

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05100

研究課題名(和文) ヒト初期胚発生型リプログラミングによるがん化しない安定したiPS細胞の樹立

研究課題名(英文) Establishment of induced Pluripotent Stem cells with genomic stability by zygotic transcriptional factors

研究代表者

山田 満稔 (YAMADA, Mitsutoshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40383864

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,200,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵から樹立される胚性幹細胞(ES細胞)と、体細胞から樹立されるiPS細胞は、いずれも未分化能および多分化能を有し、細胞治療や疾患モデルへの臨床応用が期待されている。しかしながら受精卵および幹細胞に多くみられる染色体異常や、加齢成人から樹立したiPS細胞におけるゲノム不安定性は、安全な生殖補助医療と再生医療の実現化にとって障壁となっている。本研究では受精卵からES細胞を樹立する過程で発現する遺伝子Zscan5bを同定し、Zscan5bが染色体構造を安定させるとともに、体細胞分裂期のDNA損傷修復を介して、いまだ分からないことの多いES細胞におけるゲノム安定性に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、「受精後の初期に生じる遺伝子の機能を喪失させることで体細胞とESCのゲノム安定性が損なわれ、ランダムに染色体異常が起こりえる」という新たな概念を提示した。マウスモデルとヒトにおける遺伝子発現の時期は異なるため、本研究結果がそのままヒトに当てはまるかは今後さらなる検証が必要である。しかしながら今回の成果は、健全な受精卵の発育や幹細胞の樹立を通して、より安全な生殖補助医療および再生医療の実現に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are expected to be useful for regenerative medicine such as drug screening and transplantation, which might particularly benefit older patients suffering from heart failure, diabetes and degenerative diseases. However, it is known that iPSCs isolated from aged somatic cells exhibit impaired genomic stability. In this study, we show that the Zygotic Genome Activation (ZGA) gene Zscan5b expressed from early embryonic development through the establishment process of embryonic stem cells (ESCs) and is involved in the genomic stability of ESCs. These results provide a new concept that loss of function of genes expressed in the early embryogenesis can lead to the loss of genomic stability of somatic and ES cells, resulting in random chromosomal aberrations. The findings would contribute to improve genomic stability of embryos and pluripotent stem cells, leading to the development of assisted reproduction technology and regenerative medicine.

研究分野：産婦人科学

キーワード：胚性ゲノムの活性化 ZGA iPS細胞 初期化 reprogramming ゲノム安定性 ES細胞 受精卵 生殖医学 がん化

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では晩婚化に伴う不妊症カップルの増加により、体外受精による出生児は年間 47,322 人と増加の一途をたどっている (2014 年日本産婦人科学会統計)。しかし実地臨床における胚の評価は形態学的評価に大きく依存し、ヒト胚発生に関する基礎的研究は圧倒的に不足している。胚発生を司る遺伝子発現制御機構の解明は、発生学的見地のみならず、初期化(リプログラミング)機構に関与すると考えられることから再生医療の観点からも求められている。

これまで申請者は留学先研究室 (PI: Dieter Egli) でヒト体細胞核移植 (Somatic Cell Nuclear Transfer; SCNT) 法を詳細に検討し、改良してきた。従来の SCNT 後に発生停止した胚では ZGA 遺伝子は正常に発現しなかった (Noggle, Egli et al., *Nature* 2011)。SCNT-Protocol 改良後の発生良好胚では ZGA が正常に起こり、ヒト成人疾患体細胞由来核移植胚性幹細胞 (ntESCs) の樹立に世界で初めて成功した (Yamada et al., *Nature* 2014)。

SCNT により樹立される ntESCs は、転写因子 (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*; OSKM) を導入して樹立される人工性多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cells: iPSCs) と同様、患者と同一のゲノムを有し、免疫拒絶されない細胞治療や疾患モデルを利用したドラッグスクリーニングが可能となる。一方、ntESCs は iPSCs と異なり、i) がん化しない、ii) リプログラミングにかかる日数が少ない (ntESCs 5 日間; iPSCs 14 日間)、iii) 発生能が高い利点を有する。ZGA を介した初期胚発生型リプログラミングにより、がん化しない、安定した iPSCs の樹立が期待される。

