

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02429

研究課題名(和文)生殖系列サイクルの遺伝的安定性の発生制御メカニズム

研究課題名(英文) Developmental regulation of genome stability in the germline stem cell cycle in mice

研究代表者

中馬 新一郎 (Chuma, Shinichiro)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：20378889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：生物の遺伝情報は損傷と修復を繰り返して変化する。個体発生過程の遺伝的安定性は均一ではなく、生殖細胞及び幹細胞システムは分化体細胞と比べて遺伝情報をより安定に維持する事で個体及び種の恒常性を保つものと考えられる。本研究では、マウス初期胚由来のES細胞及び各種*in vitro*分化誘導系、精原細胞由来のGS細胞、胎仔繊維芽細胞等を用いて遺伝的安定性に関わる各種指標及びオミクスデータの詳細な比較解析を行った。また、ES細胞の細胞周期活性および代謝活性を適切に制御する事で、多分化能を維持しつつ染色体分配の安定性を人為的に向上する事が可能であるproof of concept (POC)を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、個体発生の起点となる初期発生過程および生殖系列細胞の遺伝的安定性に関わる制御機構を明らかにする目的で、ES細胞、GS細胞、分化体細胞等のDNA損傷応答や染色体安定性に関わる詳細な比較データを得た。また、ES細胞の多能性を維持しつつ染色体安定性を人為的に向上する幾つかの特異的経路の候補を同定した。これらの結果は、発生生物学、遺伝学など基礎生物学的に重要なだけでなく、再生医科学領域等において期待が寄せられている幹細胞リソースの安定供給の為に技術開発の基盤となる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Genetic information is continuously modified by DNA damage and repair. In multicellular organisms, the genetic stability is differentially regulated depending on developmental stages and cell types. Among the various cell lineages, germline cells and stem cell systems are thought to maintain their genetic information more stably than differentiated somatic cells. However, how the genetic stability is properly coordinated with developmental programs is still not well understood. In this study, we carried out in depth comparative analyses of the genetic stability of mouse embryonic stem (ES) cells, their *in vitro* differentiated derivatives (ectoderm and mesendoderm etc), germline stem (GS) cells and embryonic fibroblasts etc. We obtained the proof of concept (POC) that the genetic stability of mouse embryonic stem cells can be artificially enhanced by modulating cell cycle activities and metabolic pathways while maintaining pluripotent differentiation capacities *in vitro*.

研究分野：発生生物学

キーワード：ゲノム 遺伝 発生 生殖 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報は常に損傷と修復を繰り返して変化する。多細胞生物では受精を起点に個々の細胞の遺伝情報は変異を蓄積して癌や老化等の原因になるものと考えられる。しかし各細胞系譜の遺伝的安定性は均一ではなく、幹細胞システムは分化細胞と比べて遺伝情報をより安定に維持する事で生体恒常性を保ち、また生殖系列サイクルは特に遺伝情報の安定性が高いものと考えられる。しかし、遺伝的安定性がどのように発生プログラムと連携して機能調節を受けるのか、また何故生殖系列サイクルの遺伝的安定性は特に高いのか、その制御基盤の理解は殆ど進んでいない。本研究では哺乳類の初期発生過程と生殖系列サイクルの遺伝的安定性の発生制御メカニズムの解明およびその理解に基づいた遺伝的安定性の再構成を目的とする。マウス多能性幹細胞と生殖幹細胞の *in vitro* 増殖分化モデル等を用いて、(1)初期発生過程と生殖系列サイクルの遺伝的安定性の発生制御、(2)遺伝的安定性に関わる機能遺伝子群の発現制御、(3)遺伝的安定性の人為制御が細胞の増殖分化能に与える影響、の解明を行う。遺伝的安定性の発生制御は生物学上の重要課題であると共に その制御技術は幹細胞リソースの応用等にも広く重要である。

2. 研究の目的

遺伝情報は常に物理化学的、生物学的損傷を受け、生物は遺伝情報の劣化を防ぐために各種ゲノム修復機構を獲得した。ゲノム修復機構の中核となる分子システムは進化的に保存されており、従来主に単細胞モデル、培養体細胞などを用いて研究されてきた。一方、多細胞生物のゲノム損傷応答は癌や老化亢進等の疾患研究は行われているが、通常の生理的状态でのゲノム安定性の高次制御の理解は進んでいない。これは正常な個体ではゲノム修復機構はほぼ一定の発現や機能を持つものと考えられてきた事が一因である。しかし、実際には例えば活発な細胞増殖が行われる初期発生過程や幹細胞システムでは、ゲノム損傷応答は DNA 修復と共に細胞周期遅延や細胞死を惹起する事から、発生プログラムと適切に連携して制御される事が重要である。また、生殖細胞は個体と種が成立する根幹であり、遺伝的安定性は出来るだけ高く維持される(減数分裂を除く)ものと考えられる。しかしこれら遺伝的安定性の発生制御の制御基盤は殆ど理解されて

