

博士論文

ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞の誘導とその制御

2021 年 3 月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

バイオサイエンス専攻

バイオ科学技術研究領域

古田 明日香

目次

略称表	1
序論	3
第1章 ES 細胞から 2 細胞期様細胞の誘導	8
緒言	
材料と方法	
結果	
考察	
第2章 ES 細胞と 2 細胞期様細胞におけるエネルギー代謝経路	51
緒言	
材料と方法	
結果	
考察	
第3章 2 細胞期様細胞におけるオルガネラのリモデリング	63
緒言	
材料と方法	
結果	
考察	
結論	83
総合考察	84
参考文献	87
謝辞	96

略称表

BMP4 : bone morphogenetic protein 4

BSA : Bovine serum albumin

CAF-1 : chromatin assembly factor 1

Cox7a1 : cytochrome c oxidase subunit 7A1

Cpt1a : carnitine palmitoyltransferase 1a

Dlst : dihydrolipoamide S-succinyltransferase

Dox : doxycycline

Dppa : Developmental Pluripotency Associated

Dux : double homeobox

Eno : Enolase

EPS : extended pluripotent stem

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

ES : embryonic stem

FCS : fetal calf serum

FGF4 : fibroblast growth factor 4

Gapdh : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Gpi : Glucose-6-phosphate isomerase

GSK3 : glycogen synthase kinase 3

HDAC : histone deacetylase

Hk : Hexokinase

Idh2 : isocitrate dehydrogenase 2

JNK : c-Jun N-terminal kinase

KSR : KnockOut Serum Replacement

LIF : leukemia inhibitory factor

LTR : long terminal repeat

MAPK : mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase

MEK : mitogen Activated Protein Kinase Kinase

MuERV-L : Murine endogenous retrovirus with leucine tRNA primer

mEPS : mouse Expanded potential stem

Pdk1 : pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1

Pdk3 : pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3

Pfk : Phosphofructokinase

Pgk : Phosphoglycerate kinase

Pgam : Phosphoglycerate mutase

Pkm : pyruvate kinase muscle isozyme

PRC : polycomb repressive complex

TET : Ten-eleven translocation

Slc2a1 : solute carrier family 2 facilitated glucose transporter, member 1

SSR : StemSure Serum Replacement

Stk11 : serine/threonine kinase 11

TS : Trophoblast stem

TSA : Trichostatin A

Xen : extra-embryonic endoderm

2i : 2i condition

2OGD : 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase

序論

精子と卵子は次世代に遺伝情報を伝えるために最終分化した細胞であるが、受精後リプログラミングという過程を経て、胎盤を含む体を構成する全ての細胞に分化できる全能性という能力を再獲得する(Wu et al., 2017)。この全能性は初期の着床前胚だけが持つ能力であり、受精卵から胚盤胞期までに急激に失われる。また、胚盤胞期には、将来胚体を構成する内部細胞塊と胎盤などの胚体外組織を構成する栄養外胚葉への分化が生じる(図1)。

現在までに、胚盤胞を構成する内部細胞塊、原始内胚葉、及び栄養外胚葉の細胞から、それぞれ胚性幹 (Embryonic stem; ES) 細胞(Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981)、胚体外内胚葉 (extra-embryonic endoderm; Xen) 細胞(Kunath et al., 2005)、及び栄養膜幹 (Trophoblast stem; TS) 細胞(Tanaka et al., 1998)が樹立されている。ES 細胞、Xen 細胞、及び TS 細胞は、試験管内でそれぞれ胚体組織、卵黄嚢、及び胎盤組織へと分化誘導することができ、それぞれが由来する細胞の特徴を維持している(Rossant, 2007)。ES 細胞は、桑実胚または胚盤胞に移植した場合に、胚体組織には分化するが胚体外組織には分化できない多能性幹細胞である。しかし、ES 細胞は試験管内では原始内胚葉に分化誘導ができることや(Niakan et al., 2010; Xu et al., 2002)、生体内においても、非常に低い割合で胚体と胚体外の両方に寄与することが明らかにされている(Beddington and Robertson, 1989; Lallemand and Brulet, 1990)。これらのことから、ES 細胞は培養下でエピブラスト、原始内胚葉、及び栄養外胚葉の性質を持つ細胞が混在している可能性が考えられる。ES 細胞は、Leukemia inhibitory factor (LIF) と Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) または Fetal calf serum (FCS) の存在下で未分化状態を維持できることが明らかにされている(Ying et al., 2003)。しかし、これらの条件下において、ES 細胞は遺伝子発現が不均一でヘテロな細胞集団であることが明らかにされている(Canham et al., 2010; Hayashi et al., 2008; Singh et al., 2007; Toyooka et al.,

2008; Zalzman et al., 2010)。また、ES 細胞は、MEK/ERK と GSK3 の 2 種類の阻害剤 (2 inhibitors; 2i) を含む最小培地を用いることにより、遺伝子発現が均一で分化能が高い内部細胞塊様の基底状態で培養できることが明らかにされている(Ying et al., 2008)。このように、ES 細胞は胚体組織への分化が決定された後の内部細胞塊から樹立された細胞ではあるが、培養下では遺伝子発現が不均一であり、潜在的には胚体外組織への分化能を有する可能性があると考えられていた。

Macfarlan らは、ES 細胞には非常に低い割合で 2 細胞期胚において一過的に発現する内在性レトロウイルスの一種である Murine endogenous retrovirus with leucine tRNA primer (MuERV-L) を発現する亜集団が存在することを報告した(Macfarlan et al., 2012)。これらの細胞集団は全能性を有する 2 細胞期様細胞とよく似た遺伝子発現パターンを示すだけでなく、桑実胚に移植した際に栄養外胚葉へも分化できることから、「2 細胞期様細胞」と呼ばれている (図 2)。Morgani らは、ES 細胞には胚体外内胚葉のマーカーとして知られている Haematopoietically expressed homeobox (Hex) 遺伝子を発現する亜集団が存在し、その一部が胚体外組織への分化能を有することを報告している(Morgani et al., 2013)。また、Yang らは、ES 細胞を 3 種類の低分子化合物 (CHIR9902, glycogen synthase kinase 3 (GSK3) inhibitor; (S)-(+)-dimethindene maleate; antagonist of muscarinic M2 and histamine H1 receptors ; minocycline hydrochloride, inhibitor of endothelial cell proliferation) を含む培地で培養することにより、胚体外組織への分化能を有する Extended pluripotent stem (EPS) 細胞へと変換されることを報告した(Yang et al., 2017b)。さらに、Yang らは、マウス 8 細胞期胚の割球から 6 種類の阻害剤 (CHIR9902, GSK3 inhibitor; PD0325901, Mitogen-activated protein kinase kinase (Mek1) inhibitor; c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor VIII; SB203580, p38 inhibitor; A-419259, Src kinase inhibitor; XAV939, poly(ADP-ribose) polymerases inhibitor) を用いて、

胚体外組織への分化能を有する mouse Expanded potential stem (mEPS) 細胞を樹立した(Yang et al., 2019; Yang et al., 2017a)。また、ES 細胞や iPS 細胞も 6 種類の阻害剤を含む培地で培養することにより、mEPS 細胞へと変換できることも示されている。

現在までに、2 細胞期様細胞については ES 細胞においてクロマチンリモデリングに関与する chromatin assembly factor 1 (CAF-1) (Ishiuchi et al., 2015)、polycomb repressive complex (PRC) 1.6(Li et al., 2017; Rodriguez-Terrones et al., 2018)、転写因子 *Dux* (double homeobox) (De Iaco et al., 2017; Hendrickson et al., 2017)、*Dppa* (Developmental Pluripotency Associated) 2/4(De Iaco et al., 2019; Eckersley-Maslin et al., 2019)、及びマイクロ RNA *miR-34a* の発現を制御することにより誘導できることが明らかとなっている(Choi et al., 2017)。一方で、Hex 陽性細胞、EPS 細胞、及び mEPS 細胞については、他のグループからの続報がない状況となっている。このように、遺伝子を改変することなく 2 細胞期様細胞を効率よく誘導する方法については未だに報告されていない。

本研究では、MuERV-L の発現を指標に ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞を可視化し、効率よく 2 細胞期様細胞を誘導する培養条件を確立するとともに、誘導した 2 細胞期様細胞の特性について明らかにすることを目的とした。第 1 章では、ES 細胞から 2 細胞期様細胞を効率よく誘導できる培養条件の検討、及び得られた 2 細胞期様細胞の特徴について遺伝子発現を中心に考察する。第 2 章では、2 細胞期様細胞の特性についてエネルギー代謝経路について考察する。第 3 章では 2 細胞期様細胞の細胞内小器官の形態的な特性について考察する。最後に、これらの結果を統合して、2 細胞期様細胞の誘導のメカニズムとその特性、また本研究の今後の展開について議論する。

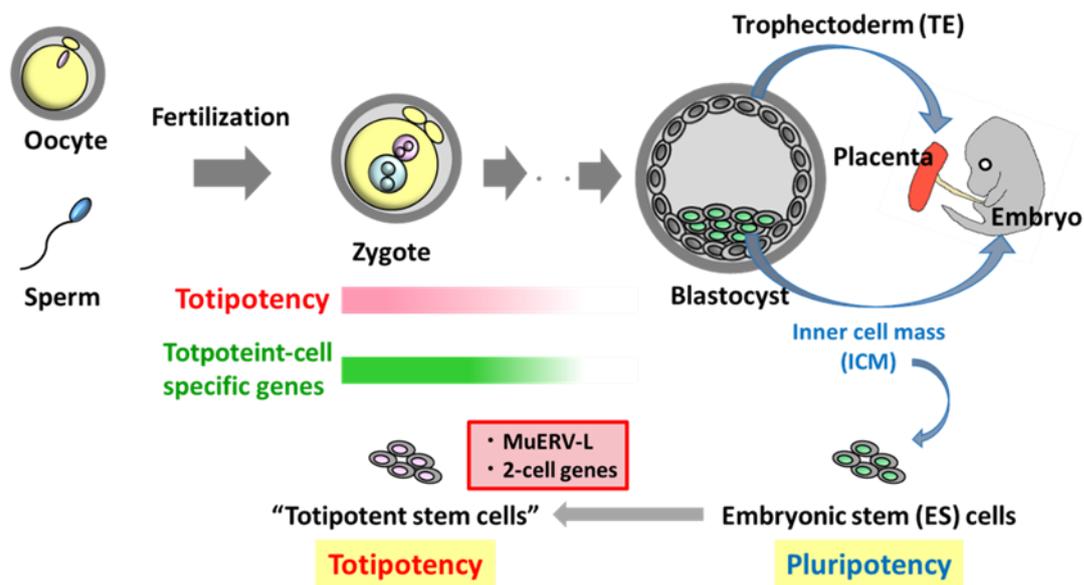


図 1. 全能性細胞から多能性細胞への分化機構

ES 細胞は胚盤胞期から樹立された細胞であり、胚体外組織への分化能を失った多能性幹細胞である。また、iPS 細胞は体細胞に特定の転写因子を遺伝子導入することにより誘導された細胞であり、ES 細胞と同様に多能性幹細胞である。過去の報告から、多能性幹細胞には培養下で僅かに全能性細胞が含まれていることが明らかにされている。

Embryonic stem cell (ES cell) : 胚性幹細胞

Inner cell mass (ICM) : 内部細胞塊

Pluripotency : 多能性

Totipotency : 全能性

Totipotent-cell specific gene : 全能性細胞特異的遺伝子

Trophectoderm (TE) : 栄養外胚葉

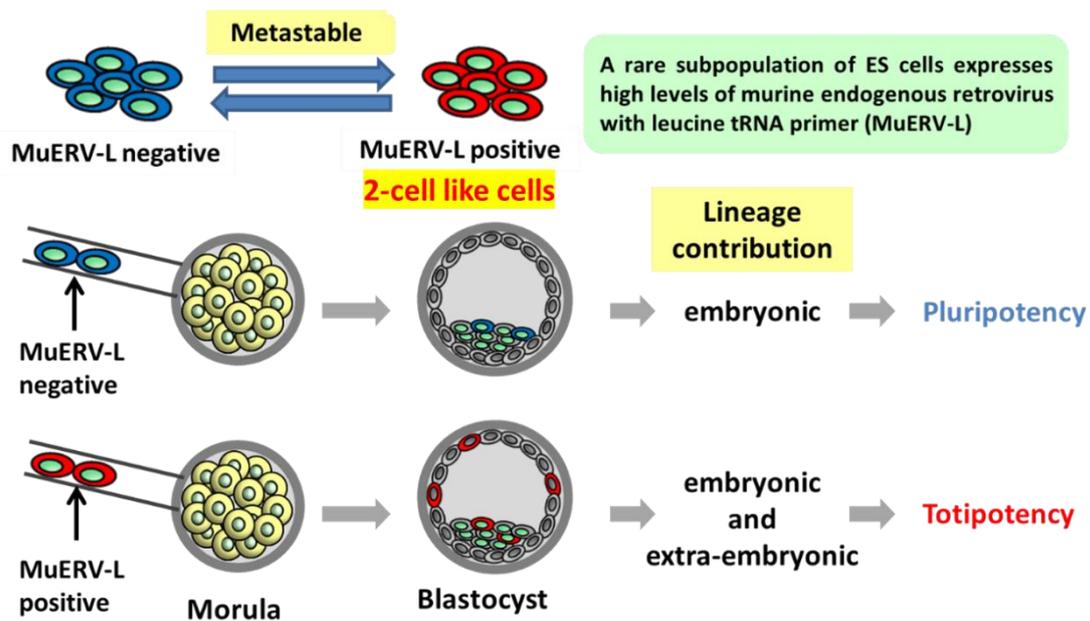


図 2. ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞

ES 細胞の中には非常に低い割合で内在性のレトロウイルスの一種である MuERV-L を発現する細胞集団が存在する。MuERV-L 陰性細胞は、桑実胚に移植すると、内部細胞塊にのみ寄与するのに対して、MuERV-L 陽性細胞は、内部細胞塊だけではなく、栄養外胚葉にも寄与することから、これらの細胞集団はそれぞれ多能性と全能性を有する細胞が混在すると考えられている。また、MuERV-L 陰性細胞と MuERV-L 陽性細胞は、可塑的な遷移状態にある。MuERV-L 陽性の ES 細胞は、2 細胞期胚に近い遺伝子発現パターンを示すことから 2 細胞期様細胞 (2-cell like cells) と呼ばれている。

第 1 章 ES 細胞から 2 細胞期様細胞の誘導

緒言

現在までに、多能性幹細胞である ES 細胞から全能性を有する細胞として 2 細胞期様細胞、Hex 陽性細胞、EPS 細胞、及び mEPS 細胞が誘導できることが示されている。これらの 4 種類の細胞の中で、2 細胞期様細胞だけが複数の研究グループにおいて再現されている。しかし、遺伝子を改変せずに 2 細胞期様細胞を効率よく誘導する方法については未だ確立されていない。

そこで、本研究では MuERV-L の発現を指標として、2 細胞期様細胞を効率よく誘導できる培養条件の最適化を行うとともに、2 細胞期様細胞の誘導に影響を与える生理活性物質を同定した。また、得られた 2 細胞期様細胞の遺伝子発現パターンの特徴について解析を行った。さらに、当研究室の先行研究により同定されている全能性を有する初期の着床前胚に高発現する遺伝子の強制発現が 2 細胞期様細胞の誘導に与える影響について検討を行った。

