

令和 4 年 10 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01433

研究課題名(和文) 組織幹細胞の維持・若返りを可能にする新規分子メカニズム

研究課題名(英文) Novel molecular mechanisms for enabling the maintenance and rejuvenation of tissue stem cells

研究代表者

洪 実 (KO, Minoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：50631199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス成体組織におけるZscan4の発現解析および遺伝子改変マウスの作製を行った。(1)成体マウス組織の各Zscan4パラログの発現解析を行い、精巣・卵巣・膵以外においても組織特異的に発現するパラログが確認された。免疫染色で一部の細胞にのみ陽性が認められES細胞と同様であった。(2)Zscan4遺伝子クラスター(850kb)領域をKOしたマウスを作成した。LoxP配列を挿入したconditional KO ES細胞からマウスを作成した。Zscan4 全クラスター領域が欠損したマウスも作成したが、germ lineへ入らなかった。今後、新たなconditional KOマウスの作成を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、組織幹細胞の維持・若返りの分子機構が明らかになれば、細胞老化や細胞老化の伴う疾患の治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expression analysis of Zscan4 in adult mouse tissues and generation of genetically modified mice were performed.(1) An expression analysis of each Zscan4 paralog in adult mouse tissues was performed, and a paralog that was tissue-specifically expressed in areas other than the testis, ovary, and pancreas was confirmed. By immunostaining, only some cells were positive, which was similar to ES cells.(2) A mouse in which the Zscan4 gene cluster (850 kb) region was KO was prepared. Mice were prepared from conditional KO ES cells in which LoxP sequences were inserted. Mice deficient in the entire Zscan4 cluster region were also created, but did not enter the germ line. We will continue to develop new conditional KO mice.

研究分野：システム医学

キーワード：ZSCAN4 組織幹細胞 若返り

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体は、一生を通じて様々な組織・臓器に少数存在している組織幹細胞 (Tissue Stem Cells) によって維持されていると考えられている (*Ko, Harrison's Principles of Internal Medicine, 19th Ed., Ch. 88, 2015)。そして、もし組織幹細胞の老化を減速させることが出来れば、疾患の発症を遅らせ、さらなる健康長寿を達成できるとも考えられている (Rando, Nature 2006)。近年の ES 細胞および iPS 細胞研究の進展により、幹細胞に対する理解は急速に深まってきたが、幹細胞、特に組織幹細胞を維持するメカニズムについては、まだまだ不明な点が多い。

Zscan4 遺伝子は、1 個の SCAN ドメインと 4 個の Zinc Finger ドメインを持ち、哺乳類にしか存在しない (*Falco et al., Dev. Biol. 2007)。着床前期の 2 細胞期胚と ES 細胞で特異的に発現する遺伝子として同定されたが、ES 細胞集団中で 1~5% の細胞でしか発現していない (図 1: *Falco et al., 2007; *Carter et al., Gene Expr Patterns 2008)。これは、Zscan4(+)細胞が一定量混ざっているということではなく、その遺伝子発現が一過性 (6~12 時間程度) であるために一度には 5% 程度の細胞でしか発現しないが、実際には 9 代の継代の間にほぼ全ての ES 細胞が一度は Zscan4(+)の状態を経験する (図 2)。Zscan4 の一過性発現が起こらないようにすると、ES 細胞は 9 代培養後には核型の異常、細胞死がおり ES 細胞不死化の性質が失われる。つまり正常細胞でありながら癌細胞のように無限に増殖できるという ES 細胞不死化の機能は、Zscan4 が担っていることを発見した (*Zalzman et al., Nature 2010)。

一過性に Zscan4 が発現している状態では、減数分裂に特異的な蛋白質の出現と、テロメア組み換えによるテロメア伸長がおこることも発見した。これは、ES 細胞におけるテロメラーゼに依存しない新しいテロメア長維持機構である (図 2: *Zalzman et al., 2010)。これらの極めて特異な現象は、なかなか受け入れられなかったが、最近、他のグループによっても確認された (Macfarlan et al., Nature 2012; Nakai-Futatsugi and Niwa. Stem Cell Reports. 2016)。

更に申請者らは、遺伝子操作により ES 細胞の Zscan4 発現頻度を高めることによって、長

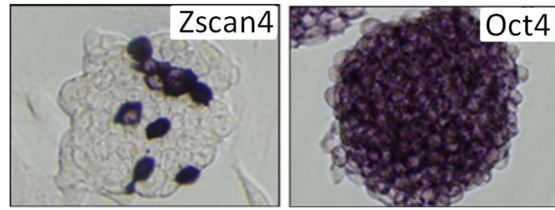


図 1. RNA-WISH による遺伝子発現解析。マウス ES 細胞コロニー中で、Oct4 は、ほぼ全ての細胞で発現するが、Zscan4 は、ごく一部の細胞でだけ発現する。

