

マウスにおける初期化因子探索のための新規検定系の確立

松尾 明子

昨今、分化した体細胞を初期化した iPS 細胞が再生医療の分野で注目されている。患者本人の細胞を利用するため、今まで問題となっていた拒絶反応や倫理上の問題が解決され、その臨床応用が期待されている。しかし、初期化を図る際に導入した遺伝子の相互作用や作用機序、また完全に初期化が起きているかなど不明な点も未だ多い。

今回、一方の X 染色体に GFP 遺伝子を持つ雌マウス由来の線維芽細胞（テスター細胞）とマウス由来の ES 細胞を融合させることで、体細胞の初期化モデルを作成した。テスター細胞は X 染色体の不活化によって GFP 蛍光が無い状態のものを選別して使用した。テスター細胞と初期化作用のある ES 細胞を融合した細胞は GFP 蛍光を発現し、Western 解析でも GFP タンパクが確認された。テスター細胞と融合細胞の GFP 遺伝子のメチル化状態を比較すると、融合細胞で脱メチル化している率が高かった。未分化状態を維持できない培養環境下で融合細胞を培養すると、再び GFP 蛍光は消退した。

これらの結果より、X 染色体の不活化、再活性化は体細胞の初期化と並行して起こる現象と考えられ、体細胞の初期化の検定系として用いられると考えられた。また、再活性化された X 染色体が再び不活性化される際に全ての細胞で GFP 蛍光が消退したことから、ランダムに不活化されるのではなく、テスター細胞の時の記憶が残っていることも推察された。

(平成20年2月28日受理)

Assay System for Mouse Reprogramming Factor

Akiko MATSUO

Recently, Yamanaka and his colleagues reported on a novel method for reprogramming of somatic differentiated cells into pluripotent stem cells (iPS cells) by transfecting transcription factor genes. Their new method would solve the problems of immunological rejection and ethics in the case of ES cells, because the somatic cells of each individual could be converted into ES-like pluripotent stem cells and serve for transplantation into the same patients. However there are still many problems to solve. For example, the molecular mechanism and interactions among the introduced genes are unknown as well as whether the reprogramming state using this method would be perfect or not.

In this study, the reprogramming of somatic cells was performed by fusion between fibroblasts (tester cells) of female mouse origin that have a GFP gene in one of two X-chromosomes and mouse ES cells. GFP fluorescence negative fibroblasts purified by a cell sorter

were used as tester cells. The resulting fused cells showed GFP fluorescence under a fluorescent microscope and GFP protein by western blot analysis. Analysis of the methylation state of the GFP gene in the fused cells revealed that there were more demethylated cytosines in the fused cells than in the tester cells. Moreover, the GFP fluorescence of all of the fused cells disappeared along with their differentiation.

These results indicate that X-chromosome reactivation and the reprogramming of somatic cells happen simultaneously, suggesting that both phenomena have a common underlying mechanism. Moreover, reprogramming can be monitored with X-chromosome reactivation through GFP fluorescence.

Finally, a question exists as to whether memory for X-chromosome inactivation in the tester cells remained even after reactivation, since GFP fluorescence was completely lost in all fused cells during differentiation. (Accepted on February 28, 2008) *Kawasaki Medical Journal* 34(3):157-164, 2008

Key Words ① reprogramming ② X-inactivation ③ ES cell
④ GFP ⑤ methylation

はじめに

材料と方法

分化した体細胞からクローン動物を作製できるという事実は、いったん分化した体細胞を、もう一度すべての細胞に分化できる全能性細胞に戻す、初期化因子が卵細胞の中に存在していることを示している。この初期化の人為操作は、免疫拒絶を回避するという観点から再生医療において、非常に重要な技術になると考えられる。最近、山中らは Oct 3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の4種類の遺伝子をレトロウイルスを介してマウスならびにヒト由来の線維芽細胞に導入、発現させると ES 細胞様の多能性細胞に転換できることを発表した^{1),2)}。しかしそれらの相互関係や機序については依然不明な点が多い。また以前より、ES 細胞には体細胞を初期化する能力があることが知られていた。体細胞の完全な初期化という過程は、まだその多くが謎に包まれている。

