

始原生殖細胞の多能性維持における DNAメチル化因子群の機能解析

[1] 組織

代表者：Jafar SHARIF
(RIKEN RCAI 免疫器官形成グループ)
対応者：松居 靖久
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：松居 靖久
(東北大学加齢医学研究所)
望月 研太郎
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 40万円，旅費 0円

[2] 研究経過

発生の初期段階に出現する多能性幹細胞は将来的にあらゆる細胞や組織に分化できることから基礎研究のみならず、個体の寿命や老化の解明においても高い注目を集めている。多能性の獲得、または維持にDNAメチル化やヒストン修飾などのエピジェネティック機構が深く関与していることが近年の研究から明らかになりつつある (Mochizuki & Matsui, 2010; Mochizuki et al, 2012)。本研究は、始原生殖細胞 (PGC: primordial germ cells) を用いて多能性とエピジェネティクスの関連性を明らかにすることを目的としている。始原生殖細胞は本来、卵子や精子 (配偶子) のみに分化するが、特殊な条件化培養をすることによって多能性を獲得することができる (Matsui et al, 1992)。胚発生において初期の始原生殖細胞は活発に増殖をするものの、後期になるとその能力が衰退していく。同様に、培養系においても初期 (8.5dpc) の始原生殖細胞からより多くの多能性幹細胞を樹立できるが、後期 (13.5dpc) のものに関しては多能性細胞への変化を遂げる能力が著しく低下する (Matsui & Tokitake, 2009)。始原生殖細胞の発生に伴い、特定の遺伝子領域、また、ゲノム全体のDNAメチル化レベルが低下することは既に報告をされている (Mochizuki et al, 2012; Seisenberger et al, 2012)。これらのことから、我々は、始原生殖細胞の多能性幹細胞に変化する能力の衰退とゲノムにおけるDNAメチル化レベルの低下が相関しているのではないかと作業仮説を立てた (図1)。

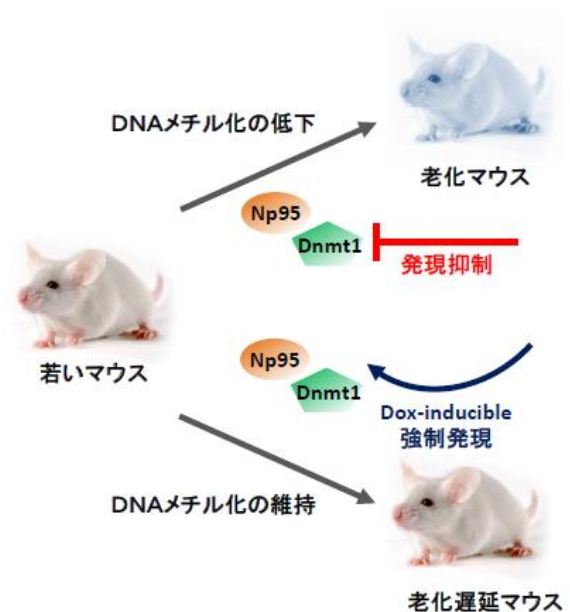


図1: 老化とエピジェネティクスの関連性を解析するための作業仮説をまとめたモデル図。始原生殖細胞老化と共にDNAメチル化が低下するが、Dnmt1やNp95などのメチル化促進因子を強制的に発現させることにより、始原生殖細胞の老化を遅延させることができれば、将来的に個体の寿命や老化のメカニズムに光を当てることができる。

始原生殖細胞の持つ多能性細胞への分化能力とDNAメチル化の関連性を解明するための実験方法を議論するため、定期的に電子メールやSkype会議による意見交換、また東北大学加齢医学研究所において直接打ち合わせ (24年5月、8月:2回) を行っている。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

我々は、当初の計画ではDNAメチル化関連因子のDnmt1やNp95をDox-inducibleに発現させるtransgenicマウスを作製することを考えていた。しかし、その後に議論を重ねた結果、transgenicマウスを作製する前に培養細胞系を用いて作業仮説を検証することが妥当だと判断し、そのように実験計画を変更した。培養細胞を使った場合は、時間や経費が大幅に短縮できることも計画変更のひとつの理由

