

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440120

研究課題名(和文) Nanog遺伝子を持たないツメガエル細胞におけるリプログラミングの研究

研究課題名(英文) Study of reprogramming in Xenopus cells that do not have Nanog gene

研究代表者

小沼 泰子 (Onuma, Yasuko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：90431824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：リプログラミング因子の導入によるアフリカツメガエル細胞の遺伝子発現の変化を解析した。全プローブの相関係数解析により遺伝子発現プロファイルが遺伝子導入後24時間から72時間の間に経時的に変化することがわかった。多能性マーカーであるOct3/4のオーソログであるoct-91 (pou5f3.1)や、TDGF1/CriptoのオーソログであるFRL-1 (tdgf1.3)の発現上昇が確認された。また、Nanog代替因子の候補であるVent / Ventx遺伝子群の中では、ventx2.1-b (Xbr-1b)とventx3.2 (Xvex-1)の発現上昇が確認された。

研究成果の概要(英文)：The gene expression changes in *Xenopus laevis* cells by transfection with reprogramming factors were investigated. The correlation coefficients using all probes indicated that the gene expression profiles changed sequentially in 24 to 72 hours after transfection. Pluripotent markers, Oct3/4 orthologue oct-91 (pou5f3.1) and Cripto/TDGF1 orthologue FRL-1 (tdgf1.3), showed increased expression. ventx2.1-b (Xbr-1b) and ventx3.2 (Xvex-1) also showed upregulation of the expression, among vent / ventx family genes that are candidates of Nanog alternative.

研究分野：生物学

キーワード：幹細胞 ツメガエル リプログラミング 多能性

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞は、再生医療、難病の発症メカニズムの解明、薬理学検査等の分野で注目を集め、幹細胞の性質を活かした応用研究の今後の一層の発展が期待されている。

多能性幹細胞を規定する、多能性や自己複製能のメカニズムの理解は、遺伝子発現制御とその過程のシグナルパスウェイを明らかにすることに重点が置かれ、大半の知見は哺乳類の胚性幹細胞 (ES 細胞) と人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いた研究により得られている。一方で遺伝子工学的な観点から、非哺乳類生物の多能性幹細胞株を樹立する試みも行われ、鳥類 (ニワトリ、ウズラ) や魚類 (ゼブラフィッシュ、メダカ等) において、哺乳類 ES 細胞様の多能性幹細胞株の樹立が報告されている (参考文献 1-3)。これらの多能性幹細胞の性質を比較研究することから、脊椎動物において魚類からヒトまで共通して、Nanog を中心とするシグナルネットワークが多能性に必須であることが報告されつつある。

しかしながら、ツメガエルにおいては、ゲノムから Nanog 遺伝子が欠落しているという報告があり、別の遺伝子が Nanog の働きを代替しているという説が提唱されている (参考文献 4-5)。代替因子の可能性のある Vent あるいは Ventx (Vent/Ventx) の活性では、哺乳類 ES 細胞において Nanog の機能を代替できず、また、アフリカツメガエル胚内に異所的に導入した哺乳類 Nanog の活性と、Vent/Ventx の活性が一部しか一致しないことが指摘されている (参考文献 4-6)。ツメガエルでは *in vitro* で継代可能な ES 細胞様の多能性幹細胞株が樹立されていないことが、Nanog の果たす多能性維持機能をこれらの因子が補完するのかどうかの解決を難しくしている一因である。

2. 研究の目的

この研究の目標は、多能性幹細胞の成立に必要なシグナルネットワークを進化的な観点から理解することである。多能性幹細胞の未分化性を維持する機構としては、魚類からヒトまで共通に、Nanog を中心とするシグナルネットワークの必要性が解明されている。しかしながら、ツメガエルにおいては、Nanog 遺伝子がゲノムから失われているという最近の知見があり、また多能性幹細胞の樹立が未だに成功していないという背景から、本研究では、ツメガエル細胞を用いて強制的なリプログラミングをおこない、その過程で起こる遺伝子発現の網羅的な解析を通じて、多能性幹細胞の成立のために必要な条件と機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 多能性幹細胞を誘導する過程の変化をとらえるため、センダイウイルスベクターを用いてリプログラミング因子である Sox2,

Oct4, Klf4, c-Myc をツメガエル細胞に導入し、継時的な観察が可能な系を構築した。

(2) 継時的な遺伝子発現プロファイルを作成した。遺伝子導入後、24、48、72 時間後の細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (G2519F, Agilent Microarray Design ID 015066) を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。

(3) 得られた遺伝子発現プロファイルを元に、哺乳類 ES 細胞・iPS 細胞の未分化マーカー遺伝子のうち、それぞれの条件で共通に発現する遺伝子と、一致しない遺伝子を明らかにした。

(4) Nanog 代替因子の候補である vent / ventx の発現解析を行った。また、新たな候補遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) ツメガエル細胞の調整および遺伝子導入

初期ツメガエル胚から、組織片の切り出しまたは細胞解離を行い、それらをゼラチンコートしたディッシュ上で接着培養した。細菌等のコンタミネーション予防のために数種の抗生物質の効果を試した。その結果、Modified L-15 Medium containing 10% Fetal Calf Serum (参考文献 7) を元に、改変を加えた培地を使用することで、コンタミネーションリスクをコントロールできた。この培地を用いて、継代を繰り返すことで、組織片培養から 4 株、全胚解離培養から 2 株のツメガエル培養細胞株を得た。これらの細胞の凍結保存方法についても保存液や温度等の条件検討を行い、生存可能な凍結・融解方法を決定した。

この細胞 (図 1) に対して多能性幹細胞の樹立に必要なリプログラミング因子である Sox2, Oct4, Klf4, c-Myc の導入を行った。遺伝子導入された細胞は形態が変化し、立体的な細胞塊が形成された (図 2)。この細胞塊を継代培養したところ、図 3 のような形状の細胞が得られた。