材料と方法

1. ES 細胞の培養

ES 細胞 (E14Tg2a) は、10%FCS を含む GMEM (Sigma; G6148) に 1mM Sodium Pyruvate (Nacalai tesque; 06977-34) 、1xNEAA (Non-essential amino acid, Nakalai tesque; 06977-34) 、0.1mM 2-ME (2-Mercaptoethanol, Nacalai tesque; 21438-82) 、及び LIF を加えた培地を用いて培養した。また、本研究に用いた添加物については表 1 に示した。

表 1 ES 細胞の培養に用いた添加物

Product name	Supplier	Cat. NO.
KnockOut Serum Replacement	Gibco	10828028
StemSure Serum Replacement	WAKO	191-18375
Neurobasal medium	Gibco	21103
B27 supplement	Gibco	17504-044
N2 supplement	Gibco	17502-048
DMEM/F-12	Nacalai tesque	08460-95
CHIR99021	WAKO	034-23103
PD0325901	WAKO	162-25291
NaCl	Nacalai tesque	31320-05
AgNO ₃	WAKO	191-05185
Ba(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	WAKO	027-10681
3CdSO ₄ 8H ₂ O	WAKO	030-12372
AlCl ₃ 6H ₂ O	WAKO	012-01862
CoCl ₂ 6H ₂ O	WAKO	036-03682
CrCl ₃ 6H ₂ O	WAKO	033-17482
GeO ₂	WAKO	077-02131
KBr	WAKO	164-03472
KI	WAKO	164-03972
MnCl ₂ 4H ₂ O	WAKO	139-00722

表 2 続き

NaF	WAKO	192-01972
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	WAKO	199-02445
Na ₂ SeO ₃	WAKO	196-10842
NaVO ₃	WAKO	190-07012
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	WAKO	018-08961
NiSO ₄ 6H ₂ O	WAKO	144-01172
RbCl	WAKO	187-02082
SnCl ₂	WAKO	204-11491
ZrCl ₂ 8H ₂ O	WAKO	267-00492
Glycine	WAKO	070-05281
Histidine HCl H ₂ O	WAKO	084-00702
Isoleucine	WAKO	032-23741
Methionine	WAKO	133-01602
Phenylalanine	WAKO	161-01302
Proline	WAKO	161-04602
Hydroxyproline	WAKO	088-01643
Serine	WAKO	199-00402
Threonine	WAKO	204-01322
Tryptophan	WAKO	204-03382
Tyrosine	WAKO	202-03562
Valine	WAKO	228-00082
Insulin	WAKO	093-06351
Glutathione (reduced)	Nacalai tesque	08786-74
Transferrin (Holo), human	WAKO	208-18971
Ascorbic acid-2-PO ₄ (Mg salt)	WAKO	012-04802
Thiamine HCl	WAKO	039-24351
Bovine serum albmin (BSA)	WAKO	010-23382

2. MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞の作製

MuERV-L の発現を制御する long terminal repeat (LTR) の下流に赤色蛍光タンパク質である tdTomato をコードする遺伝子を繋いだコンストラクト (2C::tdTomato) を制御酵素 *AvaII* で消化することにより直線化し、トランスフェクションに使用した。トランスフェクションの前日に、ES 細胞を 0.1% ゼラチンコートした 6 well plate に 7.5×10^5 個播種した。次に、表 2 に示した溶液 A と溶液 B をそれぞれ調整し、室温で 5 分間静置した。溶液 A と溶液 B を混合し、室温で 20 分間静置した後、ES 細胞に添加した。トランスフェクション 48 時間後に 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hygromycin (Invitrogen; 10687-010) を含む培地で培養し、プラスミドがゲノムに組み込まれたクローンを選択した。10 日後に薬剤耐性コロニーをピックアップし、実験に用いた。

表 2 トランスフェクション用の試薬

Solution	2C::tdTomato (linearized)	Lipofectamine 2000	OPTI-MEM
A	4 μg	-	250 μL
B	-	8 μL	250 μL

3. 全能性細胞特異的遺伝子を条件的に発現できるベクターの作製

A5n-P2A-Venus-pA_PGK-neo-pA (Kimura et al., 2015)、PB -TRE3G-cHApA (Ascl) (Tsukiyama et al., 2014) 及び、pcDNA4FLAG-Klf17 (後藤悠比、修士論文、2015)、pcDNA4FLAG-Btg4 (鈴木健士、修士論文、2015)、pcDNA4FLAG-Pramef12 (稲岡京介、修士論文、2016)、pcDNA4FLAG-Trim61 (比留田圭佑、修士論文、2019)、または、pcDNA4FLAG-Rfp14 (中田健太、修士論文、2017) をテンプレートにして、表 3 に示すプライマーを用いて PCR を行い、それぞれ P2 A-Venus-pA_PGK-neo-pA (Kimura et al., 2015)、TRE3G-PB5'TR-PB3'TR (Tsukiyama et al., 2014)、及び FLAG-Klf17、FLAG-Btg4、FLAG-

Pramef12、FLAG-Trim61、または FLAG-Rfp14 を含む断片を増幅した。PCR には KOD FX neo (TOYOBO) を使用した。PCR 産物は、0.8%アガロースゲル電気泳動により理論値と実際に出たバンドの長さを確認した。次に、目的の DNA 断片を 0.8%アガロースゲルから切り出し、Qiaex II Gel extraction kit (QIAGEN; 20051) を用いて精製した。精製した断片を In-fusion HD Cloning kit (Clontech; 639650) により各断片の末端に設定した相同配列を融合し、コンピテントセル (DH5 α) に導入することにより形質転換を行った。形質転換された大腸菌のコロニーを 2 mL の LB/Amp 培地に植菌し、37°Cで激しく振盪しながら一晩培養した。培養後、2 mL tube に集菌 (5,000rpm、4°C、5 min) し、上清を除去して P1 Buffer を 250 μ L 加え、vortex で完全に分散させた。そこに P2 Buffer を 250 μ L 加え、転倒混和した後、N3 Buffer を 350 μ L 加えてさらに転倒混和することにより中和した。遠心分離 (13,500rpm、4°C、10 min) 後の上清を回収し、DNA purification column (EconoSpin1a; GeneDesign,Inc) にアプライして遠心分離した (8,000rpm、4°C、1 min) 。素通り画分を除去後、PE Buffer を 750 μ L 加えて遠心分離した (8,000rpm、4°C、1 min) 。素通り画分を除去後、新しい 1.5 mL tube に column を移して遠心分離した (13,500rpm、4°C、1 min) 。再度、新しい 1.5 mL tube に column を移し、D.W.を加えて 1 分間静置した後、遠心分離した (13,500rpm、4°C、1 min) 。プラスミドの濃度を Nano Drop One (Thermo Scientific; ND-ONE-W) で測定後、約 200 ng のプラスミドを制限酵素 *EcoR* I で消化し、0.8%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色を行った。目的の大きさのバンドが得られたクローンを midiprep して、使用するまで-20°Cで保存した。

表3 プラスミド作製に用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
GGs-2A-FWD	GGATCCGGAGCTACTAACTTCAGCC
SV40 polyA-PB-5TR-REV	CTTGTATATAGATATCAAGCTCTAGCTAGAGGTCTCGA
PB-TRE3G-5TR-FWD	GATATCTATAACAAGAAAATATATA
PB-TRE3G-b-globin-int-REV	CTGTAGGAAAGAGAAGAAGGCATGA
FLAG-b-globin-int-FWD	TTCTCTTTCTACAGATGGACTACAAGGACGACGA
Klf17-GGS-2A-REV	AGTAGCTCCGGATCCCTTGGGCAGATGCGTTCTTT
Btg4-GGS-2A-REV	AGTAGCTCCGGATCCCTTTTGGCTTTAGGGAAGACA
Pramef12-GGS-2A-REV	AGTAGCTCCGGATCCAGGAAGACAGGGCGCGACGC
Rfp14-GGS-2A-REV	AGTAGCTCCGGATCCCTTGGGGGTAACTGGAATTC
Trim61-GGS-2A-REV	AGTAGCTCCGGATCCCTCAAGATCTGCAACTGTGC

4. 全能性細胞特異的遺伝子を条件的に発現できる ES 細胞の作製

ES細胞をトランスフェクションの前日に 8×10^5 cells/wellになるようにあらかじめ0.1%ゼラチンでコートした6 well plateに播種した。表4に示したトランスフェクション用の試薬AとBを調製し、室温で5分静置した。AとBを混合し、さらに20分間静置し、細胞に添加した。トランスフェクション48時間後から、200 µg/mL G418を含む培地で2週間培養し、薬剤耐性となった細胞を選択し、実験に用いた。

表4 トランスフェクション用の試薬

Solution	PB-TRE3G-FLAG- Klf17-2A-Venus- PGK-neo etc.	PB-CAG- Tet3G	pCAG-humanized PBase	Lipofectamine 2000	OPTI- MEM
A	1.5 µg	-1.5 µg	1.5 µg	-	250 µL
B	-	-	-	9 µL	250 µL

5. 受精卵の採取と試験管内培養

8-12 週齢のメスの BDF1 マウスに 7.5 IU の PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin、あすかアニマルヘルス株式会社；動物用セロトロピン) を腹腔内に投与し、48 時間後に 7.5 IU の hCG (human Chorionic Gonadotropin、あすかアニマルヘルス株式会社；動物用ゴナトロピン 3000) を腹腔内に投与することにより過排卵処理を行い、オスの BDF1 マウスと 14-16 時間交配させた。交配後、輸卵管より卵塊を採取し、M2 培地(Sigma; M7167) 中で Hyaluronidase (350U/mL, Sigma; H4272) 処理を行い、卵丘細胞を除去した。M2 培地で洗浄後、KSOM 培地 (Millipore; MR-620P-5D) に移し 37°C、5%CO₂ で培養した。

6. 受精卵雄性前核へのプラスミド DNA のマイクロインジェクション

2ng/μL に調整したプラスミドをマイクロマニピレーター (NARISHIGE; MMO-202ND) を設置した倒立顕微鏡 (Olympus IX73; レリーフコントラスト) 下で、Femtojet 4i (Eppendorf) を用いて受精卵の雄性前核にインジェクションした。37°C、5%CO₂ で 24 時間培養し、tdTomato の蛍光を倒立蛍光顕微鏡 (Olympus IX71) を用いて観察した。

7. RNA-seq と qRT-PCR

tdTomato 陽性細胞をセルソーター (Bio-rad S3 Cell sorter) を用いて分取し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN; 74106)、または RNeasy Micro Kit (QIAGEN; 74004) を用いて Total RNA を精製した。Total RNA 1 μg を SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen; 11754250) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。リアルタイム PCR システム (Roche Light Cycler 480 SystemII) を用いて各遺伝子の発現量を定量化した。テンプレートは 10 倍希釈し、表 5 に示すプライマーを用いた。サンプル間の発現を比較するために、18S rRNA

の値で補正を行った。RNA-seq 解析は、ダナフォーム社 (<https://www.dnaform.jp/ja/>) に依頼した。

表5 qRT-PCRに用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
MuERV-L_qPCR_FWD2	CTCTACCACTTGGACCATATGAC
MuERV-L_qPCR_REV2	GAGGCTCCAAACAGCATCTCTA
Oct3/4(FWD)	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC
Oct3/4(REV)	CTCGAACCACATCCTTCTCT
Gata6(FWD)	TCCATGGGGTGCCTCGACCA
Gata6(REV)	ACCCCTGAGGTGGTCGCTTGT
Gata4(FWD)	TTCCTCTCCCAGGAACATCAAA
Gata4(REV)	GCTGCACAACCTGGGCTCTACTT
Cdx2(FWD)	AGGCTGAGCCATGAGGAGTA
Cdx2(REV)	CGAGGTCCATAATTCCACTCA
Elf5(FWD)	CCCTCCTCCTCTTCAAAACC
Elf5(REV)	AAGTTGCCACAAGACCATCC
Esrrb (FWD)	TTTCTGGAACCCATGGAGAG
Esrrb(REV)	AGCCAGCACCTCCTTCTACA
Nanog (FWD)	CACCCACCCATGCTAGTCTT
Nanog (REV)	ACCCTCAAACCTCCTGGTCCT
Sox2(cds)F	GAGTGGAACCTTTTGTCCGAGA
Sox2(cds)R	GAAGCGTGTACTTATCCTTCTTCAT
Zfp42(FWD)	TGTCCTCAGGCTGGGTAGTC
Zfp42(REV)	TGATTTTCTGCCGTATGCAA
Stat3(FWD)	TTCTCTGGGGCTGGTGTGT
Stat3(REV)	AGGGGCTCACTATGGGTGGT

表 5 続き

18S(FWD)	CGGCTACCACATCCAAGGAA
18S(REV)	AGCTGGAATTACCGCGGC
Klf17_IF1	AATCCGCTGTTTCCAGAAGA
Klf17_IR1	CATGGAGCAGGACAATAAGGA
Btg4_IF2	GGCTGCAATGACTGTTTGAA
Btg4_IR2	AGACTGCTCCTCTGGCACAT
Trim61-qPCR(S2)	GCTGTTCTGGGATCTGAGGGATATAG
Trim61-qPCR(R)	TCATCAGAGAACCGTTCGGCATAAC
pramef12_ORF_FWD	ATGAGCTTGCGTGCCACACC
pramef12_ORF_REV	GGAGCTCCATGGGCAGGTCC
Rfpl4 qPCR FWD	GATGATGAGGTGGTTCTGGG
Rfpl4 qPCR REV	CAGTTAGGGGCCCTGGTTAC
Zbed3 qPCR FWD3	TAATGACCCAGCGGAACAAG
Zbed3 qPCR REV3	CAGGTGCACATCACTCAGGT
Zc3h6 qPCR FWD	GGCCTTATGTCTTTTCAGGA
Zc3h6 qPCR REV	TGTTCCACTGTGTGCTGGTT
Zfp92_qRT-PCR_FWD	AGGTCTCTACGCAGGACGAA
Zfp92_qRT-PCR_REV	GAGTGGCTGCCATAGTCAGG
Eif1a-like_qRT-PCR_FWD	AACAGGCGCAGAGGTAAAAA
Eif1a-like_qRT-PCR_REV	CTTATATGGCACAGCCTCCT
Zscan4d_qRT-PCR_FWD	GAGATTCATGGAGAGTCTGACTGATGAGTG
Zscan4d_qRT-PCR_REV	GCTGTTGTTTCAAAGCTTGATGACTTC
Tcstv1_qRT-PCR_FWD	TGAACCCTGATGCCTGCTAAGACT
Tcstv1_qRT-PCR_REV	AGATGGCTGCAAAGACACAAGTGC
Tcstv3_qRT-PCR_FWD	AGAAAGGGCTGGAAGTGTGACCT
Tcstv3_qRT-PCR_REV	AAAGCTCTTTGAAGCCATGCCAG

動物実験は、すべて長浜バイオ大学実験附属施設運営委員会の承認を受けた動物実験計画書（承認番号：059）に従って行った。

結果

1. MuERV-L を可視化できる ES 細胞の作製

受精卵の雄性前核に MuERV-L の発現を制御する LTR の下流に赤色蛍光タンパク質である、tdTomato をコードする遺伝子を繋いだコンストラクト (2C::tdTomato) (Macfarlan et al., 2012) をマイクロインジェクションした。その結果、過去の報告通り、全能性を有する 2 細胞期胚において tdTomato の蛍光が確認できた (図 3)。MuERV-L は着床前の発生過程において 2 細胞期から一過的に発現することが知られており、2C::tdTomato により、内在性の MuERV-L の発現を再現できることを明らかにした。次に、ES 細胞に 2C::tdTomato を遺伝子導入し、薬剤選択により安定細胞株を作製した。その結果、ごく一部の細胞が tdTomato 陽性になることが分かった。また、tdTomato 陽性細胞をソーティングし、qRT-PCR により内在性の MuERV-L の発現を確認した。その結果、tdTomato 陽性細胞でのみ MuERV-L の発現を確認することができた (図 3)。

