

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791527

研究課題名(和文)

精子幹細胞における、多能性幹細胞性維持のメカニズムの解明

研究課題名(英文)

The prospective analysis in generation of pluripotency in primordial germ cells

研究代表者

小坂 威雄 (KOSAKA TAKEO)

慶應義塾大学・医学部・研究員

研究者番号：30445407

## 研究成果の概要(和文):

多能性を誘導する4つの転写因子(Klf4, Oct3/4, Sox2, c-Myc)の内在性の発現に着目し、発生サイクルにおいてエピジェネシスが重要な働きをしている始原生殖細胞(PGC)から多能性誘導実験を実施した。どの1つの転写因子のみでも、種々の多能性のマーカーを発現するES細胞様のコロニーが出現し、ヌードマウス皮下移植によって、テラトーマの形成能を有する多能性幹細胞であった。PGCは多能性誘導に必要な転写因子を内因性に発現していることから、より少ない転写因子で、多能性を誘導できることが示唆された。

## 研究成果の概要(英文):

iPS cells have been generated from somatic cells following ectopic expression of the transcription factors: Klf4, Sox2, Oct4, and c-Myc. To elucidate the reprogramming process to pluripotent state are needed to apply iPS technology for safe clinical application. In order to uncover the detailed mechanisms, high efficient reprogramming experimental model is thought to be effective. We focused on PGCs, which can be reprogrammed into pluripotent stem cells relatively high efficiently and faster than the other cells under defined conditions. By using small molecules, we tried to improve the culture condition. We estimated epigenetic modifiers and signal inhibitors. Finally, we found that combinations of ERK inhibitors, GSK-inhibitor, and TGF- $\alpha$ 1 receptor inhibitor contributed to induce PGCs into pluripotent state up to about 20% at day 10. This culture condition enabled to assess and identify the cell population progress to pluripotent state using FACS. We analyzed gene expression and uncovered the unknown dynamic change in pluripotent markers. Our high efficient culture of PGCs to pluripotent state would be a good model to understand reprogramming process.

## 交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：多能性幹細胞、エピジェネシス、iPS 細胞、

### 1. 研究開始当初の背景

生物の発生過程において、その節目に大規模な遺伝子発現の変動が生じており、ゲノムワイドなエピジェネティック修飾の変化がそれに連動する。次の世代へゲノムを伝達することができる唯一の生殖細胞においては、その発生過程において、ダイナミックなエピジェネティック修飾の変化を伴う。生殖細胞の発生のゴールは、精子・卵子の形成であり、それ以上の多様性は必要なく、これら配偶子は受精卵を生み出すためにある。こうした、生殖細胞の発生のプロセスは、受精卵が新たな個体を作り出すために全能性 (totipotency) を獲得する準備期間ともいえる。一般に、限られた分化能のみ有する細胞が、多分化能や全能性を獲得する過程は再プログラム化 (reprogramming) とよばれ、DNA メチル化・ヒストン修飾・クロマチン高次構造などのエピジェネティックな変化を伴うが、この再プログラム化 (reprogramming) に関して、京都大学の山中伸弥教授らは 2006 年にマウスの繊維芽細胞という分化した体細胞から 4 つの転写因子 (*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*) の導入によって、直接 ES 細胞様の多能性幹細胞を誘導すること、すなわち再プログラム化に成功した (Takahashi K and Yanamaka S: Cell, 126, 2006)。その後、同教授らは、薬剤による選別のタイミングを変えることによって、樹立効率が低下してしまうものの *c-Myc* を除く 3 の転写因子で iPS 細胞を誘導することに成功した。*c-Myc* の再活性化による腫瘍化の問題は改善され、マウスの iPS 細胞樹立の報告から 1 年後、ヒトの細胞においても同様の因子を導入することで iPS 細胞が誘導できることが明らかとなった (Takahashi K and Yanamaka S: Cell, 131, 2007)。ヒト細胞からも同様に iPS 細胞が樹立されたことから、臨床への応用の期待に向けた研究が世界中で展開されている。しかし、実際のところ、iPS 細胞誘導の仕組みはほとんどわかっていない。 iPS 細胞は分化した体細胞から 3 つの因子を導入し、数週間にわたる長期にわたる培養を経て誘導されるもので、効率は低く 1% 以下である。iPS 細胞誘導時に用いる 4 因子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*) の内 *Oct3/4*, *Sox2* は ES 細胞で多能性の維持に重要な働きをしていることがよく知られている因子で、これらの働きにより、多能性幹細胞としての遺伝子発現ネットワークが形成され、*Klf4*, *c-Myc* は分化した体細胞において転写因子群が、標的へアクセスしやすいようにヒストン修飾な

どのエピジェネシスを変えたり、細胞の増殖を促進のために必要だと推測されている。また、iPS 細胞では結果として *Oct3/4* や *Nanog* といった、未分化性の維持にかかわる遺伝子のプロモーター領域の DNA の脱メチル化や、ヒストン修飾の変化が明らかになっているが、これらはどのようなタイミングで起こるのかは分かっていない。さらに、1% 以下という樹立効率の低さや、iPS 細胞間の質の差、リプログラミングされるまでの、長期間の培養を要する理由についても、原因は不明のままである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は多能性を誘導する 4 因子 (*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*) の内在性の発現の有無と、細胞の分化度に着目し、その発生サイクルにおいて、運命の決定やインプリンティングなどの特有の現象に、エピジェネティック修飾が特に重要な働きをしている、生殖細胞を材料として、多能性幹細胞を誘導し、その解析から、多能性幹細胞誘導のメカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