となった。胎児から採取した始原生殖細胞はそのまま培養に用いることが困難であるため、我々は近年報告されている ES (embryonic stem) 細胞から直接始原生殖細胞への分化を誘導方法 (induction of PGC-LC: PGC like cells; Hayashi et al, 2011) を検討することにした。PGC-LC 誘導系を用いれば PGC の分化に伴う DNA メチル化の低下を培養細胞で再現することができると思われる。DNA メチル化が減少する時期に、Dox-inducible Dnmt1 や Np95 などの関連因子を強制発現させることによってメチル化レベルの低下を阻止できれば、始原生殖細胞の多能性細胞への変化する能力も維持できるかもしれない。Dox-inducible Dnmt1 や Np95 は、ES 細胞の段階で予め導入しておくことができるのもこの方法の大きなメリットである。

ES 細胞から PGC-LC への誘導は、培養条件の検討や最適化が大きな課題である。そのため、PGC の分化において DNA メチル化が消失するメカニズムを再構築する前にはこれらの問題点を解決する必要がある。我々は、PGC-LC 分化系の定量的な評価を行うべく、始原生殖細胞のマーカーである Blimp1 や Stella と蛍光タンパクを融合させた遺伝子導入型の ES 細胞 (Blimp1-Venus, Stella-CFP ESC: 京都大学の斎藤通紀博士らの作製したもの) を用いた。細胞培養の条件検討や最適化を行うことにより、上記の ES 細胞から高効率で PGC-LC 細胞を誘導することに成功した。また、これらの PGC-LC ではマーカー因子の Blimp1-Venus や Stella-GFP の発現が予想通り上昇をしていることも FACS (Fluorescence activated cell sorting) 方法によって確認をしている。ES 細胞から PGC-LC 誘導の実験系を立ち上げることができたため、今後は Blimp1-Venus, Stella-CFP ES 細胞に Dox-inducible Dnmt1 や Np95 などの DNA メチル化促進因子を導入し、後期の始原生殖細胞においても多能性細胞に変化する可能性を維持できるかどうかを解析する予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

細胞の「多能性」はどのようにしてつくられ、制御されるのかを明らかにすることは加齢における基礎研究および医学的な応用にも大きく寄与すると考えられる。本研究では、そのひとつの有力なメカニズムである DNA メチル化に注目し、始原生殖細胞を用いた培養系を利用して DNA メチル化と多能性がどのようにリンクしているのかという問いに挑戦をする。DNA メチル化レベルを安定的に維持により多能性の獲得が促進されるという我々の仮説が証明できれば、老化細胞における DNA メチル化の減

少 (または異常) を Dnmt1 や Np95 のようなマスター因子の発現レベルの調節によって「校正」できる方法が具体性を帯びてくる。本研究では薬剤誘導型のシステムを用いて Dnmt1 や Np95 を強制発現させる方法を構築するが、将来的なヒトへの治療においても増殖因子の組み合わせを変えることによって同様の効果が得られることが十分に期待できる。

今回の共同研究により、理化学研究所 (Sharif J) と東北大学加齢医学研究所 (Mochizuki K) における若手研究者の交流が深まり、活発な議論やディスカッションが行われた。また、始原生殖細胞とエピジェネティクスとの関連性を明らかにするための実験計画の立案や実行において、加齢医学研究所の松居靖久教授からのアドバイスや mentoring は Sharif や Mochizuki らの若手研究者にとって貴重な経験となった。本年度の研究により、PGC-LC 細胞を誘導する実験系を立ち上げることができたが、この方法を用いて始原生殖細胞の多能性獲得とエピジェネティクスの関連性を明らかにすることがこれからの課題である。本研究から既に得られた知見、そしてこれらから期待される結果を将来的に国内外の学会に発表すると共に論文として報告をする予定である。

[4] 成果資料
なし。