初期胚発生型リプログラミングの有用性を支える知見として、卵性因子 (ヒストン *Hlfoo*、ヒストンバリエント *TH2A/TH2B*、ヒストンシャペロン *Npm2*) がそれぞれ iPSCs の作製効率を上昇させると報告されている。一方これまで報告された ZGA 遺伝子は *Zscan4* (Zalzmann, Ko et al., *Nature* 2010)、*Hmgpi* (Yamada et al., *Hum Mol Genet* 2010) および *Chd1* (Minami et al., *Development* 2015) のみであり、ヒトでは知られていない。ZGA の初期から特異的に発現する遺伝子は、初期胚発生および分化多能性獲得に関与すると考えられ、ヒト初期胚発生におけるグローバルな発現解析と単一遺伝子レベルでの機能解析の両方が求められている。

## 2. 研究の目的

着床前期胚発生は、受精、胚性ゲノム活性化 (Zygotic Genome Activation: ZGA)、分化全能性の獲得など、生殖生物学及び再生医学において極めて重要な事象を含む。さらに受精後約 3.5 日目の「胚盤胞」と呼ばれる状態のマウス胚は内部細胞塊 (将来胎児になる細胞部分) を有し、内部細胞塊からは ES 細胞 (ESCs) が樹立される。ESCs はほぼ無限に自己を複製する能力とさまざまな種類の細胞に分化する能力を持つため、細胞治療や疾患モデルへの臨床応用が期待されている。

しかし初期胚発生を司る遺伝子発現制御機構はいまだ分からないことが多い。申請者はこれまで、ZGA がヒト卵子によるリプログラミング機構に必須であることを *Nature* 誌に報告し、さらに胚性遺伝子 *Hmgpi* が着床周辺期胚発生および分化多能性獲得に関わることを明らかにしてきた。

本研究では ZGA 遺伝子に属する *Zscan5b* 遺伝子に着目した。*Zscan5b* はドメイン解析の結果から SCAN domain と C2H2 zinc-fingers をコードして DNA に結合する転写因子と予想される。*Zscan5b* と共通した構造的特徴を有する *Zscan4* や *Zscan10* はそれぞれ、ESCs の染色体構造を保護するテロメア伸張およびヒト加齢成人から樹立した iPSCs の DNA 修復を改善させることが知られている。そこで *Zscan5b* が初期胚と幹細胞のゲノム安定性の維持機構を明らかにすることを目的とした。

ZGA を介した初期胚発生型リプログラミングにより、がん化しない安定したヒト iPSCs の樹立が期待される。本研究によって初期胚発生と多能性獲得における ZGA の分子生物学的機構の解明に向けた貴重な知見が得られるとともに、ゲノム安定性の高い幹細胞の樹立につながると期待される。

## 3. 研究の方法

マウス着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングデータおよび Unigene cDNA library におけるマウス各臓器の Expressed sequence tag 発現頻度を解析することにより、着床前期特異的に発現する *Zscan* family 遺伝子 *Zscan5b* 遺伝子を抽出した。*Zscan5b* の発現解析を行うとともに、*Zscan5b* 遺伝子の幹細胞における機能解析を行うため、ノックアウト ESCs を樹立する。

### (1) *Zscan5b* の発現解析

*Zscan5b* 遺伝子の発現解析のため、卵子から初期胚、ESCs に至るまでの免疫染色を行う。さらに体細胞における定量的リアルタイム PCR 解析 (qRT-PCR 解析) を行う。

### (2) *Zscan5b* の多分化能性に関する検討

*Zscan5b* の多分化能性に関する検討のために、*Zscan5b* 遺伝子を欠失させたマウスモデル (*Zscan5b* ノックアウトマウス) を作成する。複数の *Zscan5b* ノックアウト ES 細胞株を樹立し、

幹細胞の特性解析として、未分化マーカーの qRT-PCR 解析及び免疫染色による未分化能性評価、胚葉体形成試験及びキメラ形成試験による多分化能性評価を行う。

(3) ESCs のゲノム安定性に *Zscan5b* が果たす役割に関する検討  
ノックアウト ESCs のゲノム安定性を評価するため、核型解析、放射線試験を行う。*Zscan5b* が結合するタンパクを同定するため、免疫沈降試験を行う。

