

研究報告書

「生殖細胞の特性に基づく新しいリプログラミング手法の開発」

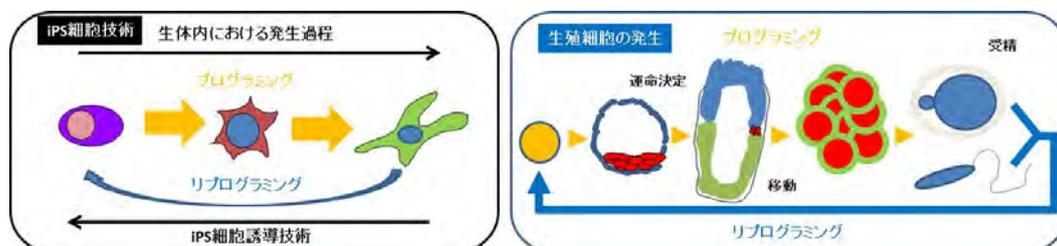
研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 永松 剛

1. 研究のねらい

体細胞をリプログラミングし多能性を付与された iPS 細胞が作成されてから多くの研究成果が発表された。低分子化合物による遺伝子導入の代替、より少ない因子で誘導できる細胞種の探索、アデノウイルスやプラスミドベクターによるゲノムへのインテグレーションのない誘導法の確立、そして各種分化細胞への誘導と腫瘍化の問題、といった安全性や樹立方法の改善に関するものが大多数であり、未だにどのようなメカニズムで細胞がリプログラミングされるのかについては不明な点が多い。リプログラミングのメカニズムを理解することは効率よく iPS 細胞を誘導するのみならず、樹立された iPS 細胞を目的の細胞へ分化させる際や腫瘍化を防ぐ安全性を考える際にも非常に有用と考えられる。しかしながら、メカニズムの解析には iPS 細胞の誘導は効率の低さや長期の培養日数が大きな障壁となっている。そこで、体細胞のリプログラミングの機構を解明するべく始原生殖細胞に着目した。生殖細胞は次世代に遺伝子を繋ぐ唯一の細胞であり、受精を経て再び全能性を獲得することができる。そのため生殖細胞は世代を超えてプログラミングとリプログラミングを繰り返している細胞と考えることができる。生殖細胞におけるリプログラミングと iPS 細胞誘導技術の体細胞リプログラミングとの関係に着目し両者を比較検討することからリプログラミングのメカニズムの解明を目指している。



2. 研究成果

(1) 概要

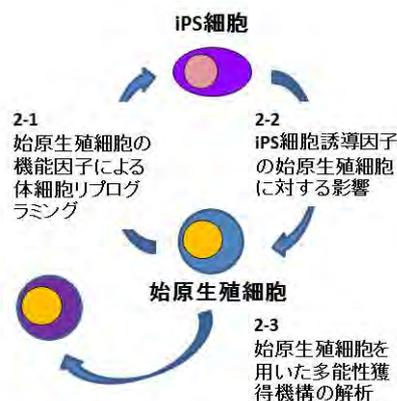
生殖細胞と体細胞リプログラミングの関係について以下の3つの観点から研究を進めた。

2-1. 生殖細胞の機能因子による体細胞リプログラミング

2-2. 始原生殖細胞と iPS 細胞誘導因子

2-3. 単能性の始原生殖細胞が多能性を獲得する過程の解析

これらの成果として、主に以下のような結果が得られた。



- ・生殖細胞の機能因子にはリプログラミング活性をもつものがあること。
- ・始原生殖細胞はリプログラミング因子を内在性に発現しているにもかかわらず単能性であること。
- ・始原生殖細胞が特定の増殖因子の存在下で多能性幹細胞へと脱分化する培養系において高効率化と純化の方法を確立したこと。

(2) 詳細

2-1. 生殖細胞の機能因子による体細胞リプログラミング

始原生殖細胞の運命決定のプロセスは体細胞系列の遺伝子発現の抑制や、多能性幹細胞における機能因子の再活性化が起こることが知られている。これらの現象は体細胞リプログラミングの過程で起こっている現象と似通っているという発想のもと、我々は生殖細胞の機能因子に着目し、体細胞をリプログラミングする活性を持つのではないかと推測した。そして、そのような因子の候補として以下の3つの条件から候補因子の抽出を行った。1) 始原生殖細胞で特異的に発現している分子、2) 生殖細胞の発生に重要な働きをしている分子、3) 生殖細胞からEG細胞への転換やES細胞の多能性の維持に関わる分子。候補因子として抽出したのはBlimp-1, Prdm14, および Prmt5 である。そして、これらの因子を繊維芽細胞に導入してリプログラミングを誘導できないかを確認した。

