

京都大学	博士（医学）	氏名	中木文雄
論文題目	Induction of mouse germ-cell fate by transcription factors <i>in vitro</i> (転写制御因子によるマウス生殖細胞系譜の試験管内誘導)		

背景と目的

生殖細胞系譜は、次の世代に遺伝情報を伝える唯一の細胞系譜である。マウスでは、受精後 5.75～6.5 日の近位エピブラストで運命決定され、始原生殖細胞（primordial germ cells; PGCs）が誘導される。PGCs の発生過程では、体細胞プログラムの抑制、多能性遺伝子発現の再活性化、エピゲノムリプログラミングといった特徴的な変化が生じることが知られているが、その詳細な分子機構は明らかでない（Saitou M. *et al.*, 2012, Review）。

近年、マウス胚性幹細胞（Embryonic stem cells: ESCs）や iPS 細胞といった多能性幹細胞から、エピブラスト様細胞（EpiBL-like cells: EpiLCs）を誘導し、BMP4（Bone morphogenetic protein 4）などのサイトカインを加えることにより、PGC 様細胞（PGC-like cells; PGCLCs）を誘導する培養系が確立された。PGCLCs は、精細管移植法（XY）、再構成卵巣移植法（XX）により、機能的な精子および卵へと分化した（Hayashi K. *et al.*, 2011, 2012）。

この培養系を用いて、多数の PGCLCs を得ることが可能となったが、生殖細胞の運命決定や、エピゲノムリプログラミングの分子機構の多くは依然不明である。分子機構の解明には、運命決定の十分条件となる遺伝子（群）を特定し、その機能を解析することが必要であった。そこで、本研究では、PGC の運命決定に重要とされる遺伝子、特に転写因子（群）を EpiLCs に過剰発現させ、PGC 様の細胞を誘導することを試みた。

材料と方法

PGC 誘導のレポーター遺伝子である *Blimp1-mVenus*、*stella-EGFP* (BVSC) (Ohinata Y. *et al.*, 2008) を有し、*Rosa26* 遺伝子座に *rtTA* (reverse tetracycline-regulated transactivator) がノックインされ (Hochedlinger K. *et al.*, 2005)、恒常的に Tet-on システムを利用可能な ESCs を樹立した。

マウス PGC 発生初期に特異的に発現し、ノックアウトマウスの解析から PGCs の発生に必要であることが示されている転写因子である、*Blimp1* (*Prdm1*)、*Prdm14*、*Tfap2c* (*AP2γ*) (Ohinata Y. *et al.* 2005, Vincent SD. *et al.* 2005, Yamaji M. *et al.* 2008, Weber S. *et al.* 2010) を、テトラサイクリン応答性のプロモーター支配下に発現する *piggyBac* トランスポゾンベクターをそれぞれ作製し、上記の ESCs にトランスフェクションした。

トランスフェクションした ESCs を EpiLCs に分化させ、EpiLCs を回収して細胞凝集塊（2,000 細胞/個）を作製し、ドキシサイクリン (Dox) によって 3 遺伝子の発現を誘導した。ESCs の維持は N2B27 2i + LIF 培地 (Ying QL. *et al.*, 2008) で行い、EpiLCs への分化は N2B27 + bFGF + Activin A + 1% KSR (Hayashi K. *et al.*, 2011) 下で 36 時間培養して行った。細胞凝集塊の培養は、Lipidure[®]-Coat 96-well plate を用いて、GK15 培地 (Hayashi K. *et al.*, 2011) で行った。