いない。本研究では、個体発生過程で特徴的な機能調節を受ける遺伝的安定性の制御基盤を体系的に研究するために、以下の問いにアプローチする。

- (1) 初期発生過程と生殖系列サイクルの遺伝的安定性の発生制御
- (2) 遺伝的安定性に関わる機能遺伝子群の発現制御
- (3) 遺伝的安定性の人為制御が細胞の増殖分化能に与える影響

3. 研究の方法

本研究は、個体および種の成立の根幹である初期発生と生殖系列サイクルの遺伝的安定性に焦点をおき、体細胞系譜との相違や分子基盤を解明し、遺伝的安定性の人為的な再構成の可能性を探索する。本研究期間中に、以下の研究課題について主要な成果を得た。

(1) 初期発生過程と生殖系列サイクルの遺伝的安定性の発生制御

マウス初期胚由来の多能性幹細胞である ES(embryonic stem)細胞及び各種 *in vitro* 分化誘導系、精原細胞由来の生殖幹細胞である GS(germline stem)細胞、胎仔繊維芽細胞等を用いて遺伝的安定性に関わる各種指標の比較解析を行い、遺伝的安定性制御の ”body map ” を作成する。

(2) 遺伝的安定性に関わる機能遺伝子群の発現制御

多能性幹細胞、生殖幹細胞、体細胞の各細胞系譜の発生段階に応じた遺伝的安定性の相違は、その機能遺伝子群(DNA 修復、DNA 複製、染色体制御、細胞周期制御など)の遺伝子発現調節や機能調節に基づくものと考えられ、その実体にアプローチするためにマルチオミクス解析 (RNAseq、プロテオーム解析) を行う。

(3) 遺伝的安定性の人為制御が細胞の増殖分化能に与える影響

上記(1)、(2)の研究項目の成果に基づき、多能性幹細胞の遺伝的安定性の向上に寄与する事が期待される遺伝子・経路をターゲットとして、低分子化合物による機能抑制や cDNA 発現、CRISPR activation 等による機能亢進を行なった場合に、多能性幹細胞の増殖分化能や各種ゲノムストレスに対する遺伝的安定性を詳しく検証する。

4. 研究成果

(1) 初期発生過程と生殖系列サイクルの遺伝的安定性の発生制御

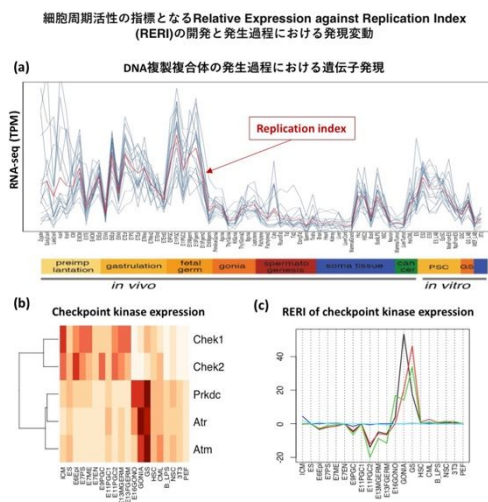
マウス ES 細胞には、naïve 型、primed 型等の初期胚の発生段階に応じた未分化状態

