

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18546

研究課題名(和文)母性効果因子による分化全能性を有した幹細胞へのリプログラミング

研究課題名(英文)Reprogramming into induced totipotent stem cells by maternal factors

研究代表者

武田 行正(Yukimasa, Takeda)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40735552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵母細胞に豊富に存在する母性効果因子を用いて、分化全能性を有した幹細胞へのリプログラミングを目指す。23種類の母性効果因子を、山中4因子とともに一つずつMEF細胞へ発現させたところ、そのうちいくつかがいPS細胞へのリプログラミング効率を上昇させるとともに、全能性の遺伝子マーカーとなりうる胚2細胞期特異的遺伝子の発現およびその陽性細胞の分布を増加させた。母性効果因子を発現するES細胞あるいはiPS細胞を、初期胚と混合させ胎盤胞まで成長させたところ、これらの細胞が通常寄与できない栄養外胚葉へ寄与している可能性が示唆された。これらの母性効果因子は、全能性獲得に重要である可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to reprogram mouse embryonic fibroblasts into totipotent stem cells. Each lentivirus to express 23 maternal effect genes was infected in MEFs together with Yamanaka's 4 factors to generate iPS cells with a higher potency. The reprogramming efficiency was clearly enhanced by some of them. Moreover, some of the iPS cells significantly more expressed a series of genes specific to embryos at the 2 cell-stage, and the cell population of the cells expressing the genes was increased. To test totipotency, either iPS cells or ES cells that were generated by using maternal effect genes from CAG-EGFP transgenic mice were combined with wild-type mouse embryos at the 8 cell-stage. The GFP fluorescence was carefully observed in inner cell mass and trophectoderm of the blastocysts. The results implied that a few cells might be contributed to the trophectoderm and that some of the maternal effect genes might play an important role for the acquisition of totipotency.

研究分野：再生医療

キーワード：リプログラミング 母性効果因子 分化全能性 人工多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では最近、卵母細胞に豊富に存在するヒストンのバリエーションが、母性効果因子として機能し、初期胚の発達に必要であると同時に、体細胞から iPS 細胞へのリプログラミングの効率を促進することを発見した。体細胞核移植 (SCNT: Somatic cell nuclear transfer) によって、卵母細胞の核を体細胞の核と入れ換えると、DNA やヒストンといった核クロマチンのエピゲノムの状態が、分化全能性を有する状態までリプログラミングすることが知られている (図 1A)。このことは、卵母細胞中に豊富に存在するタンパク質 (母性効果因子) が、終末分化している体細胞の核を、生体組織のみならず胎盤組織にも分化可能な全能性を有する状態 (totipotent state) にリプログラミング可能であることを示している。このような母性効果因子は、現在 iPS 細胞へのリプログラミングに用いられている山中 4 因子 (Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc) と比べ、より効率良くかつ ES 細胞に近い状態にリプログラミング可能であると期待されている。しかしながら、その鍵となる母性効果因子はその全てが同定されておらず、またリプログラミングの詳細なメカニズムも不明である。

近年、ヒト iPS 細胞を用いた臨床応用が実際に始まったばかりであるが、依然として再生医療や創薬への応用にはいくつかの障壁がある。その一つは、より効率的かつ ES 細胞に近い iPS 細胞の作製である。山中 4 因子を過剰発現させてリプログラミングする iPS 細胞では、DNA のメチル化、ヒストンの種類・修飾といったエピゲノムの状態が、初期胚から単離された ES 細胞とは大きく異なっていることが報告されている。また、このリプログラミングの状態がコロニーの種類によっても異なり、iPS 細胞の性質の不均一性が指摘されている。このような iPS 細胞では、多能性の獲得と適切な分化に関わる遺伝子の発現が損なわれている可能性がある。卵母細胞を用いた体細胞核移植 (SCNT) の実験に証明されているように、母性効果因子を用いることでより完全なリプログラミングを行えることが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、卵母細胞に豊富に存在する母性効果因子を用いて、分化全能性 (totipotency) を有した幹細胞へリプログラミングすることおよびそのメカニズムを解明することである。そのため本研究では、まず母性効果因子を発現させるためレンチウイルスベクターの構築を行い、MEF 細胞および ES 細胞にこれらが発現させて、全能性獲得に重要な母性効果因子の同定を目指す。そして次に、これらの母性効果因子を用いて作製した iPS 細胞やこれらが発現する ES 細胞が、本当に全能性を持つかどうか検証し、このリプログラミング機構をエピジェネティクスの観点から解析を行う。本研究で目的としている分化全能性獲得のリプログラミング機構の解明は、細胞を適切にリプログラミング・分化させることが必要な幹細胞研究とそのヒトへの臨床応用にとって科学的基盤となることが期待される。

