

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21133

研究課題名(和文) 始原生殖細胞におけるエピゲノム再編成に関わるクロマチン制御因子の動態

研究課題名(英文) Chromatin dynamics involved in epigenetic reprogramming during mammalian germ cell development

研究代表者

横林 しほり (Yokobayashi, Shihori)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：20615736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類では、生殖細胞の発生初期にゲノムワイドなエピゲノム変化が誘導され、抑制的クロマチンに関わるエピジェネティック因子がダイナミックに変化するが、その詳細な実態および制御機構は明らかではない。近年、研究代表者らはヒト多能性幹細胞を起点とした始原生殖細胞の*in vitro*再構成系を報告したが、同時に細胞株による分化効率の差異も観察されていた。本研究では、種々の細胞株群について分化効率の評価・選定を行い、さらに興味深い複数の細胞株について抑制的クロマチンのエピゲノム比較解析を行った。今後はこれらの細胞株を用いて*in vitro*再構成過程における変化を解析していく予定である。

研究成果の概要(英文)：In mammalian embryos, the specified primordial germ cells undergo epigenetic reprogramming, in which repressive epigenetic marks dynamically change; however, the molecular details remains unknown. Recently, we have developed an *in vitro* system to induce primordial germ cell-like cells (PGCLCs) using human pluripotent stem cells (PSCs) as starting materials. In this research, we first evaluated various PSC clones regarding the induction efficiency into PGCLCs, and performed comparable analysis of repressive epigenetic states in the selected clones. We further examine the dynamics of repressive chromatin during the *in vitro* induction process.

研究分野：分子生物学

キーワード：哺乳類 始原生殖細胞 多能性幹細胞 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の生殖細胞の発生は、着床後のエピブラスト胚における始原生殖細胞 (primordial germ cells, PGC) の出現により始まる。運命決定された PGC では、メチル化 DNA (5mC) の低下、ヒストン H3 の K9 に付加したジメチル基 (H3K9me2) の低下と H3K27me3 の上昇が観察され、エピゲノム状態のゲノムワイドな再編成が起きる (Seki et al., 2005, Saitou et al., 2012)。5mC、H3K9me2 および H3K27me3 は抑制的クロマチンに関わるエピジェネティック修飾である。このような PGC 発生過程における抑制的クロマチン変化の詳細な分子機序、および生殖細胞発生過程における機能的意義は未だ明らかではない。

近年、マウス多能性幹細胞から PGC 様細胞 (PGC-like cells, PGCLC) を誘導する系が開発された (Hayashi et al., 2011)。この *in vitro* 再構成系で誘導された PGCLC から、新生仔精巢移植を経た精子分化、あるいは胎仔卵巣体細胞との共培養による卵母細胞分化が可能であり、これら PGCLC 由来の精子および卵子が正常な産仔に寄与することが確かめられている (Hayashi et al., 2011, Hayashi et al., 2012, Hikabe et al., 2016)。さらに我々は、ヒト多能性幹細胞から PGCLC を誘導する系を報告した (Sasaki, Yokobayashi et al., 2015)。ヒト PGCLC の直接的機能検証を行うことは不可能であるが、ヒト *in vitro* 系のさらなる発展を目指した研究は進行中である。さらに、ヒトとマウス PGCLC の比較解析、および非ヒト霊長類であるカニクイザルとマウス着床後胚の比較解析から、PGC 発生に関わる分子制御ネットワークにおける種間の差異も明らかになってきた (Sasaki, Yokobayashi et al., 2015, Nakamura et al., 2016, Sasaki et al., 2016)。よって、霊長類を含めた哺乳類生殖細胞発生機序の理解をより深めるためには、マウス *in vitro* 系に加えて、ヒト *in vitro* 系も併用した解析が大変重要であると考えられた。

我々が報告したヒト PGCLC の *in vitro* 再構成系では、非常に高効率で PGCLC が誘導されていたが、同時に、ヒト iPS 細胞株の株間における誘導効率の差異が観察されていた (Sasaki, Yokobayashi et al., 2015)。そこで、本研究の目的である抑制的クロマチン解析を進める前段階として、ヒト iPS 細胞株間の誘導効率の差異をより幅広く検証すること、さらにその検証実験の結果を踏まえて適切なヒト iPS 細胞株を選択する必要性が生じた。そのため、本研究では、まずヒト iPS 細胞株群の評価検討を行い、その後、まずクロマチンの一次構造を規定すると考えられるヒストンタンパク質の翻訳後化学修飾について解析を行った。

## 2. 研究の目的

始原生殖細胞発生期における抑制的クロマチンダイナミクスの可視化を目指し、本研究ではヒト *in vitro* 再構成系を用いた抑制的クロマチン解析系の確立を目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト PGCLC 誘導系に用いる多能性幹細胞について、その細胞株による PGCLC への誘導効率の差異を検討し、解析に使用する細胞株の評価を行った。誘導された PGCLC は EpCAM および ITGA6 (integrin alpha 6) に対する抗体により標識可能であることが既に示されている (Sasaki, Yokobayashi et al., 2015)。各細胞株について誘導実験を複数回 (4~20 回程度) 行い、FACS により誘導された PGCLC 数および効率の評価を行った。

