

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670162

研究課題名(和文) 試験管内におけるES細胞からの精原幹細胞誘導と効率的な減数分裂誘導法の開発

研究課題名(英文) In vitro induction of meiosis from embryonic stem cells and germ line stem cells

研究代表者

鈴木 歩 (Suzuki, Ayumu)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：80639708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生殖細胞は減数分裂を経て多様な遺伝情報をもつ精子や卵子へと分化する。減数分裂に先立ち生殖細胞は体細胞分裂により数を増やすが、どのように体細胞分裂から減数分裂へと切り替わるのかについては、いまだ明らかでない部分が多い。本研究課題ではMax遺伝子を抑制したES細胞で減数分裂が開始することを見出したことを契機に、試験管内で減数分裂を効率的に誘導する系の確立および、生殖幹細胞を誘導する試みを行った。その結果、Maxを抑制したES細胞は生殖細胞系列への分化を飛び越えて、直接的に減数分裂へと移行していたことから、Maxは減数分裂開始を直接的に制御する因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Germ cell is the only cell-type that can transfer genetic and epigenetic information to subsequent generations. Although germ cells are, like somatic cells, able to increase their numbers by mitosis, germ cells stop undergoing mitosis and instead initiate meiosis to convert them to haploid cells at appropriate time points in which female germ cells onset meiosis in the genital ridge at midgestation, while male germ cells initiate this switch after birth in the testes of mammals. Although retinoic acid is known to be crucially involved in this meiotic onset, the molecular mechanisms governing the onset of this special cell division remain largely obscure. However, as an outcome of this research project, I could identify MAX as a negative regulator of meiosis, suppressing ectopic and precocious meiotic onset in embryonic stem cells (ESCs) and spermatogonial stem cells (SSCs), respectively. Thus, I could provide a novel strategy for studying the molecular bases of meiosis.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：減数分裂 Max

### 1. 研究開始当初の背景

Max は Myc ファミリー(c-Myc, N-Myc, L-Myc)と相互作用し転写活性化に作用し細胞分裂を促進する作用を担っている転写因子である。Max をノックアウトさせた ES 細胞は *Oct3/4*, *Nanog* などの未分化性維持に関わる遺伝子の発現低下がみられ、その後激しい細胞死が誘導される(Hishida et al., Cell Stem Cell 9:37-49, 2011)。一方 Max は Mad ファミリー(Mad1, Mxi1, Mad3, Mad4, Mga, Mnt)とも相互作用し、こちらは転写抑制に作用する。東北大学の松居靖久教授らは、マウス ES 細胞を用いた転写因子群の RNAi スクリーニングにより、Max 複合体が生殖細胞の機能遺伝子群の発現抑制に重要な役割を持つことを示した(Maeda et al., Nut Commun 4:1754, 2013)。その後、我々はドキシサイクリン(Dox)誘導により Max を完全にノックアウト (KO) できるマウス ES 細胞 (Max-KO ESC) で減数分裂期前期様の細胞が出現することを見出した。これは Max を抑制することにより、ES 細胞がより後期の生殖細胞まで分化したか、あるいは直接的に減数分裂へと至ったことを示唆するものである。

### 2. 研究の目的

ES/iPS 細胞から試験管内で精子を再構成させる研究において、京都大学の斎藤通紀教授のグループから世界に先駆けた成果が報告されている (Hayashi et al., Cell 146:519-32, 2011)。彼らは、生体内の精子発生過程を *In Vitro* で再現すべく、まず ES/iPS 細胞からエピプラスト様細胞(EpiLC)まで分化させ、それを更に始原生殖細胞様細胞(PGCLC)に分化させた後、精巣内に移植するという手法を確立した。しかし現段階では PGCLC までの誘導法は確立しているものの、その後の健全な精子の誘導には生体内のセルトリ細胞などを含む精巣組織が必要である。したがって現在生殖細胞研究では PGCLC から精原幹細胞様細胞(GSCLC)を誘導し、そこから正常な減数分裂を誘導することが最も大きな課題のひとつとなっている。そこで我々の Max-KO ES 細胞がそのような分化の系譜を辿っているのか、それとも体細胞分裂により増殖をする ES 細胞から直接的に減数分裂へ切り替わったものであるのかを明らかにすることにした。

### 3. 研究の方法

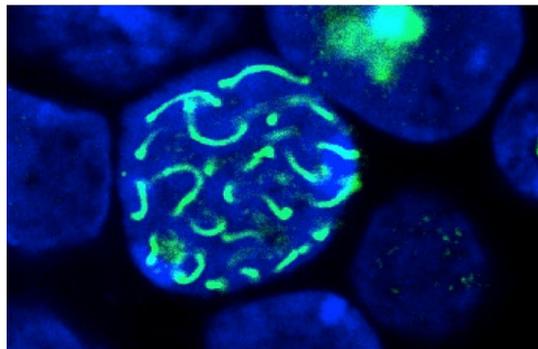
マウスやヒトで雄の生殖細胞は、内部細胞塊(ES 細胞に相当) エピプラスト (EpiLC に相当) 始原生殖細胞 (PGCLC に相当) 精原幹細胞(GS 細胞に相当)という系譜を辿り減数分裂に至る。そこで Max をノックアウトした ES 細胞から Epiblast マーカー、PGC マーカー、精原幹細胞マーカーを有する細胞が生じるかを、経時的にマイクロアレイや qPCR, 免疫染色で確認した。また最も初期の始原生殖細胞マーカーである *Blimp1* は