我々は、初期化因子を直接、ES 細胞または卵細胞から単離、同定することを目的に、まずその検定系を確立した。

テスター細胞

まず一方の X 染色体上に GFP 遺伝子が組み込まれたトランスジェニックマウス (D4/XEGFP. Jackson Laboratory より入手)³⁾ を取得し、そのメスの胎児由来の線維芽細胞を 10% FBS 添加 DMEM 培地を用いて大量培養 (CO₂ 5%, O₂ 2%) した。

X 染色体のランダムな不活性化によって、これらの細胞の約半数が GFP 蛍光を有する。GFP 陰性細胞をセルソータ (FACS Aria) によって選別純化した (Fig. 1)。GFP 蛍光を有する細胞が混在しない状況を得るため、この得られた GFP 陰性細胞を同条件下に培養、選別純化する過程を更に 2 度行い、テスター細胞とした (Fig. 2a, 2b)。

なお、neomycin 250μg/ml 下で 1 週間培養すると全ての細胞が死滅することを確認した。

ES 細胞 (E14TG2aNeo)

オスマウス由来 ES 細胞であり、HGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase) 遺伝子を欠損した E14TG2a⁴⁾ (Ed-

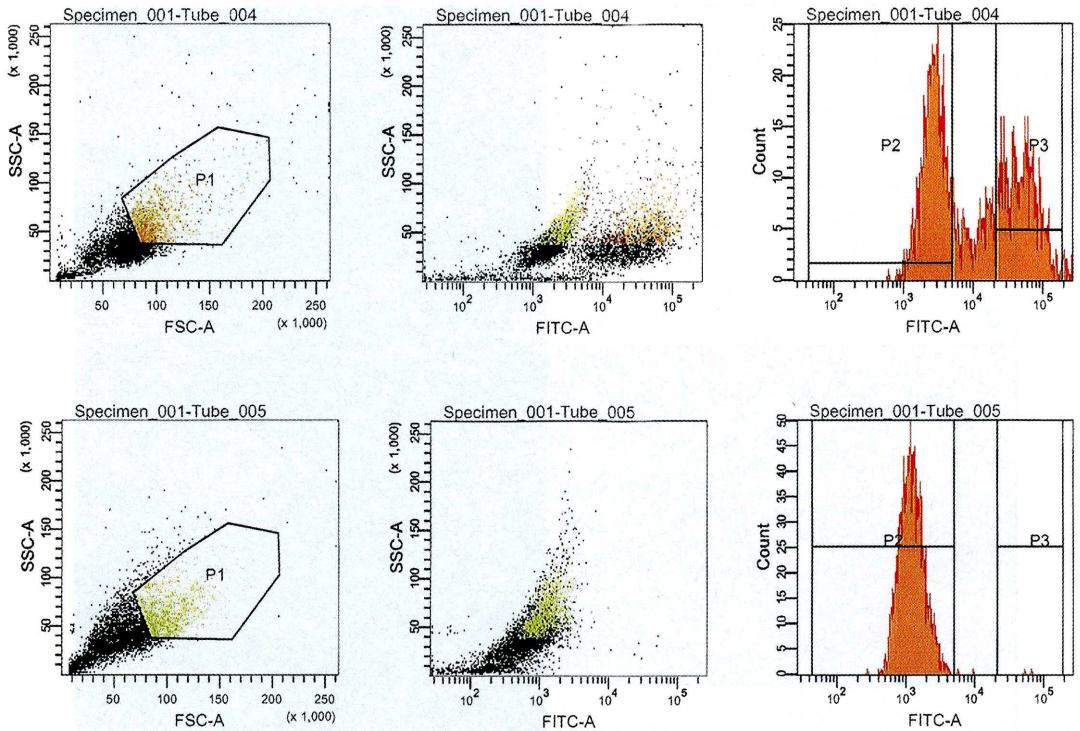


Fig. 1. セルソータによる GFP 蛍光陰性細胞の選別過程.

上段：2 度目の純化選別。下段：3 度目（最終）の純化選別。

P 2 が緑色 (GFP) 蛍光を認めない細胞群、P 3 が緑色蛍光を発する細胞群。

P 2 として得られた細胞のみを使用した。

inburgh 大学 Smith 博士から恵与) に、当教室で neomycin 耐性遺伝子を導入したものである。HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine) が添加された環境では DNA 合成が阻害され、生存できない。neomycin 添加に関しては 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においても問題なく生存しうることを確認した。

培養は未分化状態を維持するよう、TXWES 培地 (Biotechnology Development Company) を用い CO_2 5%, O_2 20% 下で行った。なおフィーダー細胞は不要であり、ゼラチンコートフラスコを用いた。

融合方法

トリプシン処理後のテスター細胞 (4.5×10^6) と ES 細胞 (9.0×10^5) を混合した。氷冷した HVJ-E (1000 U/ml) (Hemmagglutinating Virus

of Japan) (GenomONE[®] - CF, 石原産業) を添加し、氷上で 5 分間静置した後、37°C で 15 分間培養した。遠心し HVJ-E を除去した後、neomycin・HAT 添加 TXWES 培地で培養した。

融合細胞の再分化

ゼラチンコートされたフラスコを用いて neomycin・HAT 添加 TXWES 培地で培養し、未分化状態にあった融合細胞を、LIF 不含の DMEM 培地に変更してバクテリオロジカルディッシュ上で 3 日間培養した。その後トリプシン処理を行い、フラスコのみゼラチンコートされたものに変更し、培地は LIF 不含 DMEM を継続して培養した。