その結果、Blimp-1, Prdm14, c-Myc の導入によりES細胞様のコロニーが確認できた。しかしながら、このプライマリーコロニーはNanogの発現を得ることは非常にまれであり、継続して培養することもできなかった。一方で、Prmt5, Klf4, Oct3/4 の導入によってNanogの発現上昇を伴うコロニーが確認され、これらは安定して培養可能であることを見出した。この細胞は既存のES細胞やiPS細胞と非常に似た遺伝子発現パターンを示し、ヌードマウスに移植すると三胚葉すべてを含むテラトーマを形成すること、キメラマウスの形成を経て生殖細胞へ分化することを確認しており、リプログラミングを受け多能性を獲得した細胞と考えられる(G Nagamatsu et.al. J Biol Chem. 2011)。

このことは生殖細胞で得られる知見は体細胞のリプログラミングに応用可能であることを示唆するものと考えている。

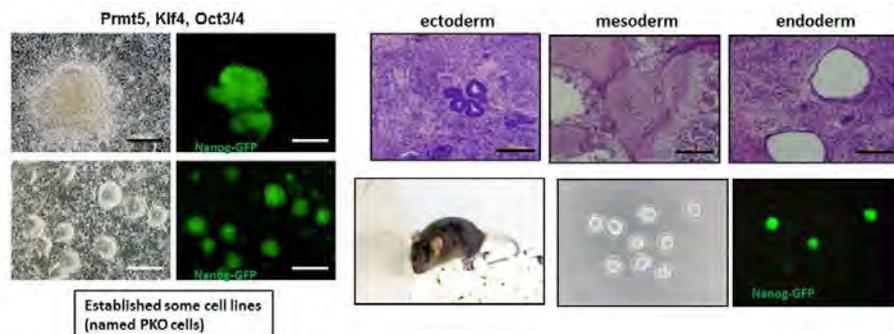


図1 Prmt5, Klf4 and Oct3/4の導入によりマウス繊維芽細胞(MEF)から誘導した多能性幹細胞。
 左) マウス繊維芽細胞にPrmt5, Klf4 and Oct3/4を導入して得られたNanog-GFP陽性のコロニー
 右上) Prmt5, Klf4 and Oct3/4の導入により得られた細胞をヌードマウスに移植して形成されたテラトーマ
 右下) Prmt5, Klf4 and Oct3/4の導入により得られた細胞をもちいて作成したキメラマウスおよびキメラマウスの交配により得られた葉実胚のNanog-GFPの蛍光はPrmt5, Klf4 and Oct3/4の導入により得られた細胞に由来する。

2-2. 始原生殖細胞とiPS細胞誘導因子

始原生殖細胞はOct3/4やNanogといった多能性幹細胞で重要な遺伝子のいくつかを発現していることが知られている。にもかかわらず、生体内では生殖細胞のみに分化可能な単能性の細胞

胞である。そこで、多能性幹細胞誘導のリプログラミング因子と始原生殖細胞との関係の解析を行った。始原生殖細胞におけるリプログラミング因子の発現を検討したところ Oct3/4, Sox2, c-Myc の発現が認められた。Klf4 の発現は認められなかったもののリプログラミング過程において Klf4 を代替できることが知られている Klf2, Klf5 および Esrrb, Esrrg の発現についてはそのすべてが認められた。このことから始原生殖細胞は内在性に多能性を獲得し得る因子を発現していると考えられる。そこで、始原生殖細胞には多能性を抑制するようなメカニズムがあるのではないかと推測し、始原生殖細胞にリプログラミング 4 因子の導入を行った。しかしながら予想に反して 4 因子のいずれの一つでも多能性幹細胞が誘導されることが明らかとなった(G Nagamatsu et.al. Stem Cells. in press)。メカニズムに関してはさらなる解析が必要であるが、この結果は始原生殖細胞は内在性に Oct3/4, Sox2, c-Myc を発現しているにもかかわらず外来性にそれらの因子を導入することで多能性が誘導されることを示している。このことから多能性誘導の過程においてはリプログラミング因子の量比が重要なのではないかと推測した。このことを検討するためにリプログラミング 4 因子が発現するとそれぞれ異なる細胞表面抗原が発現するベクターを作成した。このベクターをもちろすることで導入後に特異的な抗体とフローサイトメトリーを用いた細胞分取によりそれぞれ異なる量比のリプログラミング 4 因子が導入された細胞を得ることができる。このシステムを用いてリプログラミングにおける 4 因子の量比を検討したところ、Oct3/4 が高発現であることと Sox2 が低発現であることが統計学的に優位であることが明らかになった(G Nagamatsu et.al. J. Biol. Chem. 2012)。