が存在する。naïve 型および primed 型マウス ES 細胞、および、これら ES 細胞から *in vitro* 分化誘導を行なった外胚葉、中内胚葉細胞、またマウス精原細胞由来の GS 細胞、胎仔線維芽細胞等を用いて、各種 DNA 損傷刺激 (X 線、DNA 複製ストレス、染色体分配ストレス等) に対するチェックポイント応答 (G1、S、G2、decatenation、spindle チェックポイント等)、細胞死応答、染色体安定性等を詳細に調べた。また naïve 型 ES 細胞と GS 細胞については、全ゲノムシーケンスによる mutation rate や mutational signature の解析を行なった (GS 細胞の全ゲノムシーケンスは京都大学医学部篠原隆司研究室との共同研究)。これら解析によって、ES 細胞は体細胞と比べて特にチェックポイント応答が顕著に抑制されており、*in vitro* 分化誘導に伴ってチェックポイント応答の回復が見られる事、また、ES 細胞の mutation rate は体細胞と比べて低い一方、染色体安定性については、ES 細胞と体細胞で同等程度に染色体分配の異常が見られる事が明らかとなった。一方、GS 細胞は mutation rate が ES 細胞、体細胞と比べて明らかに低く、また、染色体安定性についても各種ゲノムストレスに対して染色体分配の異常が ES 細胞、体細胞と比べて有意に低く抑えられる事が分かった。

(2) 遺伝的安定性に関わる機能遺伝子群の発現制御機

マウス ES 細胞、GS 細胞、線維芽細胞等から得た RNAseq データ、および、公共データベースに登録されているマウス初期発生過程、生殖細胞分化過程、各種体細胞/組織/臓器、癌細胞等の RNAseq データの網羅的な再解析を行なった。特に、DNA 損傷修復、チェックポイント応答、細胞周期制御、DNA 複製、染色体分配、クロマチン蛋白質等の遺伝的安定性に関わる遺伝子群に焦点を置き、各発生段階および細胞系譜に特徴的な遺伝子発現パターンの抽出に取り組んだ。遺伝的安定性に関わる遺伝子群は、細胞周期活性と連動した発現制御が観察される場合が多い事から、RNAseq データを用いた細胞周期活性の指標を新たに設定し (Replication Index)、同指標を基準として各遺伝子の発現変動をノーマライズする Relative Expression against Replication Index (RERI) 法を開発した。RERI 法によって、細胞周期活性と相関もしくは非相関の発現パターンを示す遺伝子発現変動を明確に可視化する事が可能となった。これら解析の結果、マウス ES 細胞は高い細胞周期活性と連動して DNA 損傷修復遺伝子等の高発現を示すものの、RERI 法でノーマライズした場合には、一部の例外を除いて、多くの DNA 損傷修復遺伝子群は

体細胞と同等程度の発現レベルとなる事が明らかとなった。一方、生殖幹細胞である GS 細胞では、細胞周期活性と乖離した特徴的な発現制御を受ける DNA 損傷修復遺伝子群が存在する事が明らかとなった。これら RNAseq データで観察されたマウス ES 細胞と GS 細胞の相違は、両細胞の安定同位体ラベルを用いた相対定量プロテオーム解析データからも概ね確認された。



