

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14744

研究課題名(和文)全能性細胞作製の試み

研究課題名(英文)Trial to generate totipotent cells

研究代表者

石井 俊輔 (Ishii, Shunsuke)

国立研究開発法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・上席研究員

研究者番号：00124785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：核移植により、胎盤を含むすべての組織になり得る全能性細胞が形成される。一方、iPS細胞やES細胞は多くの組織・細胞に分化することができるが、胎盤に分化することはできない。私達は、ES細胞と全能性を有する4細胞期胚との遺伝子発現パターンを比較し、後者で発現の高い遺伝子を選び、これらの候補遺伝子が全能性細胞のマーカーになり得るかどうかを検討した。その結果、ある遺伝子の発現レベルが高いES細胞は胚盤胞で将来胚になる内部細胞塊と将来胎盤になる栄養外胚葉の両方に分化する確率が高いことが示された。このように、本研究の結果は、体細胞から全能性細胞を作製する試みに大きなヒントを与えるものである。

研究成果の概要(英文)：By using nuclear transfer method, totipotent cells, which can be developed into all types of tissues including placenta. In contrast, ES cells and iPS cells can be developed into many types of tissue, but they cannot be developed into placenta. We compared the gene expression patterns between ES cells and the 4-cell embryos, which have the capacity to develop into all types of tissues, and selected some genes of which expression levels is higher in the 4-cell embryos. ES cells expressing higher level of those specific genes had higher efficiency to differentiate into both embryonic and extra-embryonic tissues. Thus, results of this study may contribute to the generation of totipotent cells from somatic cells,

研究分野：分子生物学

キーワード：全能性細胞 ES細胞 体細胞

## 1. 研究開始当初の背景

体細胞のリプログラミングには、Gurdon らによる核移植と Yamanaka らによる iPS 細胞の作製がある。前者では、胎盤を含むすべての組織になり得る全能性細胞ができ、後者では、iPS 細胞は ES 細胞と同様に多くの組織・細胞に分化することができるが、胎盤に分化することはできない。核移植によるリプログラミングは semi in vivo の方法であり、試験管内で体細胞から全能性細胞を作製する方法はまだ確立されていない。体細胞から全能性細胞を作製することは、生命科学分野における大きなマイルストーンである。また応用面でも、「iPS 細胞はすべての体細胞に効率良く分化させることが難しい」という、再生医療分野での問題の解決にも寄与し得る。

2012 年に Pfaff らにより、ES 細胞集団には全能性細胞がごくわずか (0.5%) 存在し、2つの状態が平衡状態にあることが報告された。彼らは 2 細胞期胚に発現する MERV (Mouse Endogenous Retrovirus) をマーカーとして、このような細胞を濃縮し、キメラマウスを作製し、胚体と胎盤の両方に分化することを示した。一方私達は卵子に多く存在するヒストンバリエントが、核移植に似たメカニズムで iPS 細胞作製を促進することを報告した。

## 2. 研究の目的

本研究では体細胞から全能性細胞を作製する方法を確立するための基礎データを得ることを目的としている。体細胞から全能性細胞を作製することは、生命科学分野における大きな挑戦である。体細胞から全能性細胞を作製する方法を確立することは、非常に挑戦的な課題であるが、全能性細胞を作製するための基礎データが得られれば、基礎生物学に大きな貢献ができると共に、「iPS 細胞からすべての体細胞に効率良く

分化させることが難しい」という、再生医療分野での問題解決にも寄与し得る。

## 3. 研究の方法

山中因子及び卵子に多く存在する母性効果因子による、マウス胎仔線維芽細胞 (MEFs) からの iPS 細胞の作製は、レンチウイルスベクターを用いて行った。Stella-ECFP 発現を上昇させる薬剤のスクリーニングは、Stella-ECFP マーカー遺伝子を持つ ES 細胞の ECFP 発現レベルを FACS で測定することにより行った。細胞の全能性を検定するため、CAG-GFP マーカー遺伝子を持つ ES 細胞を 8 細胞期胚に注入後、仮親の子宮に移植しキメラマウスを作製し、胚盤胞 (blastocyst) において将来胚になる内部細胞塊 (ICM) と将来胎盤になる栄養外胚葉 (Trophectoderm) における GFP<sup>+</sup>細胞の分布を調べた。

