

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450459

研究課題名(和文)核リモデリングに基づく体細胞初期化促進法と選別法の開発

研究課題名(英文)Acceleration and selection of somatic nuclear reprogramming based on nuclear remodelling

研究代表者

谷 哲弥 (TANI, Tetsuya)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：70319763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞クローンとiPS細胞の誘導研究は、細胞分化制御と可塑性に伴うエピジェネティック制御を理解する上で非常に重要な技術であるがその根本的な分子機構は未解明である。iPS細胞における初期化では、特定の転写活性化領域のアミノ酸配列をマスター転写因子Oct4に誘導することにより初期化効率が飛躍的に向上し、アメリカ平原ハタネズミやニワトリのiPS細胞にも有効であった。体細胞クローンにおける初期化では、卵細胞質のMAPKの必要性がないことや抑制型クロマチン修飾H3K9の脱メチル化酵素Kdm4dの卵細胞およびドナー体細胞内への強制発現により卵で起こる初期化の障壁が下がり発生率が向上した。

研究成果の概要(英文)：Studies of nuclear reprogramming in somatic cell nuclear transfer (SCNT) and induced pluripotent stem cells (iPSCs) are good model for understanding for cell differentiation and dedifferentiation under epigenetic regulation. Efficiency of iPSCs reprogramming dramatically improved by fusion of specific amino acid transactivation domain and useful for vole and chicken. Reprogramming based on oocyte by SCNT does not required MAPK activity and improved clone embryo development by H3K9 specific demethylase Kdm4d overexpression in oocyte or somatic cell.

研究分野：発生工学

キーワード：リプログラミング iPS細胞 核移植 クローン

1. 研究開始当初の背景

体細胞クローン動物の誕生は、畜産分野のみならず基礎生物及び医学分野等にも大きなインパクトを与えてきたが、その成功率は未だ数%と低い。特に畜産分野において、得られたクローン牛の半数以上に死産、形態形成異常、胎盤異常や呼吸器不全など数多くの異常も報告され、実用化レベルの技術には至っていない。その原因として、卵細胞内で起こる核の初期化が不完全であることが推測されるが、未だ不明な点が多い。近年、エピジェネティック修飾のエラーが原因の一つとして考えられており、脱アセチル化酵素阻害剤の使用により高アセチル化を誘導しマウスクローンの初期化効率を高めることができる。しかしながら、この効果はマウスでのみ効果的であるため、依然として体細胞クローンの初期化機構の包括的な解明に至っていない。

一方、体細胞に4種類の初期化因子(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)を強制的に発現させることにより、核の初期化を誘導し人工多能性幹細胞(iPS細胞)を作出することが可能となった。しかし、体細胞クローンと同様にその効率が低いため、核の初期化機構の解明を目的とした研究が数多く行われている。特にエピジェネティクスに着目したアプローチにおいて、体細胞の高メチル化維持が初期化を阻む障壁である多くの知見が報告されている。そこで体細胞のメチル化を特異的脱メチル化酵素や薬剤処理を組み合わせることにより、劇的に初期化を促進することにマウスやヒトのiPS細胞で成功している。

このような背景から、卵細胞質で起こる初期化機構の解明とエピジェネティック制御因子によりクロマチンを弛緩させておけば体細胞が初期化因子により初期化を受けやすい状態になると考え、クローンの初期化に及ぼす影響を調べた。さらに、高品質なブタiPS細胞の樹立を試みた。

2. 研究の目的

これまで体細胞核の初期化機構は、体細胞クローン技術でのみ可能であったがiPS細胞技術の開発により豊富なサンプルと情報量により分子生物学及び生化学的な解析が活発に行われ、徐々に初期化機構の一端が解明されてきた。しかしながら体細胞クローンとiPS細胞の知見を包括的に解析・理解した研究は今まで行われてこなかった。特に、家畜を用いたクローン研究とiPS細胞研究はマウスやヒトの場合と異なる点が多いため家畜を用いた初期化機構の理解により、質の高いクローン技術やiPS細胞技術が実用かつ応用可能になると考えられる。

そこで本研究では卵細胞質内で起こる初期化機構の理解を目指し、初期化に必要な卵細胞質の状態を家畜卵を用いて詳細に調べた。さらに、高メチル化状態のドナー体細胞を予め核をリモデリングすることで初期化

が促進するかどうか試みた。家畜におけるiPS細胞の樹立においては、樹立におけるさまざまな諸条件を調べ、より高品質なブタiPS細胞の樹立を行った。

3. 研究の方法

(1)ウシ体細胞初期化に及ぼす卵細胞質内の主要リン酸化酵素MAPKの必要性を調べるため、さまざまな状態の卵細胞質を作製し、体細胞クローン胚への発生率を指標に評価した。屠殺場由来卵巣より採取および培養した未受精卵は、MPFおよびMAPK活性の活性と不活性化状態を誘導するためイオノマイシンによるMPFの不活性化およびU0126によるMAPKの不活性化状態になるように詳細に条件検討を行った。体細胞核移植は既報に従って行い、クローン胚のクロマチン状態は免疫染色により、クローン胚の胚盤胞への体外発生能および質はリアルタイムPCRによる遺伝子発現解析を行った。

(2)ブタ体細胞初期化に及ぼす脱メチル化処理の影響を調べるため、効率的なドナー細胞の脱メチル化処理を検討した。特に転写抑制型であるヒストンH3の9番目のリジンのトリメチル化(H3K9me3)に着目し、そのメチル化酵素であるSuv39H1/2の特異的阻害剤であるchaetocinを用いてドナー体細胞とクローン胚の脱メチル化に効果的な濃度検討を行った。次にH3K9me3の特異的脱メチル化酵素であるKdm4dに着目し、予めドナー細胞に強制発現した区、予めレシピエント卵細胞質にmRNAを注入して強制発現した区および両方の処理を施した区を設け、既報に従って行った。核の初期化の評価は、H3K9me3の特異的抗体による免疫染色、クローン胚盤胞への体外発生能および質はSOX2の免疫染色による内部細胞塊の細胞数計測を行った。

(3)ブタiPS細胞の樹立は、ブタ胎児由来線維芽細胞を用いた。レンチウイルスベクターにOct4, Sox2, Klf4, cMycを2Aペプチドで連結したものとLin28, NanogおよびZsGreen連結したものをを用いてiPS細胞への誘導を行った。樹立したブタiPS細胞は、RNASeqによる遺伝子発現解析、核型解析、タンパク質発現解析、テロメラーゼ活性解析、SCIDマウスへのテロトーマ形成、COBRA法によるX染色体不活化の検出、ブタ胚盤胞への注入によるキメラ形成による質の評価を行った。

4. 研究成果

(1)ウシ未受精卵における効率的で選択的なMPFとMAPK活性の不活化法を調べた。デメコルシン処理によるスピンドルチェックポイント機構とMAPK特異的阻害剤U0126を組み合わせることにより、3時間処理でMAPK活性だけを既定値まで低下させることができた(図1-A)。また、イオノマイシンとシク

ロヘキシミドの複合処理およびU0126を用いることで、MPFとMAPK活性をそれぞれの組み合わせ（Type I～IV）で不活化させることができた（図1-C）。このようなさまざまな活性をもつ卵細胞質を用いることで、体細胞初期化に必要な活性を調べることが可能となった。その結果、MPFおよびMAPK活性もクロマチンリモデリングおよびクローン胚への発生能、クローン胚の遺伝子発現に影響しないことが明らかとなった。これまで必要だと考えられていた卵細胞の中心的なリン酸化酵素であるMPFとMAPK活性が体細胞の初期化に必要なことが明らかとなった。

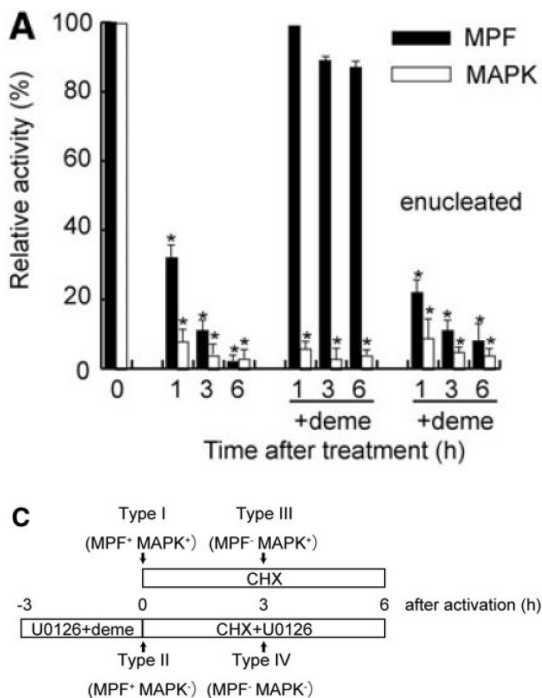


図1 ウシ未受精卵のMPFとMAPK活性制御

(2) H3K9me3の特異的メチル化酵素 Suv39H/2の阻害剤 chaetocin がブタ胎児線維芽細胞核に及ぼす脱メチル化への影響を調べた。1nMで数日間処理した結果、細胞の10%程度が脱メチル化を起こしていた。これらの細胞を用いたクローン4細胞期胚は、H3K9me3のメチル化レベルが有意に低下した、さらに、ヒストン脱アセチル化阻害剤VPAと併用することで脱メチル化効果はさらに向上した（図2）。しかしながら、クローン胚の胚盤胞への発生率は対照区と比較して向上しなかった。

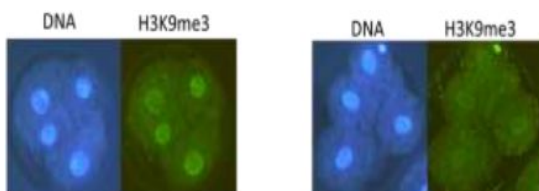


図2 ブタクローン胚における chaetocin の影響 左：対照区 右：chaetocin+VPA区

次に H3K9me3 の選択的脱メチル化酵素 Kdm4d を用いて、同様の検討を行った。胎児線維芽細胞に CAG プロモーターを持つプラスミドベクターで強制発現させると、細胞全体の15%程度が脱メチル化状態になった。Kdm4d 強制発現細胞を用いたクローン胚は、H3K9me3 レベルが有意に低下した。また、Kdm4d の mRNA を予めレシピエント未受精卵に強制発現させてクローン胚を作製すると、同様にメチル化状態が有意に低下した。ドナー細胞およびレシピエント卵細胞に kdm4d を強制発現させて作製したクローン胚は、対照区と比較して胚盤胞への発生率が有意に向上し、胚盤胞の SOX2 陽性細胞の割合も高くなった。これらの結果より、ブタ体細胞クローンへの脱メチル化誘導操作により体細胞核の初期化が促進したと考えられる。

(3) 高品質のブタ iPS 細胞の樹立を試みた。これまでの初期化に必要な Oct4, Sox2, Klf4, cMyc に加え、Lin28, Nanog と ZsGreen を導入した結果、図3に示すようなブタ iPS 細胞のコロニーを得ることができた。

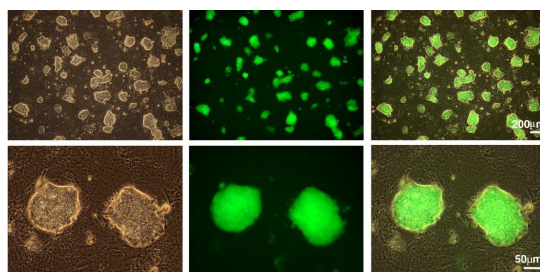


図3 ブタ iPS 細胞コロニー

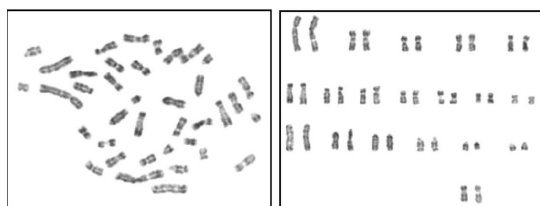


図4 ブタ iPS 細胞の染色体像

得られたブタ iPS 細胞のさまざまな分子生物学的な機能評価を行ったところ、染色体構成は得られた染色体像のすべてが38本であり正常であった（図4）。また、テロメラーゼ活性、タンパク質発現、遺伝子発現レベルも ES 細胞と比較して正常範囲であった。さらに、細胞の性が雌であったため H3K27me3 や COBRA 法による X 染色体の状態を調べた結果、両方の X 染色体が活性状態であった。次に細胞の機能評価として、テラトーマアッセイとキメラアッセイを行ったが正常範囲内であった（図5）。以上の結果から、従来の報告されたブタ iPS 細胞と比べて極めて高品質であり、ナープ状態に近い細胞であることが明らか

かとなった。

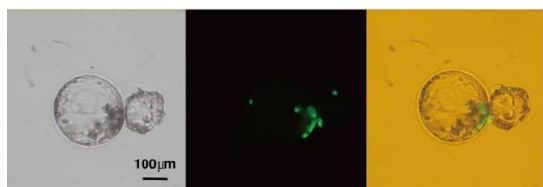


図5 ブタ iPSC 細胞のキメラ形成能

「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 5 件)

1) Tani T, Kato Y. (2017) Mitogen-Activated Protein Kinase Activity Is Not Essential for the First Step of Nuclear Reprogramming in Bovine Somatic Cell Nuclear Transfer. Cellular reprogramming.19(2):95-106
doi: 10.1089/cell.2016.0044 (査読有)

2) Katayama M, Hirayama T, Kiyono T, Onuma M, Tani T, Takeda S, Nishimori K, Fukuda T. (2017) Chick derived induced pluripotent stem cells by the poly-cistronic transposon with enhanced transcriptional activity. J Cell Physiol. doi: 10.1002/jcp.25947 (査読有)

3) Katayama M, Hirayama T, Kiyono T, Onuma M, Tani T, Takeda S, Nishimori K, Fukuda T. (2017) Immortalized prairie vole-derived fibroblasts (VMF-K4DTs) can be transformed into pluripotent stem cells and provide a useful tool with which to determine optimal reprogramming conditions. J Reprod Dev. doi: 10.1262/jrd.2016-164. (査読有)

4) Fukuda T, Tani T, Haraguchi S, Donai K, Nakajima N, Uenishi H, Eitsuka T, Miyagawa M, Song S, Onuma M, Hoshino Y, Sato E, Honda A (2016) Expression of six proteins causes reprogramming of porcine fibroblasts into induced pluripotent stem cells with both active X chromosomes. Journal of Cellular Biochemistry.118(3):537-553.
doi: 10.1002/jcb.25727. (査読有)

5) Ezoe K, Yabuuchi A, Tani T, Mori C, Takayama Y, Beyhan Z, Kato Y, Okuno T, Kobayashi T, Kato K (2015) Developmental competence of vitrified-warmed bovine oocytes at the germinal-vesicle stage is improved by a cyclic adenosine

monophosphate modulator during in vitro maturation. Plos One 10(5) e.0126801
Doi:10.1371/journal.pone.0126801 (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 片山 雅史, 平山 貴士, 堀江 健吾, 清野透, 土内 憲一郎, 谷 哲弥, 竹田 省, 西森 克彦, 福田 智一, アメリカ平原ハタネズミ由来の人工多能性幹細胞の作成, 第 109 回日本繁殖生物学会大会、2016 年 9 月 14 日、麻布大学 (神奈川県相模原市)

2) Ndubuisi Samuel MACHEBE, Masaki HATA, Kohei ARIFUKU, Yurika NARUMIYA, Yuki ITANI, Kazuki OHATA, Tetsuya TANI, Yoko KATO. Pre-fusion treatment with phytohaemagglutinin-P (PHA-P) increases relative expression of mitochondria related genes in somatic cell nuclear transfer embryos in pig. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies、九州産業大学、2016 年 8 月 24 日、(福岡県福岡市)

3) Ndubuisi Samuel MACHEBE, Masaki HATA, Kohei ARIFUKU, Yurika NARUMIYA, Yuki ITANI, Kazuki OHATA, Tetsuya TANI, Yoko KATO. Evaluation of the impact of pre-exposure to PHA on developmental efficiency of porcine PA and SCNT embryos 日本畜産学会 第 121 回大会、麻布大学、2016 年 3 月 27 日、(神奈川県武蔵野市)

4) Ndubuisi Samuel MACHEBE, Masaki HATA, Kohei ARIFUKU, Yurika NARUMIYA, Yuki ITANI, Kazuki OHATA, Tomokazu FUKUDA, Tetsuya TANI, Yoko KATO. Development of porcine cloned embryos produced using fibroblast and porcine induced pluripotent stem cells as nuclei donor cell types. International Symposium on the Future of Nuclear Transfer and Nuclear Reprogramming、山梨大学、2016 年 3 月 10 日 (山梨県甲府市)

5) 大島一輝, 谷 哲弥, 加藤容子 マウス体細胞核移植胚の発生能と胚盤胞期における Nanog の発現様式との関連性 第 56 回 日本卵子学会、栃木県総合文化センター、2015 年 5 月 30 日、(栃木県宇都宮市)

6) 谷 哲弥, 加藤容子, 体外加齢ブタ未受精卵の生物学的特性と体外発生能の検討、第 107 回日本繁殖生物学会大会、帯広畜産大学、2014 年 8 月 22 日、(北海道帯広市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 哲弥 (TANI, Tetsuya)
近畿大学農学部・講師
研究者番号：70919763

(2) 研究分担者

研究者番号：

(3) 連携研究者

柏崎 直巳 (KASHIWAZAKI, Naomi)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号：90298232

伊藤 潤哉 (ITO, Junya)
麻布大学・獣医学部・准教授
研究者番号：30454143

福田 智一 (FUKUDA, Tomokazu)
岩手大学・理工学部・教授
研究者番号：40321640

福原 武志 (FUKUHARA, Takeshi)
順天堂大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：20359673