

課題番号：27

多能性幹細胞から始原生殖細胞 (PGC) への分化における エピジェネティック抑制機構の役割

[1] 組織

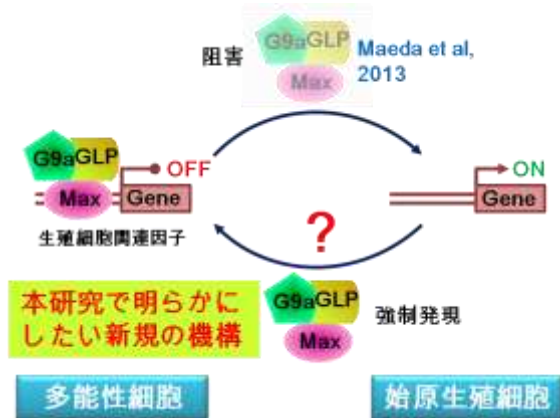
代表者：Jafar Sharif
 (理化学研究所 横浜研究所 IMS)
 対応者：松居 靖久
 (東北大学加齢医学研究所 教授)
 分担者：
 望月 研太郎
 (東北大学加齢医学研究所 助教)

研究費： 物品費 361,620 円
 旅費 38,380 円
 計： 400,000 円

[2] 研究経過

研究の目的

哺乳類胚発生初期段階に出現する多能性幹細胞 (multipotent/pluripotent cells) は将来的に個体をつくるあらゆる細胞や組織に分化できることから、発生・分化における基礎生命機能の研究のみならず、再生医療などの臨床応用の観点からも近年注目を集めている。多能性幹細胞から発生・分化を経て、体細胞 (somatic cells) と生殖細胞 (germ cells) との主に2つの種類の細胞が作りだされるが、その運命決定はどのように制御されているのか、詳しいメカニズムは未だ明らかになっていない。



(図1) 本研究の概念図

我々は2013年に、H3K9メチル化機構を促進するMaxという分子の機能を多能性幹 (ES) 細胞において阻害 (knockdown) することにより、本来抑制されている始原生殖細胞への分化が誘導されることを見出した (Maeda et al., 2013)。本研究では、始原生殖細胞でH3K9メチル化機構を促進する因子 (G9a, GLP, Max など) を強制発現させ、エピジェネティックな均衡状態を変えることによって、一度分化した細胞を再び未分化な状態 (i. e. 多能性幹細胞) へ誘導できるかどうか検証することを中心的なテーマとしている。(図1を参照)

研究の概要

In vivo (マウス個体を用いた) 実験系では、始原生殖細胞分化過程においてG9a/Glpなどのエピジェネティック因子の強制発現させるには、遺伝子改変マウス (transgenic mouse) の作製が必要となる。一方、このよう遺伝子改変なマウスの作製には膨大な時間と労力がかかることも事実である。この問題を回避するため、我々は培養系を用いた下記のような予備実験を行うことにした。

特定の増殖因子を培地に添加することにより、ES細胞からPGC-LC (PGC like cell: 始原生殖細胞類似細胞) を誘導する方法は既に報告されている (Hayashi et al., 2011)。我々は、この実験系を用い、ES細胞からPGC-LCを誘導する過程においてH3K9メチル化を制御するG9a/Glpなどの因子を強制発現することを考えた。

打ち合わせ等の開催状況

本研究を実行することにあたって代表研究者 (Jafar Sharif, 理研) がメールなどを介して定期的に受け入れ教員 (松居靖久 教授、加齢研) との意見交換を行ってきた。更に、平成27年の3月20日に加齢研を訪問し、研究成果を報告するセミナーを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

● PGC-LC 培養系の確立 (望月、松居) :
前述したように、*in vivo* 実験系におけるエピジェネティック制御因子を強制的に発現するには、膨大な時間及び労力を要する。そのため、我々は *in vivo* に代わる実験系として、より簡便な PGC-LC 培養系を導入した。ES 細胞から PGC-LC を誘導するプロトコールは既に報告されているが (Hayashi et al., 2011)、実際に実験を行う際には、微調整及び最適化を行う必要がある。この実験では具体的に、ActA, bFGF, KSR を添加することにより、ES 細胞から Epiblast like cells (Epi-LC : 胚盤葉上層類似細胞) を誘導した。更に、BMP4, BMP8b, SCF, LIF, EGF を加え、PGC-LC に分化させた。将来的に、上記の PGC-LC 実験系を用いて G9a/G1p などのエピジェネティック分子の強制発現を行う予定である。

