

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06223

研究課題名(和文)ES細胞の樹立におけるインプリンティングの役割

研究課題名(英文)Role of genomic imprinting in the establishment of ESCs

研究代表者

山口 新平(Yamaguchi, Shinpei)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80740795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞の樹立過程で、生体においては分化していく運命にある細胞が、どのように永続的に未分化性を維持する能力を獲得するのかは未解明であった。本研究課題では、片アレル性遺伝子発現機構であるゲノムインプリンティングなどに着目し、未分化性確立機構の解明を目指した。その結果、ES細胞の樹立と維持では要求される培養条件が異なり、ゲノム全体のDNAメチル化低下を誘導するMEK阻害剤の使用を最低限にした新規のES細胞樹立、培養法の確立に成功した。また、インプリンティング遺伝子のアレル特異的発現をリアルタイムで解析できる実験系を確立し、インプリンティング破綻が起きるタイミングの同定や、その機能解析を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚性幹細胞(ES細胞)は基礎・応用両方において広く用いられている。特に、高い遺伝的恒常性を活かし、スクリーニングや発生分化研究に汎用されている。しかし、近年用いられている培養条件では、DNAのメチル化状態がゲノム全体で低下し、生体内の胚のエピジェネティック状態を反映していないことが問題となっていた。本研究で報告された新規のES細胞樹立、培養法はこの問題を解決できる可能性が高い。また、永続的な未分化性の獲得は細胞のがん化とも共通する変化が認められる。本研究成果は、未分化性維持機構の解明のみならず、将来的には生体内の細胞の変質、維持の背景にある分子メカニズムの解明に貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem (ES) cells, which can maintain almost infinite pluripotency, are established by the culture of internal cell mass (ICM) of blastocyst that appear transiently in the very early stages of development. The molecular mechanism how cells in an internal cell mass, which is destined to differentiate in a few days in vivo, acquire the ability to maintain undifferentiated state permanently has remained unexplored. In this project, we focused on the culture condition affecting the state of genome imprinting, which is a mechanism of single-allele gene expression. As a result, we succeeded in establishing a novel method for the establishment and culture of ES cells that minimizes the use of MEK inhibitors that induce genome-wide DNA demethylation.

研究分野：発生生物学

キーワード：ES細胞 未分化性 DNAメチル化 インプリンティング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)ES 細胞の未分化性維持と確立

ES 細胞は着床前初期胚を至適な条件で培養することにより樹立される細胞であり、体を構成するすべての細胞に分化する能力、未分化性を維持しつつ、ほぼ無限に増殖することができる。そのため、遺伝子改変マウスの作製など様々な研究において使用されてきた。ES 細胞は長い間、線維芽細胞を不死化した細胞をフィーダーとして、血清と白血病阻止因子を含む培地で維持されてきた。しかし、この条件では限られた系統でしか ES 細胞は樹立できない、樹立後も安定的に維持できない、細胞の性質が不均一である、などの問題があった。これらの問題は、細胞の分化に重要な MEK/ERK 経路と GSK3 経路の阻害剤を添加する、2iL 培地が発見されたことでほぼ解決された。しかし、我々は、この条件で樹立、維持した ES 細胞では一部のインプリンティング遺伝子が両アレル性発現を示していることを見出した。

(2)ゲノムインプリンティング

哺乳類は基本的に父母それぞれから受け取った二組の染色体を有する。父母染色体の塩基配列はほとんど同一であり、そのため、殆どの遺伝子は同じように制御されている。しかし、インプリンティング遺伝子は例外的に、父方、あるいは母方どちらか一方のアレルからしか発現せず、他方のアレルは抑制されている。これは、配偶子が形成される過程で、DNA のメチル化やヒストン修飾が精子、卵子で異なるパターンで獲得され、受精後も父母アレル間のエピジェネティック状態の違いが維持されるためである。インプリンティング遺伝子は発生や増殖に機能し、特に胎盤や脳において重要な機能果たしていることがわかってきた。しかし、幹細胞におけるインプリンティングの制御、および機能に関する研究はほとんどされてこなかった。

(3)ES 細胞の樹立機構

正常な発生過程においては、未分化な多能性細胞は発生のごく一時期だけに出現し、次第に分化能を失っていく。それに対して、ES 細胞は未分化状態を維持したままほぼ無限に増殖できる細胞である。ES 細胞が樹立されてからの未分化性の維持機構については詳細に解析されているが、*in vivo* では一時的にしか存在しない多能性幹細胞が、*in vitro* では永続的に未分化性を維持できるようになる分子機構はこれまでほとんどわかっていなかった。