2. ES 細胞からの 2 細胞期様細胞の誘導

マウスの ES 細胞は、Fetal calf serum (FCS) の存在下では遺伝子の発現パターンが内部細胞塊様の状態 (naïve inner cell mass-like state; naïve 型) とエピブラスト様の状態 (primed epiblast-like state; prime 型) の間を変動していることが明らかにされている。また、ES 細胞は、fibroblast growth factor 4 (FGF4) による分化のシグナルに LIF 及び、WNT シグナルが拮抗することにより、未分化性を維持することが示されている。現在では、FCS 非存在下で分化シグナルとして働く Mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase (MAPK) / Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 、及び ES 細胞の未分化性に関与する transcription factor 3 (TCF3) を不安定化する GSK3 の特異的阻害剤を加えた “2i condition (2i)” で ES 細胞を培養するこ

とにより、大部分がより未分化な naïve 型になることが報告されている(Ying et al., 2008)。そこで、MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、通常の培地 (GMEM +FCS; +LIF) 、2i を加えた培地 (GMEM +FCS; +LIF; +2i) 、及び ES 細胞を基底状態に誘導する 2i を含む最小培地 (N2B27 +2i) を用いて、培養し、5 日後に出現する dTomato 陽性細胞の割合を FACS 解析により定量した。その結果、全ての培養条件において、5 日間培養後においても、2 細胞期様細胞の誘導効率に変化はなかった (図 4)。

ES 細胞では、フィーダー細胞非存在下で培養した場合に、分化能を失うことが多く、ノックアウトマウス作製の際に問題となっていたが、FCS の代わりに KnockOut Serum Replacement (KSR) を用いることにより、ES 細胞の分化能が保持されやすいことが明らかにされている。(Bryja et al., 2006; Cheng et al., 2004; Davies and Fairchild, 2012)。そこで、MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、KSR を含む培地 (GMEM +KSR; +LIF) 及び KSR を含む培地に 2i を添加した培地 (GMEM +KSR; +LIF; +2i) で 5 日間培養し、2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、通常の FCS を含む培地を用いた場合では、0.27-036%の細胞が 2 細胞期様細胞だったが、KSR を含む培地で培地交換をしない条件下では、5 日後には約 22%の細胞が 2 細胞期様細胞へと変換された (図 4)。しかし、KSR を含む培地で毎日培地交換を行うと 2 細胞期様細胞への誘導は著しく阻害された (図 4)。さらに、KSR を含む培地に 2i を添加した培地においても、2 細胞期様細胞への誘導が著しく阻害された (図 4)。これらのことから、KSR を含む培地で培地交換をせずに 5 日間培養することにより、ES 細胞において効率よく 2 細胞期様細胞が誘導できることが明らかとなった。

FCS を KSR に置換した培地を用いることにより、効率よく MuERV-L 陽性細胞を誘導できることが示されたが、培地交換をしない条件で出現した細胞であり、トリプシン処理したときに、通常の条件で培養した細胞よりも表

面に不規則な凹凸が多く、細胞の状態が悪いことが示唆された。そこで、培地交換のタイミングが 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響を検討した (図 5)。また、KSR を含む培地は FCS を含む培地に比べて細胞の増殖が遅くなるため、KSR を含む培地で培養した後、FCS を含む培地に交換する条件についても検討を行った (図 5)。その結果、KSR を含む培地で培養を開始して、2 日後に KSR を含む培地に交換し、その後 3 日間培地交換を行わない条件では、5 日後に出現する 2 細胞期様細胞は 4.78%~6.19%であった (図 5)。また、KSR を含む培地で培養を開始し、2 日後から毎日 KSR を含む培地に交換した場合にも、5 日後に出現する 2 細胞期様細胞は 4.93%~6.93%であった (図 5)。一方、KSR を含む培地で培養を開始して、2 日後に FCS を含む培地に交換した場合には、3 日後からの培地交換の有無に関わらず、5 日後に出現する 2 細胞期様細胞は KSR を含む培地と比べて顕著に低くなった (図 5)。KSR を含む培地で毎日培地交換を行うと 2 細胞期様細胞への誘導は著しく阻害されたこと (図 4) を考慮すると、KSR には 2 細胞期様細胞を誘導する成分が含まれており、培養開始後少なくとも 2 日間培地を交換しないことが重要であることが示された。

3. KSR に含まれる 2 細胞期様細胞の誘導に関与する成分の同定

KSR の成分は、非公開であり詳細については不明であるが、アスコルビン酸、アルブミン、及びインシュリンが含まれることが示唆されている。iPS 細胞の誘導の研究と試験管内精子形成の研究から、KSR の効果は、それぞれアスコルビン酸と AlbMAX により置換できることが明らかにされている。iPS 細胞を誘導する際に、*Dlk1-Dio3* インプリンティング領域に異所的な DNA メチル化が生じるが、FCS を KSR に置換した培地を用いることにより、DNA のメチル化を抑制できることが報告されている (Stadtfeld et al., 2012)。この *Dlk1-Dio3* インプリンティング領域の異所的な DNA メチル化

は、アスコルビン酸の添加によっても軽減できることから、KSR による DNA メチル化の抑制はアスコルビン酸の効果であると結論されている。一方、成体マウスの精巣から未分化精原細胞を単離し、試験管内で精子形成を行う際に、FCS を用いた場合には減数分裂への移行が阻害されるが、KSR を用いることにより、減数分裂が完了することが明らかにされている(Sato et al., 2011a; Sato et al., 2011b)。この KSR による未分化精原細胞の減数分裂への移行は、AlbMAX に置換できることも明らかにされている(Sato et al., 2011a; Sato et al., 2011b)。AlbMAX は、脂質を多く含むウシ血清アルブミンであることが示唆されている。したがって、KSR の効果は、脂質もしくはウシ血清アルブミンであると考えられている。これらの知見に基づき、アスコルビン酸と AlbMAX が ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響を検討した。ES 細胞の無血清培養系の培地 (N2B27 +2i) を基本培地として、アスコルビン酸と AlbMAX を添加した培地を用いて MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を 5 日間培養した。また、通常 10% で使用する FCS の濃度を 1% と 5% に変える培養条件についても検討を行った。その結果、アスコルビン酸を添加しても、培養 5 日間後において、MuERV-L 陽性細胞は誘導されなかった (図 6)。一方、AlbMAX を添加した場合には、濃度が 20 mg/mL と 30 mg/mL の条件で若干ではあるが MuERV-L 陽性細胞の割合が上昇した。また、AlbMAX を 30 mg/mL、アスコルビン酸を 150 µg/mL 添加した条件においても MuERV-L 陽性細胞の割合が上昇した (図 6)。しかし、いずれの条件においても、KSR の効果には及ばなかった。

次に、KSR の類似品で和光純薬より供給されている StemSure serum replacement (SSR) が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、KSR を用いた条件と同様に SSR を含む培地を用いた場合にも 2 細胞期様細胞が効率よく誘導できることが明らかとなった (図 7)。SSR の成分は KSR と同様に非公開だが、SSR の成分の提供を受け、その成分の中から、

チアミン、アスコルビン酸及びインシュリンが 2 細胞期様細胞の誘導に重要である可能性を考えた（提供元；和光純薬）。この可能性を検証するために、チアミン、アスコルビン酸、またはインシュリンを含まない SSR 培地を用いて、これらの成分が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、アスコルビン酸を含まない SSR 培地では、2 細胞期様細胞の誘導効率が顕著に低下することが示された（図 8）。また、インシュリンを含まない SSR 培地では、2 細胞期様細胞への誘導効率が顕著に増加することが示された（図 8）。一方、チアミンを含まない SSR 培地では 2 細胞期様細胞への誘導効率に影響がなかった（図 8）。このことから、ES 細胞から 2 細胞期様細胞の誘導は、アスコルビン酸により促進され、インシュリンにより抑制されている可能性が示された。一般に、FCS にはインシュリンが含まれている一方で、アスコルビン酸はほとんど含まれていないことが知られている。このことから、FCS を用いて ES 細胞を培養した場合に 2 細胞期様細胞がほとんど誘導されないのは、インシュリンがその誘導を阻害したことが原因であると考えられた。そこで、インシュリンをほとんど含まないチャコールフィルター処理した FCS (C) 、及び透析した FCS (D) にアスコルビン酸を添加することにより、2 細胞期様細胞が誘導できるかどうか検討した。その結果、全ての培地条件において、2 細胞期様細胞がほとんど誘導されないことが明らかとなった（図 9）。これらのことから、血清にはインシュリン以外にも 2 細胞期様細胞への誘導を阻害する成分が含まれていることが示された。

4. ES 細胞と 2 細胞期様細胞における rDNA のメチル化状態の解析

ES 細胞をアスコルビン酸で処理することにより、ゲノムワイドな脱メチル化が誘導されることが知られている (Chung et al., 2010)。そこで、アスコルビン酸による 2 細胞期様細胞の誘導に DNA の脱メチル化が関与するかどうかを検討した。DNA のメチル化解析には大量のゲノムを要するため、真

核生物のゲノム中に 100 コピー以上の繰り返し配列として存在する rDNA のプロモーター領域の DNA メチル化状態について検討した。その結果、ES 細胞と 2 細胞期様細胞では、rDNA のプロモーター領域はともに低メチル化状態にあることが示された (図 10) (Furuta and Nakamura, 2017)。

5. 2 細胞期様細胞の遺伝子発現解析

KSR または SSR を用いて誘導した 2 細胞期様細胞の遺伝子発現パターンを RNA-seq により解析した (図 11)。その結果、ES 細胞と KSR または SSR を用いて誘導した 2 細胞期様細胞では、遺伝子発現が大きく変動していることが示された (図 11)。また、KSR と SSR により誘導された 2 細胞期様細胞の間では非常によく似た発現パターンを示すことも明らかとなった (図 11)。次に、ES 細胞において高発現する多能性マーカー (Oct3/4、Sox2、Nanog、Esrrb、Zfp42、及び Stat3)、分化マーカーである原始内胚葉マーカー (Gata4、及び Gata6) 及び栄養外胚葉マーカー (Cdx2、及び Elf5)、2 細胞期で一過的に発現する遺伝子群 (2 cell genes; Zscan4、Eif1a-like、Tcstv3、Gm6763、及び Tcstv1)、及び当研究室で同定した全能性細胞特異的遺伝子 (Klf17、Btg4、Trim61、Pramef12、Rfpl4、Zbed3、Zc3h6、及び Zfp92) について、ES 細胞で発現する各遺伝子の発現量を基準とした場合に 2 細胞期様細胞で発現する各遺伝子の発現量がどのように変動しているかを RNA-seq のデータをもとに解析した (図 12)。その結果、ほぼ全ての多能性マーカーの発現が KSR と SSR により誘導された 2 細胞期様細胞において著しく低下していた。また、原始内胚葉のマーカー及び栄養外胚葉のマーカーに関しては、今回調べたほぼ全ての遺伝子において、2 細胞期様細胞で顕著に上昇していた (図 12)。さらに、2 細胞期で一過的に活性化する遺伝子群は、過去の報告と同様に 2 細胞期様細胞で強く活性化されていた (図 12)。全能性細胞特異的遺伝子に関しては、Klf17、Btg4、Rfpl4、Zfp92 の 4 種類の遺伝子において、2 細胞期

様細胞で有意に発現が上昇していた (図 12)。また、qRT-PCR により、特定の遺伝子群の発現について検討したところ、今回調べたほぼ全ての遺伝子において 2 細胞期様細胞で RNA-seq により得られた結果の再現性が得られた (図 13)。これらのことから、2 細胞期様細胞では、多能性マーカーの発現が低下し、原始内胚葉、栄養外胚葉、2 細胞期で一過的に発現する遺伝子群、及び大部分の全能性細胞特異的遺伝子群の発現が上昇することが明らかとなった。

6. 全能性細胞特異的遺伝子が 2 細胞期様細胞の誘導に与える影響

2 細胞期様細胞において発現が上昇することが明らかになった全能性細胞特異的遺伝子 (Klf17、Rfp14、Trim61、Pramef12、及び Btg4) が ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換に影響を与えるかどうかを検討した。そのため、MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞に各遺伝子を doxycycline (Dox) 依存的に発現が誘導できるベクターを遺伝子導入した。また、各遺伝子の cDNA の後に自己消化ペプチドである P2A と Venus をコードする遺伝子を組み込み、各遺伝子の発現を Venus の蛍光によりモニターできるようにした。これらの ES 細胞を、KSR を含む培地で Dox を添加して 5 日間培養し、各遺伝子が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、2 細胞期様細胞がほとんど誘導されない FCS を含む培地条件下において、全能性細胞特異的を発現させて 5 日間培養しても、2 細胞期様細胞はほとんど誘導されなかった (図 15-20)。また、KSR を含む培地条件下では、2 細胞期様細胞の誘導は認められたが、全能性細胞特異的遺伝子が発現している Venus 陽性細胞において 2 細胞期様細胞の割合は増加していなかった (図 21-26)。これらのことから、全能性細胞特異的遺伝子は、少なくとも単独で発現させても、2 細胞期様細胞の誘導には影響を与えないことが示された。

考察

本研究では、MuERV-L の発現を指標にして ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞を可視化するシステムを構築した。図 3 に示すように、MuERV-L の発現を制御する LTR の制御下で tdTomato を発現するコンストラクトは、内在性の MuERV-L と同様に 2 細胞期胚で活性化することを明らかにした。このコンストラクトを用いて ES 細胞の安定細胞株を得たところ、過去の報告通り、非常に低い割合で MuERV-L 陽性細胞が存在することが明らかとなった (図 3) (Macfarlan et al., 2012)。次に、ES 細胞の未分化性を高める阻害剤や ES 細胞の分化能を維持するために開発された KSR を含む培地を作製し、2 細胞期様細胞を効率よく誘導できる培養条件の検討を行った。その結果、KSR を含む培地で 5 日間培養することにより 2 細胞期様細胞を効率よく誘導できることが明らかとなった (図 4)。次に、SSR を用いた場合にも KSR と同程度の高効率で 2 細胞期様細胞を誘導できることが明らかとなった (図 7)。また、特定の成分を除去した SSR を用いた解析から、2 細胞期様細胞への変換はアスコルビン酸により促進され、インシュリンにより阻害されることが明らかとなった (図 8)。

ES 細胞をアスコルビン酸で処理するとゲノムワイドな脱メチル化を生じることが知られているため (Chung et al., 2010)、ES 細胞と 2 細胞期様細胞において rDNA のプロモーター領域の DNA メチル化状態を検討した。しかし、ES 細胞と 2 細胞期様細胞の rDNA のプロモーター領域はともに低メチル化状態であり、この領域に関してはメチル化状態に変化は認められなかった (図 10) (Furuta and Nakamura, 2017)。一般に、アスコルビン酸は、コラーゲン合成、カテコールアミン合成、カルニチン合成などにおける補因子としての生理活性が知られていたが、近年 DNA の 5-メチルシトシン (5mC) を 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に変換する脱メチル化酵素である Ten-eleven translocation (TET) の補因子であることが報告された (Tahiliani et al.,

2009)。TET は、2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2OGD) の一種であり、その活性中心にはヘム鉄の鉄イオン (Fe^{2+}) が結合しており、酵素反応には Fe^{2+} 、 α -ケトグルタル酸 (α -KG) 及び分子状酸素 (O_2) が必要である。アスコルビン酸は、この Fe^{2+} の還元状態を維持することによって TET 活性を上昇させ、DNA の脱メチル化を促進する。また、Jumonji C (JmjC) ドメイン含有ヒストン脱メチル化酵素 (JHDM) は、ヒストンのメチル化リシンの脱メチル化反応を触媒する一群の酵素である。HDM も 2OGD の 1 種であり、アスコルビン酸は JHDM 活性も TET と同様のメカニズムで調節すると考えられている (Chung et al., 2010; Cimmino et al., 2018)。アスコルビン酸で処理した ES 細胞は大量に得ることができるため、今後アスコルビン酸で処理した ES 細胞において 2 細胞期様細胞の誘導に関与することが明らかにされている *Dux* や 2 細胞期様細胞への変換に必須であることが報告されている *Dppa2/3* のプロモーター領域の DNA メチル化やヒストン修飾について検討する必要があると考えられる (De Iaco et al., 2019; De Iaco et al., 2017; Eckersley-Maslin et al., 2019; Hendrickson et al., 2017; Whiddon et al., 2017)。

FCS に含まれるインシュリンはセリン・スレオニンキナーゼである Akt (Protein kinase B; PKB) を活性化することが知られているが (Brazil et al., 2004; Manning and Toker, 2017)、当研究室の先行研究により、ES 細胞において、Akt を活性化した場合には、2 細胞期様細胞の誘導が顕著に阻害されることが明らかとなっている (柿原礼佳、卒業論文、2017)。これらのことから、インシュリンを含む培地で培養した ES 細胞では、Akt が活性化し、その下流分子により 2 細胞期様細胞への変換が阻害されている可能性が考えられる。今後、Akt の下流で働く分子を解析することにより、インシュリンによる 2 細胞期様細胞への変換阻害の分子機構が解明できると考えられる。

ES 細胞は、GSK3 と Erk の阻害剤 (2i) の存在下では、分化能が高い naïve

型の ES 細胞に変換されることが知られている(Ying et al., 2008)。また、ES 細胞において Akt を活性化すると、LIF 非存在下で未分化性が維持され(Watanabe et al., 2006)、体細胞から iPS 細胞の樹立効率が上昇することが明らかにされている(Yu et al., 2014)。しかし、これらの多能性を維持するために重要な培養条件では ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換は誘導されず、むしろ阻害されるという結果が得られた。このことから、2 細胞期様細胞への変換には GSK 及び Erk シグナルの活性化と Akt シグナルが抑制されることが重要であることが考えられる。また、GSK3 及び Erk シグナルの抑制や Akt の活性化は多能性幹細胞の分化だけではなく、より未分化な特性を持つ 2 細胞期様細胞への脱分化も抑制することが示唆された。次に、インシュリンが 2 細胞期様細胞の誘導を阻害することが明らかとなったため、インシュリンをほとんど含まない FCS (C) 及び FCS(D) において、アスコルビン酸が 2 細胞期様細胞の誘導に与える影響を検討した。その結果、FCS にはインシュリン以外にも 2 細胞期様細胞の誘導を阻害する成分が含まれている可能性を示した(図 9)。FCS (C) は、Charcoal/Dextran 処理により、ホルモンや成長因子の含有量を低下させた血清であり、この処理により除去された成分の中で SSR と共通していたのはインシュリン、チアミン及びアスコルビン酸だけであった。チアミン及びアスコルビン酸については、FCS にはほとんど含まれていないことが知られている。一方、FCS(D) は分子量が 10 kDa 以下の分子を透析で除去した血清あり、分子量が約 5.8 kDa のインシュリンは除去されていると考えられる。これらのことから、Charcoal/Dextran 処理や透析により除去された成分の影響については、今後の検討が必要であるが、FCS にはインシュリン以外にも 2 細胞期様細胞の誘導を阻害する成分が含まれていること可能性が高いと考えられる。

受精卵では、受精前から持ち越された母性 RNA が存在し、当研究室で同定した全能性細胞特異的遺伝子は、受精前から発現していることが明らかに

されている (Leung and Zernicka-Goetz, 2015; Lu and Zhang, 2015; Morgani and Brickman, 2014; Wu et al., 2017; Zhou and Dean, 2015) (図 14)。2 細胞期胚では、MuERV-L を含む 2 細胞期で一過的に発現する遺伝子群の発現が起こり、8 細胞期胚では、エピブラストのマーカ、原始内胚葉のマーカ、及び栄養外胚葉のマーカが各割球において同時に発現する (図 14)。桑実胚期では、内側と外側に位置する細胞で遺伝子発現に変化が生まれ、それぞれ、エピブラストのマーカと栄養外胚葉のマーカを排他的に発現するようになる (図 14)。初期の胚盤胞期では、エピブラストのマーカを発現する内部細胞塊及び栄養外胚葉のマーカを発現する栄養外胚葉の細胞で原始内胚葉のマーカの発現が認められる (図 14)。中期の胚盤胞期の内部細胞塊では、エピブラストのマーカと原始内胚葉のマーカが同時に発現する細胞がなくなり、後期の胚盤胞期では、内部細胞塊の細胞は、胞胚腔に接した単層の細胞のみが原始内胚葉のマーカを発現するようになり、内部細胞塊、原始内胚葉、及び栄養外胚葉が形成される (Leung and Zernicka-Goetz, 2015; Lu and Zhang, 2015; Morgani and Brickman, 2014; Wu et al., 2017; Zhou and Dean, 2015) (図 14)。KSR を用いて誘導した 2 細胞期様細胞では、多能性マーカの発現が低下し、原子内胚葉、栄養外胚葉、2 細胞期で一過的に発現する遺伝子群、及び大部分の全能性細胞特異的遺伝子の発現が上昇することが示された (図 12、13)。当研究室で同定した全能性細胞特異的遺伝子は、受精卵から桑実胚期の間で特異的に発現する遺伝子として同定されているが、その多くは、4 細胞期以降に急激に発現が低下する。これらのことから、KSR により誘導された 2 細胞期様細胞は初期発生過程で生じる細胞とは違い、2~8 細胞期の遺伝子発現を兼ね備えた細胞集団が混在している可能性が示唆された (図 14)。この可能性については、単一細胞解析を行うことにより、さらに検討する必要があると考えられる。

iPS 細胞は、体細胞に ES 細胞で特異的に発現する遺伝子を導入すること

により誘導される(Takahashi and Yamanaka, 2006)。そこで、ES 細胞に 2 細胞期様細胞で発現が上昇していた全能性細胞特異的遺伝子を発現させ、2 細胞期様細胞を誘導できるかどうかを検討した(図 15-26)。しかし、単独で発現させた場合には 2 細胞期様細胞を誘導できないことが示された。iPS 細胞の誘導にも 4 種類の遺伝子が必要であることから、今後複数の全能性細胞特異的遺伝子を同時に導入することにより、2 細胞期様細胞が誘導できるかを検討する必要があると考えられる。

造血幹細胞は、KSL (c-Kit+, Sca-1+, Lin-; B220-, CD4-, CD8-, Gr-1-, Mac-1-, Ter119-) という、8 個のマーカーを用いて選別した時にのみ、1 個の細胞から、全ての血液細胞を生み出せる“真の幹細胞”を同定できることが明らかにされている(Krause et al., 2001; Sharkis et al., 2001)。一方で、*miR34a* をノックアウトすることにより誘導された 2 細胞期様細胞では、1 個の細胞を桑実胚に移植した場合に、胚盤胞期において内部細胞塊と栄養外胚葉の両方に寄与できるのは約 4 割の細胞であり、約 6 割の細胞は全能性細胞ではないことが報告されている(Choi et al., 2017)。これらのことから、2 細胞期様細胞を、全能性細胞を含む細胞集団として捉え、さらに複数の別のマーカーで分画することにより 1 個の細胞から将来胚体と胚体外を形成する 2 種類の細胞を生み出す能力を持つ“真の全能性細胞”が同定できるのではないかと考えられる。当研究室で同定した全能性細胞特異的遺伝子の一部は 2 細胞期様細胞で発現していることから、全能性細胞の誘導だけではなく、全能性のマーカーとして利用できる可能性も考えられる。

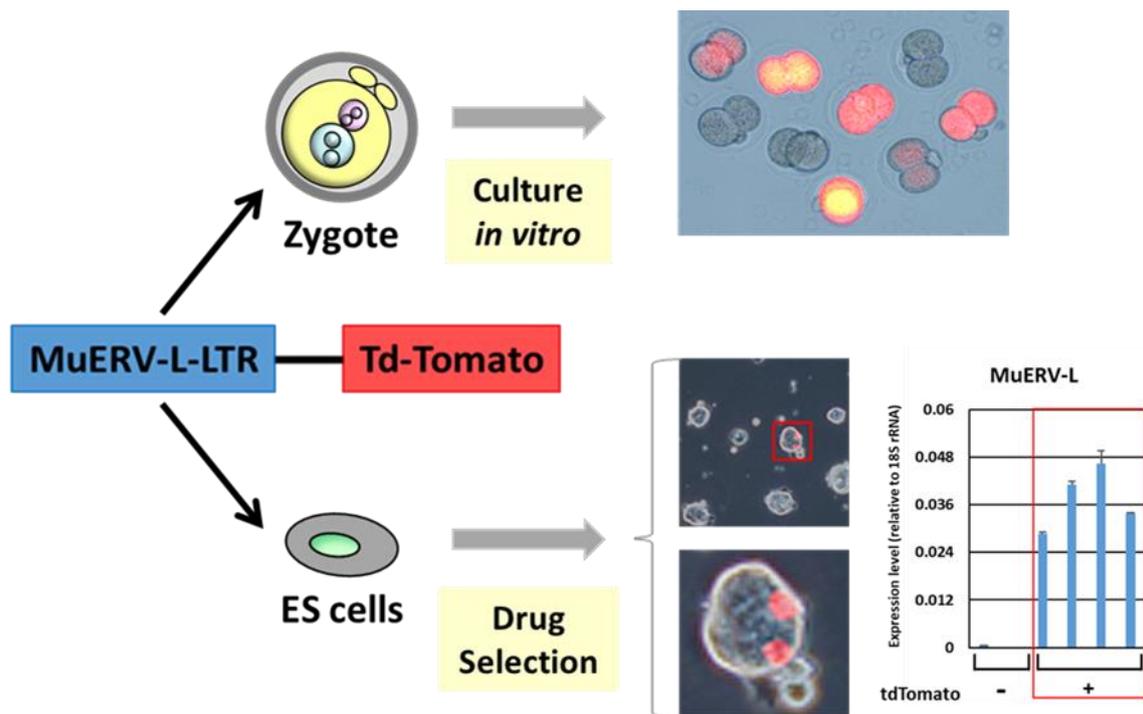


図 3. ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞の可視化

受精卵の雄性前核に MuERV-L の発現を制御する LTR の下流に赤色蛍光タンパク質である、tdTomato をコードする遺伝子を繋いだコンストラクト (2C::tdTomato) をマイクロインジェクションし、2 細胞期における tdTomato の発現を検討した (上部写真)。ES 細胞に 2C::tdTomato を遺伝子導入し、薬剤選択により安定細胞株を作製した (下部写真)。tdTomato 陽性細胞をソーティングし、qRT-PCR をより内在性の MuERV-L の発現を確認した。(下部グラフ)。

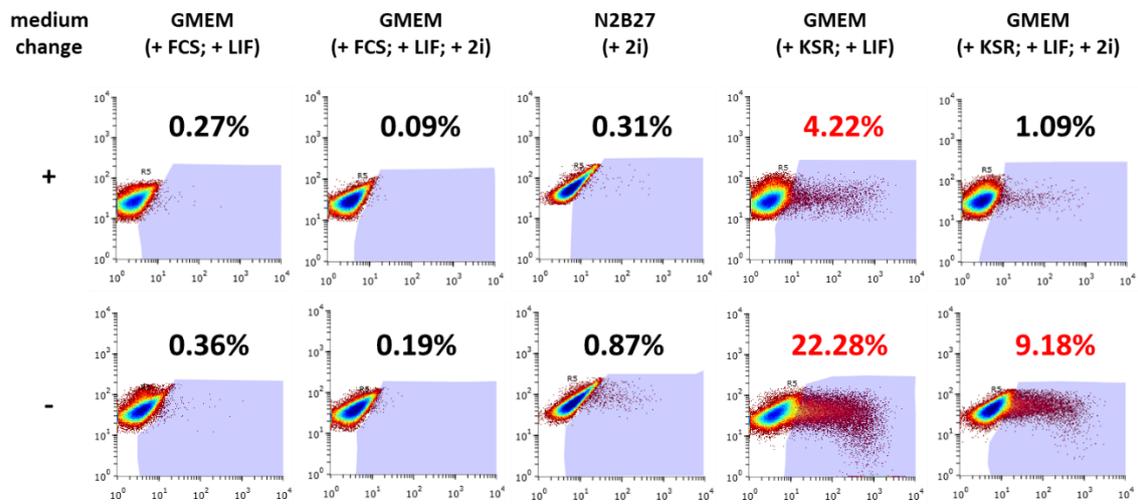


図 4.2 細胞期様細胞を効率よく誘導できる培養条件の検討

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、様々な培地中で 5 日間培養し、tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

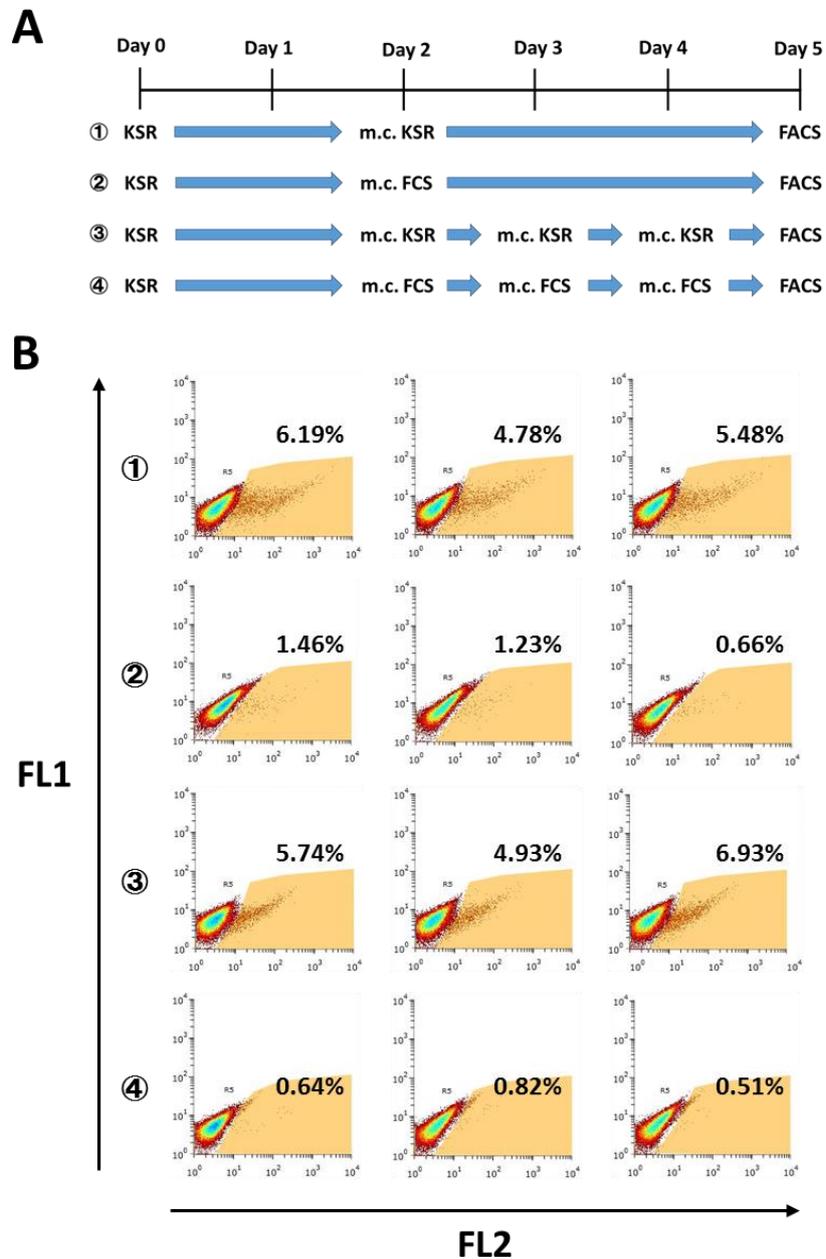


図 5. 培地交換のタイミングが 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響。

(A) 培地交換のタイミング。

(B) MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、KSR を含む培地で培養を開始し、(A) に示すタイミングで培地交換を行い、培養 5 日目の tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

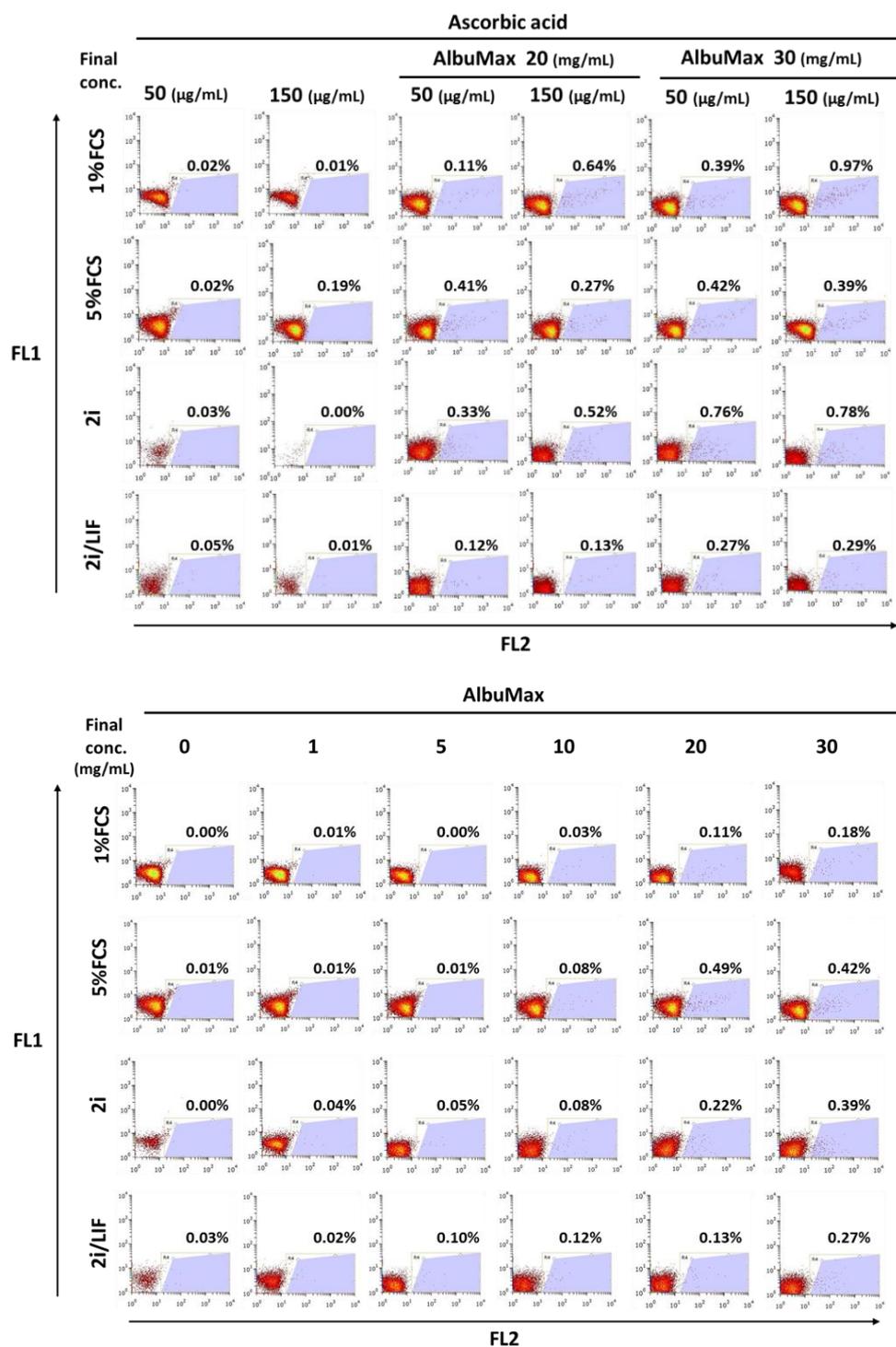


図 6. アスコルビン酸と AlbMAX が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、1% FCS、5% FCS、2i、または 2i/LIF を含む培地に様々な濃度の Ascorbic acid または AlbMAX を含む培地で 5 日間培養し、tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

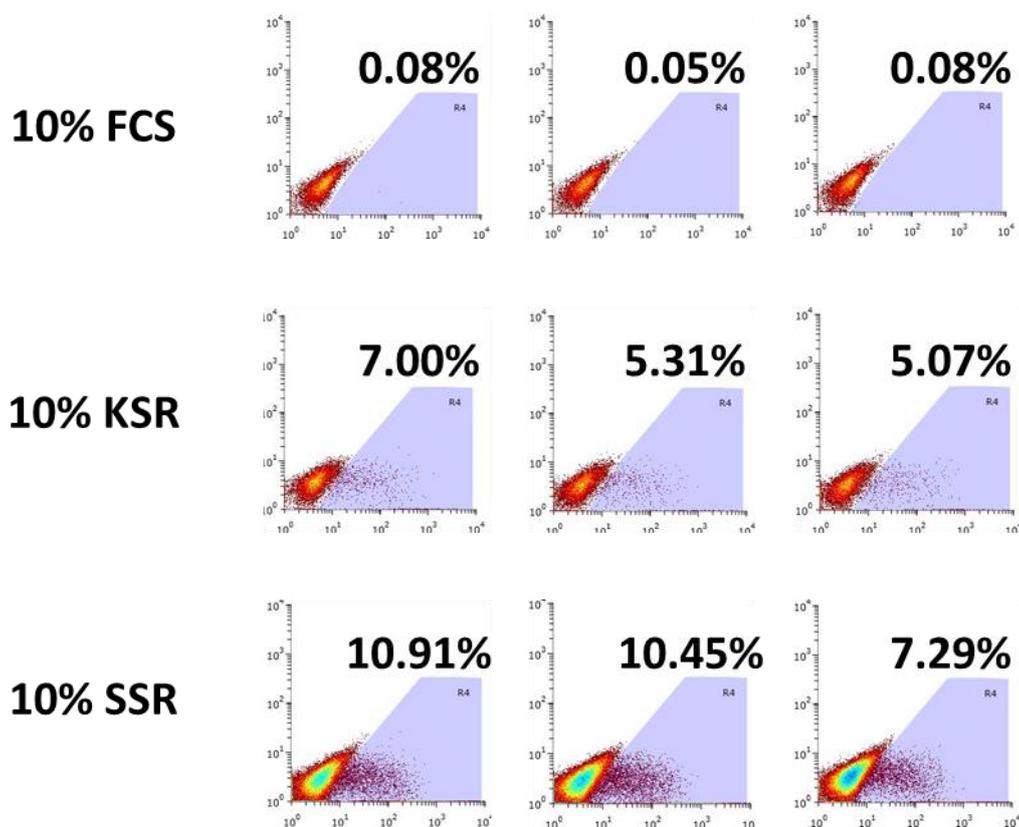


図 7. SSR が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% FCS、10% KSR、または 10% SSR を含む培地で 5 日間培養し、tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

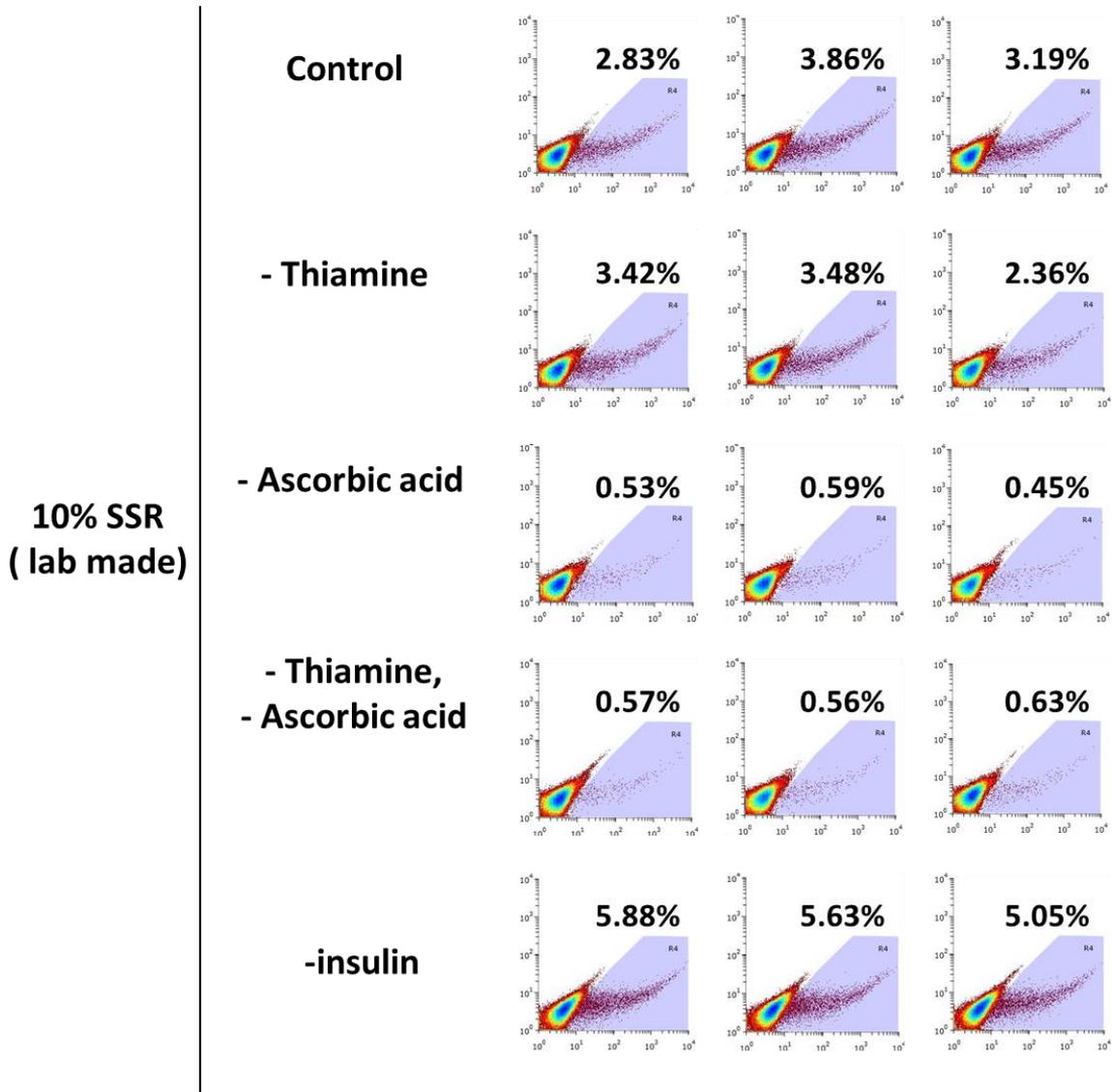
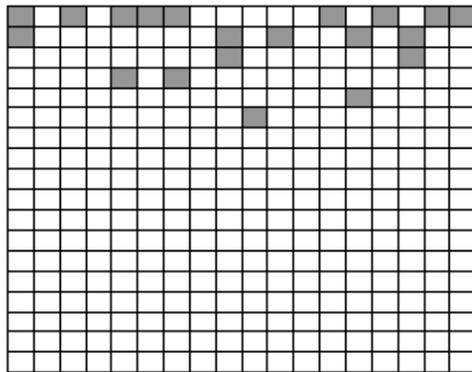


図 8. チアミン、アスコルビン酸、およびインシュリンが 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、チアミン、アスコルビン酸、またはインシュリンを除いた SSR を含む培地で 5 日間培養し、tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

ES (5.9%)



2-cell like cells (1.9%)

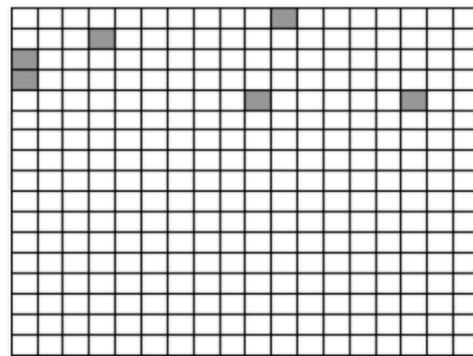


図 10.2 細胞期様細胞における rDNA プロモーター領域のメチル化状態
MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR 含む培地で 5 日間培
養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングした後、bisulfite-sequencing により
ゲノムのメチル化状態を検討した。メチル化 DNA は黒塗りで示した。

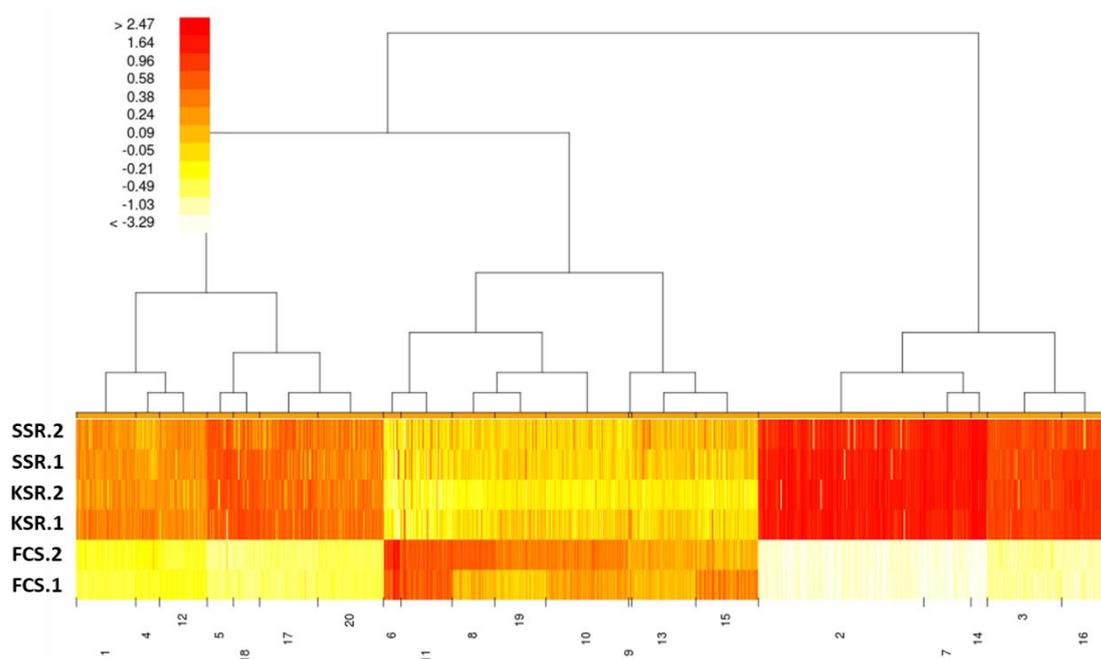


図 11. FCS で培養した ES 細胞と KSR 及び SSR により誘導された 2 細胞期様細胞におけるトランスクリプトーム解析

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR または 10% SSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングした後、RNA-seq を行った。MuERV-L を発現していない細胞として、FCS を含む培地で培養した MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を用いた。