Western 解析の方法

テスター細胞ならびに融合細胞から抽出した

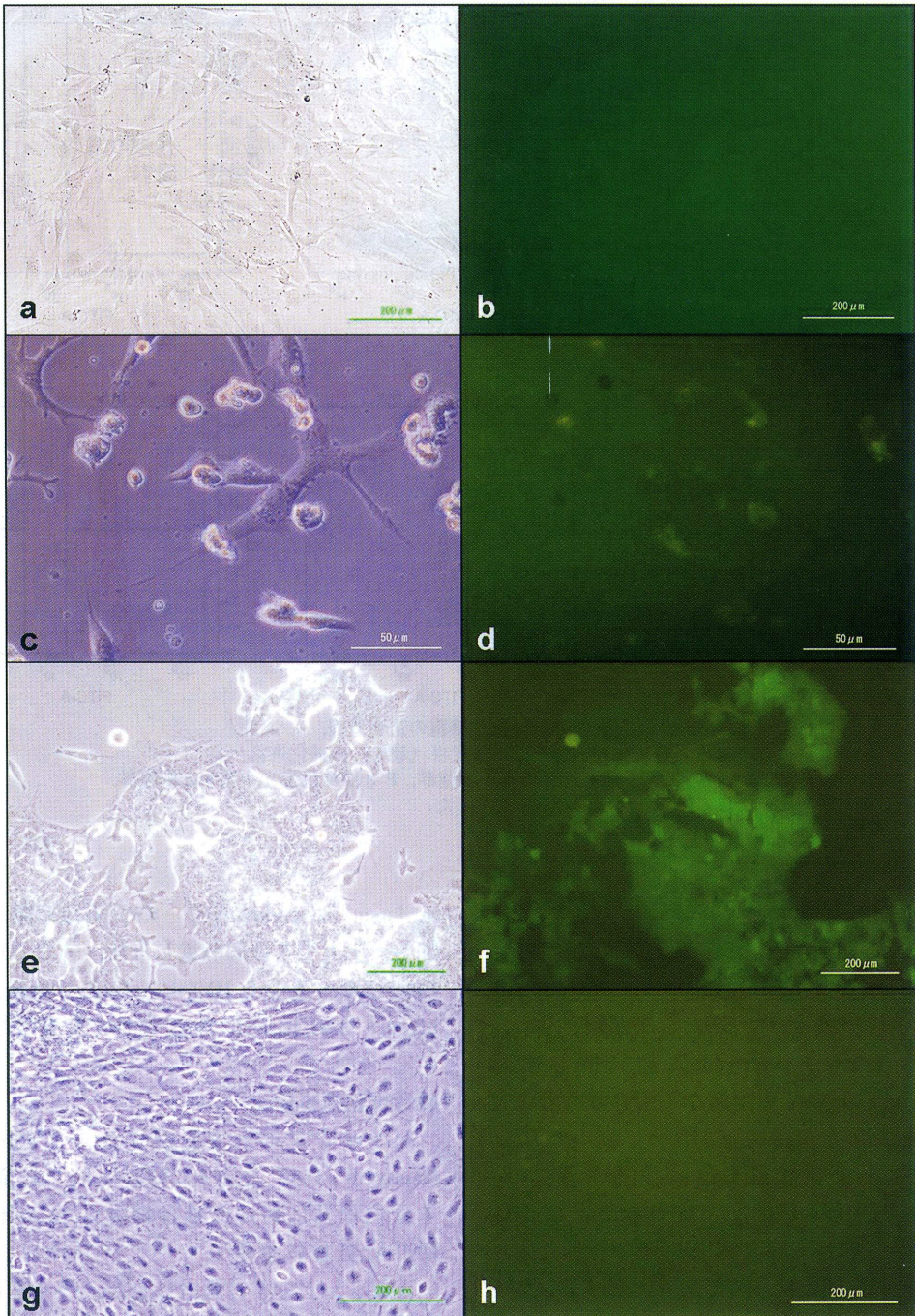


Fig. 2. a・b…テスター細胞
 c・d…融合細胞（融合後48時間）
 e・f…融合細胞（クローニング後）
 g・h…融合細胞（LIF free 下1週間）
 a・c・e・gは位相差像
 b・d・f・hは蛍光像

タンパク質（各レーン 10^5 cell由来）をポリアクリルアミド（15%）分離ゲルを用いて100 V、85分泳動後、ミニトランスブロットセル（BioRad）を用いてニトロセルロースメンブレン（Hybond ECL）（GE Healthcare）に転写した。一次抗体（抗GFP抗体）（Clontech）、二次抗体（HRP標識抗マウスIgG抗体）（GE Healthcare）、ECL染色液（ECL Plus Western Blotting Detection system）（GE Healthcare）を用いて検出した。

蛍光観察の方法

位相差蛍光顕微鏡（Olympus IX81）を用いてテスター細胞、融合細胞の観察を行った。

メチル化状態の解析

融合前後のGFP遺伝子領域のメチル化状態を解析した。テスター細胞ならびに融合細胞のDNAを抽出（REDEX Extract-N-Amp Tissue PCR Kit, SIGMA[®]）しCpGenome[™] Modification Kit（Chemicon[®]）を用いてbisulfite処理をおこなった。bisulfite処理後のDNAを鋳型としてPCRを行い、塩基配列を解析した。PCRに用いたプライマーは5'TGGGGTATAAGTTGGAGTATAATTATAATA 3', 5'AACTCCAACAAAACCATATAATC 3'であった。

DNAは酸性条件下でsodium bisulfite処理を行うと、シトシン（C）がウラシル（U）に変換されるが、メチル化Cでは反応効率が悪く、Cのまま残る。これをPCRするとメチル化CはCとして、脱メチル化CではTとして読まれる。この差異を利用してCpG領域のメチル化状態が解析できる。

結 果

融合細胞の性状

HVJ-Eによる細胞融合後48時間の時点で、一部の細胞にごく弱いGFP蛍光が確認された（Fig. 2c, 2d）。これはES細胞との融合により、テスター細胞由来GFP遺伝子が発現した

ために起こる現象である。これらの蛍光を有する細胞の形態は線維芽細胞のテスター細胞よりES細胞に類似しており、かつES細胞よりもやや大型であった。細胞の増殖とともに辺縁の細胞がやや扁平に分化する傾向がみられ、この扁平化した細胞ではGFP蛍光が消退するものがあつた。細胞増殖能はテスター細胞とES細胞の中間レベルであった。その後、neomycin及びHAT選択培地により徐々に細胞が減少し、最終的に4個のクローンが得られた。これらのクローンの形状は、ES細胞に類似し、各クローン間で程度の差はあるもGFP蛍光は陽性であった（Fig. 2e, 2f）。

Western解析

Western解析において、融合細胞ではGFP蛋白に相当する27kDにバンドが出現し、テスター細胞では出現しなかった（Fig. 3）。すなわち、融合細胞、テスター細胞はいずれもGFP遺伝子を持ちながら、GFPタンパクの発現は融合細胞のみであった。

なお、出現したバンドの強弱は、そのクローンの蛍光の強弱と相関していた。

融合細胞の再分化

融合細胞を未分化な状態を維持する環境から、バクテリオロジカルディッシュとLIF不含のDMEMに変更すると細胞は凝集し、球状の胚様体に類似した形態を呈するようになった。この培養条件の変更48時間後に、一部の細胞の蛍光が陰性化しているのが確認できた。

トリプシン処理を行い凝集していた個々の細胞を解離し、フラスコを変更して培養すると細胞の形態はES細胞様の丸みを帯びた状態から扁平な状態に変化するとともに、GFP蛍光の陰性化が進んだ。この環境で1週間培養すると、全ての細胞で蛍光が消退した（Fig. 2g, 2h）。

メチル化解析

X染色体の不活化が起きているテスター細胞と、解除された融合細胞のGFP遺伝子領域

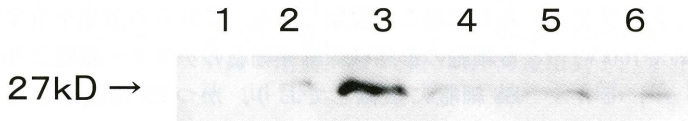


Fig. 3. Western blottingによる GFP 蛋白発現の確認.

レーン1：テスター細胞

レーン2～6：融合細胞

この時点では融合細胞は5クローン存在しており程度の差はあるが全てで陽性であった。のちに1クローンが死滅し、最終的に4クローンとなった。

テスター細胞は GFP 遺伝子を持ちながら、蛋白発現は陰性であった。

における CpG のメチル化状態を比較した。両者で変化がない部位も多く存在したが、変化のある部位に関しては、融合細胞で脱メチル化されている割合が高かった (Fig. 4)。

考 察

受精後、細胞は多能性を有した未分化な状態から分化する。分化した体細胞においては未分化状態へ戻ることは生体においてはみられない現象である。着床前の初期胚から得られる ES 細胞は多能性を有した万能細胞として、再生医療の分野で脚光を浴び様々な研究がなされてきた。常に未分化な状態で存在することから、細胞内に自身を未分化状態に維持する物質や機構があると考えられている。しかし、受精卵を用いるため倫理上の問題や拒絶反応の問題などから臨床応用には難点があった。

