

2009 年

第 11 回 SSRE シンポジウム
講演要旨集

*Proceedings of the 11th (2009) Annual Symposium of
the Society for Study of Reproduction Engineering*

生殖幹細胞の分化制御機構

2009 年 3 月 7 日(土曜日)

明治大学駿河台校舎アカデミーコモン(9 階)309F 教室

東京都千代田区神田駿河台 1-1

SSRE 生殖工学研究会

第 11 回シンポジウム目次

13:30 開会の挨拶会長

座長 多田昇弘 (順天堂大学医学部アトピーセンター)

13:35-14:25

精巣幹細胞から前駆細胞への分化に伴う遺伝子発現制御機構の変化
横浜市立大学医学部組織学 大保 和之

14:25-15:15

マウス生殖細胞の分化のエピジェネティカル制御
大阪大学微生物病研究所 野崎 正美

.....休憩.....

15:45-16:35

胚性幹細胞の自己増殖様式と始原生殖細胞分化
The Gurdon Institute, University of Cambridge 林 克彦

16:35-17:00 総合討論

総合座長 佐藤正宏(鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センター)

17:00 閉会の挨拶.....後藤正幸(明治大学農学部)

精巣幹細胞から前駆細胞への分化に伴う遺伝子発現制御機構の変化

○大保 和之（横浜市立大学医学部組織学）

近年、再生医学の実現に向けて、ES 細胞、iPS 細胞に代表される多能性幹細胞研究に加え、組織幹細胞研究も急速な進展をみせている。幹細胞研究の視点に立てば、組織にある細胞は、幹細胞 (stem cell)、前駆細胞 (progenitor cell)、分化細胞 (Maturing cell) の大きく3つに分類する事ができる。組織幹細胞は多能性幹細胞と異なり、すでにある特定の細胞系譜に運命決定づけられてはいるが、自己複製能、増殖能、分化能、組織再構築能を維持している細胞であり、前駆細胞は、このうち自己複製能を喪失した細胞である。幹細胞、前駆細胞の性状を研究する理由は、生物学的興味ばかりでなく、*in vitro* における幹細胞増幅が可能となれば、組織再生の実現化は容易となるなど、その成果が社会に大きく還元されるからであると考えられる。

生体内において組織幹細胞を持つ組織として精巣は古くから知られており、形態学的手法による細胞の分化段階の分類が精力的になされてきた。しかし、造血幹細胞の研究が最も進んでいることから解るように、純化した特定の細胞集団を材料に、分化能、自己複製能の評価を行うシステムの構築が幹細胞研究には必要不可欠であり、形態学的解析には限界がある。そこで我々も含め幾つかのグループが、精巣において、幹細胞、前駆細胞に特異的に発現する細胞表面分子、或は、特異分子の発現調節領域を用いて GFP を発現させたような遺伝子改変マウスを作出、利用し、幹細胞、前駆細胞を生細胞のまま純化単離することを試み、さらに、純化されてきた幹細胞候補細胞の精細管移植による精巣再構築能の検証を行い、より厳密に、幹細胞、前駆細胞の性状解析を行っている。我々は転写因子 Oct4 が生殖細胞系譜に特異的に発現していることから、その発現調節領域を用いて GFP 蛋白を発現するレポーターマウスを作出し、c-Kit の発現の有無により、幹細胞、前駆細胞の区別が可能であることを明らかにした。現在は、これに加え、他のグループから c-Kit 陰性の精原細胞に特異性が高い Neurogenin 3, Plzf, 我々のグループから JAM4 などといった新たなマーカーが明らかとなってきた。

このようなマーカーの同定とマーカーとしての信頼性の検証は、幹細胞研究に必要不可欠な研究であり継続して行っているが、その一方でマーカーの発現は、細胞周期、マウスの系統、遺伝子改変の影響により時に定常状態とは異なる表現型とな

ることが知られている。そこで我々は、現在より普遍的な幹細胞、前駆細胞の鑑別が可能か、高次の遺伝子発現制御機構(エピジェネティクス)の視点から詳細に検討を行ってきた。定常状態のマウスを用い、上述した幹細胞、前駆細胞のマーカーに重ね合わせて DNA メチル基転移酵素、いくつかのヒストン修飾酵素の免疫染色タパーンを観察した。その結果、より未分化な幹細胞分画では、*de novo* DNA メチル基転移酵素の発現がなく、ゲノムは低メチル化状態になっており、分化細胞には存在する抑制性ヒストン修飾の一部が認められなかった。前駆細胞への分化の進行とともに、*de novo* DNA メチル基転移酵素の発現と、幹細胞では認めなかった抑制性ヒストン修飾が加わってくるのが判った。また、幹細胞、前駆細胞で発現が認められるいくつかの遺伝子を代表例としてピックアップし、その発現調節領域を中心に、ゲノムメチル化、ヒストン修飾状況を観察すると、例えば前駆細胞で必須な分子 *c-Kit* の発現調節領域は、発現が認められない幹細胞の時期でも発現調節領域における DNA のメチル化という制御機構は用いられておらず、前述した免疫組織学的解析の結果を反映していたことに加え、幹細胞における遺伝子発現抑制機構は、あるヒストン修飾による抑制機構が主であった。