## 4. 研究成果

全能性を持つ 2 細胞期胚で Stella 遺伝子の発現レベルが高いことに注目し、Stella-ECFP トランスジェニックマウスから調製したマウス胎仔線維芽細胞 (MEFs) を用いて、全能性細胞の作製をモニターできないかを検討した。私達は以前、卵子に多く存在するヒストンバリエント TH2A/TH2B が、核移植に似たメカニズムで iPS 細胞作製を促進することを報告した。これらのヒストンは、卵子から受精卵に伝達され、受精卵中での精子由来ゲノムの解きほぐしに関与し、2 細胞期胚での受精卵ゲノムからの遺伝子発現を促進する。このようにヒストンバリエント TH2A/TH2B は母性効果因子 (Maternal Effect Factor) としての機能を持つ。この結果に基づき、これらのヒストンと同様に、卵子に多く存在し、受精卵に伝達され、母性効果因子として機能する因子に注目し、Stella-ECFP

MEFs に山中 4 因子 (OSKM) と一緒に発現させ、Stella-ECFP<sup>+</sup>の iPS 細胞の作製効率が上昇するかどうかを検討した。その結果、ヒストンバリエント TH2A/TH2B、Lin28a、Nlrp5、Zar2 などが有意に Stella-ECFP<sup>+</sup>の iPS 細胞の作製を上昇させることが分かった。

さらに Stella-ECFP マーカー遺伝子を持つ ES 細胞を作製し、一連の薬剤処理を行い、Stella-ECFP を発現し、全能性を有すると期待される候補細胞の割合を増加させる薬剤のスクリーニングを行った。その結果、Stella-ECFP<sup>+</sup>の ES 細胞の割合を 70% 以上に増加させる薬剤と、Stella-ECFP<sup>+</sup>の ES 細胞の割合を数倍から 10 倍程度上昇させる複数の薬剤を同定することができた。これらの薬剤を組み合わせ、Stella-ECFP<sup>+</sup>の ES 細胞の割合を最も上昇させる薬剤の組合せを決定した。

ES 細胞の全能性を検証するには、8 細胞期胚に注入後、仮親の子宮に移植しキメラマウスを作製し、胚体と胎盤の両方に分化することを示す必要がある。Stella-ECFP<sup>+</sup> ES 細胞からキメラを作製し、胚盤胞 (blastocyst) を調べると、将来胚になる内部細胞塊 (ICM) と将来胎盤になる栄養外胚葉 (Trophectoderm) の両方に分化する細胞の割合が、コントロールの Stella-ECFP<sup>-</sup> ES 細胞に比べ、有意に上昇していることが示された。しかしこの割合はまだ充分ではなく、今後さらに条件を検討する必要がある。以上のように、本研究は体細胞から全能性細胞を作製する試みに大きなヒントを与えるものである。

## 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 2 件)

1. Padavattan S, Thiruselvam V, Shinagawa T, Hasegawa K, Kumasaka T, Ishii S & Kumarevel T: Structural analyses of the nucleosome complexes with human testis-specific histone variants, hTh2a and hTh2b. *Biophys Chem.* 221, 41-48, 2017. doi: 10.1016/j.bpc.2016.11.013. 査読有り。
2. Liu Y, Maekawa T, Yoshida K, Furuse T, Kaneda H, Wakana S & Ishii S: ATF7 ablation prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun.* 478, 696-702, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.009. 査読有り。

[学会発表] (計 5 件)

1. Ishii S: Innate immune memory in macrophages via ATF7-dependent epigenetic changes. Conference on Innate Immune Memory, Hinxton, Cambridge, UK, March 14-16, 2017.
2. Yoshida K, Ishii S: Analysis for trans-generational inheritance of epigenetic change induced by pathogen infection via ATF7. Conference on Innate Immune Memory, Hinxton, Cambridge, UK, March 14-16, 2017.
3. 石井俊輔: 精子を介したエピゲノム情報の伝達、ワークショップ「染色体研究の最前線」、大阪大学、大阪、1月17~18日、2017.
4. 石井俊輔: 環境要因によるエピゲノム変化の世代を超えた遺伝、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、千里ライフサイエンスセンター、大阪、5月19~20日、2016.
5. 吉田圭介、石井俊輔: 低タンパク質餌によるエピゲノム変化の世代を超えた遺

伝、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、千里ライフサイエンスセンター、大阪、5月19～20日、2016.

〔その他〕

ホームページ等

<http://rtcweb.rtc.riken.jp/lab/mg/mg.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石井 俊輔 (ISHII SHUNSUKE)

国立研究開発法人 理化学研究所

石井分子遺伝学研究室・上席研究員

研究者番号：00124785