(3) 遺伝的安定性の人為制御が細胞の増殖分化能に与える影響

上記の(1)、(2)の結果に基づいて、マウス ES 細胞の染色体安定性を人為的に向上するアプローチとして、細胞周期活性の抑制、チェックポイント活性の増強、代謝活性の抑制、を行なった。細胞周期活性の抑制については、Cdk インヒビター等を適切な濃度と組み合わせで用いる事で、マウス ES 細胞の細胞増殖活性を緩やかに抑制した状態で多分化能を維持しつつ、染色体分配の安定性を向上可能である事が分かった。一方、チェックポイント活性の増強については、チェックポイントキナーゼや下流因子群の cDNA 過剰発現や CRISPR activation システムを用いた発現誘導を行った結果、マウス ES 細胞の未分化状態や細胞増殖活性は維持されたものの、染色体分配の安定性に有意な変化は認められなかった。代謝活性については、各種エネルギー代謝経路の低分子化合物による抑制実験を行なった結果、マウス ES 細胞は様々なレベルで細胞増殖活性の抑制を示すと共に、幾つかの特異的な代謝経路を抑える事により染色体分配の安定性が有意に向上する事が明らかとなった。染色体分配の安定性について最も明瞭な効果の見られた代謝経路の抑制について、全ゲノムシーケンスによる mutation rate の算出を行なった結果、mutation rate はコントロールサンプルと比べて大きな相違は観察されなかった。これらの事から、染色体安定化と塩基変異抑制は異なった経路により制御される可能性が示唆された。現在、染色体分配の安定性を人為的に向上したマウス ES 細胞について、長期培養による影響や個体発生能の検定を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiromoto Yusuke, Kuramochi-Miyagawa Satomi, Nagamori Ippei, Chuma Shinichiro, Arakawa Tatsuhiko, Nishimura Toru, Hasuwa Hidetoshi, Tachibana Taro, Ikawa Masahito, Nakano Toru	4. 巻 101
2. 論文標題 GPAT2 is required for piRNA biogenesis, transposon silencing, and maintenance of spermatogonia in mice†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 248 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz056	査読の有無 有
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 Ishiguro Kei-ichiro, Matsuura Kumi, Tani Naoki, Takeda Naoki, Usuki Shingo, Yamane Mariko, Sugimoto Michihiko, Fujimura Sayoko, Hosokawa Mihoko, Chuma Shinichiro, Ko Minoru S.H., Araki Kimi, Niwa Hitoshi	4. 巻 52
2. 論文標題 MEIOSIN Directs the Switch from Mitosis to Meiosis in Mammalian Germ Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 429 ~ 445.e10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.01.010	査読の有無 有
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 Yamauchi Kaori, Ikeda Tatsuhiko, Hosokawa Mihoko, Nakatsuji Norio, Kawase Eihachiro, Chuma Shinichiro, Hasegawa Kouichi, Suemori Hirofumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Overexpression of Nuclear Receptor 5A1 Induces and Maintains an Intermediate State of Conversion between Primed and Naive Pluripotency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 506 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2020.01.012	査読の有無 有
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 Yoshimura, T., Watanabe, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Takemoto, N., Shiromoto, Y., Kudo, A., Kanai-Azuma, M., Tashiro, F., Miyazaki, S., Katanaya, A., Chuma, S., Miyazaki, J.I.	4. 巻 19
2. 論文標題 Mouse GTSF1 is an essential factor for secondary piRNA biogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EMBO Rep	6. 最初と最後の頁 e42054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201642054	査読の有無 有
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 Anand Deepti, Al Saai Salma, Shrestha Sanjaya K., Barnum Carrie E., Chuma Shinichiro, Lachke Salil A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Genome-Wide Analysis of Differentially Expressed miRNAs and Their Associated Regulatory Networks in Lenses Deficient for the Congenital Cataract-Linked Tudor Domain Containing Protein TDRD7	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 615761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.615761	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ichimura Hajime, Kadota Shin, Kashihara Toshihide, Yamada Mitsuhiro, Ito Kuniaki, Kobayashi Hideki, Tanaka Yuki, Shiba Naoko, Chuma Shinichiro, Tohyama Shugo, Seto Tatsuichiro, Okada Kenji, Kuwahara Koichiro, Shiba Yuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Increased predominance of the matured ventricular subtype in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68373-9	査読の有無 有
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 Barnum Carrie E, Al Saai Salma, Patel Shaili D, Cheng Catherine, Anand Deepti, Xu Xiaolu, Dash Soma, Siddam Archana D, Glazewski Lisa, Paglione Emily, Polson Shawn W, Chuma Shinichiro, Mason Robert W, Wei Shuo, Batish Mona, Fowler Velia M, Lachke Salil A	4. 巻 29
2. 論文標題 The Tudor-domain protein TDRD7, mutated in congenital cataract, controls the heat shock protein HSPB1 (HSP27) and lens fiber cell morphology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 2076 ~ 2097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddaa096	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 中馬新一郎
2. 発表標題 生殖系列サイクルの発生段階に応じた遺伝的安定性の調節機構
3. 学会等名 遺伝研研究会「有性生殖にかかわる染色体・クロマチン・核動態に関する研究会」, 三島
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako L. Mochizuki, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Mihoko Hosokawa, Emiko Moribe, Akira Motegi, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Gen Kondoh, Hitomi Watanabe, Norio Nakatsuji, Shinichiro Chuma.
2. 発表標題 PARI regulates both replication stress response and DNA damage response to maintain genome stability in mice.
3. 学会等名 ICRR2019, Manchester, UK (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中馬新一郎
2. 発表標題 PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice
3. 学会等名 新学術領域研究「生殖細胞のエピゲノムダイナミクスとその制御」成果取りまとめ公開シンポジウム, 京都
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinichiro Chuma
2. 発表標題 Meiosis priming program and genome stability control of the germline stem cell cycle in mouse development
3. 学会等名 MBSJ2000. ZOOM
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中馬新一郎
2. 発表標題 初期発生軸に沿った幹細胞の増殖分化プログラムと遺伝的安定性の可塑性
3. 学会等名 新学術領域研究「配偶子インテグリティの構築」「全能性プログラム」合同公開シンポジウム. ZOOM
4. 発表年 2020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
---------	---------