管内で分化誘導するのに用いられている細胞である。OP9 細胞をフィーダー細胞 (支持細胞) として用いて、その上に ES 細胞を播種し、中胚葉系細胞への分化を誘導した。その際に、遺伝操作や小分子化合物処理などを行うことで、PGC が分化誘導できる条件を探し出した。

BVSC (Blimp1-Venus, Stella-CFP) ES 細胞を使用した。BVSC ES 細胞は、PGC のマーカーである Blimp1 遺伝子のプロモーターの支配下に緑色蛍光タンパク質 (Venus) を、また、別の PGC マーカーである Stella 遺伝子のプロモーターの支配下に青色蛍光タンパク質 (CFP) を発現するレポーターをもつ ES 細胞である。この ES 細胞は PGC に分化誘導されると、Blimp1-Venus 陽性、且つ、Stella-CFP 陽性となるので、PGC 様細胞の出現をモニタ

ーすることができる。

PGC 様細胞(Blimp1-Venus 陽性、Stella-CFP 陽性細胞)を、FACS(Fluorescent Activated Cell Sorter)により集めた。PGC 様細胞が PGC としての特性をどの程度獲得しているかを、遺伝子発現解析、DNA メチル化解析、精巣への移植実験で解析した。

(2) 生殖細胞の初期化

Oct4 遺伝子のプロモーターの支配下に EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein : 緑色蛍光タンパク質) を発現するマウス (Oct4-EGFP マウス) から、PGC を調整し、初期化実験に用いた。また、Akt シグナルをコンディショナルの活性化することができる Akt-Mer マウスから、PGC を調整し、初期化実験に用いた。

SCF (Stem Cell Factor) を発現するフィーダー細胞の上に PGC を播種し、LIF (Leukemia Inhibitory Factor) と bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) の存在下で培養することで、通常の EG 細胞を誘導した。誘導した EG 細胞は、マウス胎仔繊維芽細胞 (MEF : Mouse Embryonic Fibroblast) をフィーダー細胞として使用しながら培養した。

小分子化合物 (Kempauillone、SB431542) により EG 細胞を誘導するときは、Oct4-EGFP マウス由来の PGC を MEF 上に播種し、LIF の存在下で培養をおこなった。この方法で樹立した EG 細胞を、iEG 細胞 (induced EG Cell) と名付けた。

ES 細胞は、Oct4-EGFP マウスの胚盤胞を MEF 上に播種し、LIF の存在下で培養をおこなうことで樹立した。

iPS 細胞は、胎齢 13.5 日の Oct4-EGFP マウス胚から調製した MEF に、Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc をもつレトロウイルスを感染させ、MEF 上に播種し、LIF の存在下で培養をおこなうことで樹立した。Akt シグナルを活性化させるときは、Akt-Mer をもつレトロウイルスを感染させた。

~ で樹立した細胞について、Q-RT-PCR (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) 法やマイクロアレイ法を用いて遺伝子解析をおこなった。また、COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法などを用いて、DNA のメチル化状態を調べた。多分化能を解析するときには、ヌードマウスの皮下に接種しテラトーマを形成させる実験や、胚盤胞にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製する実験をおこなった。

Bra2、Snf5、LKB1、Ragulator のコンディショナル・ノックアウトマウスを、PGC に組換え酵素 Cre を発現するマウスと交配した。得られたコンディショナル・ノックアウトマ

ウスにおいて、PGC の発生がどのような影響を受けたか調べた。

4 . 研究成果

(1) 試験管内での生殖細胞の分化誘導

BVSC ES 細胞を OP9 フィーダー細胞上に播種し、様々な小分子化合物の存在下で培養したところ、ERK シグナルの阻害剤処理により、PGC 様細胞 (Blimp1-Venus 陽性、Stella-CFP 陽性細胞) が誘導されることを見出した。

この細胞の遺伝子発現や DNA メチル化のパターンは、生体内の PGC によく似ていた。一方、ERK シグナルを阻害したときは、ES 細胞から中胚葉細胞への分化は完全に抑制されていた。