現在、組織幹細胞研究は、特異的マーカー候補分子の同定、マーカーとしての信頼性の検証の繰り返しを行うなかで、幹細胞集団が、いわゆる *actual stem cell* と *potential stem cell* の2つに区別されはじめるなど、分子論的に新たな分類が行われ始めている。我々は、これらの進展に重ね合わせて幹細胞、前駆細胞のゲノム修飾機構を観察しているが、将来の検討課題の1つとして、その成果が他の組織幹細胞システムに応用可能なものであるか検証が必要と考えている。

参考文献

1. Ohbo, K. et al. Identification and characterization of stem cells in pre-pubertal spermatogenesis in mice. *Dev. Biol.*, 258:209–225. 2003.
2. Yoshida S, et al. The first round of mouse spermatogenesis lacks the stem cell stage *Development*, 133:1495-1505. 2006.
3. Nagamatsu G. et al. A CTX family cell adhesion molecule, *JAM4*, is expressed in stem cell and progenitor cell populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages. *Mol Cell Biol.* 26:8498-506. 2006.

生殖細胞分化のエピジェネティカル制御

○野崎正美（大阪大学微生物病研究所）

多細胞有性生殖生物では、体の構築や機能に影響を持たない特別な細胞である配偶子が、次世代を生み出し、遺伝情報を継承する。従って、配偶子はもちろん、そのもととなる生殖系列細胞も体細胞には無い多くの特性を持つ。基本的に細胞の特性は、利用する遺伝子の組み合わせによって生み出される。生殖細胞は、持っているゲノム情報は体細胞と同じであるが、特異的な遺伝子を多く発現するための特有の制御システムを持つ。一般的に遺伝子発現制御は、プロモーターを中心としたシス配列とトランスに作用する転写因子との組み合わせによる直接的な制御と、クロマチン構造変化を伴うエピジェネティカル動態による間接的な制御に大別される。生殖系列細胞は多くの特異的な基本転写因子群と、転写制御因子群を持ち、さらにゲノム全体のエピジェネティカル変動が著しいことが知られている。しかしそれらが、生殖細胞の特徴的な遺伝子制御と具体的にどのようにつながるのかについては、実はよくわかっていない。本講演では、マウス精巣生殖細胞分化における特異的な遺伝子制御システムの理解を目的とした研究成果について紹介する。

プロモーター制御

トランスジェニックマウス解析と *in vivo* electroporation 法の併用により、精細胞特異的な遺伝子の発現制御領域の同定を試みた。その結果、TATA-box 等の既知のプロモーターエレメントを持たないが cAMP response element (CRE) を含む、転写開始点前後の非常に短い配列だけで特異的な発現制御に必要な十分であることを見いだした。さらに CRE への転写因子 CREM の結合が、基本転写活性に必要な例を見いだした。CREM は精細胞の分化に必須であることが示されていることから、基本転写因子群と CREM を含む転写制御因子が近接して作用するコンパクトな転写制御メカニズムが生殖細胞に特有のシステムの確立に役立っている可能性がある。また、精巣生殖細胞だけで発現する遺伝子にはレトロポゾンと思われる単一エクソン遺伝子が比較的多く含まれる。レトロポゾンは親遺伝子由来の mRNA が逆転写活性により cDNA となった後、ゲノム中にランダムに挿入されるため、プロモーターを持たず発現されないで、ほとんどは偽遺伝子となる。一方、上述の通り、精巣生殖細胞は典型的なプロモーターではない配列からも転写しやすい制御システムを持つので、一部のレトロポゾンの発現が