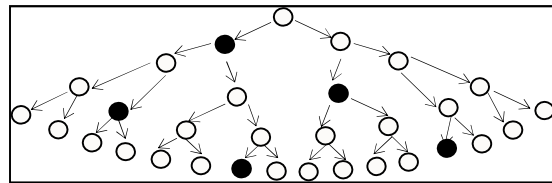


図 2. 未分化 ES 細胞は、時折、Zscan4(+) 状態 (●) になるが、短時間で、Zscan4(-) 状態 (○) に戻る。Zscan4(+) の時に、減数分裂蛋白が出現し、テロメアの組み換え、伸長が起こる。

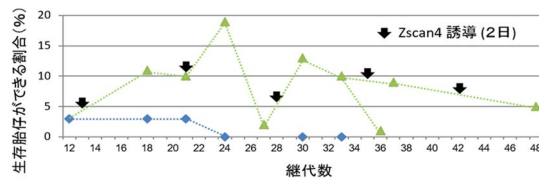


図 3. ES 細胞を 4N の胚盤胞に注入後 13.5 日目に生存胎仔が存在している割合を示す。%が高いほど ES 細胞のポテンシャルが高い (若い) とみなせる。コントロールの ES 細胞 (◆) と比べて、Zscan4 を時折、発現誘導した細胞 (▲) は、ポテンシャルが高くなり、長期間の培養でも劣化 (老化) を抑える (若返りする) ことがわかる。

期培養後に起こるマウス ES 細胞の劣化（特に核型）および老化を打ち消すことができ、ES 細胞からの個体発生能が樹立直後の ES 細胞と同等なレベルまで回復することを発見した。（図 3：*Amano et al., Nature Commun. 2013）。

申請者らは、Zscan4(+)細胞では、クロマチン（特にヘテロクロマチン）のエピゲノム状態が短時間で劇的に変化していることを示した(*Akiyama et al., DNA Res 2015)。普段抑制されているヘテロクロマチンの抑制が解除された後、直ちに再抑制がかかる（図 4）。信じられないくらい迅速なエピゲノムの変化は、他のグループによっても確認された（Eckersley-Maslin MA et al., Cell Rep 2016）。この特異なメカニズムが、分裂の度に少しずつ劣化したヘテロクロマチン（そしてテロメア）を一気に修復・若返りさせると考える。クロマチンをオープンにすることと関連して、申請者らは、iPS 細胞作成時に Zscan4 が c-Myc を代替し、他の iPS 因子と異なり最初の 1~3 日間の発現で十分であることを示した（*Hirata et al., Sci Rep 2012）。類似の現象が 2 細胞期胚にあると考えられ（*Ko, Curr Top Dev Biol. 2016）また Zscan4 がマウスの第一減数分裂の厚糸期・複糸期に特異的に発現していること（*Ishiguro, Monti et al., In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2016）とも示した。

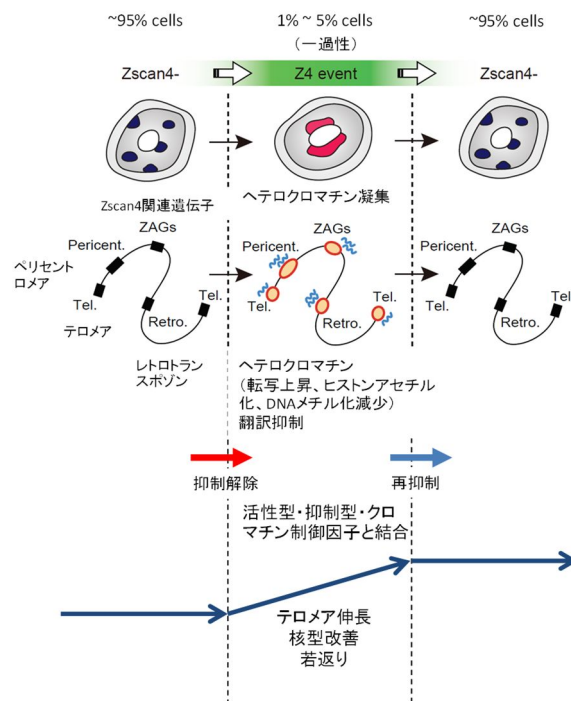


図 4 . 一過性に出現する Zscan4(+)細胞では、ヘテロクロマチンが核小体の周りに凝集し、転写のバースト、ヒストンのアセチル化の亢進、DNAメチル化の減少が起きる。活性型と抑制型の両方のクロマチン・リモデリング・コンプレックスが結合している。この過程を通じて、テロメアの伸長、核型改善、若返りが起こる。

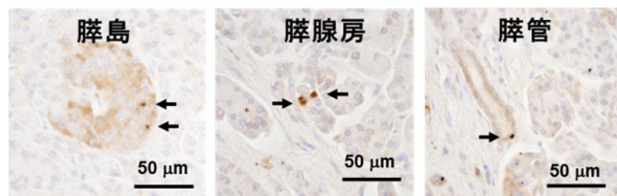


図 5.Zscan4 抗体による膵臓の免疫染色。膵島、膵腺房、膵管それぞれに稀ではあるが強く ZSCAN4 蛋白が存在している細胞（矢印）がある。

申請者らは最近、詳細な免疫染色および遺伝子発現解析により、成体ヒトおよびマウスの全身組織中の極めて少数の組織幹細胞で、Zscan4 が強く発現していることを発見した（図 5：*Ko, S. et al., Am J Physiol, 2013）。これは、Zscan4 に依存した幹細胞性維持機構がマウス ES 細胞のみならず、マウスやヒトの組織幹細胞にも存在している可能性を強く示唆している。本研究では Zscan4 とその関連遺伝子の発現が組織幹細胞性の維持に必須であるという仮説を立て、それを検証し、さらに、Zscan4 の発現頻度を操作することで、個体における抗老化の可能性を探る。

