

## 論文の内容の要旨

応用動物科学専攻  
平成 23 年度博士課程 進学  
氏名 足達 冬規  
指導教員名 田中 智

論文題目 マウス ES 細胞から栄養膜細胞への分化転換に関する研究

### 緒言

ほ乳類初期胚の細胞は、子宮への着床前に内部細胞塊(ICM)と栄養外胚葉(TE)に分化する。着床後、ICM が体細胞と生殖細胞へ分化するのに対し、TE は胎盤を構成する各種の栄養膜細胞に分化する。ICM と TE の分化運命の決定は厳密で、ICM から栄養膜細胞へ、逆に TE から体細胞への分化は無い。また、ICM から樹立されるマウス胚性幹細胞(mESC)も、ICM の分化運命を反映して通常の分化誘導系では栄養膜細胞に分化しない。しかし、近年、人為的な操作により mESC の栄養膜細胞への分化転換を誘導できることが報告された。ICM(mESC)から栄養膜細胞への分化転換は生体内では通常起こり得ない現象であるが、この現象の研究により、幹細胞の分化方向を厳密に制御する機構に関する知見が得られるものと期待できる。

細胞の分化にはエピジェネティックな制御が必要である。しかし、mESC から栄養膜細胞への分化転換に関するエピジェネティック制御の知見は少ない。特に、ヒストン修飾による制御に関する知見は少なく、H3K9 のモノメチル化酵素である Setdb1 を欠損した mESC を用いてキメラ胚を形成した場合に、mESC の一部が TE へ寄与することが報告されているのみである。

本研究では、BMP4 によって誘起される mESC から栄養膜細胞への分化転換の解析から、分化

方向の決定に関するエピジェネティック制御の存在を明らかにすることを目的とした。第一章では、栄養膜細胞への分化能を有する幹細胞に着目し、mESC が栄養膜細胞へ分化転換する経路を解析した。第二章では、いくつかのエピジェネティック因子欠損株を用い、mESC の分化転換におけるエピジェネティック因子の必要性を検証した。

## 第一章 BMP4 処理による mESC の分化転換経路の解析

無血清条件下で維持した mESC を BMP4 存在下かつラミニン上で 8 日間培養することで分化転換が誘導されることが報告されている。ラミニンは mESC の原始外胚葉様細胞への分化を誘導する。また、マウスにおいて原始外胚葉から樹立される原始外胚葉幹細胞 (EpiSC) は、BMP4 処理によって栄養膜細胞へ分化することが示されている。これらの知見から、BMP4 で誘導される分化転換には EpiSC 様の状態を経る過程があると考えた。

EpiSC は Activin A と FGF4(AF) に依存して未分化状態が保たれる細胞である。8 日間の分化転換誘導過程に EpiSC 様の状態が存在したとしても、これらの EpiSC 未分化維持因子がなく、逆に分化を誘導する BMP4 が存在し続けるため、EpiSC 様細胞の存在を捉えることが困難である。そこで、分化転換の誘導に必要最小限の時間だけ BMP4 で処理し、その後速やかに EpiSC 未分化維持条件に移すことで、EpiSC 様細胞を未分化のまま増殖させその存在を証明できると考えた。そのため、まず分化転換の誘起に必要な BMP4 処理時間を検討し、少なくとも 24 時間の BMP4 処理によって分化転換が誘起されることを明らかにした。

次に、BMP4 処理 24 時間後の mESC を AF 共存下で培養し、AF 依存的に増殖する細胞株を樹立した。AF-dependent cell (AFC) と命名したこの細胞は EpiSC 様の遺伝子発現を示し、BMP4 処理によって栄養膜細胞の 3 つのサブタイプのうち合胞栄養芽層 (SynT) への分化のみが確認された。

以上のことから、BMP4 による分化転換過程には少なくとも EpiSC 様の状態が存在することが明らかになった。しかし、残るサブタイプである栄養膜巨細胞 (TGC) と海綿状栄養膜細胞 (SpT) への分化転換経路は確認できていない。分化転換に関するエピジェネティック制御の解析には全ての栄養膜サブタイプが出現するような分化転換系がより有用である。第二章ではこれを確立し、分化転換におけるエピジェネティック因子の必要性を調べた。

## 第二章 エピジェネティック因子欠損 mESC の分化転換の解析

H3K9 メチル化酵素である Setdb1 と G9a は栄養膜細胞の分化に関与することが知られている。前述の様に、Setdb1 欠損 mESC を用いてキメラ胚を作成した場合に mESC の一部が TE へ寄与する。また、G9a を欠損した場合には胎盤の TGC が減少し、SpT が増加する。