これまでの報告から、ERK シグナルやこのシグナルの下流の転写因子は、中胚葉への運命づけに必須であることが示されている。一方、我々は、生体内で、多能性細胞から PGC が分化するときには、ERK シグナルを抑制する遺伝子群 (Spred、Sprouty、Dusp など) の発現が上昇することを見出した。上記の実験結果と合わせると、ERK シグナルの活性化・不活性化が、中胚葉に分化するか、それとも、生殖細胞に分化するか、という2つの細胞系列の運命づけを決定するスイッチになっていることが明らかとなった。

本研究では、ES 細胞から PGC 様細胞を試験管内で分化誘導する系を構築することができた。今後、EG 細胞のような生殖細胞由来の多能性幹細胞からの生殖細胞の分化誘導実験、PGC より分化段階の進んだ生殖細胞への試験管内分化誘導実験、などをおこなっていく予定である。

生殖細胞の分化やそれに伴うエピジェネティック制御について、その分子基盤を、効率よく詳細に研究するには、*in vitro* の実験系が不可欠である。本研究で開発した試験管内での分化誘導系をさらに進化させることで、PGC における DNA 脱メチル化、その後の分化段階における *de novo* DNA メチル化、精子形成過程のヒストンからプロタミンへのクロマチン再構成といった、生殖細胞の分化過程で生じるエピゲノム変動を *in vitro* で解析できるようになる可能性がある。

さらには、こういった技術をヒト iPS 細胞にも適用することができれば、癌の治療などが原因で不妊となった患者の不妊治療へと応用することも可能である。

(2) 生殖細胞の初期化

Oct4-EGFP マウスの PGC を用いて、SCF や bFGF の非存在下でも、小分子化合物 (Kempauillone、SB431542) を1つ加えるだけで iEG 細胞が樹立できた。iEG 細胞の遺伝子発現パターンは、ES 細胞や iPS 細胞のものと同じであった。また、ヌードマウスの皮下

に接種すると、テラトーマを形成し、その中で三胚葉の組織へ分化した。さらに、胚盤胞にマイクロインジェクションしたところ、キメラマウスの中で体細胞と生殖細胞に分化した。このように、PGCは、たった1つの小分子化合物で初期化されることが明らかとなった。

この結果は、PGC初期化は、体細胞からiPS細胞への初期化と共通の分子機構で制御されることを示したものである。これらの小分子化合物が、どのような影響を与えて初期化を促進しているのかは今後の課題である。

また、iEG細胞、ES細胞、iPS細胞のDNAメチル化状態を比較した。まず、インプリント遺伝子を調べたところ、ES細胞とiPS細胞では半分がメチル化されており、iEG細胞では低メチル化状態であった。これは、それぞれの多能性幹細胞の起源となる細胞の性質を反映していると考えられる。しかし、H19というインプリント遺伝子は、iEG細胞でも、ある程度のメチル化が認められた、これは培養過程で*de novo*メチル化が起こったためであると考えられる。

生殖細胞で発現する遺伝子についてもメチル化解析をおこなった。これらの遺伝子は、PGCでは低メチル化状態であるが、iEG細胞におけるメチル化は、低メチル化の遺伝子もあれば高メチル化の遺伝子もあった。これらの遺伝子のメチル化レベルは、iEG細胞、ES細胞、iPS細胞すべてで同じレベルであったので、多能性細胞では、細胞の起源に関係なく、生殖系列遺伝子のDNAメチル化は、それぞれの遺伝子に特有なレベルに落ち着くことを示唆している。

体細胞からiPS細胞を誘導するときに、Aktシグナルを活性化させたところ、OSK(Oct4、Sox2、Klf4の3因子)の条件でも、OSKM(Oct4、Sox2、Klf4、c-Mycの4因子)の条件でも、iPS細胞のコロニー数が上昇した。この結果は、再び、PGC初期化と体細胞の初期化には、共通の分子機構があることを示したものである。

iPS細胞誘導時に、Aktシグナルにより発現が変化する遺伝子とmiRNAを解析し、初期化の促進に関与する可能性のある候補遺伝子やmiRNAを同定した。今後、これら候補となる遺伝子やmiRNAが、iPS細胞の初期化に関与するかを解析し、その解析結果をPGC初期化の研究へフィードバックさせる予定である。