使用するマウスは、申請者が保有する、*Nanog* 遺伝子座に、緑色蛍光タンパク (GFP) および、ピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスである。申請者は、このマウスの繊維芽細胞を使用して、山中らの方法に準じて、*c-myc* を除く 3 因子で、約 0.5% の効率で再プログラム化、すなわち iPS 細胞を誘導する系ならびに、また iPS 細胞の多分化能の評価系をすでに確立している。

生殖細胞の体外培養は、支持細胞として、膜結合型の SCF (stem cell factor, stiel factor) を発現する SI/m220 細胞を使用し、培養液中に LIF (leukemia inhibitory factor) を加えることで可能となってきた。マウス胎仔から胎齢 7.5-8.5 日の初期始原生殖細胞を取り出して培養した場合は 4-5 日間の体外培養が、胎齢 10.5-11.5 日の始原生殖

細胞の場合は、1-2日間の体外培養が可能であり、それ以上の期間は増殖の停止が起こる。また1胎仔から採取可能な細胞数は胎齢8.5日では約130個、胎齢13.5日では約26000個である。また胎齢13.5日以降では増殖停止期間に入る。これらの所見を統合して、細胞増殖のサイクルを有し、かつ、十分な始原生殖細胞が採取可能な胎齢11.5日のマウスの胎仔から採取することとする。なお、胎齢11.5日の始原生殖細胞は、Nanogを発現しており、他の細胞でのNanog陽性部位はないため、可視的に分割採取可能であり、さらにこのトランスジェニックマウスの特性から、GFPを指標にフローサイトメトリーを使用してソーティングすることで、純化が可能である。

多能性を誘導する4つの転写因子(*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-myc*)を導入する際には、レトロウイルスベクターを使用する。それぞれを全部で10通りの組み合わせで、レトロウイルスを感染する。多能性幹細胞が誘導された際に、多能性の質の高い多能性幹細胞の指標として、ウイルスのサイレンシングが重要であるとされているので、蛍光タンパク(DsRed)などの発現が視認できる遺伝子を、各転写因子を導入する際に、同時に導入する。支持細胞(feeder細胞)は、感染初期は始原生殖細胞用のSl/m220細胞を使用する。感染した後、3日目にES用の支持細胞(ピューロマイシン耐性ST0細胞)に播きなおし、ピューロマイシンで薬剤選択を開始する。胎齢11.5日の始原生殖細胞は、特定の増殖刺激因子を加えない限り、1-2日で増殖が停止されるので、通常の体外培養では、コロニーを形成されないと考えられるので、コロニーの形成と、Dsred 蛍光タンパクの発現の消失を指標に多能性幹細胞の出現を観察する。

#### 4. 研究成果

平成20年度は、多能性を誘導する4つの転写因子(*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*)の内在性の発現の有無と、細胞の分化度に着目し、その発生サイクルにおいて、エピジェネシスが特に重要な働きをしている生殖細胞を材料として、多能性幹細胞(iPS細胞)の誘導実験を実施した。申請者が保有する、Nanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク、ピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスの胎仔から始原生殖細胞(PGC)を、フローサイトメトリーにて、Nanog陽性を指標とし、ソーティングにて採取し、細胞単位で純化することが可能になった。レトロウイルスベクターを使用して、多能性を誘導する4つの転写因子を、種々の組み合わせで導入し培養した。質の高いiPS細胞の指標として、蛍光タンパク(DsRed)を同時に導入した。またPGCのリプログラミングに必須のbFGFを除いて多能性幹細胞の誘導を試みた。その結果、4つの転写因子のどの組み合わせでも、また、非常に興味深いことに、*Klf4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *c-myc*のうちどの1つの転写因子のみでも、ES細胞様のコロニーが約0.3-0.7%の高い効率で出現した。これらのコロニーは、種々の多能性のマーカーを発現し、20世代以上に渡って安定したES様のコロニー形態を呈し、ヌードマウス皮下移植によって、テラトーマの形成能を呈する、多能性幹細胞であることが証明された。PGCは多能性誘導に必要な転写因子を元来発現していることから、より少ない転写因子で、多能性幹細胞を誘導できることが示唆された。

ERK阻害剤、GSK-3阻害剤、FGFR阻害剤、TGF- $\beta$ 阻害剤を種々の組み合わせで併用して、多能性誘導実験を試みたところ、特定の組み合わせにおいて、数10%の高い効率で多能性を誘導することが可能となった。この高い誘導効率により、細胞集団の中の多能性獲得途上の細胞集団を、前向きに解析することが可能な実験系を提供するものと考えられる。

引き続き、小分子化合物を併用して、更に誘導効率を改善させて、多能性誘導・維持のメカニズムを解析していく予定である。

#### 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. Go Nagamatsu, Takeo Kosaka et al. A Germ Cell-specific Gene, Prmt5, Works in Somatic Cell Reprogramming. The Journal of Biological Chemistry. 査読有

286(12), 2011, 321-6.

2. Taisuke Kinoshita, Go Nagamatsu, Takeo Kosaka et al. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPS cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 査読有 407(2), 2011, 321-6.

〔学会発表〕(計4件)

1. 永松剛、小坂威雄、他3名、始原生殖細胞からの多能性幹細胞分化、第10回日本再生医療学会総会、2011. 3. 2、新宿、東京
2. 小坂威雄、他5名、Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. 第8回 幹細胞シンポジウム2010. 5. 14、淡路、兵庫
3. 木下泰輔、永松剛、小坂威雄、他3名、ATM deficiency decreases reprogramming efficiency in iPS cells. 第8回 幹細胞シンポジウム2010. 5. 14、淡路、兵庫
3. 小坂威雄、他5名、Prospective analysis of reprogramming process in primordial germ cells. 第7回 幹細胞シンポジウム2009. 5. 16、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.keio-urology.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小坂 威雄 (KOSAKA TAKEO)  
慶應義塾大学・医学部・研究員  
研究者番号：30445407

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし