

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640048

研究課題名(和文)レトロエレメントの制御因子の解析を基盤としたES細胞の未分化性維持機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of maintenance of ES cell pluripotency through analyses of regulatory factors of retroelements

研究代表者

堀江 恭二 (Horie, Kyoji)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞/iPS細胞の多能性の制御機構の解明は、ES細胞/iPS細胞を臨床に応用するための重要な基盤となる。一方、ES細胞/iPS細胞においては、レトロエレメントの発現が強く制御されていることが知られており、制御が不十分な細胞は多能性に障害を有す可能性が高い。我々はこれまで、独自に開発した手法により、多数のホモ変異体マウスES細胞株を作製してきた。本研究では、これらのホモ変異体の中から、レトロエレメントの発現制御が障害された変異体を同定し、さらにその中から、多能性が障害された変異体を特定した。この変異遺伝子は、ES/iPS細胞の多能性制御において重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Analyses of the regulatory mechanisms of ES/iPS cell pluripotency is an important issue for the application of ES/iPS cells toward clinical fields. It has been known that expression of retroelements is tightly regulated in ES/iPS cells. Therefore, aberrant expression of retroelements implies abnormality of pluripotency of ES/iPS cells. We recently developed a method to generate homozygous mutant mouse embryonic stem cells and established a large number of mutant cell lines. In the present study, we screened these homozygous mutant cell lines for abnormal expression of retroelements. Among them, we identified cell lines exhibiting abnormalities in the regulation of pluripotency. It is likely that the mutated genes play important roles in the regulation of the pluripotency of ES/iPS cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：ES細胞 レトロエレメント ゲノム 遺伝子 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

レトロエレメントは、転写と逆転写を介してゲノムの別の場所へと挿入する配列である。ヒトやマウスのゲノムの約4割を占めるものの、そのほとんどは進化の過程で変異が蓄積して不活化されており、junk DNAとも呼ばれて、生体には不要な配列と考えられていた。一方、ES細胞においてレトロエレメントの発現が抑制されていることは、1980年代から知られていた。また、京都大学の山中伸弥博士によるiPS細胞の樹立の際に、体細胞への遺伝子導入に用いられたレトロウイルスがiPS細胞樹立時には不活化されていたことから、未分化性とレトロエレメントの活性が逆相関することが再認識された。さらに、レトロエレメントの抑制が弱いES細胞/iPS細胞では、未分化性・多能性に障害があることもわかってきた。以上より、junk DNAと呼ばれてきたレトロエレメントは、ES細胞/iPS細胞の未分化性・多能性のレポーターとしての意義があると考えられる。しかし、このような観点からレトロエレメントの制御因子を系統的に単離して未分化性・多能性の研究へと発展させた例は、極めて乏しい。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、マウスをモデルとした遺伝学的手法の開発に携わり、トランスポゾンを用いた変異マウス大量作製技術の開発(Horie et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9191-9196, 2001; Horie et al. *Mol Cell Biol* 23: 9189-9207, 2003)を行ってきた。さらにその経験を利用して、レトロウイルスやトランスポゾンをバクテリオンに用いた遺伝子トラップベクターを作製し、さらに、Bloom遺伝子を一過性に低下させることでヘテロ変異体からホモ変異体を効率良く作製する手法を開発した。この手法を用いて大量のホモ変異体ES細胞株からなる細胞バンクを作製し、培養細胞レベルでの迅速な表現型解析を可能にした(Horie et al. *Nature Methods* 8: 1071-1077, 2011)。

本研究では、レトロエレメントの発現状態をレポーターに用いて、変異ES細胞バンクの中から未分化性・多能性に障害のあるES細胞をスクリーニングし、ES細胞/iPS細胞の未分化性・多能性の新たな制御機構の解

明を目指した。

3. 研究の方法

(1) レトロエレメントの発現解析

我々は、約200個の遺伝子について、マウスES細胞においてホモ変異体を樹立してきた。変異ES細胞からRNAを精製し、各種レトロエレメントの発現を、qRT-PCR法により定量した。

ES細胞の培養条件としては、従来から広く用いられている血清をベースとした培地に加えて、Austin Smith (Nature 453:519-523, 2008)らが報告した無血清培地である「N2B27+GSK3 inhibitor + Mapk inhibitor」も用いた。後者は、未分化性を保持するために極めて強力な培養条件と考えられており、この条件においても異常を示す変異体は、さらに解析を進める意義が高いと判定した。

(2) 未分化マーカー/分化マーカーのqRT-PCRと免疫染色、および、in vitro 分化誘導による、未分化性と多能性の評価

レトロエレメントの発現に異常を示した変異体について、未分化マーカーや分化マーカーの発現レベルを調べた。未分化マーカーとしては、Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4, Tbx3, Zfp42等を用いた。Nanog, Oct3/4については、免疫染色も行った。分化マーカーとしては、Nes, Gata4, Gata6, Fgf5, Afp, Sox1, Sox17, Krt18等を用いた。

分化能の検定には、embryoid bodyを作製した。我々は、非付着性のround-bottom type 96-well plateを用いて効率的にembryoid bodyを作製する条件を設定済みであり、分化誘導後に経時的にRNAを採取して、qRT-PCRにより、上記の分化マーカーを定量した。