(4) 加齢がもたらす幹細胞への影響に関する検討  
マウス体細胞からのリプログラミングにより、若齢 (6-8 週齢) から 1 年程度の ESCs、若齢 (6-8 週齢) から 2 年程度の iPSCs を樹立する。これら複数の細胞株の特性解析として未分化能性、多分化能性評価を行う。さらに加齢がもたらす幹細胞への影響を遺伝子レベルで検索するため、グローバルな転写の状態を RNA-seq 解析により検討する。

## 4. 研究成果

### 研究の主な成果

本研究計画では胚性ゲノム活性化 (Zygotic Genome Activation; ZGA) 遺伝子 *Zscan5b* が初期胚発生から ESCs の樹立過程を通して発現し、ESCs のゲノム安定性に関わることを明らかにし、*Stem Cell Reports* 誌に発表した (Ogawa, Yamada\* et al., *Stem Cell Rep* 2019 \*corresponding author)。

#### (1) *Zscan5b* の発現解析

RT-PCR、qRT-PCR、免疫染色の結果、*Zscan5b* は受精後早期の 2 細胞期から胚盤胞期の着床前期胚、精巣および ESCs で発現し、核に局在した (図 1)。

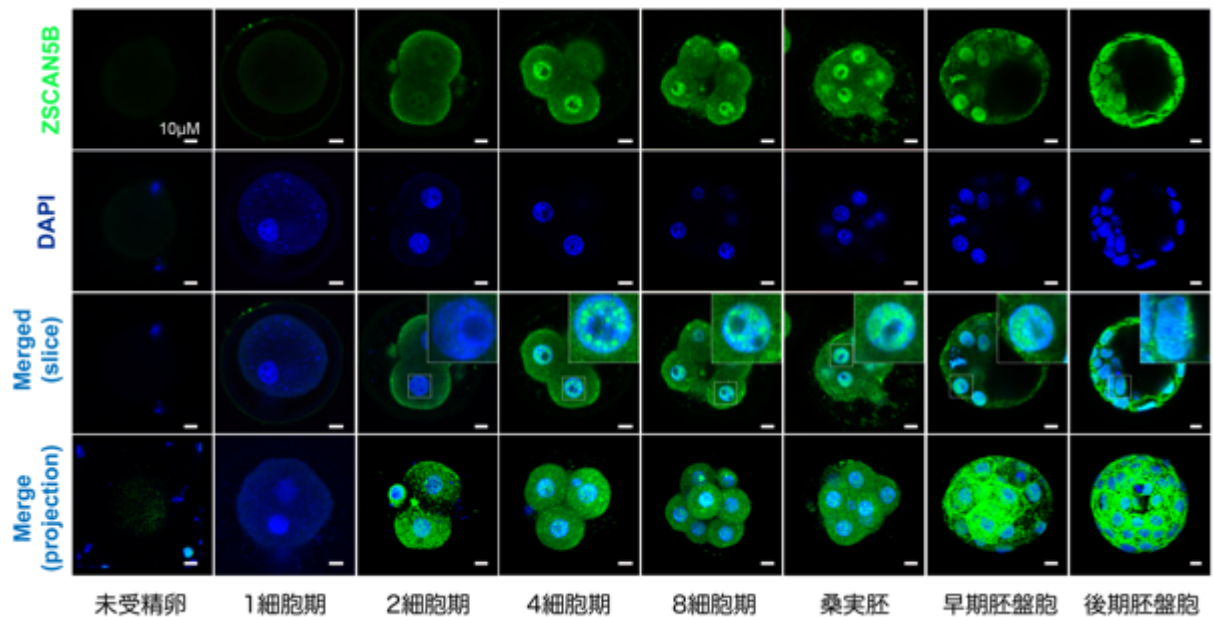


図 1

図 1. *Zscan5b* は受精後の初期に生じる遺伝子発現に伴い発現し、2 細胞期から胚盤胞期にかけてタンパクが翻訳される。

#### (2) *Zscan5b* の多分化能性に関する検討

*Zscan5b* の妊娠する力への関与を検討するために、*Zscan5b* 遺伝子を欠失させたマウスモデルを作成した。この遺伝子をもたない父母のマウスから得られる産仔数をカウントしたところ、正常のマウスと同等であり、*Zscan5b* の欠失が発生能に影響を持たないことが示された。また、*Zscan5b* を欠失させた胚盤胞から ESCs を樹立し分化誘導したところ、すべての体細胞に分化した。しかしながら、これらの細胞は悪性胚細胞性腫瘍を形成した。

#### (3) ESCs のゲノム安定性に *Zscan5b* が果たす役割に関する検討

悪性腫瘍を形成するような細胞においては染色体異常がおり、ゲノム安定性が損なわれていることが推測される。そこで、*Zscan5b* 欠失マウスの体細胞と、*Zscan5b* を欠失した受精卵から樹立した ESCs (KO-ESCs) の染色体検査を行ったところ、KO-ESCs と KO-体細胞では高頻度に chromosome gap、染色体切断 (chromosome break)、ロバートソン転座、重複および欠失などの多様な染色体構造異常を示した。

*Zscan5b* の染色体構造への関与を検討するため免疫沈降法を用い *Zscan5b* と DNA のヌクレオソーム構造を構成する他の関連分子との相互作用を調べた結果、*Zscan5b* はヌクレオソームを折

りたむことで、染色体を構成するクロマチン線維の構造維持に関わるヒストン H1 タンパクと結合することが明らかとなった。このことから、*Zscan5b* が欠失しているとクロマチン構造を保つことができず、染色体を傷つける環境的要因から染色体を守ることができなくなる結果として、染色体切断 (chromosome break) の頻発につながり、染色体切断症候群が生じることが示唆された。

さらに、DNA 分子の安定性への関与を検討するために放射線照射を *Zscan5b* 欠失 ESCs に行った結果、DNA が損傷したことを表す  $\gamma$ H2AX マーカーの発現頻度が野生型と比較して有意に上昇した。一方、*Zscan5b* 欠失 ESCs に *Zscan5b* を過剰発現させた結果、 $\gamma$ H2AX の発現頻度は減少した (図 2)。

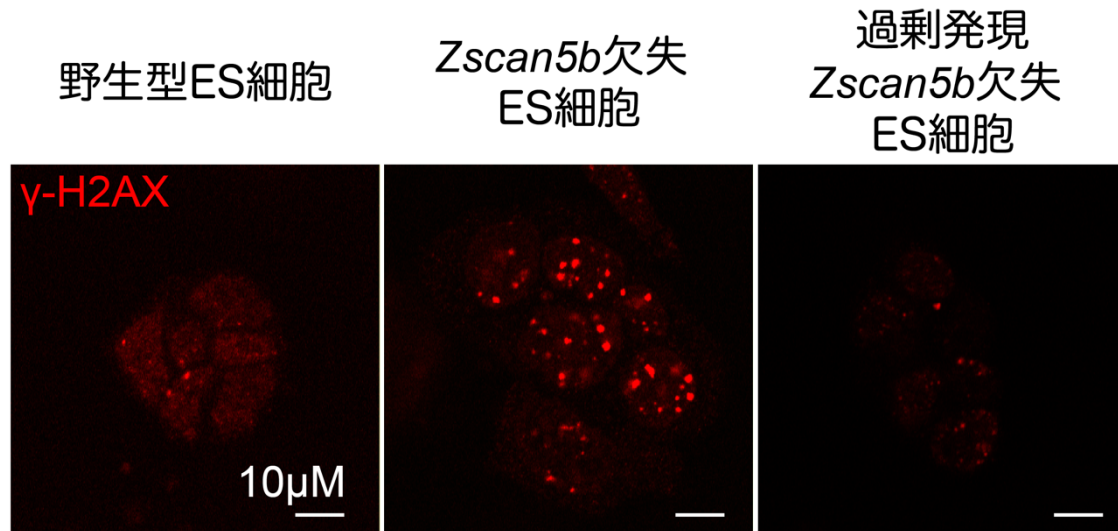


図 2

図 2 : *Zscan5b* を欠失した ESCs は、放射線照射を加えると DNA 損傷マーカーの  $\gamma$ H2AX の発現頻度が有意に上昇する。しかし、*Zscan5b* 遺伝子を強制発現させるとその頻度は野生型 ESCs と同等程度に低下する。

*Zscan5b* を欠失した ESCs におけるグローバルな転写状態を解析するため行なったマイクロアレイの結果、DNA 修復遺伝子 *Rad51l3* および *Bard1* の発現が上昇していた。これらの結果から *Zscan5b* はヒストン H1 と結合することによりクロマチン構造の安定化に寄与するとともに、体細胞分裂期の DNA 修復遺伝子 (*Bard1* など) と DNA 損傷修復に関わる二つのメカニズムを介して、ESCs におけるゲノム安定性に寄与すると考えられた。

#### (4) 加齢がもたらす幹細胞への影響に関する検討

さらに加齢がもたらす幹細胞への影響の解明を目指して、マウス若齢由来 3 株の ESCs、iPSCs に加えて、12 ヶ月齢の個体から ESCs および iPSCs を、24 ヶ月齢の個体から iPSCs を樹立した。未分化マーカー遺伝子 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Nanog* について定量的リアルタイム解析を行った結果、明らかな発現量の差を認めなかった。多分化能性の検討のため *in vitro* に胚様体作成を行った結果、12 ヶ月齢までの幹細胞では TUJ1、AFP、SMA の発現が観察された。加齢モデルにおけるミトコンドリア機能を評価した結果、naïve 型では電子伝達系が活動し、6 ヶ月齢の ESCs・iPSCs における一時的な酸素消費量の増大と、予備呼吸能の低下を観察した。7 週齢から 12 か月齢までの線維芽細胞・ESCs・iPSCs の RNAseq 解析による発現プロファイルにおいて、12 か月齢の iPSCs は他の群とことなり同一にクラスタリングされた。

#### 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

これらの結果から、ZGA 遺伝子 *Zscan5b* が幹細胞のゲノム安定性に寄与すること、転写因子型リプログラミングは体細胞加齢の影響を消去できない可能性が示唆された。

本研究は、「受精後の初期に生じる遺伝子の機能を喪失させることで体細胞と ESCs のゲノム安定性が損なわれ、ランダムに染色体異常が起こりえる」というあらたな概念を提示した。マウスモデルとヒトにおける遺伝子発現の時期は異なるため、本研究結果がそのままヒトに当てはまるかは今後さらなる検証が必要である。しかし、受精卵の発生および幹細胞の樹立過程に特定の遺伝子の発現を適切に誘導することで、受精卵や ESCs、iPSCs のゲノム安定性が改善されれば、生殖補助医療と再生医療の発展に貢献できるものと期待される。