現在は皮膚由来体細胞を、多能性を有する ES 細胞類似の iPS 細胞へ誘導し、更に再分化をはかることが可能となってきた²⁾。この方法では、材料となる体細胞を得ることが容易であり、患者自身の細胞を用いるので拒絶反応を起こすことも無い。しかし、この体細胞から iPS 細胞への初期化のメカニズムや相互関係、報告された3つ⁵⁾あるいは4つの遺伝子のみが関与しているかなど、未だ不明な点が多い。またこの iPS 細胞が完全に初期化されているのかという問題も残っている。

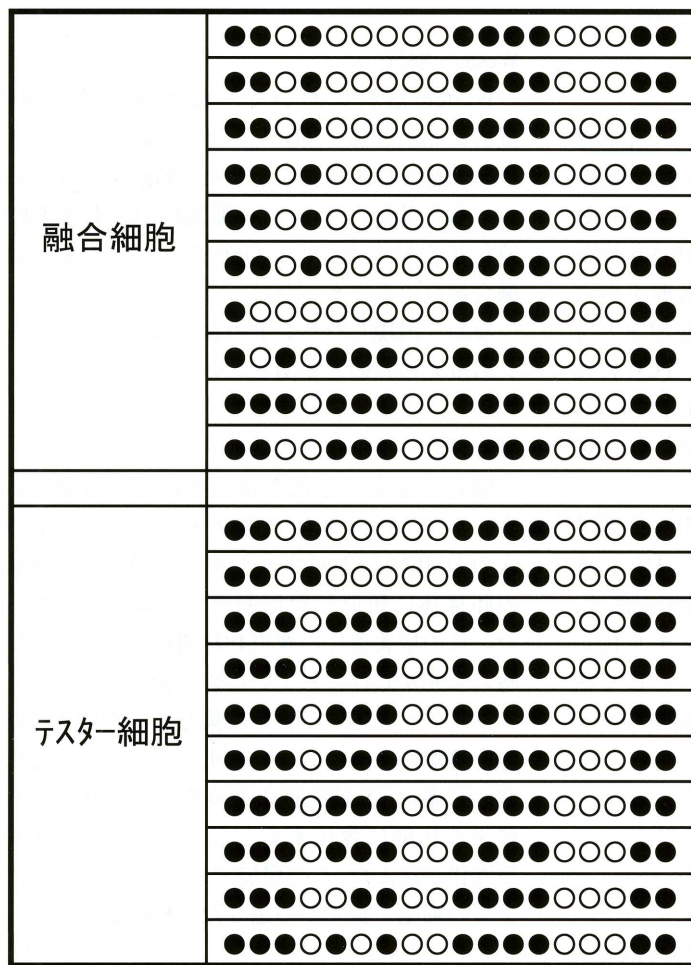


Fig. 4. テスター細胞と融合細胞における GFP 遺伝子領域の CpG 領域のメチル化状態。

上段が融合細胞，下段がテスター細胞。

○：メチル化なし，●：メチル化あり。

この初期化に類似した現象として、X染色体の不活化がある。哺乳類の性染色体は雄ではXY、雌ではXXであり、X染色体は1本分で生命の維持に必要な内容を含んでいる。X染色体を2本持つ雌は雄と比べ2倍の情報を持つことになり、雌雄間でX染色体からの転写量を同レベルに維持する補正機構としてX染色体の不活化とゲノムインプリンティングが存在する。全能性を持ち2本のX染色体の両者とも発現していた細胞が発生の過程において、1本のX染色体上の大半の遺伝子が不活化により発現されなくなる。また、未分化・分化と直接の関連性はまだ不明であるが、この現象に着目すると、体細胞が初期化されるとX染色体は再活性化されると推測される。

今回使用したテスター細胞は1本のX染色体上にGFP遺伝子を持ちながらもX染色体の不活化によってGFP蛍光が陰性なものを用いた。線維芽細胞として分化した状態での限りは不活化の解除は起こらず、蛍光は陰性のままである。これは、このX染色体の不活性化状態は安定なものであることを示している。ES細胞と融合すると、ES細胞中の初期化因子により、テスター細胞は未分化な状態へと誘導されるはずである。そして未分化な状態に戻るとX染色体の不活化が解除され、GFP蛍光を発すると考えられる。