2. 研究の目的

目標 1. Zscan4 の組織・臓器での発現パターンの解明 免疫染色と RNA-WISH により、マウスの新生仔および成体の各組織・臓器における Zscan4 遺伝子発現パターンを詳細に調べる。ゲノム上の Zscan4 遺伝子の一部を CRE-ERT2 に入れ替えたマウスを作成、R26R-Confetti と呼ばれる 4 色中 1 色がランダムに活性化される CRE-reporter マウスと交配することにより、Tamoxifen (Tmx) 依存的に Zscan4 発現細胞を標識、同定し、その細胞系譜を検討する。

目標 2. Zscan4 が組織幹細胞の維持に必須であることの検証 Zscan4 遺伝子は、ヒトゲノムでは 1 コピーだが、マウスゲノムでは 850 kb 領域に偽遺伝子を含め 9 コピー存在する。その領域全てを欠失した条件的ノックアウトマウスを作製し、発生・生殖細胞・老化過程での Zscan4 欠失マウスの表現形質を詳細に検討する。さらに、これらのマウスに DNA やクロマチンを障害するような薬物を投与し、内在性の Zscan4 が組織・臓器（特に組織幹細胞）で誘導されるか、また、その細胞修復、テロメア伸長、ゲノム安定化への関わりを検証する。

目標 3. Zscan4 の抗老化作用をテスト Zscan4 の発現を調節できる遺伝子導入マウスを作成し、Zscan4 の発現頻度の上昇が、老化を遅らせたり若返りさせたりできるかを検討する。

3. 研究の方法

本研究は、マウス個体レベルでの解析が中心となるため、3 年間の研究期間内に 10 種類の遺伝子改変マウスを作成、様々な解析を行うことで 3 つの目標を達成する。

目標 1 では、内在性 Zscan4c と Zscan4d の発現パターンの詳細な検討と一過性に Zscan4 が発現した細胞の系譜の解析のために、Zscan4c, Zscan4d それぞれについて、Emerald knockin; CreERT2 knockin; CRE-ERT2/Confetti; CreERT2/LacZ を作成・解析する。

目標 2 では、850 kb 領域の外側に LoxP 配列を挿入した conditional Zscan4 locus deletion mouse を作成、Cre mouse と掛け合わせることで全欠失マウスを作成・解析する。

目標 3 では、Tet 誘導で全身で外来性 Zscan4c 遺伝子を発現させられるように、tetZscan4c-ires-LacZ mouse を作成・解析する。

4. 研究成果

(1) マウス組織での発現解析は RT-PCR、および本研究室で作製した複数の特異的抗体を用いた免疫染色法により行った。RT-PCR においては、Zscan4 パラログに対するプライマーの特異性を検討し、成体マウスの組織における各 Zscan4 パラログの発現解析を行った。その結果、精巣・卵巣・膵臓以外の組織において Zscan4 の発現を確認できただけでなく、各組織特異的に発現する Zscan4 パラログが存在することが判明した。また免疫染色による解析によって組織の一部の細胞にのみ陽性細胞がみられることがわかり、ES 細胞と同様の発現パターンを示す可能性が示唆された。

(2) Zscan4 ノックアウトマウスの作製を行った。CRISPR-Cas9 システムを用いて、850kb にわたる 9 つのパラログをもつ Zscan4 遺伝子のクラスター領域をすべてノックアウトし

たマウスの作成を行った。昨年度までに Zscan4 クラスター領域の下流に LoxP 配列を挿入することに成功し、Zscan4 conditional KO ES 細胞を樹立した。今年度は、この遺伝子改変 ES 細胞を胚盤胞に注入しキメラマウスの作成を行った。さらに、この遺伝子改変 ES 細胞に Cre 発現ベクターを導入し Zscan4 全クラスター領域が欠損した ES 細胞も樹立した。この ES 細胞においてはキメラマウスの作出に成功したが、germ line への寄与が確認できなかった。そこで、Zscan4 遺伝子のクラスター領域を同時に欠損させるコンストラクトを作成し、新たな conditional KO ES 細胞株の樹立を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 洪 実
2. 発表標題 幹細胞におけるZSCAN4の役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究分担者	中武 悠樹 (NAKATAKE Yuhki) (20415251)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師 (32612)	
研究分担者	秋山 智彦 (AKIYAMA Tomohiko) (20570691)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教 (32612)	
研究分担者	洪 繁 (KO Shigeru) (90402578)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授 (32612)	
研究分担者	小田 真由美 (ODA Mayumi) (80567511)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------