3. 研究の方法

まず最初に、報告されている母性効果因子の遺伝子クローニングを行い、発現効率の良いレンチウイルスベクターに組み込む ( )。次に、それぞれのレンチウイルスを調製した後濃縮し、目的のタンパク質が発現することを確認する ( )。これを用いて、マウス胚性繊維芽細胞 (MEF 細胞) に、山中 4 因子とともに母性効果因子を発現させ、iPS 細胞へのリプログラミング効率を測定する ( )。このとき、iPS 細胞の状態の違いについて、全能性のマーカーとなりうる胚 2 細胞期の発現とその陽性細胞の分布について解析する ( )。また、ES 細胞についても本来発現していない母性効果因子を発現させ、同様に胚 2 細胞期

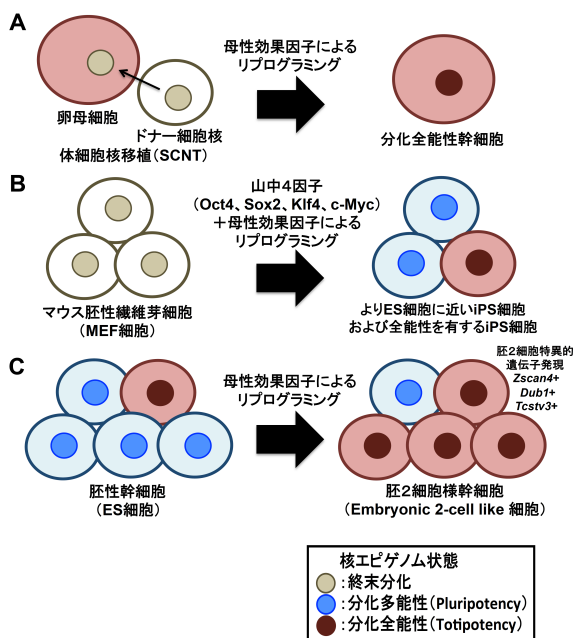


図 1. 母性効果因子による分化全能性を有した幹細胞へのリプログラミング

- A. 体細胞核移植 (SCNT) によるリプログラミング
- B. 山中 4 因子および母性効果因子の共発現によるリプログラミング
- C. 母性効果因子による胚 2 細胞様幹細胞へのリプログラミング

の発現とその陽性細胞の分布について解析する( )。最後に、これら母性効果因子によってリプログラミングされた iPS 細胞および ES 細胞が分化全能性を持つかどうか調べるため、野生型マウスの初期胚と混合したキメラ胎盤胞における栄養外胚葉の細胞へ寄与するかどうか調べる( )。

#### (1) 遺伝子クローニング

23 種類の母性効果因子およびその候補について、卵母細胞より抽出した RNA を用いて、cDNA クローニングを行う。これらの多くは、卵母細胞において発現減少または消失により、2 細胞期 (2-cell stage embryo) あるいは胎盤胞 (blastocyst) での発達が阻害されることが報告されている遺伝子である。

#### (2) レンチウイルスの作製

上記で増幅あるいはクローニングベクターへ組み込んだ母性効果因子の全長 cDNA について、それぞれテトラサイクリン誘導性 (Tet-on) のレンチウイルス発現ベクターへサブクローニングを行う。HEK293 細胞を基本としたパッケージングシステムを用いてレンチウイルスをそれぞれ調製し、濃縮後実際に細胞へ感染させて、発現するタンパク質の分子量について確認を行う。

#### (3) 母性効果因子による iPS 細胞へのリプログラミング効率の影響評価

ES 細胞のマーカーである *Nanog* 遺伝子のプロモーターにより発現する蛍光色素 GFP を iPS 細胞の指標とするため、*Nanog*-GFP トランスジェニックマウスより胚性繊維芽細胞 (MEF 細胞) を採取する。これら MEF 細胞に対し、山中 4 因子 (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) とともに一つずつ上記の母性効果因子を発現するレンチウイルスを感染させ、リプログラミングを行い、GFP 陽性の iPS 細胞のコロニー数を計測する。また、フローサイトメトリーを行い、GFP 陽性 iPS 細胞の数と蛍光強度を定量することでリプログラミングの効率を評価する。

#### (4) 胚 2 細胞期に特異的に発現する遺伝子群の定量

山中 4 因子とそれぞれの母性効果因子によって作製された iPS 細胞について、リプログラミングの状態がどのように異なるのか、多能性の遺伝子マーカー (*Oct4*, *Rex1*, *Sall4* など) と、全能性の遺伝子マーカーとなりうる胚 2 細胞期に特異的に発現する遺伝子群 (*Zscan4*, *Dub1*, *Tsctv3* など) の発現レベルを、山中 4 因子のみで作製した iPS 細胞と比較することで検証する。

#### (5) 母性効果因子による ES 細胞のリプログラミング

上記の母性効果因子が分化全能性を持つ状態まで ES 細胞をリプログラミングすることが

可能かどうか明らかとするため、レンチウイルスをそれぞれ ES 細胞に感染させる。しかし、ES 細胞ではこのような外来性の遺伝子の発現が抑制されることが知られており、安定した発現を維持するため、抗生物質による細胞のセレクションを行う。その後、リアルタイム PCR による胚 2 細胞期特異的な遺伝子の定量、また抗 *Zscan4* 抗体を用いた 2 細胞様細胞の染色およびフローサイトメトリー解析によって、その分布の増加を評価する。

#### (6) キメラ胎盤胞の作製による栄養外胚葉への寄与の検証

上記研究計画 (4) および (5) において判明した胚 2 細胞期特異的な遺伝子をより多く発現する、母性効果因子を用いてリプログラミングされた iPS 細胞および ES 細胞が、分化全能性を持つ可能性について検討する。つまり、これらの細胞が栄養外胚葉 (trophectoderm) の細胞に寄与するかどうか解析するため、これらの細胞を野生型マウスから採取した 8 細胞期 (8-cell stage) の初期胚と混合させ、キメラ胎盤胞までを作製する。このとき ES あるいは iPS 細胞由来の細胞であることを示すため、これらの細胞は全身に GFP を発現する *CAG*-EGFP トランスジェニックマウスから採取した MEF 細胞および ES 細胞を用い、レンチウイルスを用いて母性効果因子を発現させ調製する。

## 4. 研究成果

### (1) 遺伝子クローニング

表 1 で計画した母性効果因子およびその候補を卵母細胞より抽出した RNA を用いて、cDNA クローニングを行った。結果、23 種類すべてのクローニングに成功し、レンチウイルスベクターへ挿入した。