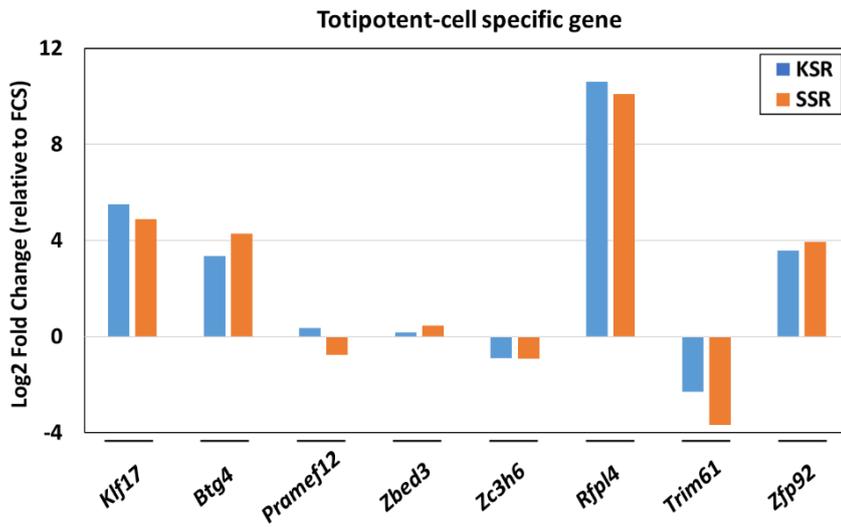
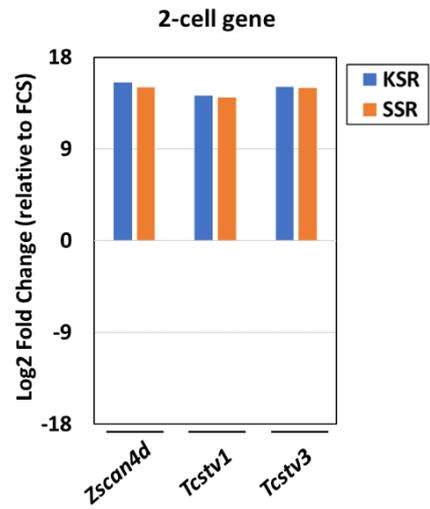
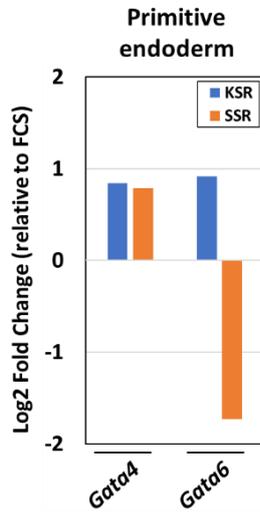
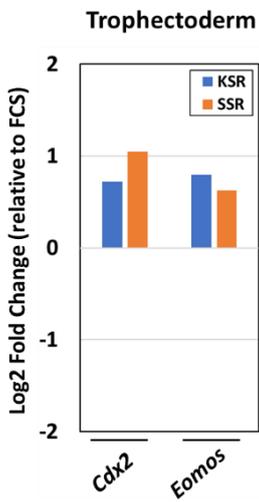
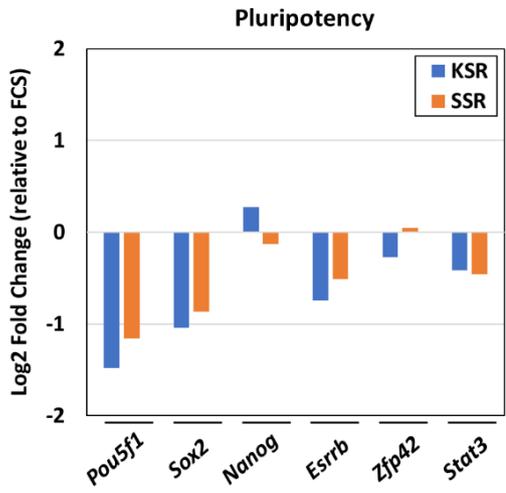
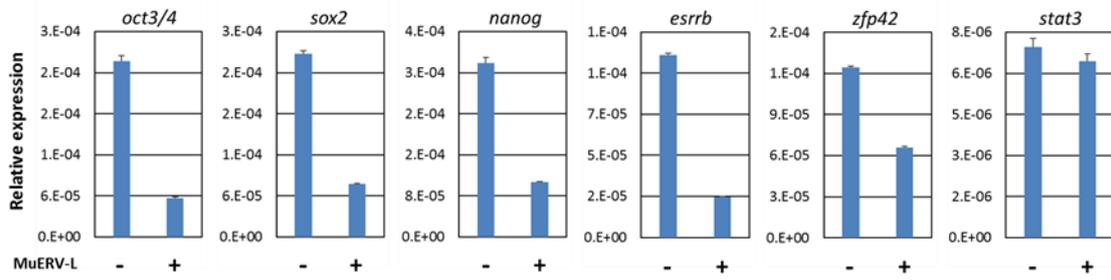


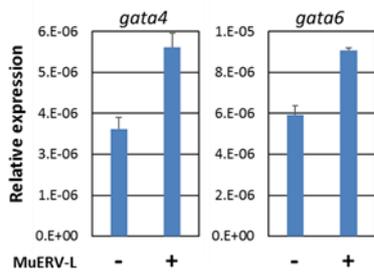
図 12.2 細胞期様細胞におけるマーカー遺伝子の発現量の変動

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR 及び 10% SSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングした後、各マーカー遺伝子の発現を RNA-seq により解析した。2 細胞期様細胞における各マーカー遺伝子の発現を、ES 細胞を基準として示した。

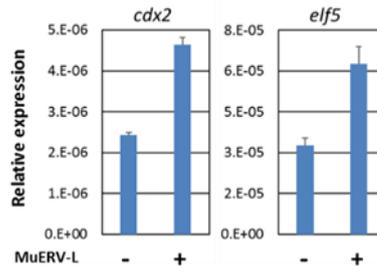
Pluripotency



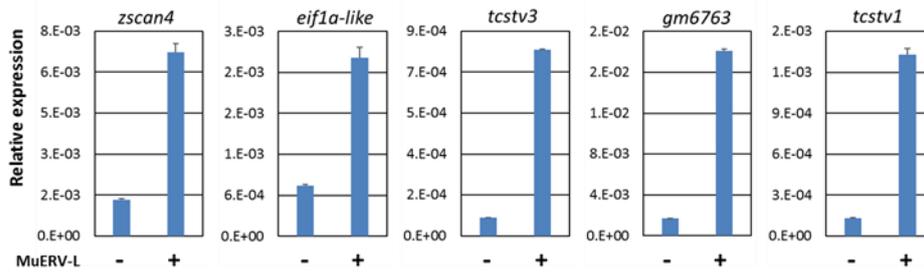
Primitive endoderm



Trophectoderm



2 cell genes



Totipotent-cell specific factors

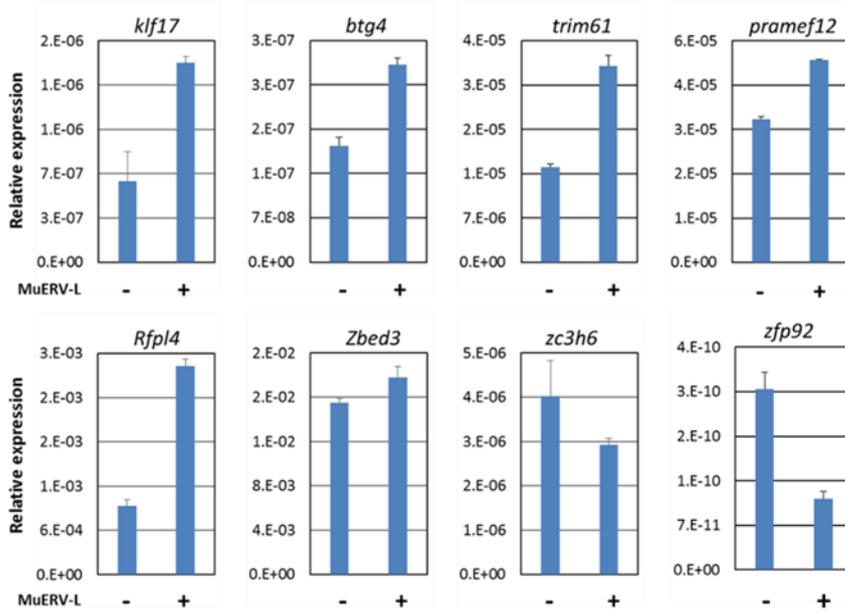


図 13.2 細胞期様細胞におけるマーカー遺伝子の発現

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングした後、各マーカー遺伝子の発現を qRT-PCR で解析した。

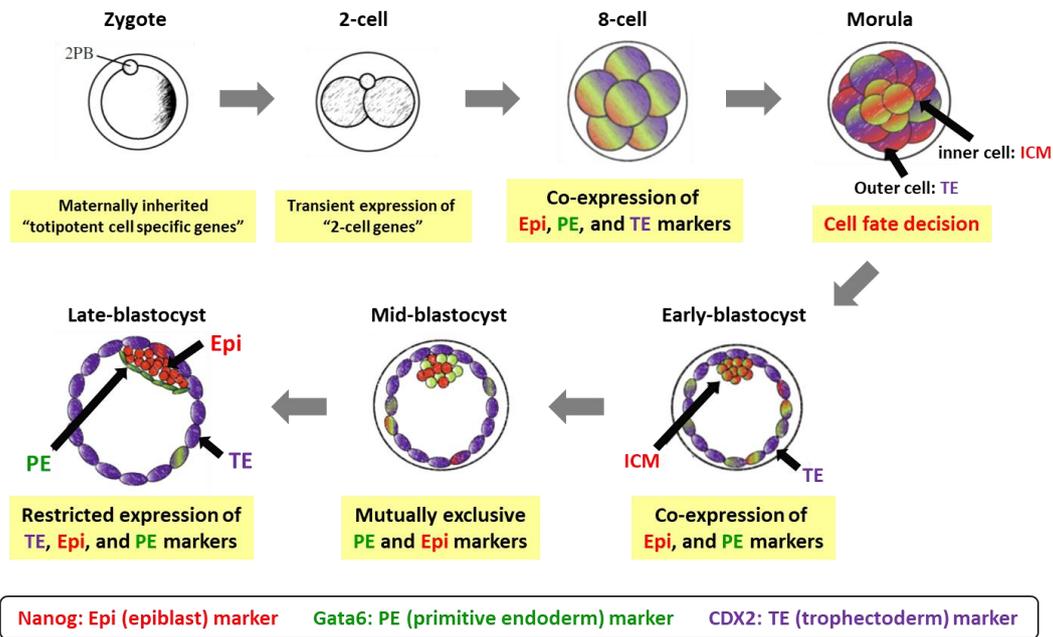


図 14. 初期の着床前胚の発生における遺伝子発現パターンの変化

受精後、受精卵は、未受精卵から持ち越された、全能性細胞特異的遺伝子を含む母性 RNA が発現する。当研究室での先行研究では、これらの遺伝子は桑実胚期までに抑制されることが明らかにされている。2 細胞期では、2-cell genes が一過的に発現し、8 細胞期では、エピブラストのマーカである Nanog, プリミティブエンドダーム (PE) のマーカである Gata6, トロフェクトダーム (TE) のマーカである Cdx2 が同一の細胞で共発現する。桑実胚期では、内側の細胞は内部細胞塊 (ICM) に、外側の細胞は TE に発現が偏る。初期の胚盤胞期では、エピブラストと PE マーカーが ICM で共発現し、TE マーカーは TE にのみ発現する。中期胚盤胞期になると、エピブラストマーカーと PE マーカーは、ICM の中で相互排他的に発現しはじめ、後期胚盤胞ではエピブラストと PE が分離する。

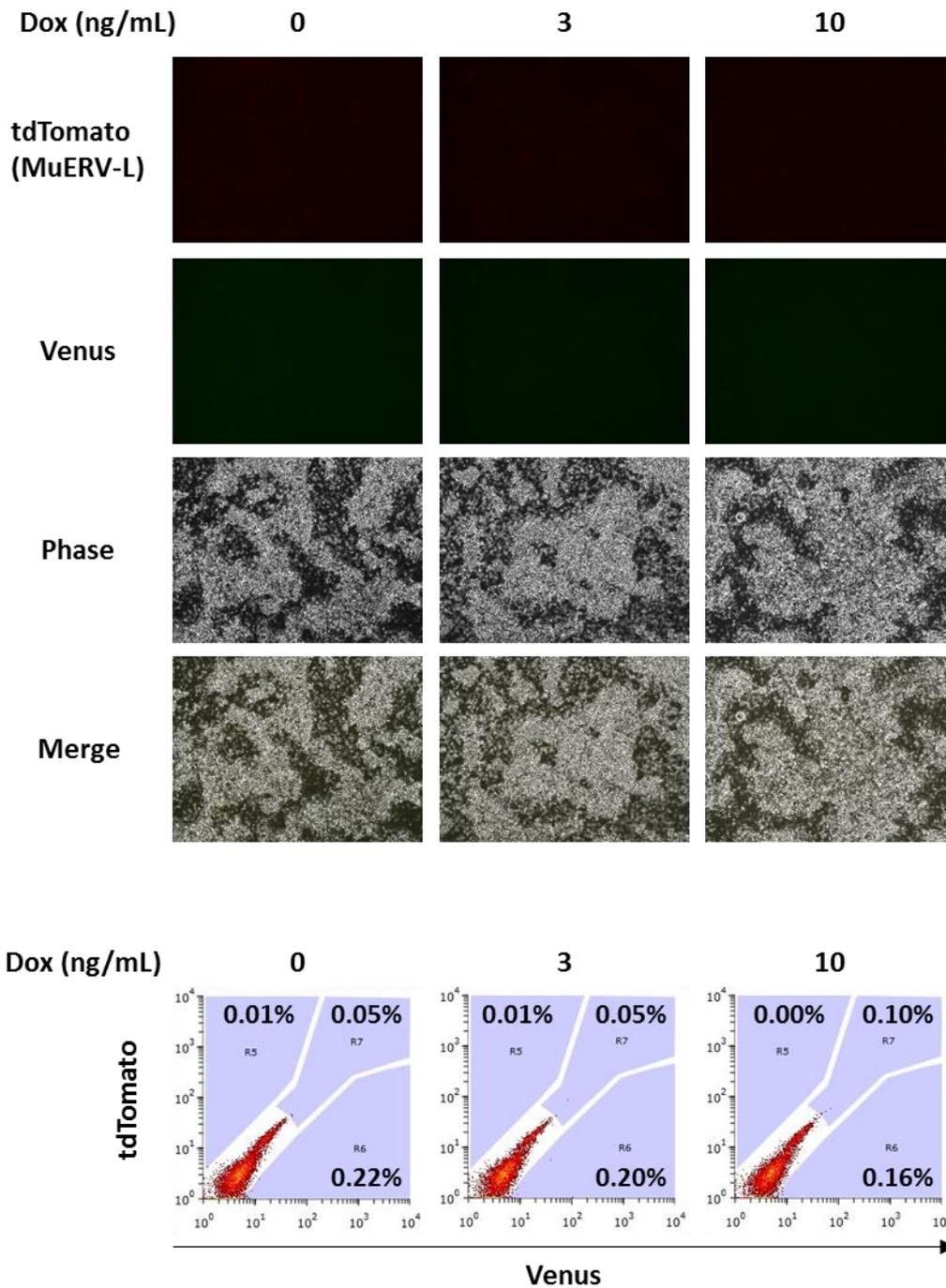


図 15. 全能性細胞特異的遺伝子が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響
 MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% FCS を含む培地に様々な濃度の Dox を含む培地で 5 日間培養し、Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。(ネガティブコントロール)