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 Seiji Ogawa, Mitsutoshi Yamada, Akihiro Nakamura, Tohru Sugawara, Akari Nakamura, Shoko Miyajima, Yuichirou Harada, Reina Ooka, Ryuichiro Okawa, Jun Miyuchi, Hideki Tsumura, Yasunori Yoshimura, Kenji Miyado, Hidenori Akutsu, Mamoru Tanaka, Akihiro Umezawa, Toshio Hamatani	4. 巻 12
2. 論文標題 Zscan5b Deficiency Impairs DNA Damage Response and Causes Chromosomal Aberrations During Mitosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1366-1379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.05.002	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14件（うち招待講演 6件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Yamada M, Ogawa S, Nakamura A, Sugawara T, Miyado K, Akutsu H, Hamatani T, Umezawa A, Tanaka M
2. 発表標題 Zspi deficiency impairs DNA damage response and causes chromosomal aberrations during mitosis
3. 学会等名 The 90th Royal College of Obstetriciaans & Gynaecologists (RCOG) World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada M, Ooka R, Nakamura A, Sugawara T, Ogawa S, Miyado K, Akutsu H, Hamatani T, Tanaka M, Umezawa A.
2. 発表標題 MOUSE ZSCAN5B DEFICIENCY IMPAIRS DNA DAMAGE RESPONSE AND CAUSES CHROMOSOME ABERRATIONS DURING MITOSIS.
3. 学会等名 The International Society for Stem Cell Research 17th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada M
2. 発表標題 Development of new Assisted Reproductive Technology (ART) and regenerative medicine based on regulating gene expression during preimplantation development
3. 学会等名 The 105th Annual Congress of Korean Society of Obstetrics & Gynaecologists (KSOG) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada M, Ogawa S, Nakamura A, Sugawara T, Miyado K, Akutsu H, Hamatani T, Umezawa A, Tanaka M
2. 発表標題 Zspi deficiency impairs DNA damage response and causes chromosomal aberrations during mitosis.
3. 学会等名 The 90th Royal College of Obstetriciaans & Gynaecologists (RCOG) World Congress. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada M, Ooka R, Nakamura A, Sugawara T, Ogawa S, Miyado K, Akutsu H, Hamatani T, Tanaka M, Umezawa A.
2. 発表標題 MOUSE ZSCAN5B DEFICIENCY IMPAIRS DNA DAMAGE RESPONSE AND CAUSES CHROMOSOME ABERRATIONS DURING MITOSIS.
3. 学会等名 The International Society for Stem Cell Research 17th Annual Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada Mitsutoshi
2. 発表標題 Development of new Assisted Reproductive Technology (ART) and regenerative medicine based on regulating gene expression during preimplantation development.
3. 学会等名 The 105th Annual Congress of Korean Society of Obstetrics & Gynaecologists (KSOG). (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada M, Ogawa S, Hamatani T, Akutsu H, Umezawa A, Tanaka M.
2. 発表標題 Zspi-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal gap and accelerates carcinogenesis in mice.
3. 学会等名 The NYSCF conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 満稔
2. 発表標題 卵子・初期胚発生のバイオロジーからみた不妊症
3. 学会等名 第20回大阪不妊の集い勉強会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 満稔
2. 発表標題 【シンポジウム】卵子間核置換は排卵後加齢卵子のfragmentationを防ぐことで発生能を改善させる
3. 学会等名 第36回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田 満稔
2. 発表標題 遺伝子発現からみた初期胚発生のバイオロジー
3. 学会等名 第17回生殖バイオロジー東京シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川誠司、山田満稔、阿久津英憲、梅澤明弘、浜谷敏生、田中守
2. 発表標題 新規SCAN-zinc finger遺伝子Zfp371は胚性ゲノム活性化に伴い発現し、体細胞分裂過程におけるゲノムの安定性に関わる
3. 学会等名 第35回日本受精着床学会総会・学術講演会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 山田満稔、阿久津英恵、Dieter Egli
2. 発表標題 【シンポジウム】Rising Sun Lectureヒトtherapeutic cloningへの挑戦と課題
3. 学会等名 第20回日本IVF学会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山田満稔、田中守、Dieter Egli
2. 発表標題 【シンポジウム】難治性疾患克服バイオロジー：生殖・発生・小児疾患を中心に ヒト生殖細胞系列におけるミトコンドリアゲノムの遺伝とミトコンドリア病遺伝予防を目指した卵子核移植の課題
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Seiji Ogawa, Yamada M, Hamatani T, Akutsu H, Tanaka M, Umezawa A
2. 発表標題 Zspi-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal gap and accelerates carcinogenesis in mice
3. 学会等名 The International Society for Stem Cell Research 14th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山田満稔、田中守	4. 発行年 2017年
2. 出版社 先端医療技術研究所	5. 総ページ数 529
3. 書名 先端医療シリーズ48	

〔産業財産権〕



〔その他〕

所属機関による研究成果のプレスリリース  
 受精卵・幹細胞のゲノム安定性の維持機構を解明 - 遺伝子による染色体構造の保護作用とDNA修復 -  
<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2019/5/31/28-53422/>

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
研究協力者	大岡 令奈  (OOKA Reina)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教	
研究協力者	中村 彰宏  (NAKAMURA Akihiro)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員	
研究協力者	菅原 享  (Sugawara Tohru)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・上級研究員	
研究協力者	大川 隆一郎  (Ookawa Ryuichiro)		
研究協力者	田中 守  (Tanaka Mamoru)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	阿久津 英憲  (Akutsu Hidenori)  (50347225)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・生殖医療研究部・部長	