

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：63905

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23711

研究課題名（和文）ラットES細胞を用いたナীব型幹細胞が持つ潜在的な多能性の活性化に関する研究

研究課題名（英文）Understanding the capacitation of naive embryonic stem cells in rat

研究代表者

及川 真実 (Oikawa, Mami)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・特任研究員

研究者番号：30732903

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：ラットES細胞をエピプラスト様細胞(EpiLC)に分化誘導する培養条件を確立した。誘導したEpiLCは、in vivoエピプラストと類似した遺伝子発現パターンを示した。EpiLCのさらなる誘導を試みたところ、始原生殖細胞様細胞(PGCLC)への分化を示した。以上より、分化誘導したラットEpiLCは多能性活性化を獲得したことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
ナীব型幹細胞が多能性を獲得する機序を理解することは、効率的な細胞分化誘導系を確立する上で重要である。本研究で確立した、ラットES細胞-エピプラスト様細胞-始原細胞への分化誘導系は、ヒトを含む、他の動物種の多能性幹細胞を用いた細胞分化誘導系の確立や改良に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：We optimized culture conditions for differentiation of epiblast-like cells from embryonic stem cells in rat. EpiLCs showed similar gene expression profiles to that of in vivo epiblast. Furthermore, EpiLCs were able to differentiate into primordial germ cells like cells (PGCLCs). These results showed that we succeeded in differentiating functional rat EpiLCs.

研究分野：発生生物学

キーワード：ラット ナীব型幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウス ES 細胞に代表されるナイーブ型 ES 細胞は、生殖細胞を含むあらゆる細胞に分化できる多能性を持つ。ナイーブ型 ES 細胞は、後の発生段階で生じる細胞種に直接分化することはできず、少し発生の進んだエピブラスト様細胞 (Epiblast-like cell, EpiLC) と呼ばれる段階を経て、実際の多分化能を獲得する。したがって、ES 細胞から正常で均一な EpiLC を作出することは、その先の細胞種への効率的な分化誘導につながると考えられる。しかし、マウス以外の動物種のナイーブ型 ES 細胞から、エピブラスト様細胞 (Epiblast-like cell) を分化誘導した報告は未だ数少ない。

2. 研究の目的

マウスと同じナイーブ型を示すラット ES 細胞を用いて、正常で均一な EpiLC を分化誘導する条件を確立することを目指した。

3. 研究の方法

(1) ラット ES 細胞を EpiLC に分化させる基本的な方法を確立し、最適化する

予備実験において、マウス ES 細胞から EpiLC を分化誘導する条件をラット ES 細胞に応用したところ、細胞は増殖せず、生存さえもできなかった。マウス EpiLC は、培養容器に接着して増殖するが、ラット ES 細胞は接着できず、培養コーティング剤を変更しても生存・増殖細胞の増加は見られなかった。そこで、ラット ES 細胞の性質と、マウス ES 細胞の違いを見直した上で、分化誘導に適した条件を探索する。

(2) 始原生殖細胞様細胞 (PGCLC) への誘導により EpiLC の多能性活性化を確認する

(1) でラット ES 細胞から EpiLC を分化誘導できた場合、多能性の活性化が起こっているのかどうか、PGCLC への分化誘導率をもとに判断する。

両実験には、ナイーブ型多能性細胞と PGC で特異的発現を示す *Prdm14* 遺伝子上に、*H2B-Venus* をノックインしたラット (*Prdm14-H2B-Venus*) と、野生型ラットの交配で得られた胚から樹立した ES 細胞を用いた。これにより、細胞を生きのまま観察し、レポーター遺伝子 (*H2B-Venus*) の発現を指標として、EpiLC への分化によるナイーブ型の性質低下、および PGCLC への誘導効率を評価することができる。

4. 研究成果

(1) ラット ES 細胞を EpiLC に分化させる培養条件を最適化できた

ラット ES 細胞は、マウス ES 細胞と比べると、フィーダー細胞に接着しづらい性質を持つ。そこで接着させるのをやめ、低吸着容器を用いてスフェア細胞塊を作製し、FGF2 やアクチビンを含む分化誘導培地で培養したところ、細胞は生存・増殖できるようになった。分化誘導中、*Prdm14-H2B-Venus* の蛍光強度が減弱したことから、ナイーブ型の性質が失われ、EpiLC に分化していることが示唆された (図 1)。スフェア細胞塊を回収し、qRT-PCR により遺伝子発現を解析したところ、エピブラストで発現増大を示す *Dnmt3b* が、ES 細胞に比べて高発現を示した。免疫蛍光染色では、分化誘導開始 24 時間後より、内細胞塊からエピブラストへの分化に必要な *Otx2* タンパクの発現増加も観察された。一方で、胚盤胞の内細胞塊で高発現を示す *Klf2*、*Klf4*、*Klf5*、*Prdm14* や、ES 細胞で高発現を示す *Nanog*、*Sox2* の発現は低下していた。以上の結果から、スフェア培養および分化誘導培地を組み合わせることで、ラット ES 細胞を EpiLC に分化させることができた。

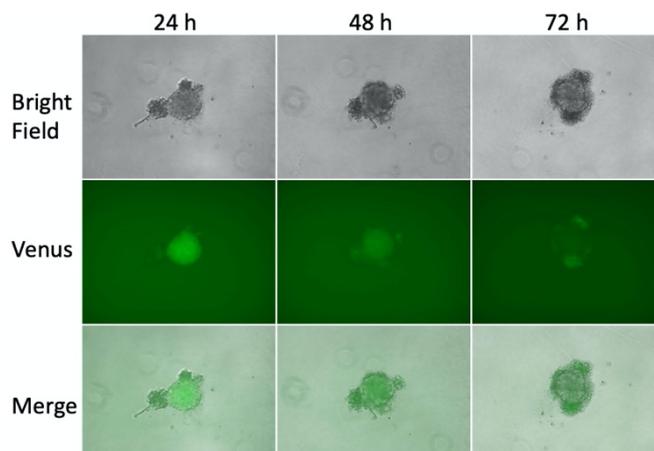


図 1 EpiLC 誘導過程における *Prdm14-H2B-Venus* 蛍光の変化

(2) EpiLC から始原生殖細胞様細胞 (PGCLC) への分化誘導に成功した

次に、誘導した EpiLC が機能的であるかを明らかにするために、胚中の多能性細胞集団から最初に分化する、始原生殖細胞 (PGC) 様の細胞への分化誘導を試みた。まずは *Prdm14-H2B-Venus* ES 細胞からスフェア塊を作製し、EpiLC 分化誘導培地で 2-3 日間培養した。誘導した EpiLC を回収し、サイトカイン不含培地への移動によりもとの培地を除去し、BMP4 など複数のサイトカインを含む PGCLC 分化誘導培地で 3 日間培養した。培養 2 日後から、EpiLC スフェアの一部において、*Venus* 陽性の細胞集団が観察され始めた。培養 3-4 日後のセルソーターによる解析では、BMP4 添加区において、生きた細胞のうち 10%前後の細胞が *Prdm14-H2B-Venus* 陽性を示した(図 2)。これらの *Prdm14-H2B-Venus* 陽性細胞を回収し、qRT-PCR により、ES 細胞および EpiLC と遺伝子発現を比較した。*Prdm14-H2B-Venus* 陽性細胞において、EpiLC で高発現を示す *Dnmt3b* は発現量が大いに減少し、PGC で特異的発現を示す *Prdm14*, *Blimp1*, *Tfap2c*, *Nanos3*, *Dnd1* といった遺伝子は高発現を示した。よって、これらの細胞は PGC の特徴を持つことから、PGCLC に分化できたと考えられる。

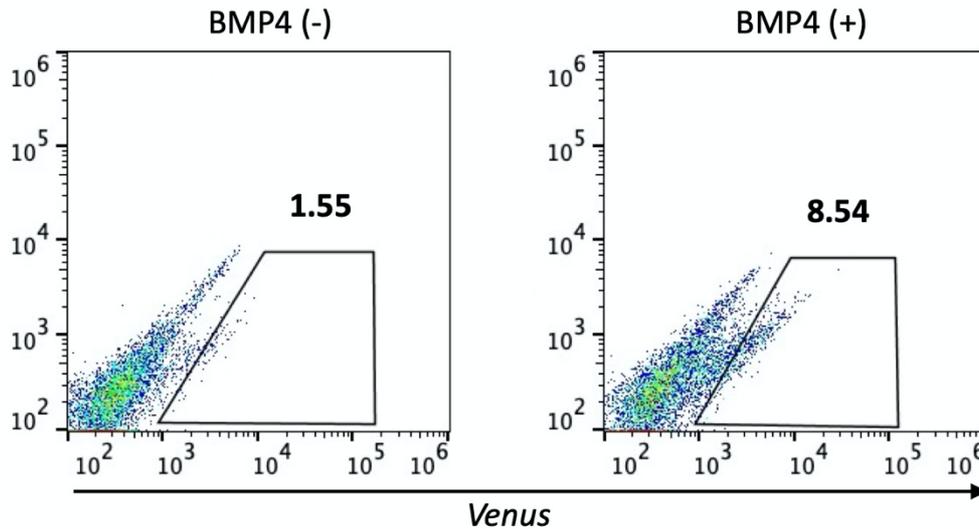


図 2 EpiLC から誘導した d4 PGCLC の解析結果

(3) EpiLC、PGCLC のトランスクリプトームのデータセットを揃えた

(1)および(2)で、培養細胞数や誘導タイミングを最適化した条件を用いて、ラット ES 細胞から EpiLC および PGCLC を分化させた。分化誘導した細胞を回収し、RNA-seq によりトランスクリプトームを解析した。主成分分析により、各細胞種は同じ群に分けられた。qPCR での解析結果と同様に、各細胞種のマーカーとなる遺伝子は、高い発現量を示した。また、EpiLC から誘導した PGCLC を、胎生 9.5~15.5 日の *in vivo* PGC のトランスクリプトームのデータ (Kobayashi et al., 2020, *Development*) と比較すると、性分化前の PGC (およそ胎生 10.5-12.5 日ほど) の発現プロファイルに近いことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi T, Kobayashi H, Goto T, Takashima T, Oikawa M, Ikeda H, Terada R, Yoshida F, Sanbo M, Nakauchi H, Kurimoto K, Hirabayashi M.	4. 巻 147
2. 論文標題 Germline development in rat revealed by visualization and deletion of Prdm14.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.183798	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------