今回融合後48時間の時点でごく弱い蛍光を発する細胞が出現してきた。このごく弱い蛍光は、死滅した細胞でみられる乱反射による擬似蛍光とは明らかに異なるものである。しかしクローニングしてゆく過程で徐々に弱い蛍光を発する細胞は死滅してゆき、最終的に鮮やかな蛍光を有する4クローンのみが残存した。これは、融合初期のX染色体の不活化の解除が起こる48時間時点までは生存できたものの、融合時の細胞のダメージや4倍体になり遺伝子の一部が脱落するといったことで死滅したのと考えられる。

このGFP蛍光の出現は、未分化な状態が維持できなくなり分化してゆく過程で、再びX

染色体の不活化が起きたことを意味する。ES細胞の分化過程においては、X染色体はランダムに不活性化されるので、再分化でもランダムに不活化が起こりうると予想していた。つまり再分化の結果、蛍光が有るものと無いものが混在すると考えていた。しかし予想に反し、全ての細胞が陰性化した。この結果から考えられることは、2本のX染色体のどちらが不活化するかについては細胞に何らかの記憶が残っていたといえる。

また、X染色体の活性・不活性状態を考える上で今日着目されている現象にDNAのメチル化状態が挙げられる。従来の説⁶⁾では未分化状態にある細胞のCpG領域が脱メチル化されているとなっていた。ところが、全く逆の説⁷⁾が最近報告されており、議論をよんでいる。X染色体の不活化と分化の状態の関連性と同時に、その判定基準としたGFP遺伝子領域のメチル化状態をみたものが**Figure 4**である。テスター細胞と融合細胞間で、CpGのうち約半数は同じ状態を呈しており、変化のみられる領域では未分化状態モデルの融合細胞の方が脱メチル化されている部分が多く、従来説に近い結果となった。前述の不活化の記憶については、このメチル化状態の類似が何らかの関連があるのかもしれない。

ま と め

ES細胞と融合することで、体細胞の初期化モデルを作成した。X染色体の再活性化を指標とし、蛍光の有無で判定できるので比較的容易に確認できる。今後新規の初期化因子を同定する際の検定系の一つとして利用しうる。

体細胞の初期化、再分化を利用した再生医療では、由来となる体細胞の記憶が残っている状態つまり不完全な初期化であれば、疾患によっては再燃の恐れがあり、問題を生ずるため、完全な初期化が望ましい。今回のX染色体の不活化部位の再現性が完全な初期化とどのような関係にあるか、またメチル化状態との関連性に

ついて、今後検討を要する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御高闊を賜りました川崎医科大学生化学教室 湊川洋介前教授、ならびに刀祢重信准教授に深甚なる謝意を表します。ま

た本研究に当たり御協力、御助言を頂きました各教室員の皆様に厚くお礼申し上げます。

なお、本研究の一部は平成19年度プロジェクト研究費（一般研究C 大学院奨励）の援助によって行われた。

なお、本論文の要旨は第30回日本分子生物学会年会・第80回生化学会大会 合同大会において発表した。

参 考 文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 : 663-676, 2006
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131 : 861-872, 2007
- 3) Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A : Non-invasive sexing of preimplantation stage mammalian embryos. *Nat Genet* 19 : 220-222, 1998
- 4) Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M : HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326 : 292-295, 1987
- 5) Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita, M, Mochizuki Y, Takizawa N, Yamanaka S : Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26 : 101-106, 2008
- 6) Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ : Reactivation of an Inactive Human X Chromosome : Evidence for X Inactivation by DNA Methylation. *Science* 211 : 393-396, 1981
- 7) Hellman A, Chess A : Gene Body-Specific Methylation on the Active X Chromosome. *Science* 315 : 1141-1143, 2007