ES 細胞の維持には必要ないが、始原生殖細胞の分化維持には必須の遺伝子である。この *Blimp1* をノックアウトした ES 細胞で、Max もノックアウトしたときに減数分裂細胞が誘導されるかどうか検討し、Max-KO ESC の減数分裂が PGC 状態を経ずに生じたものであるのか、そうでないのか結論づける。

### 4. 研究成果

研究代表者は、Max-KO ES細胞で発現が上昇した遺伝子群の中には生殖細胞の初期の *Blimp1* などはほとんど上昇することはなく、むしろ顕著に上昇する遺伝子群には減数分裂に関係するものが多く含まれており、なかでも、減数分裂の開始前に発現し、減数分裂開始に必須であることが知られている *Stra8* 遺伝子が含まれていることに気づいた。そこでこの観点を持って解析したところ、*Stra8* 陽性細胞はMax消失後6日後には約20%ほど出現し、かつ、頻度は約1%と少ないが、Max消失後約8日でシナプトネマ構造形成というような細胞形態学的に見ても減数分裂過程にある細胞に類似した細胞が出現することがわかった (図1)。

図1 Max KO ESCから誘導された減数分裂様細胞



なお、CRISPR-Cas9システムにより *Stra8* 遺伝子をKOしたところ、減数分裂様細胞の出現が見られなくなったことから、*in vivo* と同様のメカニズムでMax KO ES細胞は減数分裂過程を進行させていることが示唆された。また、*Stra8* をKOしたES細胞ではMax KOに伴う細胞死がキャンセルされたことから、おそらくMax KO ES細胞は減数分裂の進行という本来はありえない現象に順応することができず、その為、細胞死のフェノタイプを呈するのであろうと考えている。同様の現象はレチノイン酸受容体の阻害剤を用いたときにも見られ、そのとき *Stra8* の発現は完全に消失していたことから、*Vivo* と同様に *RA-Stra8* シグナルが減数分裂開始の引き金であることがわかった。

次にES細胞がどのような系譜を辿って減数分裂へと至ったのかを明らかにすることにした。ES細胞のMEK阻害剤とGSK3β阻害

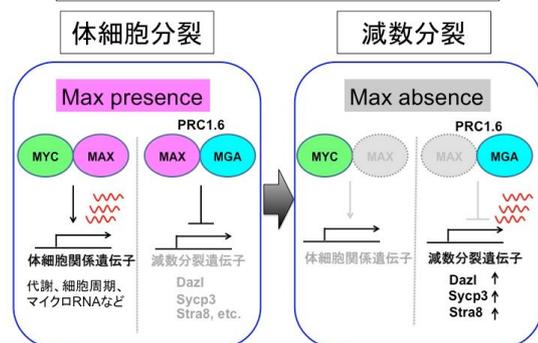
剤を組み合わせた2i条件において強力に分化が抑制される。2i条件においてMax-KO ES細胞の減数分裂関係遺伝子群はグローバルに抑制されるものの完全に抑制されることはなく、また減数分裂様細胞の出現がキャンセルされることはなかった。また始原生殖細胞の分化に必須な*Blimp1*をノックアウトしてもMax消失に伴う減数分裂開始には影響がなかった。つまりMax-KO ES細胞で見られる減数分裂開始は分化とは独立した現象であることがわかった。またGS細胞の培養条件でMax-KO ES細胞を維持することはできず、やはり減数分裂様細胞が出現することがわかった。これは当初の目的のひとつであるGSCLCを誘導する上ではネガティブなデータであったが、これは逆にMaxが減数分裂に対して直接的に制御する重要な因子であることを意味している。そこでMax遺伝子の発現の消失に伴って起こった現象が生理的な減数分裂を反映したものであるかどうかを確かめるために、発生の過程でMaxのタンパク質の局在を観察したところ、雄でも雌でも減数分裂直前に一過的に減少することが明らかになった。かつ、私たちは、精巣由来の生殖幹細胞であるGS細胞株でもMaxを抑制することによっても減数分裂が誘導されることを確認した。さらに、これらの現象を司る分子メカニズムを解明することを目的として、Maxが相互作用することが可能なMycファミリー及びMadファミリー遺伝子を網羅的にノックダウンしたところ、MadファミリーのメンバーであるMgaでのみ、減数分裂関係遺伝子の上昇が見られた。さらにこのMax/MgaのヘテロダイマーがPRC1.6複合体のDNAへの結合の足場となって遺伝子抑制していることも示唆された。Maxは本来Mycとヘテロダイマーを構成する相手役として有名であり、その作用はMycと同様に体細胞分裂を促進するものとして知られている。我々の研究により、そのような細胞分裂を促進する作用だけではなく、MaxはMgaとともにPRC1.6複合体を構成し、減数分裂関係遺伝子群を抑制する分子の実体であることが示された。興味深いことに、Max以外のPRC1.6複合体の構成因子(L3mbtl2, RYBP, Ring1A/B, MBLRなど)では、減数分裂関連遺伝子群の上昇は認められるものの、実際に細胞学的に減数分裂様の細胞が出現することは認められていない。我々はMgaをノックダウンしたときに減数分裂関係の遺伝子の顕著な上昇を確認したが、MaxノックアウトES細胞のような減数分裂様の細胞が出現することはなかった。この違いは、おそらくMyc/Maxの活性によるものではないかと考えている。事実、Max KO ESCにおいてはMyc/Maxの活性もMga/Maxの活性も消失するが、その状況で変異型Mycと

