

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18200

研究課題名(和文) 初期胚因子Zscan5bによるゲノム安定性に関する研究

研究課題名(英文) Genomic stability studies with early embryonic factor Zscan5b

研究代表者

中村 彰宏 (Nakamura, Akihiro)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：50750973

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)：8週齢、12週齢、24週齢それぞれの週齢のマウスから樹立したiPS細胞のメタボローム解析を実施し、それぞれの代謝に着目し解析をおこなった。事前の実験や論文での報告から老化マウスから樹立したiPS細胞ではミトコンドリア活性の低下とZscan5b遺伝子導入による改善が予想された。しかしながら、同週齢由来iPS細胞の株間での差が大きく、週齢それぞれの傾向をつかむことができなかった。これらの解析結果が手技的なものに由来するものなのか、あるいは株間でのばらつきは想定される事象なのか、株間での特性の違いがなにに由来するのか明らかにすることは今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では人工多能性幹(iPS: induced Pluripotent stem)細胞を始めとした培養細胞に対し、「初期胚型修復機構」を誘導、再現させることでゲノム安定性の向上を目指した。人工多能性幹(iPS)細胞の老化に伴うゲノム損傷の蓄積や、ゲノム安定性の低下が指摘されており、臨床応用をはじめ、胚性幹(ES)細胞や全能性を有する受精卵と同様の研究素材とするうえでの課題となっている。このような課題に対し本研究ではゲノム修復因子を外部から遺伝子工学的技術を用いて人工的に導入することにより克服することができるのではないかと考え、本研究課題に着手した。

研究成果の概要(英文)：Metabolome analysis of iPS cells established from 8-week-old, 12-week-old, and 24-week-old mice was performed. Based on previous experiments and reports in papers, iPS cells established from aged mice were expected to have reduced mitochondrial activity and improved by Zscan5b gene transfer. However, there was a large difference between lines of iPS cells derived from the same age, and it was not possible to grasp the tendency of each age. It is future task to clarify what the differences in characteristics between strains are derived from.

研究分野：分子生物学

キーワード：iPS細胞 ゲノム安定化

1. 研究開始当初の背景

再生医療などへの応用で注目される胚性幹細胞 (ESC: Embryonic Stem cell) や人工多能性幹細胞 (iPSC: induced Pluripotent stem cell) だが、これらの幹細胞には染色体異常の頻度が高いことが問題視されている。特に高齢者の細胞に由来した細胞ではその頻度も上昇することが示唆されている。我々の研究室では着床前期胚の遺伝子発現に着目した研究を行っており、その研究の中でゲノム修復や安定性に寄与する分子を報告している (Ogawa et al., Stem Cell reports, 2019)。これらの因子は着床前期だけでなく、胚盤胞由来の ES 細胞でも発現していることが知られている。このことから、iPS 細胞でこれらの遺伝子を発現させ、ゲノム修復機構やゲノムの安定性をサポートすることで幹細胞を用いた染色体異常のリスクを低下できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

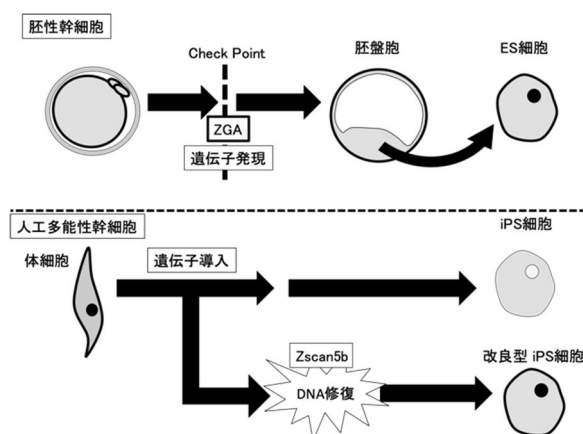
本研究では人工多能性幹(iPS: induced Pluripotent Stem)細胞を始めとした培養細胞に対し、「初期胚型修復機構」を誘導、再現させることでゲノム安定性の向上を目指す。まずはそのための誘導因子の同定を第一の目的とした。iPS 細胞はその可能性から医療をはじめとした応用利用への期待が高まるが、培養、維持の段階でのゲノムに対する損傷の蓄積など、ゲノムの不安定性が指摘され実用化への障壁となっている。一般的に細胞内には損傷したゲノム DNA を修復する機構の存在が知られている。特に初期胚(受精卵)や初期胚由来の胚性幹(ES: Embryonic Stem)細胞では時期特異的な修復関連因子が損傷を修復していることが知られている。そこで本研究ではそれらの因子について iPS 細胞を始め、培養細胞に導入し、発現を誘導することでそれら細胞の品質向上を目指した。

3. 研究の方法

本研究では Zscan5b を中心とした胚性ゲノム活性化 (ZGA) 期に発現する Zscan ファミリーの iPS 細胞における機能性の解析と、iPS 細胞樹立および培養、維持の際のゲノム安定性向上を目指す。そのためまずは生体において Zscan5b の挙動を確認した上で、iPS 細胞における発現と発現が確認された場合にはその機能を明らかにする。そのために以下の方法で解析を実施する。