● Dox 誘導性の G9a-Myc ベクターの作製及び発現確認 (Sharif) :

G9a や G1p などの H3K9 メチル化酵素は、エピジェネティックな制御により、体細胞では始原生殖細胞分化に必要な転写因子などの発現を抑制している (Maeda et al., 2013)。一方、PGC 分化が開始されると H3K9 メチル化による転写抑制が解除され、PGC 特異的な転写因子が活性化され分化に必要な

遺伝子の発現が起きる。つまり、PGC-LC を使った実験系では、PGC 分化を誘導した時期に合わせ、G9a/G1p などの因子の強制発現を開始させる必要がある。そこで、我々は Doxycycline (Dox) 誘導性 (Tet-OFF, Doxycycline 類似化合物の Tetracycline を添加すると転写が抑制される) の Myc-G9a (内在性のものと区別できるように N 末に Myc-tag を付加させた G9a cDNA) ベクターを作製した。実際に、HeLa 細胞を用いた予備実験では、Dox 非添加 (図 2 : lane 1) の場合は、Myc-G9a が発現し (180kDa 付近のバンド、anti-Myc tag 抗体による検出)、また、Dox 添加により発現が抑制された (図 2 : lane 3) ことを確認した。今後、Dox 誘導性のベクターを PGC-LC 分化誘導用の ES 細胞に stable transfection させ、ES 細胞では Dox 添加による抑制を維持し、PGC-LC 分化誘導に合わせ、Dox 非添加に切り替え、Myc-G9a を強制発現させる実験系を構築する。

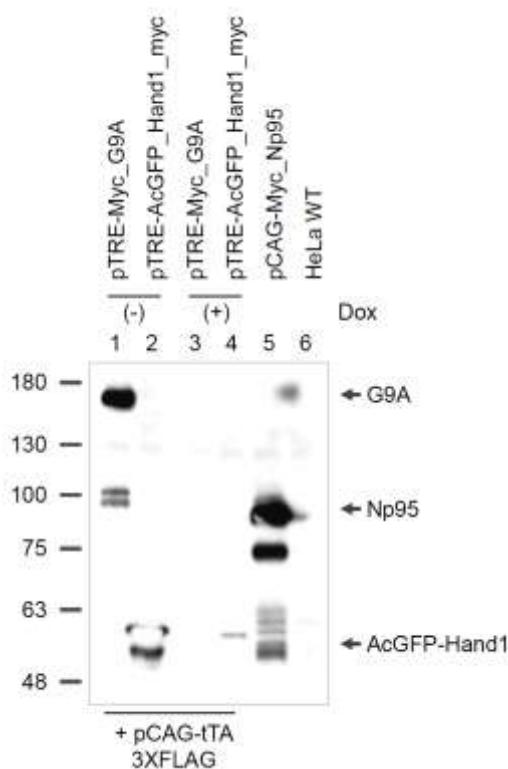
(3-2) 波及効果と発展性など

我々が構築した Dox 誘導性のエピジェネティック因子の発現系は、今後始原生殖細胞の分化過程における H3K9 メチル化の機能を明らかにするために重要な役割を果たすと思われる。さらに、このような応用的な技術は、H3K9 メチル化のみならず、DNA メチル化や H3K27me3 修飾などの幅広いエピジェネティックなメカニズムの解析に役立つことにより、将来的に新しい研究分野に発展することが期待できる。

代表者の Sharif は本研究を通じ、研究の立案や実験計画作り、結果の解釈などについて対応教員の松居教授からの mentoring を受けている。また、代表者の Sharif と分担者の望月が協力して研究を行うことにより、理研と東北大学加齢研の間で共通した新たな研究基盤の構築ができています。

[4] 成果資料

本研究から得られる成果は、今後国内や国際学会に発表すると共に、将来的に共同の論文として投稿する予定である。



(図 2) Dox 誘導性の Myc-G9a 発現系の構築。