表 1 報告されている母性効果因子の候補

#	Name	Functional annotation	Developmental arrests
1	<i>Bnc1</i>	Zinc finger protein	2-cell stage embryo
2	<i>Glis1</i>	Zinc finger protein	
3	<i>Tet3</i>	Hydroxylation of 5mC	Embryo
4	<i>Pgc7</i>	DNA methylation	Blastocyst
5	<i>Hsf1</i>	Heat shock protein	2-cell stage embryo
6	<i>Taf1b</i>	TBP-associated factor	
7	<i>Zar1</i>	Zinc finger protein	2-cell stage embryo
8	<i>Zar2</i>	Zinc finger protein	
9	<i>Lin28</i>	RNA-binding protein	
10	<i>Filia</i>	Complex with Mater	Blastocyst
11	<i>Floped</i>	Complex with Mater	2-cell stage embryo
12	<i>Mater</i>	Translational control	2-cell stage embryo
13	<i>Padi6</i>	Complex with Mater	2-cell stage embryo
14	<i>Tle6</i>	Complex with Mater	
15	<i>Brg1</i>	Chromatin remodeling	2-cell stage embryo
16	<i>Dnmt1o</i>	DNA methyltransferase	Blastocyst
17	<i>Kdm1b</i>	Histone 3K4 demethylase	
18	<i>Nobox</i>	Homeobox, oogenesis	Blastocyst
19	<i>Importin α7</i>	Importin α family	2-cell stage embryo
20	<i>H3.3</i>	Histone 3.3	Blastocyst
21	<i>TH2A/B</i>	Histone variants	Blastocyst
22	<i>Hira</i>	Histone chaperon	
23	<i>Npm2</i>	Histone chaperon	2-cell stage embryo

### (2) レンチウイルスの作製

23 種類の母性効果因子が組み込まれたレンチウイルスベクターを、一つずつ HEK293

細胞を基本としたパッケージングシステムへトランスフェクションを行い、細胞上清へレンチウイルスを調製した。次にこれを濃縮し、それぞれのタンパク質が実際に発現することをウエスタンブロッティングにより確認を行った。結果 23 種類全てにおいてその発現を確認することができた。

### (3) 母性効果因子による iPS 細胞へのリプログラミング効率の影響評価

山中 4 因子とともに、上記のように作製した 23 種類の母性効果因子のレンチウイルスをそれぞれマウス胚性繊維芽細胞 (MEF 細胞、*Nanog-GFP* トランスジェニックマウス由来) へ発現させ、iPS 細胞へのリプログラミング効率の影響を解析した。発現開始から約 2 週間程度で、iPS 細胞のコロニーが現れ、そのコロニーの数と、GFP 陽性コロニーの数をそれぞれ計測し、その効率を計算した。結果、効率を上昇させるいくつかの母性効果因子を同定した。

### (4) 胚 2 細胞期に特異的に発現する遺伝子群の定量

母性効果因子を加えて発生させた iPS 細胞の状態の違いについて解析するため、全能性の遺伝子マーカーとなりうる胚 2 細胞期に特異的に発現する遺伝子群の発現レベルを定量した。結果、*Zscan4*, *Dub1*, *Tcstv3* といった 2 細胞期に特異的な遺伝子の発現が有意に上昇しており、一方 *Nanog* の発現レベルは変わっていなかった。この結果から、山中 4 因子のみによって生じた iPS 細胞とは明確に状態が違うことが判明し、特定の母性効果因子は全能性の遺伝子マーカーとなりうる胚 2 細胞期の遺伝子を上昇させることがわかった。また、抗 *Zscan4* 抗体を用いて細胞染色を行ったところ、*Zscan4* 陽性細胞の分布が増加していることが明らかとなった。またフローサイトメトリーによって解析したところ、このような 2 細胞期特異的遺伝子を発現する細胞の数も有意に増加していることが明らかとなった。

### (5) 母性効果因子による ES 細胞のリプログラミング

ES 細胞内では、すでに数%の細胞において胚の 2 細胞期に特異的な遺伝子の発現が見られることが知られている。次に、上記の母性効果因子を ES 細胞に発現させることによって分化全能性を持つ状態までリプログラミングすることが可能かどうかについて検討した。その結果、iPS 細胞の場合と同様に、特定の母性効果因子において、上記の 2 細胞様細胞の発現とその発現細胞の分布が増加していることが判明した。これらの結果から、これらの母性効果因子が全能性獲得におけるリプログラミングに重要である可能性が示唆された。