2. 研究の目的

我々は、ES 細胞がどのように永続的な未分化性を獲得するのか、という点を明らかにするために、樹立の過程で生じている現象に着目した。予備的な研究から、ES 細胞の樹立後、未分化性が安定した段階においては、本来抑制されているはずのインプリンティング遺伝子が不活性アレルから発現していることを見いだしていた。また、2iL 条件で樹立した ES 細胞では、増殖や成長を促進する遺伝子が多く含まれる父性発現遺伝子の多くが両アレルから発現していることも見出していた。これらの結果は、*in vivo* の幹細胞が *in vitro* で未分化性を維持するために、インプリンティングが破綻し、両アレル性発現となることが重要であることを示唆していた。近年の報告から、2iL 培地に含まれる MEK 阻害剤が、DNA メチル基転移酵素の発現を抑制する効果があり、その結果、2iL 培地で培養した ES 細胞では DNA メチル化レベルがゲノムワイドに低下することがわかってきた。そこで、まず、ES 細胞の樹立と維持において要求される培養

条件の検討から研究を開始した。

3. 研究の方法

未分化状態確立の機構を解明するため、まず、ES 細胞の維持と培養のプロセスで要求される条件の検証から実験を開始した。さらに、胚の細胞のエピジェネティック状態を変化させる阻害剤の使用を最低限にする条件を探索した。また、樹立時に未分化細胞で生じている変化を解明するため、樹立における遺伝子発現変化を RNA シーケンシング法で解析した。前核移植法によって単為発生胚を作製し、ES 細胞の樹立効率を検証した。さらに、樹立に影響を与える胚の発生分化の組織的解析、および、単一細胞 RNA シーケンシングを実施した。また、インプリンティング遺伝子のアレル特異的発現を単一細胞レベルで解析可能なマウスを樹立した。

4. 研究成果

(1) ES 細胞の維持と樹立での異なる要求性

ES 細胞の安定的な維持には分化シグナルを抑制する MEK 阻害剤 (Mi) と GSK3B 阻害剤 (Gi) を含む無血清培地 (2i+LIF: 2iL) が汎用されてきた。しかし、阻害剤の使用がエピジェネティック状態を変化させることが明らかになりつつあったことから、まず、ES 細胞の維持に必要な最低限の条件を検証した。その結果、LIF や Gi を除くと ES 細胞はただちに分化した一方で、Mi を除き、Gi も 1/3 まで使用量を減らした条件 (LowGiL 条件) でも ES 細胞の未分化性は安定的に維持された。LowGiL 条件で維持した ES 細胞 (LowGiL-ES 細胞) は長期に渡って指数関数的な増殖を維持し、マウスの初期胚と凝集させることで、生殖細胞を含む全ての細胞へと寄与した。一方で、LowGiL 条件で胚盤胞を培養しても細胞は 1 週間程度で分化してしまい、ES 細胞の樹立を行うことはできなかった。このことから、MEK 経路の阻害は ES 細胞の樹立には必須だが、維持には不要であることがわかった。期間を変えて胚を培養する実験を行った結果、3 日間 2iL 条件で培養することで、Mi が不要になることがわかった。この 3 日間の培養によって生じている遺伝子発現変化を明らかにするため、培養 3 日後の内部細胞塊を RNA シーケンシング解析した。その結果、原始内胚葉系譜への分化に重要な Fgfr2 の遺伝子発現が抑制され、Dusp9 や Eras, NrOb および X 染色体上の遺伝子の発現が上昇していることがわかった。一方で、LowGiL で培養した場合にはこれらの変化が一部生じていないことがわかった。これらの結果は ES 細胞の樹立に重要な変化を始めて捉えたものであり、2018 年に Stem Cell Research 誌に論文として発表した (図 1)。

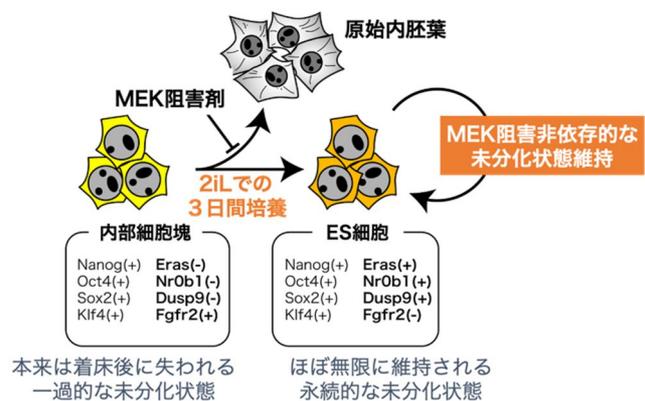


図 1. ES細胞の樹立時の要求性の変化 Konishi et al., Stem Cell Res. (2018)

(2) インプリンティングを維持した ES 細胞の樹立

上述の研究の結果、DNA の低メチル化を誘導する Mi の使用を胚の培養開始数日間のみ限定した新規の ES 細胞樹立、維持方法が開発できた。そこで、LowGiL 条件を用いて樹立した ES 細胞が、低メチル化せず正常なインプリンティングを維持しているかを解析した。2iL 条件で樹立し

た雌の ES 細胞は Kcnq1ot1, Snrpn, Peg10, Peg1/Mest, Nespas などのインプリンティング遺伝子領域で DNA が低メチル化していた一方、LowGiL-ES 細胞は高いメチル化を維持していた。インプリンティング遺伝子の片アレル性発現を解析するためには父方アレルと母方アレルを区別して解析する必要がある。従来は亜系統ハイブリッド個体を用いて父母アレル間の単一塩基多型 (SNP) を区別することで解析されてきたが、SNP を有する遺伝子は 1/3 程度しか存在せず、また、解析には非常に多くのリード数が必要で費用も大きくなる問題があった。そこで、父方、母方、いずれか一方のゲノムしか有しない単為発生胚から ES 細胞を樹立して解析した。これらの雄性単為発生胚由来 ES 細胞 (Androgenetic ES 細胞: AgES 細胞) と雌性単為発生胚由来 ES 細胞 (Parthenogenetic ES 細胞: PgES 細胞) は LowGiL 条件でも野生型 ES 細胞と同様に未分化状態を維持していた。片アレル性遺伝子発現を網羅的に解析するために、AgES 細胞と PgES 細胞の RNA シーケンシング解析を行った。AgES 細胞と PgES 細胞で発現を比較したところ、212 遺伝子が Pg で、101 遺伝子が Ag で高発現していた (FPKM \geq 1, Fold Change $>$ 5)。Peg10, Peg3, Impact, Meg3, Rian などのインプリンティング遺伝子は、2iL 条件では片アレル性発現様式が破綻して、両アレル性発現となっていた。一方で、LowGiL 条件ではこれらの遺伝子はすべて片アレル性発現を維持していた。一方、DNA メチル化ではなくヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) のトリメチル化による制御を受けている父性発現遺伝子 Slc38a4 は、PgES 細胞でも発現が認められ、脱抑制が生じていることがわかった。このことから、LowGiL 条件は DNA メチル化の低下を防止してもヒストン型インプリンティング消失は防げないことが示唆された。RNA シーケンシングの結果をさらに解析したところ、過去に報告のないインプリンティング遺伝子 (母方発現 54 個、父方発現 22 個) を同定した。本研究成果は現在論文投稿準備中である。

(3) インプリンティング破綻細胞の可視化と解析

インプリンティング遺伝子の発現動態をアレル特異的に、単一細胞レベルで検出するために、Phf17 の下流に Venus および hK01 を導入した ES 細胞、および、トランスジェニックマウスを樹立した。このマウスでは、培養前の胚と、培養開始 3 日目まで父性アレルからのみレポーターの発現が認められるが、4 日目程度から母性アレルからの発現も活性化し、顕著な増殖期に入ると両アレルからの発現が継続していた。Phf17 などの ES 細胞樹立に伴って脱抑制する遺伝子を CRISPR でノックアウトすると増殖が顕著に低下したことから、インプリンティング遺伝子の脱抑制は樹立に伴って増殖をサポートする働きがあることが示唆された。また、雄性単為発生胚 (Androgenetic 胚: Ag 胚) は雌性単為発生胚由来 ES 細胞 (Parthenogenetic 胚: Pg 胚) と比較して ES 細胞の樹立効率が著しく低いことを見出した。免疫染色の結果、幹細胞集団である内部細胞塊の数および、幹細胞マーカーである Nanog の発現が低いことがわかった。これは単一細胞 RNA シーケンシングの結果からもサポートされた。本研究は、さらに初期胚の運命決定および増殖における父母アレルの異なる機能として新たな研究の基盤となり、さらなる研究を展開しているところである。

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 1件）

1. 著者名 Konishi Riyo, Nakano Toru, Yamaguchi Shinpei	4. 巻 31
2. 論文標題 Distinct requirements for the maintenance and establishment of mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 55 ~ 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2018.07.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 6件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山口新平
2. 発表標題 ES 細胞の樹立におけるインプリンティング破綻の機構と役割
3. 学会等名 第11回日本エピジェネティクス研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口新平
2. 発表標題 ES 細胞の樹立におけるX染色体の活性化とインプリンティング破綻
3. 学会等名 第5回X染色体研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinpei Yamaguchi
2. 発表標題 Physiological function of Tet1 in germ and somatic cell development
3. 学会等名 International Symposium 2017 Development and Diseases（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shinpei Yamaguchi
2. 発表標題 The physiological role and underlying mechanism of pericentric 5hmC in mouse primordial germ cell
3. 学会等名 Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ cells (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山口新平
2. 発表標題 Tetタンパク質による遺伝子発現調節領域の能動的脱メチル化
3. 学会等名 第10回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山口新平
2. 発表標題 Molecular function of Tet1 in the epigenetic reprogramming through mouse germ cell development
3. 学会等名 第88回日本遺伝学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山口新平
2. 発表標題 Function of Tet proteins in the maintenance and removal of DNA methylation in Cp G islands
3. 学会等名 第39 回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小西理予、仲野徹、山口新平
2. 発表標題 ES細胞における未分化状態の確立と維持に機能するシグナル経路
3. 学会等名 第39 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----