変異型Maxを導入することによりMyc/Maxだけの活性を戻した場合、Max KO ESCの表現型である激しい細胞死が抑制され、さらに減数分裂様の細胞の出現もほとんど見られなかった。つまりMyc/Maxの活性も減数分裂開始に対して抑制的な効果をもたらしているのではないかと思われる。今後その詳しいメカニズムについて明らかにしていく予定である。

今回の研究では、生体マウスの生殖細胞でMaxを抑制ないしは過剰発現させたときの影響について解析していないので、それについても今後ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスを作成することにより解析する予定である。ただし特筆すべきは、これまで見た限りレチノイン酸やStra8の発現に依存するなど、Max KO ES細胞で見られる減数分裂開始の仕組みは生体マウスで見られる生殖細胞の減数分裂開始のメカニズムと共通している。これはすなわちMax KO ES細胞は減数分裂を試験管の中で解析することのできる有用なツールとなり得るということである。これまで哺乳類で減数分裂開始を研究する上では、生殖細胞の数が少ないなど、生化学的解析を行う上で困難が付きまわっていた。Max KO ES細胞ではDox依存的にMaxをノックアウトすることができるために、人為的に減数分裂を誘導することができる。今後この系が生体内で行うことの難しい研究を補完する役割を担い、この分野における新たな生物学的発見の呼び水になることが期待される。

最後に、本研究ではES細胞やGS細胞を用いることによりMaxが減数分裂開始に対して抑制的に働く因子であることを突き止めた。そして体細胞分裂から減数分裂への切り替えにはMaxタンパク質が消失することにより体細胞分裂の促進が失われ、減数分裂の抑制が解除されるという新たなモデルを構築するに至った(図2)。今後はこのMax KO ES細胞が試験管内で減数分裂を解析する新たなツールになることが期待される。これらの成果はNature Communications誌に掲載されほか、Cell Cycle誌に特集された。

図2 筆者らが明らかにした体細胞分裂から減数分裂への切り替え機構



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 5 件)

1. Okuda A, Suzuki A. Unexpected link between Max and meiotic onset. *Cell Cycle* (in press) 2016 査読有り
2. Suzuki A, Hirasaki M, Hishida T, Okamura D, Wu J, Ueda A, Nishimoto M, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Matsui Y, Izpisua Belmonte JC, Okuda A. Loss of MAX results in meiotic entry in embryonic and germline stem cells. *Nat Commun* 7: 11056, 2016 査読有り
3. Katano M, Ema M, Nakachi Y, Mizuno Y, Hirasaki M, Suzuki A, Ueda A, Nishimoto M, Takahashi S, Okazaki Y, Okuda A. Forced expression of Nanog or Esrrb preserves the ESC status in the absence of *nucleostemin* expression. *Stem Cells* 33:1089-1101, 2015 査読有り
4. Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Katano M, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Hirasaki M, Suzuki A, Ueda A, Nishimoto M, Hishida-Nozaki Y, Vazquez-Ferrer E, Sancho-Martinez I, Izpisua Belmonte JC, Okuda A. Functional compensation between Myc and PI3K signaling supports self-renewal of embryonic stem cells. *Stem Cells* 33:713-725, 2015 査読有り
5. Kamon M, Katano M, Hiraki K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. Identification of Ccr4-Not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 23: 2170-2179, 2014 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 鈴木 歩、平崎正孝、上田 篤、松居靖久、奥田晶彦 マウス ES 細胞における減数分裂抑制機構の発見 第 38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 1~4 日
2. Okuda A, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A. Max known as a Myc indispensable partner protein functions as a molecular blockade of meiotic entry. 第 38 回日本分子生物学会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド 2015 年 12 月 1~4 日
3. 片野 幸、水野洋介、仲地 豊、平崎正孝、鈴木 歩、西本正純、岡崎康

司、奥田晶彦 マウス ES 細胞において Nucleostemin ノックアウトによる未分化性の消失は Nanog もしくは Esrrb タンパク質強制発現により回避される。第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25 日~27 日 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ  
[http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div03\\_DB/index.html](http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div03_DB/index.html)  
共同通信プレスリリース  
<http://prw.kyodonews.jp/opn/release/201603299300/>

6. 研究組織

- (1)研究代表者  
鈴木 歩 (Suzuki Ayumu)  
埼玉医科大学・医学部・助教  
研究者番号：80639708
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
なし