可能となり、それらが生殖細胞だけで発現する機能的遺伝子として定着した可能性が示された。

エピジェネティカル制御

哺乳動物ゲノムでは、遺伝子プロモーター上流のメチル CpG 密度が高い場合、発現が抑制されることが知られている。特に CpG 頻度の高い CpG アイランドは通常どんな細胞でもメチル化されない。ところが最近、体細胞組織で CpG アイランドがメチル化されるいくつかの遺伝子が同定されたが、それらは雄生殖細胞ではメチル化されない。一方、先に述べた通り、精細胞では多くのイントロンレス遺伝子が特異的に発現しており、これらは遺伝子上流ではなく、内部の CpG 頻度が比較的高い。そこで、イントロンレス遺伝子の転写開始点近傍から下流にかけての CpG メチル化パターンと発現との相関を体細胞と生殖系列細胞で調べた。その結果、イントロンレス遺伝子の半数以上は体細胞ではメチル化によって発現が抑制され、生殖細胞での発現には脱メチル化が必要条件であることがわかった。ただし、生殖系列を通じて低メチル化であることと、CpG 密度が高い一部の遺伝子は体細胞でもメチル化されていないことから、メチル化除去が転写開始と直接関連することは無く、別の抑制機構の存在とその解除が必要であろうと考えた。そこでヒストン修飾について調べたところ、精細胞における発現と転写活性化型ヒストンメチル化修飾との相関は見られたが、精母細胞以前の発現抑制と、転写抑制型ヒストンメチル化修飾の相関については今のところ観察されていない。一方、染色体レベルのヒストンメチル化修飾の変動は全般的な遺伝子発現と相関しているように見える。

これら個々の遺伝子制御における DNA メチル化とヒストンメチル化の役割とゲノム全体の変動との関連を含めて、生殖細胞分化のエピジェネティカル制御について議論したい。

胚性幹細胞の自己増殖様式と始原生殖細胞分化

○林克彦 (The Gurdon Institute, University of Cambridge)

哺乳類(主にマウスおよびヒト)の胚性幹(ES)細胞は、発生初期胚の多能性細胞群より樹立され、体外培養条件下で未分化性を維持したまま無限に自己増殖する。ES 幹細胞の自己増殖はこれまで親細胞が同一な娘細胞に分裂することにより担われていると考えられてきた。しかしながら近年の遺伝子発現の解析から、ES 細胞は単一の細胞集団ではなく不均一な亜集団からなる細胞集団であることが明らかになってきた。

ここで少なくとも挙げられるいくつかの疑問は、

- (1) 不均一な細胞集団は何を反映しているのか？
- (2) 細胞集団の割合はどのような様式で維持されるのか？
- (3) それぞれの細胞集団に機能的な差異はあるのか？

という点である。これらの疑問を解くために我々の研究室では、ES 細胞に不均一に発現する遺伝子 *Stella/Dppa3* に注目した。*Stella/Dppa3* の発現は胚発生において未受精卵から胚盤胞の内部細胞塊(ICM)に認められ、着床後 ICM が原始外胚葉(エピブラスト)に発生する段階で消失する。その後 *Stella/Dppa3* の発現はエピブラストが原腸陥入した後に現れる始原生殖細胞(PGCs)に再び認められる。*Stella/Dppa3* の発現を GFP の発現で可視化できるレポーターマウス ES 細胞を用いた解析の結果、*Stella/Dppa3* 陽性 ES 細胞には ICM 特異的な遺伝子の発現が認められ、対照的に *Stella/Dppa3* 陰性 ES 細胞にはエピブラスト特異的な遺伝子の発現が認められた。ES 細胞におけるそれぞれの亜集団の割合は継代数に関わらず一定であった。またそれぞれの亜集団を単離して培養した結果、いずれの亜集団からも他方の亜集団が出現し、最終的には分離前の ES 細胞に占めるそれぞれの割合に戻る事が明らかとなった。またそれぞれの亜集団の分化能は異なり、*Stella* 陰性 ES 細胞は陽性細胞に比べ、分化を誘導するシグナルに対し高い感受性を示した

これらのことから、

- (1) ES 細胞を形成する亜集団は、胚発生の過程にある程度従った遺伝子発現パターンを維持している。
- (2) 自己増殖を繰り返す ES 細胞において、それぞれの亜集団がある一定の割合で遷移しながらその平衡状態を保っている。

(3) それぞれの亜集団は機能的に異なった細胞集団であることが示唆された。

これらと類似した自己増殖の様式は他の幹細胞にも認められることから、更なる解析は ES 細胞のみならず、様々な幹細胞の自己増殖様式を知るうえで重要であると考えられる。また亜集団の割合の人為的制御は ES 細胞に均一な分化を誘導するという点で、今後の ES 細胞制御の研究に重要であると考えられる。本講演では以上の結果に加え最近の知見を紹介し、さらに幹細胞からの生殖細胞の分化制御の可能性について討論する。

参考論文および総説

1. Hayashi K. et al Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* 3, 391-401 (2008).
2. Hayashi, K. et al. Germ cell specification in mice. *Science* 316, 394-6 (2007).