### (6) キメラ胎盤胞の作製による栄養外胚葉への寄与の検証

全身に GFP を発現する *CAG-EGFP* トランスジェニックマウスから採取した MEF 細胞から、2 細胞期特異的な遺伝子の発現を誘起する母性効果因子を用いて iPS 細胞を作製した。また、*CAG-EGFP* マウスの初期胚から ES 細胞を採取し上記の母性効果因子を発現させた。これら GFP でラベルされた 2 細胞期特異的な発現を有する iPS/ES 細胞が分化全能性を持つが解析するため、これらの細胞を野生型マウスから採取した 8 細胞期の初期胚と融合させた後、胎盤胞 (blastocyst) まで成長させた。このとき、通常の iPS/ES 細胞では寄与しない胎盤胞の周辺に位置する栄養外胚葉 (trophectoderm) にこれらの細胞が寄与しているかどうか GFP の発光を検出することで評価したところ、栄養外胚葉へ部分的に寄与している可能性が示唆された (図 2)。

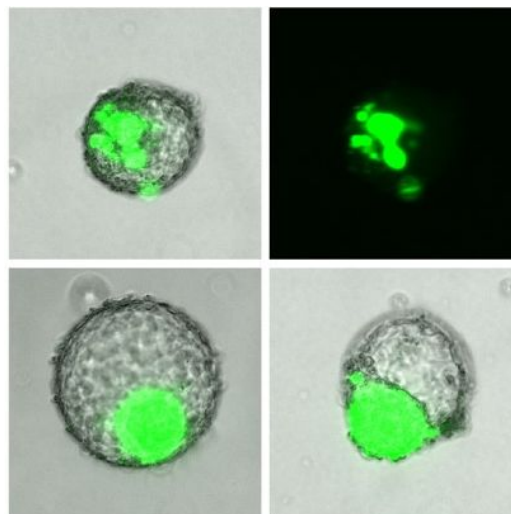


図 2 母性効果因子を発現する *CAG-EGFP* トランスジェニックマウス由来 ES 細胞における胎盤胞への寄与

現在、このような胎盤胞を仮親マウスの子宮へ移植し、GFP の発光を検出することでキメラマウスの胎児および胎盤への寄与を評価する予定である。これにより、これら母性効果因子を発現する iPS/ES 細胞のより正確な全能性の評価へとつながることが期待される。そして、どのような遺伝子発現が胎盤胞における栄養外胚葉への寄与を可能にしているか考察する。また、山中 4 因子を用いない母性効果因子のみで行うリプログラミング法の開発についても検討する。

## 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 3 件)

1. Kang H.S., Takeda Y., Jeon K., and Jetten A.M. The Spatiotemporal Pattern of

Glis3 Expression Indicates a Regulatory Function in Bipotent and Endocrine Progenitors during Early Pancreatic Development and in Beta, PP and Ductal Cells. *PLoS One*, **11**, e0157138 (2016) ( 査読有り )

2. Smith S.H., Peredo C.E., Takeda Y., Bui T., Neil J., Rickard D., Millerman E., Therrien J.P., Nicodeme E., Brusq J.M., Birault V., Viviani F., Hofland H., Jetten A.M., and Cote-Sierra J. Development of a Topical Treatment for Psoriasis Targeting ROR $\gamma$ : From Bench to Skin. *PLoS One*, **11**, e0147979 (2016) ( 査読有り )

3. Kojima H., Takeda Y., Muromoto R., Takahashi M., Hirao T., Takeuchi S., Jetten A.M., and Matsuda T. Isoflavones enhance interleukin-17 gene expression via retinoic acid receptor-related orphan receptors  $\alpha$  and  $\gamma$ . *Toxicology*, **329**, 32-39 (2015) ( 査読有り )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

1. Takeda Y., Kang H.S., Lih F.B., Jiang H., Blaner W., and Jetten A.M. Retinoic acid-related orphan receptor  $\gamma$  (ROR $\gamma$ ) participates in diurnal transcriptional regulation of lipid metabolic genes. レチノイン酸関連オーファン核内受容体 ROR $\gamma$ は脂質代謝に関わる遺伝子の1日における転写を制御する、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会(神戸)2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド(神戸市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武田 行正 (Takeda Yukimasa)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：40735552

### (2) 研究分担者

該当なし。

### (3) 連携研究者

該当なし。

### (4) 研究協力者

該当なし。