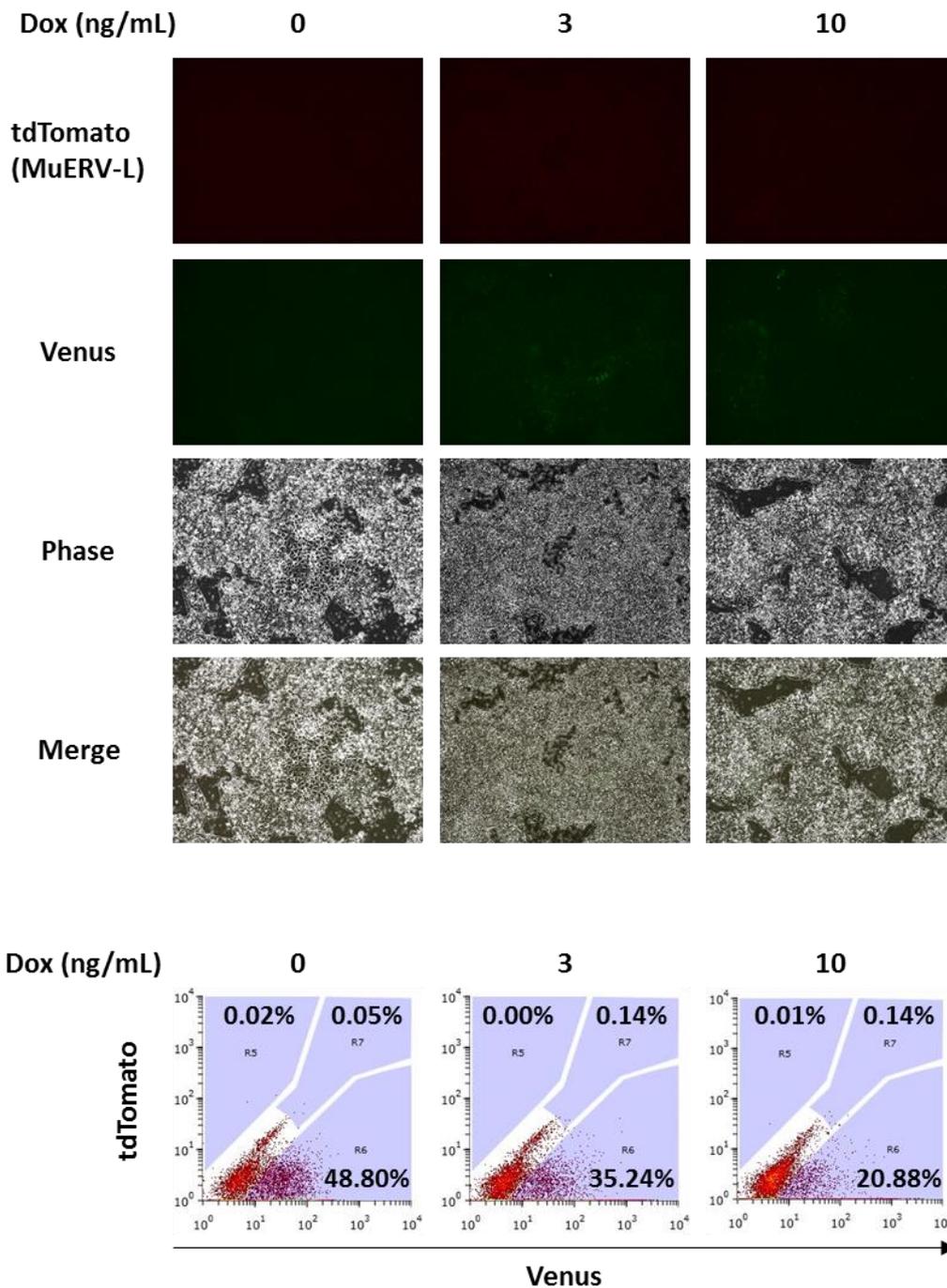


図 16. Klf17 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% FCS を含む培地中で Dox 依存的に Klf17 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

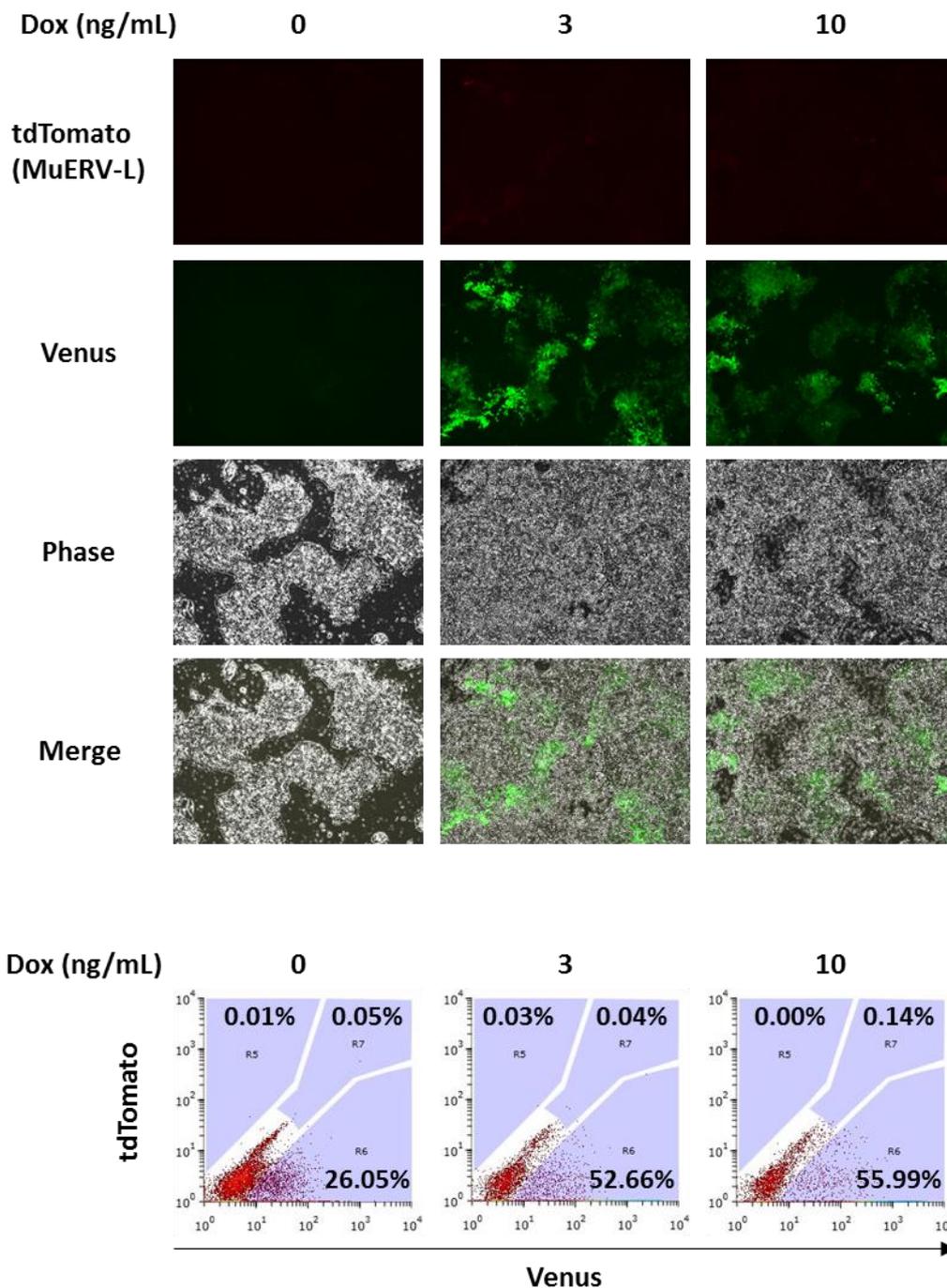


図 17. Rfp14 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% FCS を含む培地中で Dox 依存的に Rfp14 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

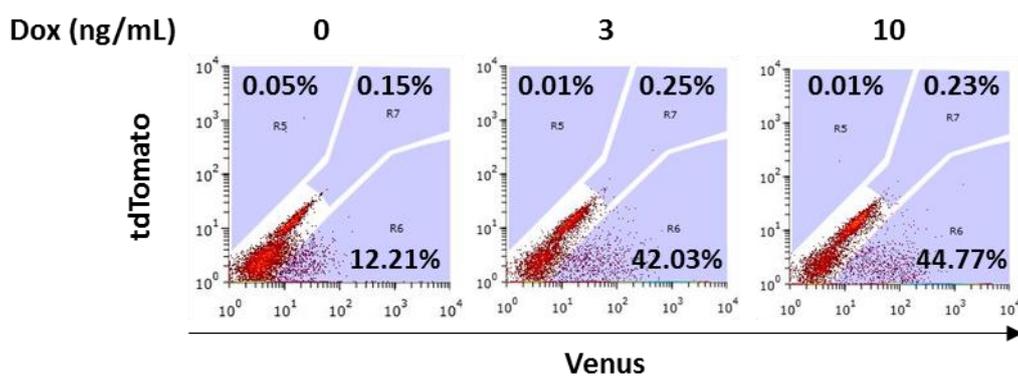
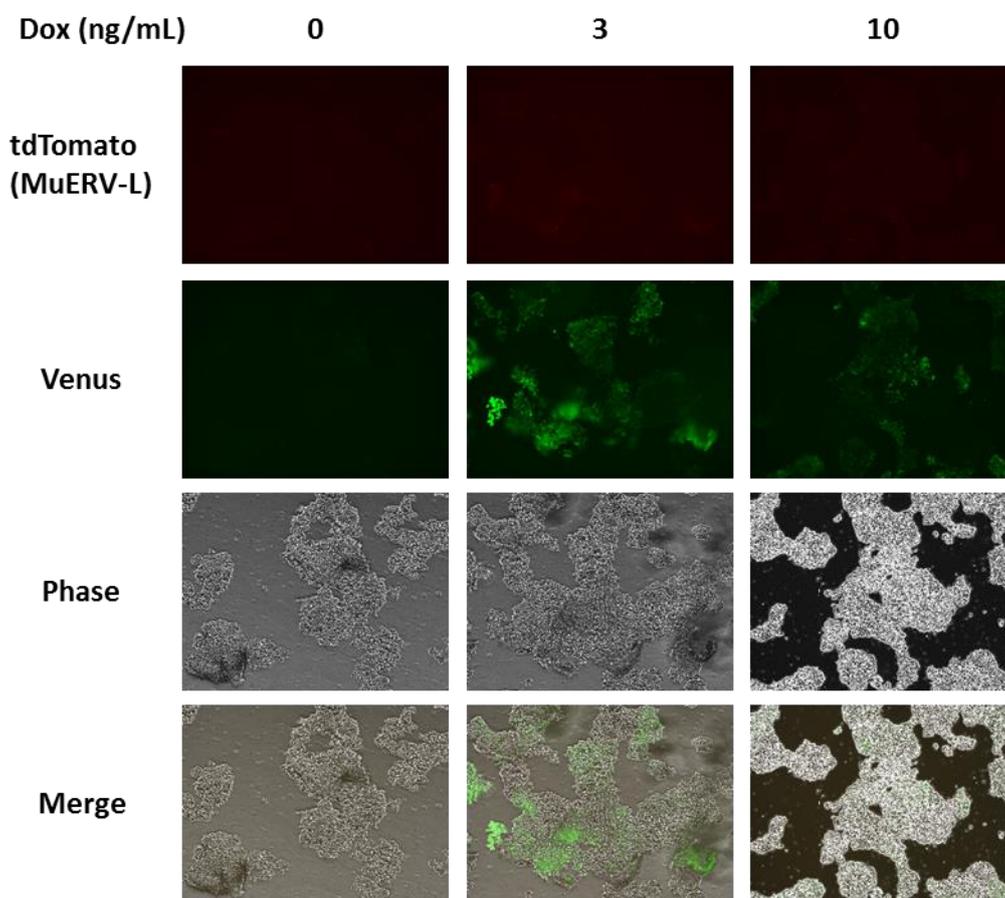


図 18. Trim61 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% FCS を含む培地中で Dox 依存的に Trim61 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