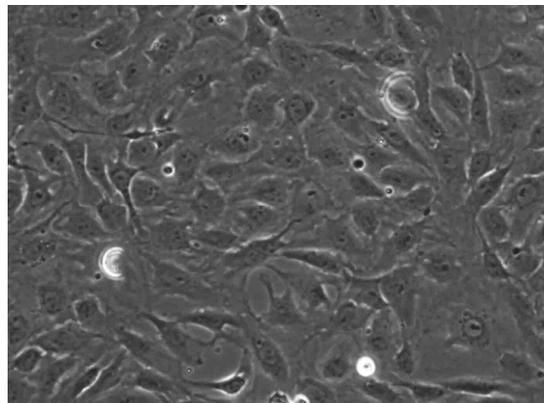


図 1 ツメガエル組織片培養から樹立された細胞株

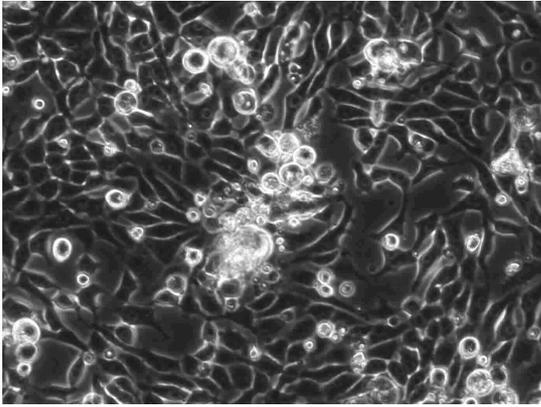


図2 図1の細胞に Sox2, Oct3/4, Klf4, c-Myc を遺伝子導入後6日後の細胞

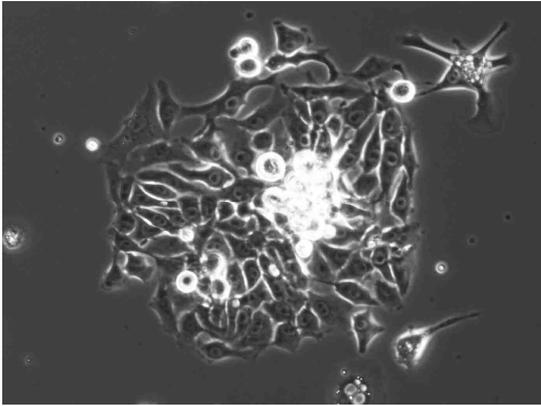


図3 図2の細胞を継代後1日後の細胞

(2) 網羅的遺伝子発現解析

リプログラミング因子導入 0、24、48、72 時間後の細胞の DNA マイクロアレイ解析を行い、全プローブを用いた相関係数を計算した (図4)。その結果、時間的に隣り合う2つの遺伝子プロファイル間の相関係数が高くなることがわかった。このことは全体的な遺伝子発現の変化が継時的に進行していることを示すものである。

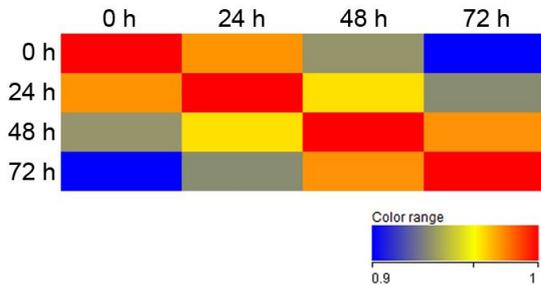


図4 遺伝子発現プロファイルの相関係数のヒートマップ。カラーチャートの下の数値は相関係数を示す。

(3) 哺乳類 ES 細胞・iPS 細胞との比較解析

マウスとヒトの ES 細胞・iPS 細胞の共通の未分化マーカーである Oct3/4, rex1, tert, Dnmt, sox2, Lin28 に相当するアフリカツメガエル遺伝子群の発現の変化を調べた。その

結果、Oct3/4 に相当すると考えられている Class V POU 因子群 oct-25 (pou5f3.2)、oct-60 (pou5f3.3)、oct-79 (pou5f1)、oct-91 (pou5f3.1)のうち、oct-91 のみが遺伝子導入 48 時間後から 72 時間後にかけて発現の上昇が見られた (図5)。これまでに Oct4, Sox2, Klf4 をツメガエル幼生に注入した際に oct-91 の発現が上昇するという報告があり (参考文献8)、これは本結果をサポートするものである。

しかしながら、rex1, tert, Dnmt, sox2, Lin28 については、遺伝子導入前から 72 時間後までの間で発現量の変化は見られなかった (図6-7)。ただし、Lin28 遺伝子群のうち Lin28a の1つのプローブについては、48 時間後からシグナルの上昇が見られた。Lin28a の他の2つのプローブではシグナル値の変化は見られなかったため、プロモーターバリエーションやスプライシングバリエーションの可能性も含めてこの変化について慎重に解釈を進める必要がある。

さらに、ヒト ES 細胞・iPS 細胞の未分化マーカーである TDGF1/Cripto については、ツメガエルの3つのオーソログのうち、FRL1 (tdgf1.3)のみが遺伝子導入 48 時間後から急激に発現の上昇を示すことが明らかになった (図8)。

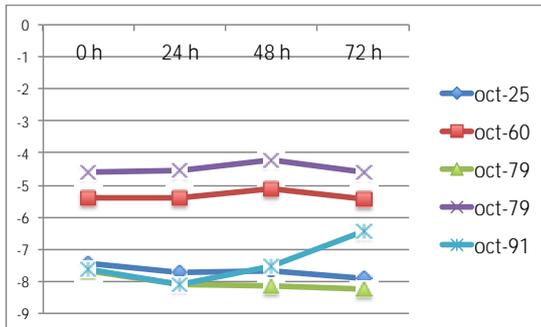


図5 Oct3/4 のオーソログ遺伝子群 oct-25 (pou5f3.2)、oct-60 (pou5f3.3)、oct-79 (pou5f1)、oct-91 (pou5f3.1)の継時的変化 (縦軸: アレイ蛍光の相対値、横軸: 時間経過)