2-3. 単能性の始原生殖細胞が多能性を獲得する過程の解析

始原生殖細胞は通常は生殖細胞にのみ分化できる単能性の細胞であるが、特定の培養条件下において外来遺伝子の導入なく、体細胞からの iPS 細胞誘導に比べてより短時間で多能性幹細胞へと脱分化することが知られている。この単能性の始原生殖細胞が多能性の EG 細胞へと脱分化する過程は多能性の獲得機構と考えることができる。始原生殖細胞を用いて多能性の獲得過程を解析するために培養系の効率化と多能性獲得過程の細胞の純化の方法の確立を行った。その結果、MEK inhibitor, GSK3-beta inhibitor, そして TGF-beta signal inhibitor の 3 者を混合して作用させた時に従来の培養条件に比べて効率を 8 倍程度上昇させることができることを見出した。さらに、多能性獲得の過程にあると考えられる細胞を SSEA-1 と Nanog の発現を指標にフローサイ

トメトリーにより分取することに成功した (G Nagamatsu et.al. Biol. Reprod. 2012)。

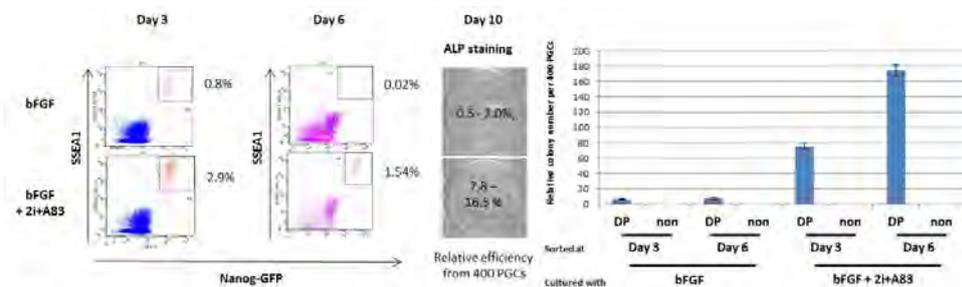


図3 多能性獲得過程の細胞の純化
左) Nanog-GFPの蛍光とSSEA-1の発現をフローサイトメーターにより検出
右) Nanog-GFP陽性、SSEA-1陰性(DP)細胞群とそれ以外の細胞群(non)をそれぞれ純化・分取し培養後のEG細胞コロニー形成数
DP細胞群からのEG細胞が形成されることからDP細胞群が多能性獲得過程にある細胞と考えられる

3. 今後の展開

生殖細胞と多能性幹細胞との関係に着目し引き続き研究をおこなっていく。特にアルギニンメチ

ル化についてと多能性の獲得過程のメカニズムについて着目している。

3-1. アルギニンメチル化修飾と多能性幹細胞

リプログラミング因子として見出した Prmt5 はアルギニンのメチル化酵素であり、アルギニンメチル化は未知の機能が多いエピジェネティック修飾として国内外の多分野にわたって注目されている現象である(Bedford MT and Clarke SG. Mol Cell. 2009)。Prmt5 は対称性のアルギニンジメチル化酵素であり、一方で体細胞リプログラミングの過程では非対称性のアルギニンジメチル化酵素の抑制が効果的であるとの報告がなされている(Yuan X et. al. Stem Cells 2011)。このことからアルギニンメチル化の対称性、非対称性のジメチル化修飾に着目し、対称性のアルギニンメチル化酵素が多能性を維持する方向性を持ち、非対称性のアルギニンメチル化酵素は多能性を阻害する方向性があるという予備的な知見を得ている。

