

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 2 5 年 5 月 3 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20062011

研究課題名（和文） 生殖細胞エピゲノム獲得機構の解明とその再構成

研究課題名（英文） The mechanism of the acquisition of germ cell-specific epigenome and its reconstruction in vitro.

研究代表者 斎藤 通紀 (Mitinori Saitou)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：80373306

研究成果の概要（和文）：本研究では、精子や卵子の起源となる始原生殖細胞の形成機構の解明に成功し、その成果に基づき、多能性幹細胞[胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES 細胞）や人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells: iPS 細胞）]を起点として、マウス始原生殖細胞の形成過程を培養ディッシュ上で再現することに成功した。培養ディッシュ上で誘導された始原生殖細胞は、精子や卵子、さらには健全な産仔に貢献した。また、マウス ES 細胞の多能性維持機構における PRDM14 の役割を解明した。

研究成果の概要（英文）：We clarified the mechanism underlying the specification of primordial germ cells (PGCs), the precursors both for spermatozoa and oocytes, in mice. Based on the knowledge obtained, we succeeded in reconstituting mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells including embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs). The induced PGC-like cells contributed to spermatozoa and oocytes, and to fertile offspring. We also clarified the role of PRDM14 in the maintenance of pluripotency in mouse ESCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,700,000	0	12,700,000
2009年度	12,700,000	0	12,700,000
2010年度	12,700,000	0	12,700,000
2011年度	12,700,000	0	12,700,000
2012年度	12,700,000	0	12,700,000
総計	63,500,000	0	63,500,000

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：発生・分化、遺伝子、ゲノム、シグナル伝達、再生医学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マウスをモデル動物として、発生過程で生殖細胞が体細胞から分離する機構、それにより生殖細胞が獲得する特性を理解することを研究の出発点とし、生殖細胞に託されるゲノム情報再編・継承の機構、全能性維持・再獲得の機構を理解・再構成する

ことを目指した研究を推進してきた。研究代表者は、本研究開始当初までに、1) 単一細胞解析による始原生殖細胞（Primordial Germ Cells: PGCs）決定に関わる分子プログラムの提唱（体細胞プログラムの抑制と潜在的多能性の再獲得）、2) Blimp1(Prdm1)が、生殖細胞決定過程の最上流で働く必須の転

写制御因子であることの証明、3) 生殖細胞形成に必須な役割を果たす新規遺伝子 *Prdm14* の同定とその機能解析(研究推進中)、4) 単一細胞マイクロアレイ法を開発し、生殖系列決定過程で機能する因子群の系統的な解析を推進、5) 生殖細胞はその運命決定直後ゲノムワイドなエピゲノム修飾の変換を行うことを証明、を含む成果を挙げ、生殖細胞成立機構に関する研究を先導してきた。

本研究では、これらの研究をさらに発展させ、遺伝情報継承に必須な生殖細胞系列が成立・分化する分子機構をより完全に理解し、それを試験管内で正確に再現することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、

(1) 生殖細胞形成機構を解明し、その知見に基づき、生殖細胞形成過程を試験管内で再構成し、生殖細胞系列が獲得するユニークなエピゲノム情報とその獲得機構を解明すること、を大きな目的とした。

さらに、(1) の目的に付随して、

(2) *Prdm14* の胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells: ESCs) の多能性維持における役割解明、

(3) 生殖細胞形成能獲得における *Wnt3* 及び *Bmp4* シグナルの作用機序解明、することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 我々が開発した単一細胞マイクロアレイ法を用いて、PGC の形成過程に付随するゲノムワイドな遺伝子発現を同定した。同方法を用いて、*Blimp1* ノックアウトマウスにおける遺伝子発現異常の同定した。*Prdm14* ノックアウトマウスを作成し、PGC 形成異常の解析を行った。様々なシグナル分子のノックアウト胚における *Blimp1* 及び *Prdm14* の発現異常の解析、胚体外胚葉の培養実験により、*Blimp1* 及び *Prdm14* の発現誘導機構を解析した。ES 細胞及び iPS 細胞を用いて、胚体外胚葉細胞、PGC 様細胞を誘導する条件を検討した。

(2) *Prdm14* ノックアウト ES 細胞を作成し、その異常を様々な方法で解析した。

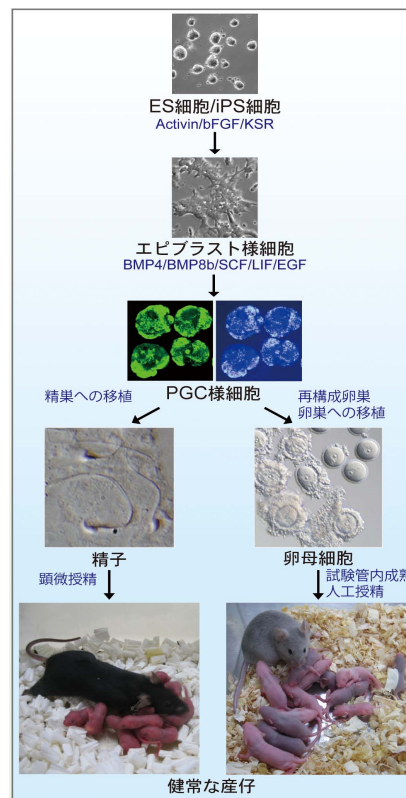
(3) *Wnt3* ノックアウト ES 細胞を作成し、その異常を様々な方法で解析した。

4. 研究成果

(1) PGCs の形成機構を高い解像度で明らかにした。具体的には、PGC 形成に伴うゲノムワイドな遺伝子発現動態とそれを統合する *Blimp1* の役割解明 (*Blimp1* が PGCs の中胚葉化を抑制する必須の因子であることを証明)、PGC 形成に必須な遺伝子 *Prdm14* の同定とその機能解明 (*Prdm14* が PGCs に

おける多能性再獲得とエピゲノムリプログラミングに必須であることを証明)、PGC 二重モニターマウス及び ES 細胞の樹立、PGC 形成のシグナル原理解明、PGCs における *Nanos3* の局在解明、などに成功した。

その知見に基づいて、ES/iPS 細胞から PGC 様細胞を試験管内で誘導すること、誘導した PGC 様細胞を、生殖細胞を有さない新生児精巣に移植することで、健全な精子に分化させることに成功した (図 1)。また、メス ES/iPS 細胞から誘導した PGC 様細胞を、メス胎児卵巣由来体細胞と共培養することで凝集塊を形成し (再構成卵巣)、それらをマウス卵巣皮膜化に移植すると、PGC 様細胞は卵母細胞に分化することを示した。それら卵母細胞を試験管内で成熟、受精させると、胚発生が進行し、それらの胚は仮親に移植すると健全な子孫に貢献することを示した (図 1)。これらの成果は国内外で高い評価を得た。



(図 1) ES/iPS 細胞からの PGC 様細胞誘導と、PGC 様細胞から精子、卵子、産仔を得る実験系の概要。

(2) マウス ES 細胞がナイーブな多能性を維持するために、*PRDM14* が、*FGFR* シグナル経路に関与する分子群の発現を抑え ES 細胞分化のプライミングを防ぐこと、また *Dnmt3a*, *Dnmt3b*, *Dnmt3l* の発現を抑え ES 細胞がエピブラスト様のエピゲノ

ムを獲得するのを防ぐこと、これら分子の発現抑制はPRC2と複合体を形成することにより行われることを証明した。

(3) 我々が開発した *in vitro* 生殖細胞誘導系を用いて、エピブラスト様細胞において *Blimp1* と *Prdm14* が誘導されるには、*BMP4* と *WNT3* の両シグナルが必要かつ十分であること、*Blimp1* の高い発現と *Prdm14* の活性化にはそれらシグナルの下流でさらに別の因子が活性化されることが必須であることを示す実験結果を得た。

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30件)

Yamaji, M., Ueda, J., Hayashi, K., Ohta, H., Yabuta, Y., Kurimoto, K., Nakato, R., Shirahige, K., and Saitou, M. PRDM14 ensures naïve pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 12, 368-382, (2013). DOI: 10.1016/j.stem.2012.12.012.

Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., and Saitou, M. Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *The EMBO Journal*, 32, 340-353, (2013). DOI: 10.1038/emboj.2012.331

Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H., and Saitou, M. Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 338, 971-975, (2012). DOI: 10.1126/science.1226889.

Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146, 519-532, (2011). DOI: DOI 10.1016/j.cell.2011.06.052

Hirota, T., Ohta, H., Shigeta, M., Niwa, H., and Saitou, M. Drug-inducible gene recombination by the *Dppa3-MER Cre MER* transgene in the developmental cycle of the germ cell lineage in mice, *Biology of Reproduction*, 85, 367-377, (2011). DOI: DOI 10.1095/biolreprod.110.090662

Yabuta, Y., Ohta, H., Abe, T., Kurimoro, K., Chuma, S., and Saitou, M. TDRD5 is required for retrotransposon silencing, chromatoid body assembly and spermiogenesis in mice. *The Journal of Cell Biology*, 192, 781-795, (2011). DOI:10.1083/jcb.201009043

Yamaji, M., Tanaka, T., Shigeta, M., Chuma, S., Saga, Y., and Saitou, M. Functional reconstruction of *Nanos3* expression in the germ cell lineage by a novel transgenic reporter reveals distinct subcellular localizations of *Nanos3*. *Reproduction*, 139, 381-393, (2010). DOI:10.1530/REP-09-0373

Ohinata, Y., Ohta, H., Shigeta, M., Yamanaka, K., Wakayama, T., and Saitou, M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*, 137, 571-584, (2009). DOI:10.1016/j.cell.2009.03.014

Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., and Saitou, M. Critical function of *Prdm14* for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nature Genetics*, 40, 1016-1022, (2008). DOI:10.1038/ng.186

Kurimoto, K., Yabuta, Y., Ohinata, Y., Shigeta, M., Yamanaka, K., and Saitou, M. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by *Blimp1* for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes & Development*, 22, 1617-1635, (2008). DOI:10.1101/gad.1649908

[学会発表] (計66件)

Saitou, M. Mechanism and reconstitution *in vitro* of germ cell specification in mice. EMBO/EMBL “From Functional Genomics to Systems Biology” meeting Heidelberg, Germany 平成24年11月18日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution *in vitro* of germ cell specification in mice. EMBO/EMBL Symposium Heidelberg, Germany 平成24年10月16日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution

in vitro of germ cell specification in mice.
The 4th EMBO meeting
Nice, France
平成 24 年 9 月 25 日

Saitou, M. Towards in vitro reconstitution
of mammalian germ cell development.
ISSCR 10th Annual Meeting
横浜
平成 24 年 6 月 14 日

Saitou, M. Mechanism and reconstitution
in vitro of germ cell specification in mice
Stem Cells in Development and Disease
Max-Delbruck-Center, Berlin-Buch,
Germany
平成 23 年 9 月 12 日

Saitou, M. Germ cell specification in mice
in vivo and in vitro.
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on
Germ Cells
Cold Spring Harbor Laboratory, New York,
USA
平成 22 年 10 月 5 日

Saitou, M. Germ cell specification in vivo
and in vitro.
ISSCR 8th Annual Meeting
San Francisco, USA
平成 22 年 6 月 18 日

[図書] (計 3 件)

Saitou, M., and Yamaji, M. Primordial
germ cells in mice. CSH Perspectives in
Biology, 4, (2012).
DOI: 10.1101/cshperspect.a008375

Kurimoto, K., and Saitou, M. A global
single-cell cDNA amplification method for
quantitative microarray analysis. Methods
in Molecular Biology, 687, 91-111, (2011).
DOI:10.1007/978-1-60761-944-4_7

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称 : METHOD OF INDUCING
DIFFERENTIATION FROM
PLURIPOTENT STEM CELLS TO GERM
CELLS
発明者 : 斎藤通紀、林克彦
権利者 : 国立大学法人京都大学
種類 : 特許
番号 : 61/373,563

出願年月日 : 2010 年 8 月 13 日
国内外の別 : 国外 (米国)

名称 : METHOD OF INDUCING
DIFFERENTIATION FROM
PLURIPOTENT STEM CELLS TO GERM
CELLS

発明者 : 斎藤通紀、中木文雄
権利者 : 国立大学法人京都大学
種類 : 特許
番号 : 61/771,619

出願年月日 : 2013 年 3 月 1 日
国内外の別 : 国外 (米国)

○取得状況 (計 0 件)

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

[その他]

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/doctoral_course/r-003/

<http://step.anat2.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

斎藤 通紀 (Mitinori Saitou)

研究者番号 : 80373306

(2)研究分担者

大日向 康秀 (Yasuhide Ohinata)

研究者番号 : 70415107

上田 潤 (Jun Ueda)

研究者番号 : 80450394