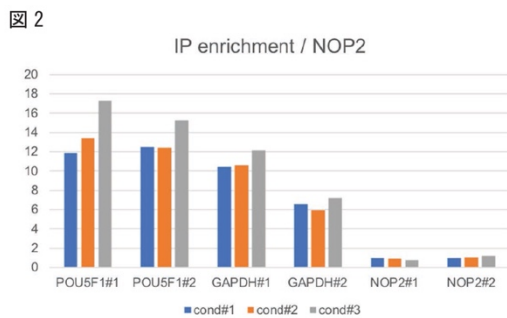
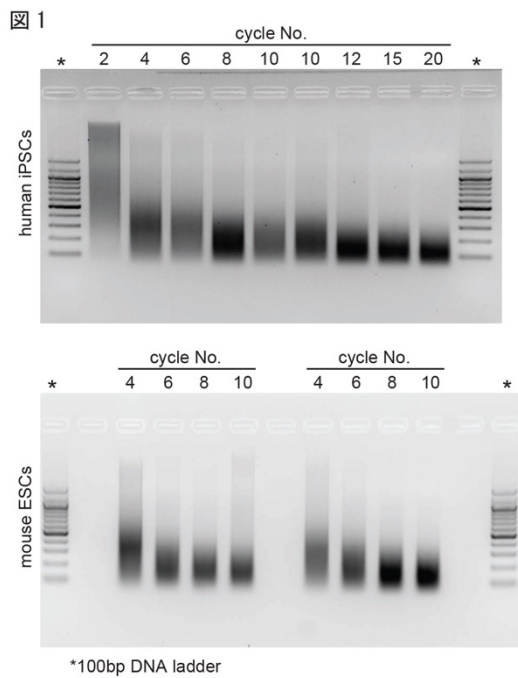
抑制的エピジェネティック因子のクロマチン相互作用領域の同定のために、クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) を用いた。そのため、ChIP 法の条件検討 (クロマチン剪断条件および抗体、抗体反応条件の評価) を行った。この条件検討に基づき、抑制的エピジェネティック因子 4 種類を含む計 6 種類のヒストン修飾基について ChIP 法を行い、ライブラリー作製後、illumina HiSeq2500 を用いてシーケンスデータを取得した。同様の実験を、細胞株間比較のため複数の多能性幹細胞株に適用し、解析を行った。

## 4. 研究成果

ドナー細胞種および樹立方法が異なるヒト iPS 細胞株 (計 15 株) について、PGCLC への誘導効率を評価したところ、細胞株による差が有意に存在することが明らかになった。また、男性 (XY) 細胞株群に比べて、女性 (XX) 細胞株群は概して誘導効率が低くまた株間の差異がより大きい傾向を示した (Yokobayashi et al., 2017)。この結果は、多能性幹細胞の分化能等の特性に雌雄差 (性染色体) が影響を与える可能性を示唆しており、大変興味深い。

ChIP-seq 法を行う際、クロマチンの剪断効率はデータの解像度に大きく影響する重要な要因である。そのため、一定の効率で剪断されたクロマチンを再現性良く得ることが、良質なデータの取得に不可欠である。我々は、

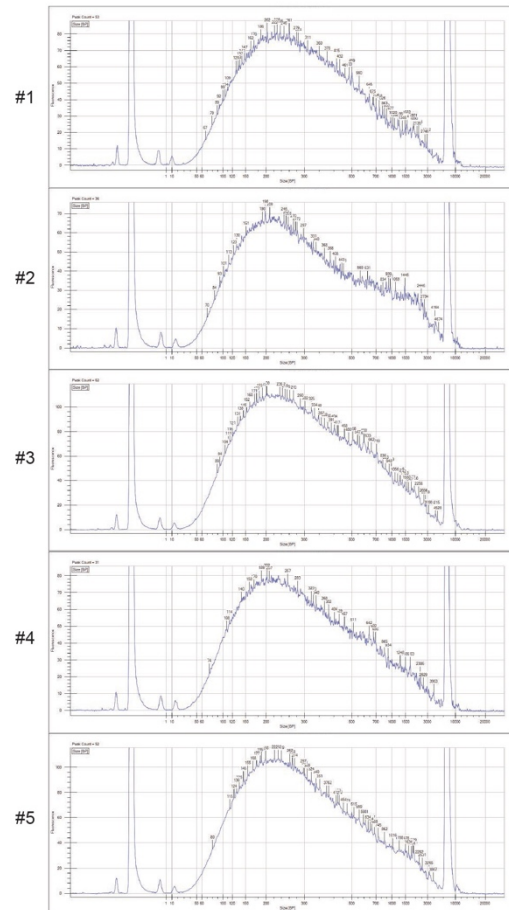
Picoruptor (diagenode) を用いて条件検討を行った。その結果、ヒト iPS 細胞においては 8 サイクル (30 秒 ON, 30 秒 OFF) 程度で十分な剪断が起きていた (図 1)。これは、同様の目的に使用されている他の機器を用いた場合に比べて、要する時間が非常に短く、優良な結果といえる。マウス ES 細胞を用いた実験においても同様の結果が得られた (図 1)。次に、抗体反応の条件検討を行った。抗 H3K27Ac 抗体を用い、抗体量や反応容量等について 3 条件を試した (図 2)。この結果、最も免疫沈降比が高かった condition#3 をその後の実験条件と定めた。