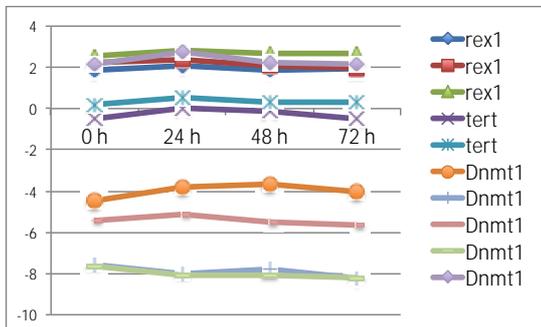


図6 rex1, tert, Dnmt のオーソログ遺伝子群の継時的変化 (縦軸: アレイ蛍光の相対値、横軸: 時間経過)

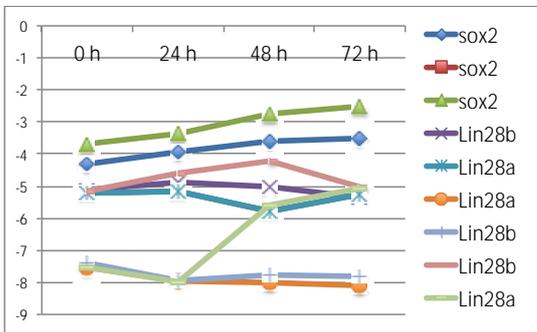


図7 sox2、Lin28 のオーソログ遺伝子群の継時的変化（縦軸：アレイ蛍光の相対値、横軸：時間経過）

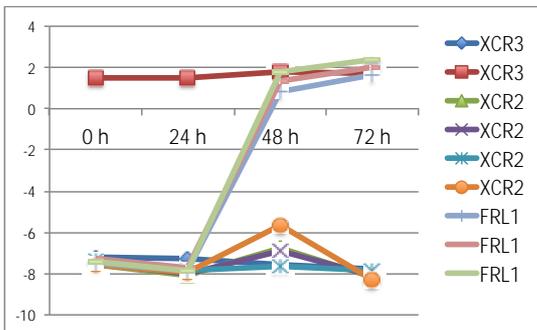


図8 Cripto のオーソログ遺伝子群 FRL-1 (tdgf1.3)、XCR2 (tdgf1.2)、XCR3 (tdgf1.1) の継時的変化（縦軸：アレイ蛍光の相対値、横軸：時間経過）

(4) Nanog の代替因子の候補である vent / ventx 遺伝子の発現と新規候補遺伝子群
 アフリカツメガエル *Xenopus laevis* の vent / ventx 遺伝子群には、ventx1.1-a (PV.1)、ventx1.2 (vent1)、ventx2.1-a (vent2)、ventx2.1-b (Xbr-1b)、ventx2.2 (Xom)、ventx3.2 (Xvex-1) が報告されている。このうち、Xbr-1b と Xvex-1 が 48 時間後から 72 時間後にかけて発現が上昇し、その他の遺伝子には変化が見られなかった (図 9)。

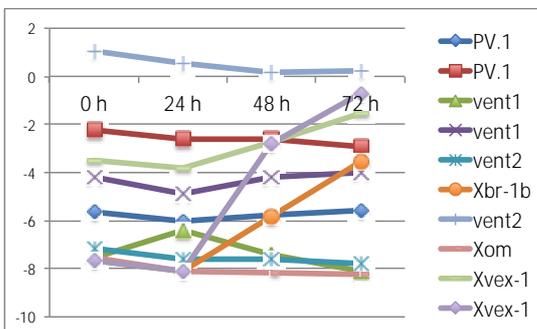


図9 ventx 遺伝子群の継時的変化（縦軸：アレイ蛍光の相対値、横軸：時間経過）

さらに、vent / ventx 遺伝子群の他に発現が変化する遺伝子を探索した。その結果、遺伝子導入前と比べて、72 時間後に発現が 10 倍以上増加する遺伝子プローブを 834 個 (図 10)、10 倍以上減少する遺伝子を 206 個 (図