結果と考察

分化させた EpiLCs を凝集させ、導入した 3 遺伝子を発現させたところ、培養 2 日目には BVSC

が陽性となり、80%以上の細胞で BV が陽性となった。また、*Prdm14* 遺伝子のみでも、BVSC 陽性細胞が誘導された。

次に、誘導された BV 陽性細胞の遺伝子発現を定量的 PCR 法により調べた結果、PGC 発生初期に発現する遺伝子および多能性関連遺伝子の発現レベルが上昇し、DNA メチル基転移酵素の発現レベルが低下していた。また、免疫染色および Bisulfite sequence 法でエピゲノムを調べた結果、H3K9me2 レベルが低下していたが、インプリントの消去は生じていなかった。以上の結果から、BV 陽性細胞は、胎生 9.5 日 (E9.5) 頃の PGCs に近いと推定された。

さらに、マイクロアレイ法を用いてトランスクリプトーム解析を行った結果、BV 陽性細胞では、PGC 発生過程で認められる中胚葉プログラムの一時的活性化を経ることなく、直接的に生殖細胞プログラムが誘導されていることが示唆された。サイトカインで誘導された PGCLCs と対比して、これらの細胞を Transcription factor-induced PGCLCs (TF-PGCLCs) と命名した。また、ESCs から直接的には BV 陽性細胞が誘導されず、これらの転写因子が生殖細胞プログラムを活性化するには、EpiLCs という細胞の状態が必要であることが明らかになった。

TF-PGCLCs は、3 遺伝子を用いて誘導した場合に最も誘導効率が高いことから、各転写因子に誘導に対する寄与があることが示唆された。そこで、TF-PGCLCs の誘導における各転写因子の役割を明らかにするため、各 1 因子のみを導入した細胞株を用いて、発現誘導 24 時間後のトランスクリプトームを解析した。その結果、*Prdm14* 遺伝子が、生殖細胞プログラムの活性化に中心的な役割を果たしていることが明らかとなり、*Blimp1* 遺伝子が多能性遺伝子の発現レベルを調節していることが示唆された。

最後に、TF-PGCLCs の機能を検証するため、3 遺伝子で誘導し、BV レポーターを指標にソートした TF-PGCLCs を、*W/W^v* マウス (7 日齢) の精細管に移植した。その結果、移植 10 週後に精子形成しているコロニーが確認され、精子を得た。さらに、この精子を用いて体外受精・胚移植を行った結果、産仔を得た。得られた産仔は成長後、妊孕性が確認された。

結論と展望

Blimp1, *Prdm14*, *Tfap2c* の 3 種類の転写因子により、EpiLCs から PGC 様の細胞 (TF-PGCLCs) が誘導された。TF-PGCLCs は E9.5 PGCs に相当すると推定され、精細管移植法により、機能的な精子へと分化した。また、トランスクリプトーム解析により、TF-PGCLCs では体細胞プログラムの活性化を経ず、直接的に生殖細胞プログラムが誘導されていること、特に *Prdm14* 遺伝子がその誘導に中心的な役割を果たしていることが示唆された。

TF-PGCLCs の培養系は、マウス PGC 運命決定時の転写因子ネットワークや、発生過程のエピゲノムプログラミングを解析する基盤となる。また、異なる種においても共通した転写因子によって目的の細胞を誘導できる可能性があるため、ヒトを含めた他の哺乳類における生殖細胞の試験管内誘導に、新しい戦略を用いることを示す成果である。

参考文献

- Hayashi K. *et al.*, *Cell*. **146**:519-532 (2011).
Hayashi K. *et al.*, *Science*. **338**:971-975 (2012).
Hochedlinger K. *et al.*, *Cell*. **121**:465-477 (2005).
Ohinata Y. *et al.*, *Nature*. **436**:207-213 (2005).
Ohinata Y. *et al.*, *Reproduction*. **136**:503-514 (2008).
Saitou M. *et al.*, *Development*. **139**:15-31 (2012), Review.
Vincent SD. *et al.*, *Development*. **132**:1315-1325 (2005).
Weber S. *et al.*, *Biol Reprod*. **82**:214-223 (2010).
Yamaji M. *et al.*, *Nat Genet*. **40**:1016-1022 (2008).
Ying QL. *et al.*, *Nature*. **453**:519-523 (2008).