Suv39h は、H3K9 のトリメチル化を担う酵素である。Suv39h 欠損マウス胚は胎生 12.5 日以降の生存率が低下し、出生に至った個体も野生型に比べて小さい。In vitro に取り出した Suv39h 欠損マウス胎仔由来の繊維芽細胞では染色体の倍数化が認められ、これが発育不全の一因と考えられているが、in vivo では体細胞の分化や機能の顕著な異常は認められていない。Setdb1 と G9a の知見から、Suv39h も栄養膜細胞の分化に関わる可能性があると考えた。そこで、分化転換誘導時のエピジェネティック因子遺伝子の発現レベルを解析すると、*Suv39h* の発現レベルが BMP4 処理に依存して一過的に上昇することが分かった。Oct4 の発現抑制による mESC の分化転換においても、分化転換誘導の開始とともに Suv39h の発現レベルが上昇することが報告されている。これらのことから、mESC の栄養膜細胞への分化能の獲得に Suv39h が関与する可能性が示唆された。

アクチビンシグナルの阻害はヒト ESC (hESC) の BMP4 処理による栄養膜細胞への分化誘導を促進する。EpiSC と hESC は類似する性質を示す幹細胞であることから、mESC が EpiSC 様の状態へ変化した後にアクチビンシグナル阻害剤 (SB431542) を添加する (SB 処理) ことで分化転換誘導効率が向上すると期待した。SB 処理の結果、SynT と SpT の分化マーカー遺伝子は SB 処理依存的に発現レベルが上昇しており、さらに TGC の分化マーカー遺伝子は BMP4 処理と SB 処理を行った場合にのみ発現が誘導された。このことから、栄養膜細胞はサブタイプ毎に分化転換に必要なシグナルが異なることが示唆された。しかし、各サブタイプの代表的なマーカー遺伝子は BMP4 処理と SB 処理を行った条件において最も発現レベルが高かったこと、および SB 処理による効果は異なる系統の mESC でも確認できたことから、BMP4 処理にさらに SB 処理を加えた新たな条件で分化転換を解析することとした。

新たな分化転換誘導系を用いて Suv39h 欠損 mESC を分化転換誘導した結果、全てのサブタイプへの分化転換が抑制されていた。Suv39h 欠損 mESC では分化転換誘導後も未分化マーカー遺伝子である *Oct4* の発現が残っており、体細胞マーカー遺伝子の発現レベルも低かったことから、そもそも分化が抑制されていた可能性があった。*Oct4* は mESC の未分化状態を維持するだけでなく、TE の維持に必須である *Cdx2* の発現抑制も行う、栄養膜細胞系譜と体細胞系譜を分ける重要な転写因子である。そこで、RNAi により *Oct4* の発現抑制を行った後に Suv39h 欠損 mESC の分化転換を誘導したが、

体細胞分化マーカー遺伝子の発現は有意に上昇するものの、栄養膜細胞へは分化転換しなかった。このことから、Suv39h の欠損による分化転換の抑制は *Oct4* の発現の残存によるものではないことが示唆された。

一章において EpiSC 様の状態を介した SynT への分化転換経路があることを示した。分化転換の抑制が *Oct4* の発現の残存による mESC の分化抑制ではないとすれば、Suv39h 欠損 mESC から AFC を誘導できるはずである。実際、Suv39h 欠損 mESC から AFC を樹立することが可能で、EpiSC の未分化マーカー遺伝子の発現が確認された。しかし、Suv39h 欠損 AFC を分化誘導しても SynT へ分化しなかったことから、Suv39h は EpiSC 様の状態から SynT への分化に必要な因子であることが示された。

Suv39h は DNA メチル化酵素である Dnmt3a、Dnmt3b、Dnmt1 と相互作用する。Suv39h 欠損による分化転換の抑制が DNA メチル化の異常による結果であるのかを解析するために、Dnmt 欠損 mESC を用いて分化転換誘導を行った。その結果、どの Dnmt 欠損 mESC においても、いずれかの栄養膜細胞のサブタイプへの分化転換が誘導された。このことから、分化転換の誘起は DNA メチル化に依存しないことが示唆された。ただし、Dnmt 欠損 mESC においても分化転換が抑制されたサブタイプがあったことから、DNA メチル化は栄養膜細胞のサブタイプ毎の分化転換に必要であると考えられる。

## 総括

分化転換の経路の解析から、BMP4 による分化転換の過程に少なくとも EpiSC 様の状態が存在すること、および EpiSC 様の状態から SynT への分化に Suv39h が必要であることを示した。さらに、アクチビンシグナルの阻害が mESC においても分化転換誘導効率を向上させることを示し、全ての栄養膜細胞のサブタイプへ分化転換を誘導する系を新たに確立した。新たな分化転換誘導系を用いた解析から、SynT だけでなく TGC と SpT への分化転換にも Suv39h が必要であることを示し、mESC の、栄養膜細胞への分化抑制を解除するためには Suv39h によるヒストン修飾が必要であることを示唆した。

Suv39h は遺伝子の発現抑制に関わる因子とされている。よって、mESC では *Oct4* 以外にも栄養膜細胞への分化転換を抑制する因子が存在しており、Suv39h がその因子の発現を抑制することで栄養膜細胞への分化抑制の解除に寄与すると考えられる。