11) を同定した。

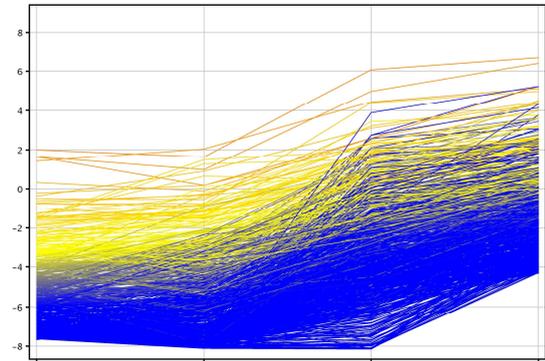


図10 遺伝子導入前 (左) と比べて、導入 72 時間後 (右) に 10 倍以上発現が増加する遺伝子プローブの継時的変化（縦軸：アレイ蛍光の相対値、横軸：時間経過）

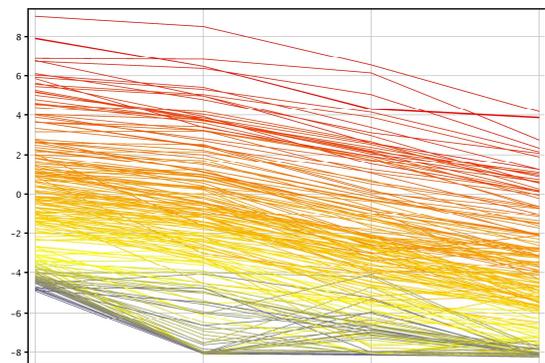


図11 遺伝子導入前 (左) と比べて、導入 72 時間後 (右) に 10 倍以上発現が減少する遺伝子プローブの継時的変化（縦軸：アレイ蛍光の相対値、横軸：時間経過）

本研究により、アフリカツメガエル細胞において、遺伝子発現プロファイルがリプログラミング因子の導入後経時的に変化することが明らかになり、マウスとヒトの ES 細胞・iPS 細胞の未分化マーカーの発現は遺伝子ごとに異なる挙動を示すことが明らかになった。また、継時的に発現量が 10 倍以上増加する遺伝子を同定することができた。

参考文献

1. Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. Pain B, et al. *Development*. 122(8):2339-48. (1996)
2. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos. Sun L, et al. *Mol Mar Biol Biotechnol*. 4(3):193-9. (1995)
3. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). Hong Y, et al. *Mech Dev*. 60(1):33-44. (1996)
4. Characterization of *Danio rerio* Nanog and functional comparison to *Xenopus* Vents. Schuff M, et al. *Stem Cells Dev*.

- 21(8):1225-38. (2012)
5. Ventx factors function as Nanog-like guardians of developmental potential in *Xenopus*. Scerbo P, et al. PLoS One. 7(5):e36855. (2012)
6. mNanog possesses dorsal mesoderm-inducing ability by modulating both BMP and Activin/nodal signaling in *Xenopus* ectodermal cells. Miyazaki A, et al. PlosONE. 7(10):e46630. (2012)
7. Methods in cell Biology: *Xenopus Laevis*, Practical Uses in Cells and Molecular Biology, 36. (1991)
8. Non-viral expression of mouse Oct4, Sox2, and Klf4 transcription factors efficiently reprograms tadpole muscle fibers in vivo. Vivien C, et al. J Biol Chem. 287(10):7427-35. (2012)

5 . 主な発表論文等
なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小沼 泰子 (ONUMA, Yasuko)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
創薬基盤研究部門・主任研究員
研究者番号：90431824

(2) 連携研究者

中西 真人 (NAKANISHI, Mahito)
国立研究開発法人産業技術総合研究所・
創薬基盤研究部門・主任研究員
研究者番号：10172355

(3) 連携研究者

辻 真吾 (TSUJI, Shingo)
国立大学法人東京大学・駒場オープンラボ
ラトリー・特任助教
研究者番号：80431823