

令和元年6月13日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07104

研究課題名(和文) 転写因子Tfcp2l1を介した129系統マウスES細胞の安定な自己複製機構

研究課題名(英文) Tfcp2l1 confers robust self-renewal in embryonic stem cell

研究代表者

大塚 哲(OHTSUKA, Satoshi)

金沢医科大学・総合医学研究所・准教授

研究者番号：40360515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまで血清条件下においてNOD系統に由来するES細胞は樹立と自己複製の維持することができなかった。本研究により129系統特異的に発現が維持される転写因子としてTfcp2l1を同定した。Tfcp2l1の発現維持により、これまで阻害剤フリーの血清条件下においてES細胞株の樹立ができなかったNOD系統に由来するES細胞株の樹立に成功した。ChIP-qPCR法により、このES細胞においてLIF-Stat3経路の活性化の亢進が認められた。血清条件下におけるES細胞の自己複製には129系統型のStat3のゲノム結合パターンが重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた成果をもとに、ナイーブ型幹細胞の樹立と維持が、ヒトを含む哺乳類からも可能となり、再生医学へ大きく貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Mouse embryonic stem cells (mESCs) have been established in conventional serum culture. mESCs derived from 129 mouse strain are stably self-renewing in serum culture. In contrast, mESCs from non-obese diabetic (NOD) mouse strain is not yet maintained in serum culture. In this project, we tried to explore why ESCs from 129 strain were stably established and continued to self-renew in serum culture. We identified transcription factor Tfcp2l1 which was specifically retained in 129-ESCs. Maintaining the expression of Tfcp2l1 in 2i-established NOD-ESCs allowed self-renewal in an inhibitor-free serum condition. Tfcp2l1 enhanced LIF-Stat3 activity in NOD-ESCs at a similar level to that in 129-ESCs. These results indicate that Tfcp2l1 supports 129-ESCs self-renewal in serum through enhancing LIF-Stat3.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：Tfcp2l1 ES細胞 LIFシグナル マウス系統差

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウス ES 細胞は、マウスの 3.5 日胚 (胚盤胞) の内部細胞塊に由来し、サイトカイン LIF(Leukemia inhibitory factor)存在下で自己複製する多能性幹細胞である。この ES 細胞において、これまで様々なマウス系統に由来する細胞株の樹立が試みられ、ES 細胞の樹立と維持は、培養条件および遺伝的背景 (マウス系統) に強く依存することが分かった。例えば、血清条件下において ES 細胞の自己複製が可能なマウス系統 (129 系統が代表) と、そうでないマウス系統 (NOD 系統など) が知られている。しかし、なぜ ES 細胞において、血清条件下での自己複製にマウス系統差があるのか、その原因は分かっていなかった。

そこで、この原因を明らかにするために、GSK3 および MAPK に対する 2 個の阻害剤を含んだ無血清 2i 培養法を用いて、我々は様々なマウス系統から ES 細胞を独自に樹立した。そして、129Sv、C57BL/6、Balb/c、CBA/ca、FVB/N、Msm および NOD 系統に由来する ES 細胞株の間での比較を行い以下の 2 点が判明していた。

(1) 異なったマウス系統に由来する ES 細胞は、LIF に対して異なった応答をする。すなわち、129 系統 ES 細胞 (129-ES) においては、LIF への応答性が高く、一方で NOD 系統由来 ES (NOD-ES) 細胞では LIF 応答性が低い。

(2) ES 細胞の血清条件下での自己複製には、129-ES 型の LIF 応答性を示すことが必須である。

これらのことから、ES 細胞で 129-ES 型の LIF 応答性と血清条件下での自己複製能の相関を見出していた。しかしながら、依然として血清条件下において、129 系統に由来する ES 細胞が安定に自己複製できる機構に関して、その詳細については不明のままであった。

2. 研究の目的

以前の我々の結果から、129 系統と NOD 系統に由来する ES 細胞において、LIF による Stat3 の活性化に違いがあり、Stat3 が強く活性化されることが血清条件下における自己複製を支えていることを報告した。本研究課題では、血清条件下の 129 系統 ES 細胞に特異的に発現維持される転写因子 Tfcp2l1 に着目し、129 系統 ES 細胞における自己複製の安定性が、どのように支持されているのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

血清条件下で短期間培養した 129-ES 細胞と NOD-ES 細胞においてマイクロアレイによる遺伝子発現比較を行い、これらの各々を NOD-ES 細胞へ導入し、血清条件下での自己複製が可能かどうかを検討したところ、本研究の中心となる Tfcp2l1 を同定した。この Tfcp2l1 は ES 細胞を血清条件下で培養すると、129 系統 ES 細胞ではその発現が維持できたが、NOD 系統由来 ES 細胞においては 2 日以内にタンパクと転写レベルで消失してしまう。そこで、本研究課題において、この転写因子 Tfcp2l1 による血清条件下における自己複製の維持について解析を行なった。

ES 細胞の自己複製における Tfcp2l1 の機能解析の実験系として、2i 培養法を用いて樹立した ES 細胞における Tfcp2l1 の機能を検討する。NOD 系統 ES 細胞において Tfcp2l1 の安定発現株を樹立し Gain-of-function の表現型を明らかにする。安定発現株作製には、まず Tfcp2l1 cDNA を 2 個の loxP 配列で挟み込み、Cre リコンビナーゼにより人為的に除去できる発現系として、pCAG-flox-Tfcp2l1-DsRed-IRES-pacpA プラスミドを導入する。この ES 細胞において MerCreMer 安定発現株を樹立する。この ES 細胞において、タモキシフェン (Tx) の培地への添加によって外来性 Tfcp2l1 を除去でき、外来性 cDNA 除去後は DsRed 陽性となる ES 細胞実験系を用いた。この系を用いて Tfcp2l1 により血清条件下において、NOD 系統 ES 細胞の自己複製が可能かどうかを検討する。さらに外来性 Tfcp2l1 を NOD 系統マウス由来の受精卵 (1 細胞期胚) へ注入し、その後胚盤胞期まで発生した初期胚を用いて血清条件下において ES 細胞樹立が可能かどうかを検討した。

4. 研究成果

NOD 由来 ES 細胞において外来性 Tfcp2l1 安定発現株は血清条件下において自己複製を維持することができるようになった。この細胞を血清条件下において 1 ヶ月間継代した後、Tx 添加

により外来性 Tfcp2l1 を除去すると NOD 由来 ES 細胞は自己複製を維持することができなかった。そのため外来性 Tfcp2l1 除去後の ES 細胞を 2i 培養条件下においてクローニングし、1 個 ES 細胞を 1 個の胚盤胞へ注入し多能性を検討したところキメラ胚が高効率で確認できた。このことから、Tfcp2l1 の発現を維持することで NOD 由来 ES 細胞は長期間、阻害剤フリーの血清条件下において自己複製を維持できることが明らかとなった。この結果は、2i を用いて一旦樹立された ES 細胞における知見で、一旦ナイーブ状態に捕捉された ES 細胞において、Tfcp2l1 の発現を維持することで自己複製を支持できることを示した。

さらに、Tfcp2l1 の前核期受精卵への導入によって、NOD 由来初期胚から 2i フリーな血清条件下においてもナイーブ状態の ES 細胞を捕捉することができた。これらの結果から、Tfcp2l1 によって NOD 系統に由来するナイーブ型 ES 細胞は血清条件下において樹立と自己複製を維持することができることが明らかとなった。

これらの NOD 由来 ES 細胞において LIF 添加による下流遺伝子群の発現誘導を検討したところ、Socs3、Klf4 など LIF 標的遺伝子の誘導効率が 129 由来 ES 細胞における効率と同等になっていることが明らかとなった。

本研究課題で実施した一連の研究から Tfcp2l1 の ES 細胞の自己複製における機能の一旦を明らかにすることができた。これまで血清条件下において ES 細胞の樹立と自己複製の維持ができなかった NOD マウス系統 ES 細胞を阻害剤フリーな血清培養条件下において維持でき、その時 Stat3 のゲノム占有パターンは 129-ESC と同じパターンを示すことが明らかとなった。これらの結果について現在投稿準備を進めている。また、本研究課題において新たな課題が得られた。129 系統由来 ES 細胞とは大きく異なり、NOD 系統に由来する ES 細胞の血清条件下での自己複製は厳密に外来性遺伝子依存性である。今後はこの依存性についてその原因を明らかにすることを目標として研究を進めていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Yamane M, Ohtsuka S, Matsuura K, Nakamura A, Niwa H. Overlapping functions of Krüppel-like factor family members: targeting multiple transcription factors to maintain the naïve pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Development*. 2018 年. 145(10).p1-12.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 大塚哲

マウス ES 細胞における自己複製の安定性と Socs3 発現量の相関
第 65 回日本実験動物学会総会 (富山) 2018 年

2. 大塚哲

ES cells derivation affected by the genetic background and culture context
第 41 回日本分子生物学会 (横浜) 2018 年

3. 大塚哲

129 系統由来 ES 細胞における血清条件下での安定的な自己複製の遺伝的要因
第 5 回北陸エピジェネティクス研究会 (富山) 2018 年

4. 大塚哲

最新の動物実験施設の現状と飼養保管基準への対応
第 63 回日本実験動物環境研究会シンポジウム (東京) 2018 年

〔その他〕

ホームページ等

金沢医科大学総合医学研究所細胞機能研究分野

<http://mri-molecular-oncology.kanazawa-med.labos.ac/one/>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

(2)研究協力者

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。