

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 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870017

研究課題名（和文） マウス ES 細胞の樹立過程のライブセルイメージング解析

研究課題名（英文） Live-cell Imaging Analysis of Mouse Embryonic Stem Cell Derivation Processes

研究代表者

上田 潤 (UEDA JUN)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：80450394

研究成果の概要（和文）：本研究課題ではマウス初期胚からの ES（胚性幹）細胞の樹立過程をライブセルイメージングすることで、ES 細胞の起源、ES 細胞の形成過程について明らかにすることを目的としている。研究代表者は DNA のメチル化状態を MBD プローブによって可視化したマウスを作製することに成功し、このレポーターを用いてイメージング解析を行った。これにより ES 細胞とマウスの初期胚（ICM の細胞など）とでは、DNA のメチル化状態が大きく異なることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

This project aims to identify the nature and origin of ES cells. More specifically, we wanted to know how ES cells are derived from inner cell mass cells (the events that take place during ES cell derivation), and what kind of cells they originated from. To address these questions, we decided to generate multiple reporter mice and carried out live-cell imaging analysis. One of the reporter mice which we generated can visualize DNA methylation status in living condition. This reporter mouse was termed *MethylRO* (methylation probe in *ROSA26* locus) and deposited to RIKEN BRC. Using *MethylRO*, we discovered that DNA methylation pattern undergoes dynamic changes during early embryonic development, whereas DNA methylation pattern was fairly static in ES cells. We are now preparing to carry out live-cell imaging analysis of ES cell derivation process using this *MethylRO* mouse embryo (*Ueda et al.* In preparation).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：ES 細胞、ライブセルイメージング、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ES（胚性幹）細胞や iPS（人工多能性幹）細胞は再生医療の切り札として大きく期待されている。しかしながら ES 細胞が生体内

のどの時期の細胞に由来するのか、またどのような過程を経て ICM（内部細胞塊）の細胞が ES 細胞になるのかなど、まだ解決されていない疑問は多い。例えば、ICM と ES 細胞

を等価であると主張する研究者もいるが、このような疑問、主張に答えるためには各種レポーターマウスを用いて ES 細胞の樹立過程をイメージングすることが必要不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では ES 細胞の起源、ES 細胞の形成過程について明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

研究代表者は理化学研究所の山縣一夫博士（現・大阪大学）、若山照彦博士（現・山梨大学）との共同研究によって世界で初めてマウス着床前胚からの ES 細胞の樹立過程の非侵襲性、長期蛍光ライブセルイメージングに成功した。この研究によって ES 細胞の樹立過程でカスパーゼ依存的な、大規模なアポトーシスが誘導されていることが明らかとなり、これが ES 細胞の樹立の成否を決定している大きな要因の一つであることを明らかとした。また、英国ケンブリッジ大学の Austin Smith 博士らによって報告された MEK 阻害剤と GSK3 阻害剤を用いた 3i（現 2i）法ではこのアポトーシスが抑制されることで、ES 細胞の樹立効率が著しく向上することも本イメージングによって明らかとなった。本研究課題ではこの時に用いたイメージング技術と、新たに作製する各種レポーターマウスを組み合わせることでマウス初期胚からの ES 細胞の樹立過程のライブセルイメージング解析を行う。

4. 研究成果

本研究課題では Oct4-EGFP ノックインマウス（丹羽仁史博士よりベクターを分与いただいた）と DNA のメチル化状態を MBD プローブによって可視化したマウスを作製することに成功した。これらのマウスは理研 BRC に寄託あるいは寄託するための準備を進めている。

DNA のメチル化状態を可視化したレポーターを用いてイメージングしたところ、ES 細胞とマウスの初期胚（ICM の細胞など）とでは、DNA のメチル化状態（主にヘテロクロマチンが可視化される）が大きく異なることが明らかとなった。より具体的には、ES 細胞のヘテロクロマチンは細胞周期を通じて常に凝集していた（明瞭な focus が確認された）のに対して、初期胚のそれは非常に動的に変化しており、時折ヘテロクロマチンの focus が消えることが明らかとなった。今後は本研究課題で作製したレポーターマウス由来の胚を用いて ES 細胞の樹立過程のライブセルイメージング解析を行なっていく。

本研究課題を通じて作製したレポーター

マウスについては世界中の研究者に広く利用していただくために、論文として発表する（*Ueda et al.* 投稿準備中）。

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 4 件）

- ① Do, D.V., Ueda, J., Messerschmidt, D.M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., Guo, G., Lin, P.J., Hossain, Z., Zhang, W., Moh, A., Wu, Q., Robson, P., Ng, H.H., Poellinger, L., Knowles, B.B., Solter, D. and Fu, X.Y. (2013) A Genetic and Developmental Pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG Circuit is Essential for Maintenance of ICM Lineages in vivo. *Genes & Dev. In Press.* 【査読有り】
 - ② Yamagata, K. and Ueda, J. (2013) Long-term Live-cell Imaging of Mammalian Preimplantation Development and Derivation Process of Pluripotent Stem Cells from the Embryos. *Dev. Growth Differ.* 55, 378-389. doi: 10.1111/dgd.12048. 【査読有り】
 - ③ Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Yamada, Y., Shirahige, K., and Saitou, M. (2013) PRDM14 Ensures Naïve Pluripotency through Dual Regulation of Signaling and Epigenetic Pathways in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 368-382. doi: 10.1016/j.stem.2012.12.012. 【査読有り】
 - ④ Shimizu, T., Ueda, J., Ho, J.C., Iwasaki, K., Poellinger, L., Harada, I., and Sawada, Y. (2012) Dual Inhibition of Src and GSK3 Maintains Mouse Embryonic Stem Cells, Whose Differentiation Is Mechanically Regulated by Src Signaling. *Stem Cells* 30, 1394-1404. doi: 10.1002/stem.1119. 【査読有り】
- 〔学会発表〕（計 11 件）
- ① Ueda, J., Lee, K.L., Ho, J.C., Kitajima, S., Yang, H., Sun, W., Fukuhara, N., Zaiden, N., Chan, S.L., Tachibana, M., Shinkai, Y., Kato, H., and Poellinger,

- L. Hypoxia-inducible Epigenetic Regulators Jmjd1a and G9a Antagonistically Control Angiogenesis and Immature Tumorigenic Cell Populations. **第10回がんとハイポキシア研究会**, 2012年12月6日～7日, 横浜.
- ② Ueda, J., Yamagata, K., Ikawa, M., and Okabe, M. Visualization of DNA Methylation Status in Living Mice. **新学術領域研究「哺乳類初期発生の細胞コミュニティー」第5回班会議**, 2012年11月19日～21日, 逗子.
- ③ Ho, J.C., Lee, K.L., Ueda, J., Kitajima, S., Yang, H., Sun, W., Fukuhara, N., Zaiden, N., Chan, S.L., Tachibana, M., Shinkai, Y., Kato, H., and Poellinger, L. Hypoxia-inducible Epigenetic Regulators Jmjd1a and G9a Antagonistically Control Angiogenesis and Immature Tumorigenic Cell Populations. **Frontiers in Cancer Science 2012**, November 5 - 8, 2012, NUS, Singapore.
- ④ Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Shirahige, K., and Saitou, M. PRDM14 Controls Sensitivity to Extrinsic Signals and Ensures a Naïve Epigenome in Mouse Embryonic Stem Cells. **Cold Spring Harbor Meeting "Germ Cells"**, October 2 - 6, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- ⑤ Sato, Y., Ueda, J., Horikoshi, N., Kujirai, T., Stasevich, T.J., Yamagata, K., Kurumizaka, H., Nozaki, N., and Kimura, H. A genetically encoded probe for monitoring the endogenous histone H3 Lys9 acetylation in living cells. **Cold Spring Harbor Meeting "Epigenetics & Chromatin"**, September 11 - 15, 2012, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- ⑥ 山縣一夫, 上田潤, 水谷英二, 斎藤通紀, 若山照彦. ES細胞のできるまで. 第105回日本繁殖生物学会大会, 2012年9月5日～8日, 筑波.
- ⑦ Ueda, J., Yamagata, K., Ikawa, M., and Okabe, M. Visualization of DNA Methylation Status in Living Mice. 生殖サイクル若手勉強会, 2012年7月25日～27日, 仙台.
- ⑧ Do, D.V., Ueda, J., Lorthongpanich, C., Zhang, W., Moh, A., Zhou, Y., Feng, B., Guo, G., Lin, P.J., Hossain, Z., Messerschmidt, D.M., Wu, Q., Robson, P., Ng, H.H., Poellinger, L., Knowles, B.B., Solter, D. and Fu, X.Y. The STAT3-OCT4 Axis is Essential for Development of Inner Cell Mass and Embryonic Stem Cells. **International Society for Stem Cell Research, 10th Annual Meeting**, June 13 - 16, 2012, Yokohama, Japan.
- ⑨ 佐藤優子, 上田潤, 山縣一夫, 堀越直樹, 胡桃坂仁志, 野崎直仁, 木村宏: ヒストン修飾抗体 scFv を用いた H3K9 アセチル化レベルの生細胞イメージング. 第6回エピジェネティクス研究会年会, 2012年5月14日～15日, 東京.
- ⑩ Ueda, J., Lee, K.L., Ho, J.C., Yang, H., Fukuhara, N., Chan, S.L., Tachibana, M., Shinkai, Y., Kato, H., and Poellinger, L. Role of the Hypoxia-Inducible Histone H3K9 Demethylase Jmjd1a and the H3K9 Methyltransferase G9a in Stem Cell Self-Renewal and Tumorigenesis. **Keystone Symposia "Advances in Hypoxic Signaling"**, February 12 - 17, 2012, Banff, Alberta, Canada.
- ⑪ Ueda, J., Yamagata, K., Mizutani, E., Saitou, M., and Wakayama, T. Survival and death of epiblast cells in ES derivation process revealed by long-term live-cell imaging of Oct4 reporter system. **定量生物学の会, 第四回年会**, 2012年1月7日～9日, 名古屋.
- [図書] (計1件)
- ① 上田潤, 三村維真理. 低酸素とエピジェネティクス, 「細胞」2013年8月号印刷中.
- [産業財産権]
- 出願状況 (計1件)
- 名称: Method to preserve the pluripotency of embryonic stem cells.
 発明者: Sawada, Y., Shimizu, T., and Ueda, J.
 権利者: Sawada, Y., Shimizu, T., and Ueda, J.
 種類: United States Patent US Provisional

Application

番号：No.：61/495,232

出願年月日：2011年6月9日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://researchmap.jp/wiz/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 潤 (UEDA JUN)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教

研究者番号：80450394