3-2. 多能性獲得過程のメカニズム

始原生殖細胞から高効率で多能性幹細胞を誘導する培養系の検討を行ってきた。その結果 MEK, GSK-3 β および TGF β のシグナル阻害剤を添加することで効率を上昇させることを見出した。培養系のさらなる検討によって、飛躍的に高効率で脱分化を誘導することができることを見いだした。この培養条件を用いて、どのようにして単能性の始原生殖細胞が多能性幹細胞へと脱分化していくのか分子メカニズムの解析を行っている。また、この現象を逆にとらえて始原生殖細胞が始原生殖細胞の性質をどのようにして保っているのか、その分子メカニズムについてもアプローチしている。

4. 自己評価

さきかけ期間中に研究総括やアドバイザーの先生をはじめとして多くの方から助言をいただけたことは今後の研究を進めるうえで貴重な経験となった。その結果、生殖細胞と体細胞リプログラミングの関係についていくつかの成果を上げ論文としてまとめることができた。今後は競争の激しい生殖細胞の分野でいかにして独自性や新規性を出していくかということが大きな課題であると考えている。

5. 研究総括の見解

iPS の多能性維持のメカニズムを生殖細胞との比較で考えようとするもので、プロジェクトとしては手堅いプランである。実際、様々な条件で始原生殖細胞から iPS 誘導を行う条件を確立し、この系を用いて様々な問題について検討し、多くの論文を発表した事は期待通りである。ただ、手堅い手法のみでは、より困難で根本的な問題を見つけ、それに挑戦する事は難しい。十分実力がある研究者であると期待しており、次は、このような問題にも積極的にチャレンジしてほしいと希望している。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. **Nagamatsu G***, Kosaka T, Saito S, Honda H, Takubo K, Kinoshita T, Akiyama H, Sudo T,

<p>Horimoto K, Oya M, and Suda T Induction of pluripotent stem cells from primordial germ cells by single reprogramming factors. <i>Stem Cells</i> 2013 Mar;31(3):479–87. *corresponding author</p>
<p>2. Nagamatsu G#, Saito S#, Kosaka T, Takubo K, Kinoshita T, Oya M, Horimoto K, Suda T. Optimal ratio of transcription factors for somatic cell reprogramming. <i>J Biol Chem</i>. 2012 Oct 19;287(43):36273–82 #equally contribution *corresponding author</p>
<p>3. Nagamatsu G#, Kosaka T#, Saito S, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Horimoto K, Oya M, and Suda T Tracing the conversion process from primordial germ cells to pluripotent stem cells in mice <i>Biology of Reproduction</i> 2012 Jun 14;86(6):182 #equally contribution *corresponding author</p>
<p>4. Kinoshita T#, Nagamatsu G#, Kosaka T, Takubo K, Hotta A, Ellis J, Suda T*. Ataxia–telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPS cells. <i>Biochem Biophys Res Commun</i>. 2011 Apr 8;407(2):321–6.#equally contribution *corresponding author</p>
<p>5. Nagamatsu G#, Kosaka T#, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Kobayashi T, Oya M, Suda T*. A germ cell–specific gene, Prmt5, works in somatic cell reprogramming. <i>J Biol Chem</i>. 2011 Mar 25;286(12):10641–8. #equally contribution *corresponding author</p>

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 永松剛、小坂威雄、田久保圭誉、大家基嗣、須田年生
第10回 日本再生医療学会 東京 2011年 3月
シンポジウム iPS・ES細胞の万能性と維持機構の解明 ～Pluripotencyの正体とは～
2. **Nagamatsu G**: Conversion of primordial germ cells to pluripotent stem cells and germline stem cells. Third Symposium on Systems and Synthetic Biology (TriSys 2011), Dec 9–11 2011 Suzhou (China)
3. **Nagamatsu G**: Symmetric and asymmetric dimethylation of arginine for the regulation of pluripotent stem cells. 'The International Symposium on CVM–CNU', Oct 29 2012 Gwangju (Korea)