の研究を受けて、Brca2、Snf5、LKB1、Ragulatorのコンディショナル・ノックアウトマウスを作製した。Brca2、Snf5、Ragulatorのノックアウトマウスでは、PGCの発生に異常が起こった。今後、その発生異常と、EG細胞への初期化効率を調べる予定である。

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6件)

Nakashima H, Kimura T, Kaga Y, Nakatani T, Seki Y, Nakamura T, and Nakano T. Effects of Dppa3 on DNA methylation dynamics during primordial germ cell development. *Biol Reprod* **88**(5): 125, 1-9, 2013. 査読有
DOI: 10.1095/biolreprod.112.105932.

Kimura T, Kaga Y, Ohta H, Odamoto M, Sekita Y, Li K, Yamano N, Fujikawa K, Isotani A, Sasaki N, Toyoda M, Hayashi K, Okabe M, Shinohara T, Saitou M, and Nakano T. Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition. *Stem Cells* **32**(10): 2668-2678, 2014. 査読有
DOI: 10.1002/stem.1781.

Matsui Y, Takehara A, Tokitake Y, Ikeda M, Obara Y, Morita-Fujimura Y, Kimura T, and Nakano T. The majority of early primordial germ cells acquire pluripotency by Akt activation. *Development* **141**(23): 4457-4467, 2014. 査読有
DOI: 10.1242/dev.113779.

Kimura T, Kaga Y, Sekita Y, Fujikawa K, Nakatani T, Odamoto M, Funaki S, Ikawa M, Abe K, and Nakano T. Pluripotent stem cells derived from mouse primordial germ cells by small molecule compounds. *Stem Cells* **33**(1): 45-55, 2015. 査読有
DOI: 10.1002/stem.1838.

Xu X, Smorag L, Nakamura T, Kimura T, Dressel R, Fitzner A, Tan X, Linke M, Zechner U, Engel W, and Pantakani DVK. Dppa3 expression is critical for generation of fully-reprogrammed iPS cells and maintenance of *Dkl1-Dio3* imprinting. *Nature Communications* **6**: 6008, 2015. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms7008.

Nakatani T, Yamagata K, Kimura T, Oda M, Nakashima H, Hori M, Sekita Y, Arakawa T, Nakamura T, and Nakano T. Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-dependent

γ H2AX accumulation.
EMBO Reports **16**(5): 582-589 2015. 査読
有
DOI: 10.15252/embr.201439427.

〔学会発表〕(計4件)

Kimura T, Fujikawa K, Odamoto M, Ikawa M, Abe K, and Nakano T.
Pluripotent stem cells derived from mouse primordial germ cells by small molecule compounds.
The 12th Stem Cell Research Symposium
2014年5月29日~30日
九州大学 医学部 100年講堂(福岡県・福岡市)

Odamoto M, Kimura T, Ohta H, Fujikawa K, Isotani A, Hayashi K, Okabe M, Shinohara T, Saitou M, and Nakano T.
Induction of primordial germ cell-like cells from mouse embryonic stem cells by ERK signal inhibition.
The 12th Stem Cell Research Symposium
2014年5月29日~30日
九州大学 医学部 100年講堂(福岡県・福岡市)

Fujikawa K, and Kimura T.
Promotion of iPS cell induction by Akt signaling activation.
The 12th Stem Cell Research Symposium
2014年5月29日~30日
九州大学 医学部 100年講堂(福岡県・福岡市)

木村 透
始原生殖細胞の分化と脱分化
京都大学霊長類研究所研究会 講演「霊長類への展開に向けた幹細胞・生殖細胞・エピゲノム研究」
2014年8月26日~27日
京都大学 霊長類研究所(愛知県・犬山市)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/stemcell/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
木村 透 (KIMURA, Tohru)
北里大学・理学部・教授
研究者番号：50280962

(2)研究分担者
()
研究者番号：

(3)連携研究者
篠原隆司 (SHINOHARA, Takashi)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号：30322770

伊川正人 (IKAWA, Masahito)
大阪大学・微生物病研究所・教授
研究者番号：20304066

名田茂之 (NADA, Shigeyuki)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：50291448