(3) Flp/FRTシステムによるベクター領域の削除に伴う表現型消失の評価

我々は遺伝子破壊には遺伝子トラップベクターを用いているが、ベクターの両端には、FRT配列を配置しており、Flpリコンビナーズの発現により、ベクターの大部分を削除できるようにしている。この手法により表現型が消失することで、表現型が遺伝子変異によることを確認した。

(4) ヒストン修飾の免疫染色

レトロエレメントの制御異常は、ヒストン修飾や DNA メチル化等のエピジェネティックな制御の異常による可能性が高い。また、過去の文献から、DNA のメチル化よりも、ヒストン修飾の影響が強いことが示されている (*Nature* 464:927-931, 2010)。そこで、特にヒストン修飾の変化がレトロエレメントの制御に影響している可能性を考え、ヒストンのメチル化やアセチル化等に対する免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) レトロエレメントの発現に異常を示すホモ変異体の同定

既に単離済みのホモ変異体 ES 細胞から total RNA を精製し、各種レトロエレメントの発現を、qRT-PCR により定量した。特定のレトロエレメントに異常を示すものから、複数のレトロエレメントに異常を示すものまで、多様性を認めた。また、研究当初は、レトロエレメントは ES/iPS 細胞で抑制されているとの仮説のもとに、レトロエレメントの発現が上昇する表現型を期待していたが、レトロエレメントによっては、むしろ発現が低下するものも認めた。また、血清培地と無血清培地の両方で共通の表現型を認めるものと、一方の培地で表現型が強いものなど、様々なパターンを認めた。

上記の表現型が遺伝子トラップベクターの挿入部位の遺伝子破壊であることを検証するために、遺伝子トラップベクターを Flp/FRT システムを用いて削除したところ、ほとんどの細胞株において、レトロエレメントの発現異常が正常化し、着目した遺伝子の変異が原因であることを確認できた。

(2) 多能性の評価

レトロエレメントの発現に異常を認めた変異体について、Nanog, Oct3/4, Klf4, Tbx3, Zfp42 等の未分化マーカーの発現を調べた。ほとんどの変異体では、未分化マーカーの発現には顕著な変化を認めなかった。これより、レトロエレメントの発現異常は、ES 細胞が分化した結果ではなく、ある程度の特異性を有すと考えられた。

一方、変異細胞の分化能は、embryoid body

形成時の形態と、Nes, Gata4, Gata6, Fgf5, Afp, Sox1, Sox17, Krt18 等の分化マーカーの発現で検証した。分化マーカーの発現をもとに、変異細胞をクラスタリングし、共通の性質を有す変異細胞を同定した。

(3) ヒストン修飾の変化

上記解析で異常を示した変異体の中から、ヒストン修飾の染色パターンに特異性を有す変異体を同定した。これまでに報告のないパターンを同定できたことから、本研究により、新規の多能性制御因子を特定できたと考えられる。

(4) 考察

本研究により、レトロエレメントの制御異常と ES 細胞の多能性制御との関連性を強く示唆する結果を得た。興味深いことに、レトロエレメントの発現は、変異により上昇するものと低下するものがあり、当初の仮説である「レトロエレメントは ES 細胞では抑制性の制御を受けている」という考えでは、単純に説明できないことも明らかとなった。実際、ヒトの ES/iPS 細胞においては、ある種のレトロエレメントが強く発現し、それが多能性の制御にも関わっているとの結果が報告され、注目を集めている。我々が得て来たマウスでの知見をヒトの解析へと応用することで、ヒトの多能性に関する新たな知見を得られる可能性が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ken Igawa, Chikara Kokubu, Kosuke Yusa, Kyoji Horie, Yasuhide Yoshimura, Kaori Yamauchi, Hirofumi Suemori, Hiroo Yokozeki, Masashi Toyoda, Nobutaka Kiyokawa, Hajime Okita, Yoshitaka Miyagawa, Hidenori Akutsu, Akihiko Umezawa, Ichiro Katayama, Junji Takeda. Removal of reprogramming transgenes improves the tissue reconstitution potential of keratinocytes generated from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*, 査読有, 3:992-1001, 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

① Junko Yoshida, Kyoji Horie. Genome-wide comparative analysis and DNA-type transposon vector integration sites in mouse embryonic stem cells: implication for reprogramming study. 11th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 12-15, 2013, Boston, USA.

② Junko Yoshida, Kyoji Horie. Live cell imaging for the analysis of cellular heterogeneity in mouse embryonic stem cell mutant clones identified by forward genetic screening. 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 18-21, 2014, Vancouver, Canada.

③ Junko Yoshida, Kyoji Horie. Rapid identification of homozygous mutant mouse embryonic stem cell clones showing differentiation resistant or differentiation prone phenotype. Global Controls in Stem Cells, November 5-7, 2014, Biopolis, Singapore.

④ 堀江恭二、吉田純子. ホモ変異体マウス ES 細胞バンクを用いた包括的遺伝子機能解析 第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25-27 日 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
該当無し

○出願状況(計 0 件)
該当無し

○取得状況(計 0 件)
該当無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.narmed-u.ac.jp/~2phy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 恭二 (HORIE, Kyoji)

奈良県立医科大学・第二生理学・教授

研究者番号 : 30333446

(2) 研究分担者
該当者無し

(3) 連携研究者
該当者無し