異なる PGCLC 誘導効率を示したヒト iPS 細胞株 5 株について、ChIP-seq 解析を行った。その際のクロマチン剪断効率を図 3 に示す。5 実験における剪断クロマチンのピークは何れも 200bp 前後であり、100-600bp 区域にクロマチンが~80%程度含まれており、実験間の誤差が少ない良好な結果となった。そのた

め、ライブラリー作製時のサイズセレクションを最小限に留めることが可能となった。ChIP-seq 解析の結果、抑制的クロマチンに関わるヒストン修飾について、その相互作用領域が細胞株間で異なるゲノム領域が検出された (図 4)。この結果は、多能性幹細胞株がその細胞株特有のエピジェネティック状態を有することを示唆する。今後は、クロマチンの核内動態・高次構造形成に重要な役割を担うことが考えられる構造因子について同様の解析を行い、ヒト *in vitro* 再構成過程における変化を解析していく予定である。さらに、マウス *in vitro* 再構成系を用いて同様の解析を行うことにより、哺乳類の生殖細胞発生過程におけるクロマチンダイナミクス機構の種保存性および種差について解析していく予定である。

図 3

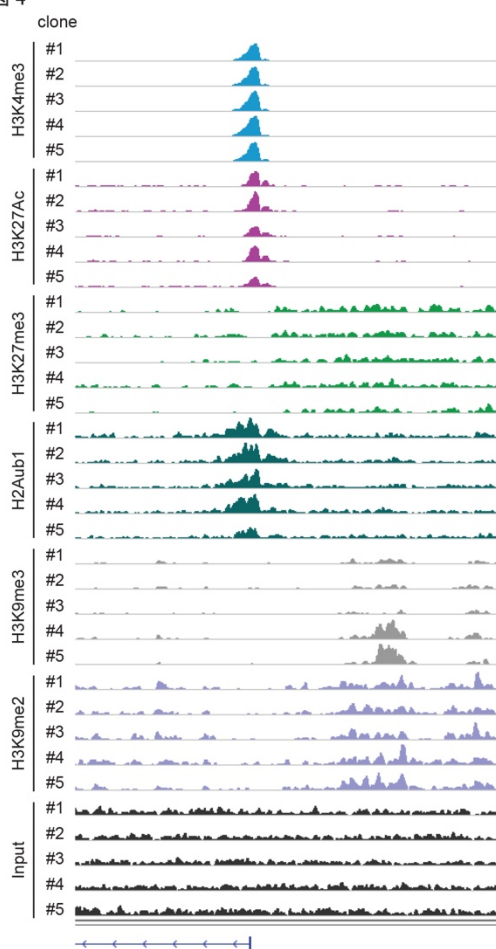


<引用文献>

- Seki et al., Dev Biol. 2005  
Feb 15;278(2):440-58.  
Saitou et al., 2012,  
doi: 10.1242/dev.050849.  
Hayashi et al., 2011,  
doi: 10.1016/j.cell.2011.06.052.

Hayashi et al., 2012,  
doi: 10.1126/science.1226889.  
Hikabe et al., 2016,  
doi: 10.1038/nature20104.  
Sasaki, et al., 2015,  
doi: 10.1016/j.stem.2015.06.014.  
Nakamura et al., 2016,  
doi: 10.1038/nature19096.  
Sasaki et al., 2016,  
doi: 10.1016/j.devcel.2016.09.007.  
Yokobayashi et al., 2017,  
doi: 10.1093/biolre/iox038.

図 4



#### 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)

Yokobayashi Shihori, Okita Keisuke, Nakagawa Masato, Nakamura Tomonori, Yabuta Yukihiro, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori, Clonal variation of human induced pluripotent stem cells for induction into the germ cell fate, *Biology of Reproduction*, 96, 2017,

1154-1166, DOI:10.1093/biolre/iox038, 査読有

Kojima Yoji, Sasaki Kotaro, Yokobayashi Shihori, Sakai Yoshitake, Nakamura Tomonori, Yabuta Yukihiro, Nakaki Fumio, Nagaoka So, Woltjen Knut, Hotta Akitsu, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori, Evolutionarily Distinctive Transcriptional and Signaling Programs Drive Human Germ Cell Lineage Specification from Pluripotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*, 21, 2017, 517-532.e5, DOI:10.1016/j.stem.2017.09.005, 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Shihori Yokobayashi and Mitinori Saitou, Clonal variation of human induced pluripotent stem cells for induction into the germ cell fate, 六甲医学研究会, 2017

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

横林しほり (YOKOBAYASHI, Shihori)  
京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教  
研究者番号：20615736

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

##### (4) 研究協力者

( )