GFP ノックインマウスの作製

Crispr gRNA を用いて Zscan5b 遺伝子座に GFP 遺伝子を挿入し、GFP 陽性 Zscan5b を発現するマウスを作製し、in vivo での Zscan5b の発現や挙動を解析し、これまでに報告した受精卵や ES 細胞といった in vitro での結果について in vivo と比較を行う。遺伝子組換えマウスの作製にあたっては i-GONAD 法を用いることにより作製期間の短縮、供する実験動物を削減する。



我々の研究室ではすでに Zscan5b 遺伝子欠損マウスと ES 細胞を樹立し、解析を行なっている。またその結果から Zscan5b に遺伝子修復機構やヒストン 1 との結合することを報告した (Ogawa et al., *Cell Stem Cell*. 2019)。そこで Zscan5b 遺伝子欠損マウスの体細胞から iPS 細胞を樹立する。

老化の影響に対する ZGA 因子の影響評価

老化した個体の体細胞から樹立した iPS 細胞はゲノム安定性や DNA 損傷修復応答が若齢個体から樹立した iPS 細胞に比べさらに低下することが報告されている。そこで 8 週齢、6 ヶ月齢、12 ヶ月齢、24 ヶ月齢から樹立した iPS 細胞について代謝量、ストレス応答と遺伝子発現について解析、比較する。

修復反応の確認

Zscan5b 欠損マウスは特徴的な染色体構造異常を示し、DNA 修復複製、あるいは染色体分離機構に関わることで染色体の安定性に関与する可能性が示唆された。そこで、遺伝子欠損マウスから樹立した iPS 細胞に紫外線照射あるいはマイトマイシンやアフィジコリン等の薬剤に暴露することで染色体異常、増殖能の低下を誘導する。増殖能の低下が確認された場合には、プロピジウムイオタイド (PI) で処理したのち、フローサイトメトリーを用いて細胞周期の延長について解析する。また H2AX や RPA などの DNA ストレスマーカーについて免疫組織化学染色を行い、野生型マウスと比較し、遺伝子欠損 iPS 細胞での DNA 損傷レベルおよび修復反応の有無を確認する。

以上の方法により iPS 細胞による Zscan5b の機能を確認した上で iPS 細胞樹立のタイミングで遺伝子導入あるいはタンパク質を強制発現させ iPS 細胞のゲノム安定性を確認する。

4 . 研究成果

本研究では Zscan5b を中心とした胚性ゲノム活性化(ZGA)期に発現する Zscan ファミリーの iPS 細胞における機能性の解析と、iPS 細胞樹立及び培養、維持の際のゲノム安定性向上を目指し、研究を遂行した。この研究目標を達成するために初期段階では (1) Zscan5b 遺伝子座に GFP 遺伝子を挿入した GFP ノックインマウス の作製、(2) Zscan5b 欠損 iPS 細胞の樹立、(3) 老化の影響に対する ZGA 因子の影響評価、(4) 修復反応の確認を計画していた。しかしながら本研究計画初年度は社会的なコロナウイルス感染に伴う非常事態宣言による社会活動の制限や、所属機関の変更等があり研究計画の大きな変更を余儀なくされた。それらのことを踏まえ、実現可能な項目から研究を遂行するべく計画を再構成し、当該年度は iPS 細胞における発現の確認を目標とした。Zscan5b の機能として、DNA 損傷の修復と損傷からの保護が報告されている。iPS 細胞は人為的に初期化を誘導した幹細胞だが、同じ幹細胞でも胚(受精卵内部細胞塊)を由来とする ES 細胞とはその性状が異なることが示唆、報告されている。そのうちの一つに老齢個体由来の iPS 細胞はがん化傾向が若齢個体由来の iPS 細胞に比べ高い可能性がある。その背景として初期化誘導の際に修復機構あるいは DNA の損傷が完全に初期化されていない可能性が考えられる。そこで、若齢(7~8 週齢)、12 か月齢、24 か月齢(老齢)のマウスの線維芽細胞から iPS 細胞作製キットを用いて iPS 細胞を樹立した。Zscan5b 遺伝子欠損マウスからの

iPS 細胞の樹立も目指したが、マウス個体が老衰等のために線維芽細胞を増殖させることができず、遺伝子欠損個体 3 個体からそれぞれ 3 株の iPS 細胞の樹立には至らなかった。つぎにそれぞれの週齢のマウスから樹立した iPS 細胞のメタボローム解析を実施し、それぞれの代謝に着目し解析をおこなった。事前の実験や論文での報告から老化マウスから樹立した iPS 細胞ではミトコンドリア活性の低下が予想され、Zscan5b 遺伝子導入による改善が予想された。しかしながら、同週齢由来 iPS 細胞の株間においても活性に差があり、週齢それぞれの傾向をつかむことができなかった。樹立したそれぞれの iPS 細胞では 3 胚葉分化能を確認し、iPS 化を確認したものの、これらの解析結果が手技的なものに由来するものなのか、あるいは株間でのばらつきは想定される事象なのかは明らかではない。ただし、いずれにせよ株間での特性の違いがなにに由来するのか明らかにすることは、本研究の当初の目的と通ずるものであり、今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------