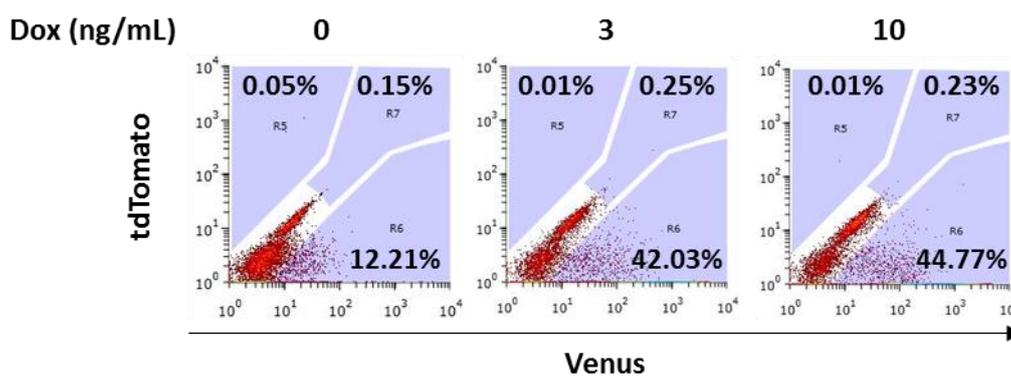
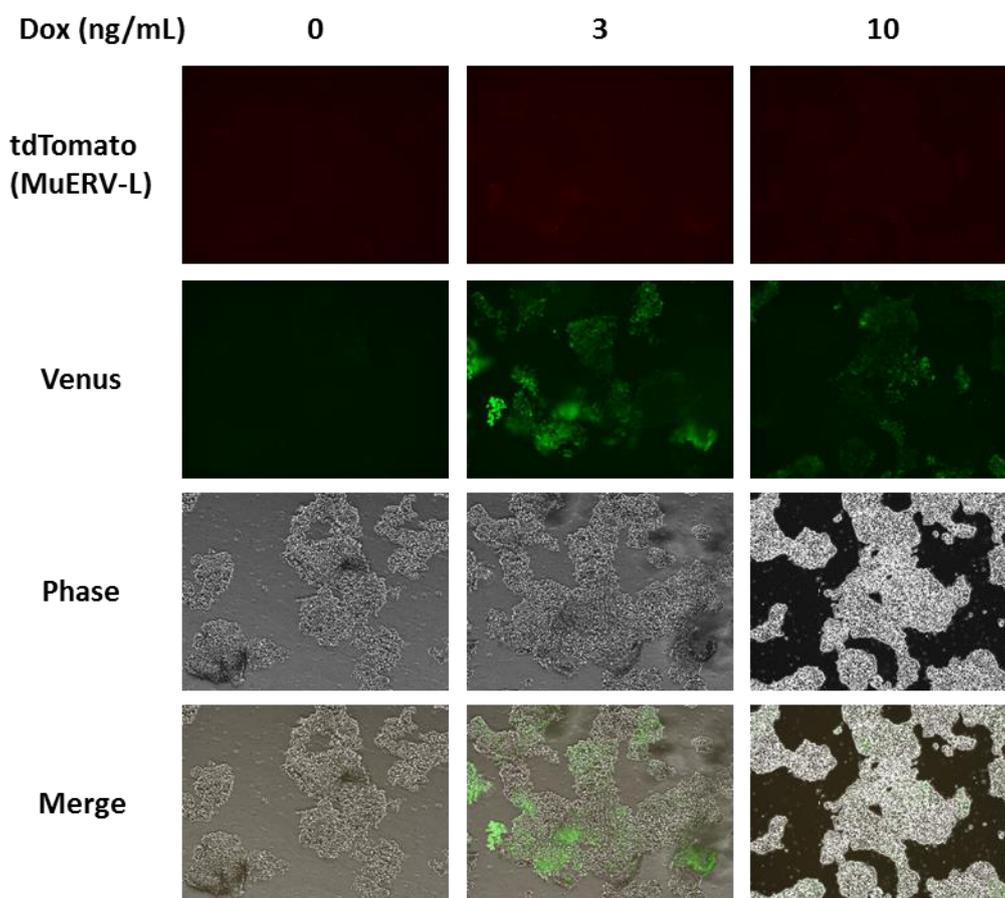


図 19. Pramef12 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% FCS を含む培地中で Dox 依存的に Pramef12 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

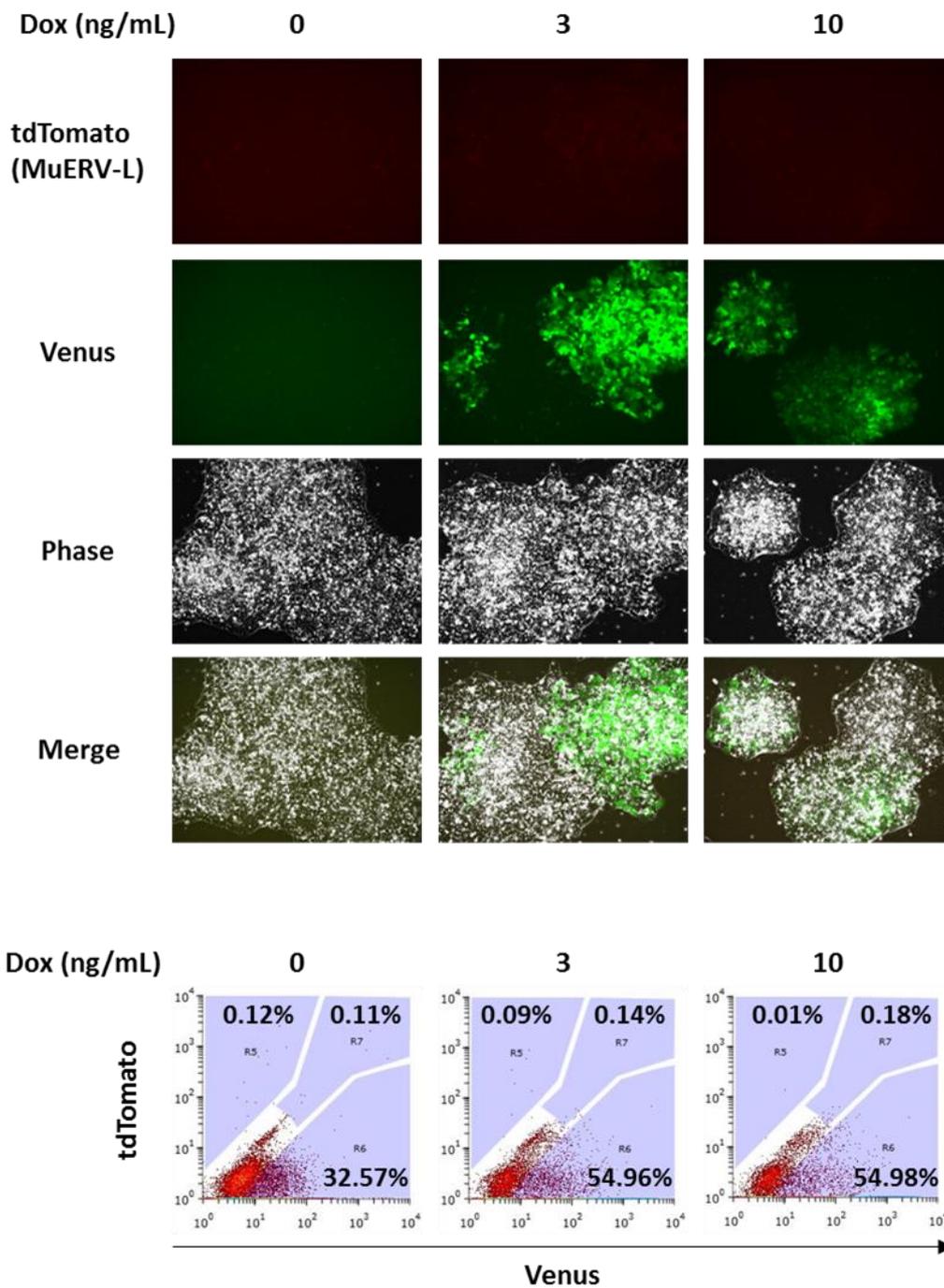


図 20. Btg4 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% FCS を含む培地中で Dox 依存的に Btg4 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

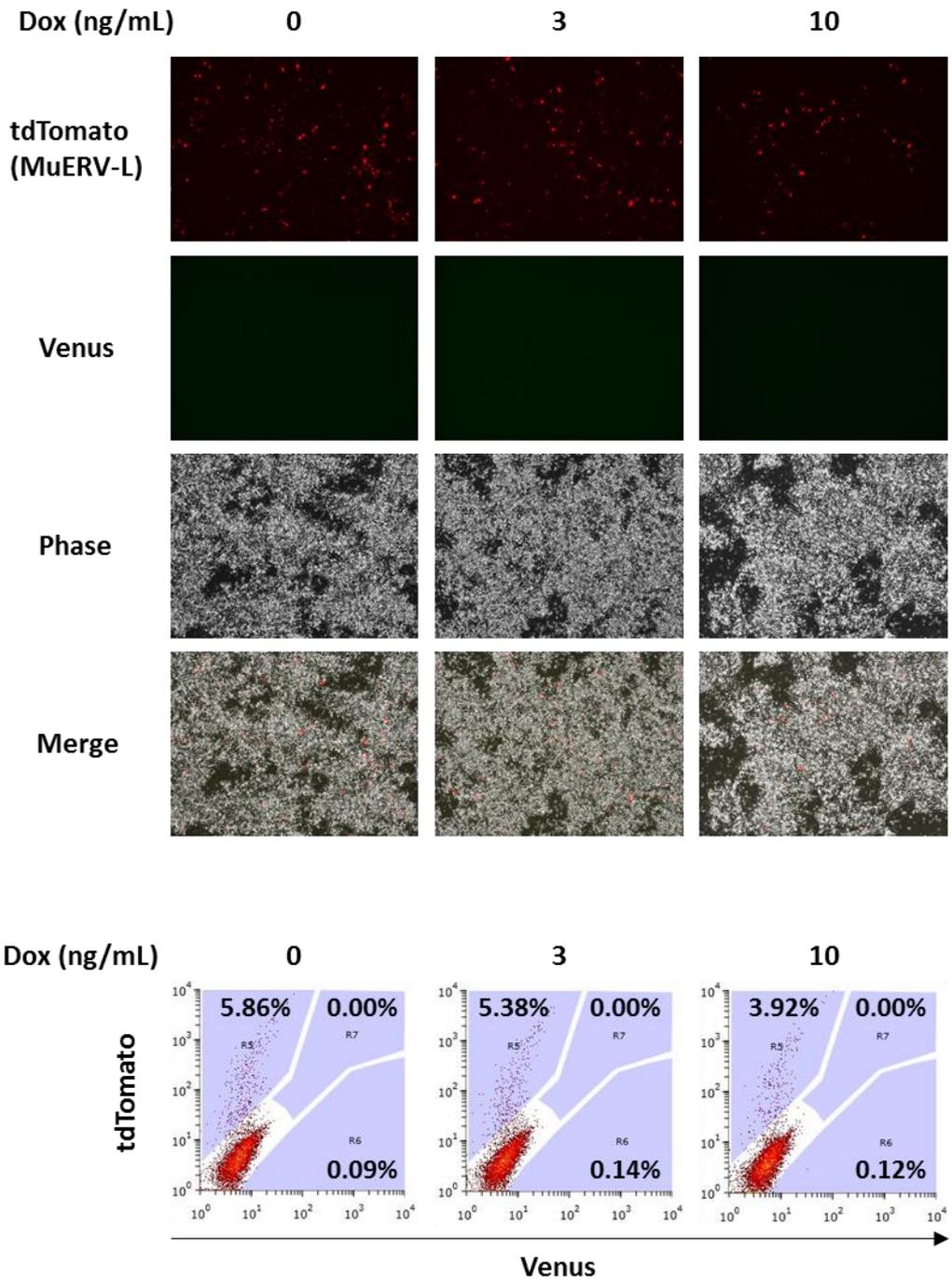


図 21. 全能性細胞特異的遺伝子が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響
 MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR を含む培地に様々な濃度の Dox を含む培地で 5 日間培養し、Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。(ネガティブコントロール)

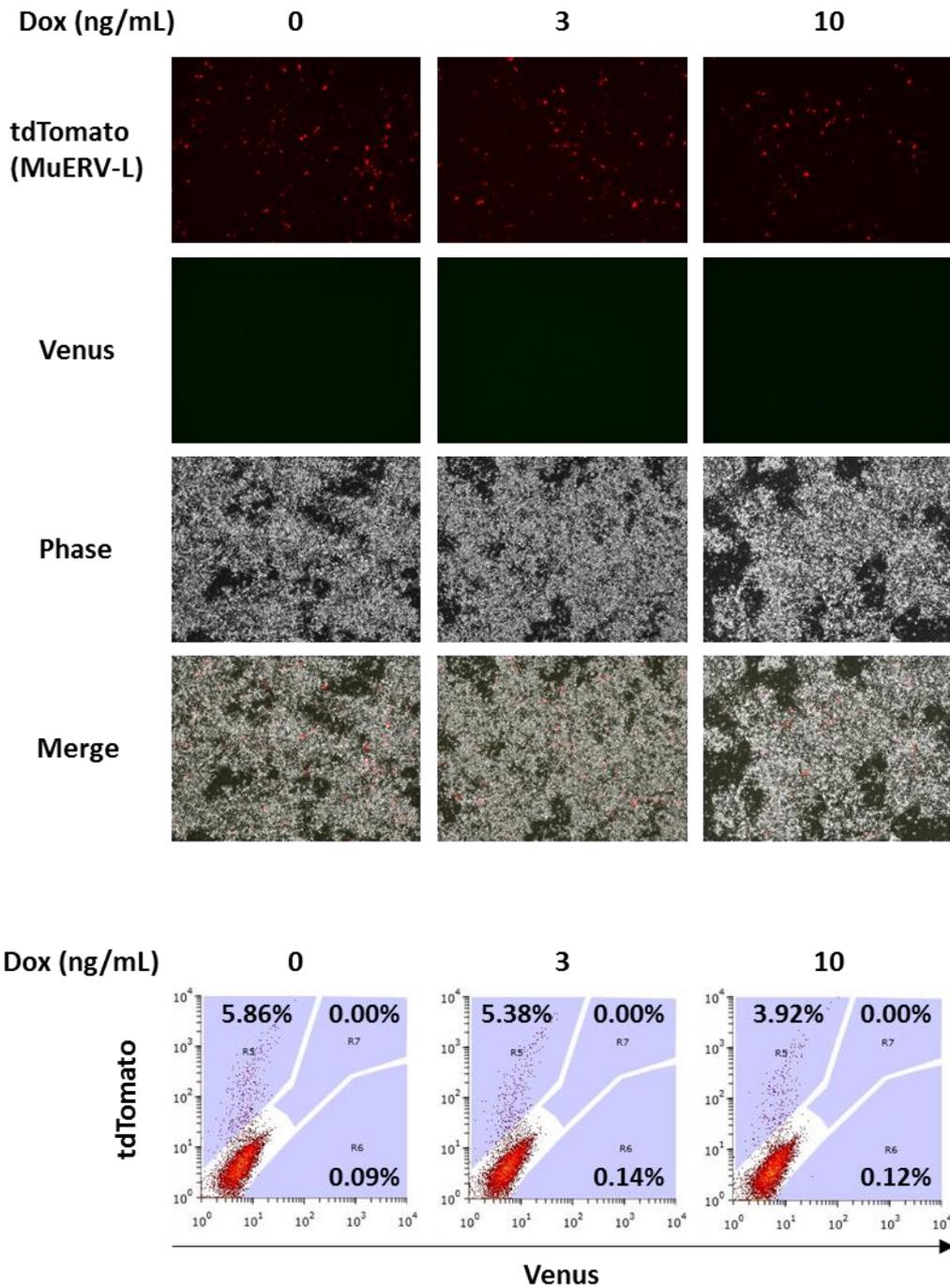


図 22. Klf17 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR を含む培地中で Dox 依存的に Klf17 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

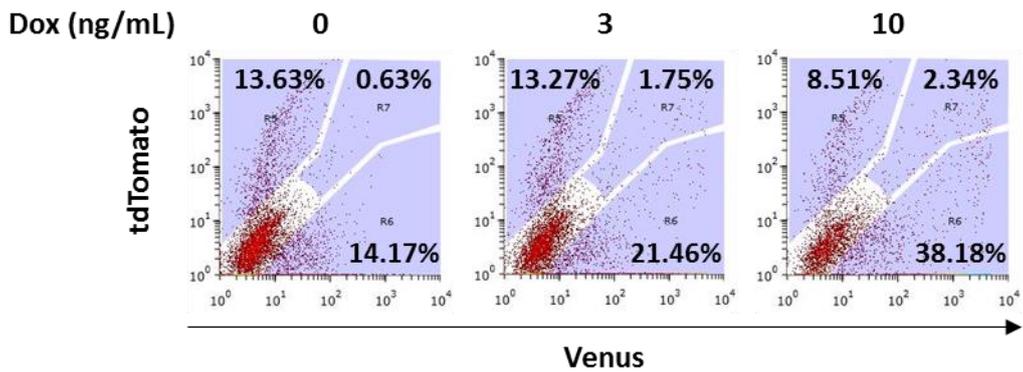
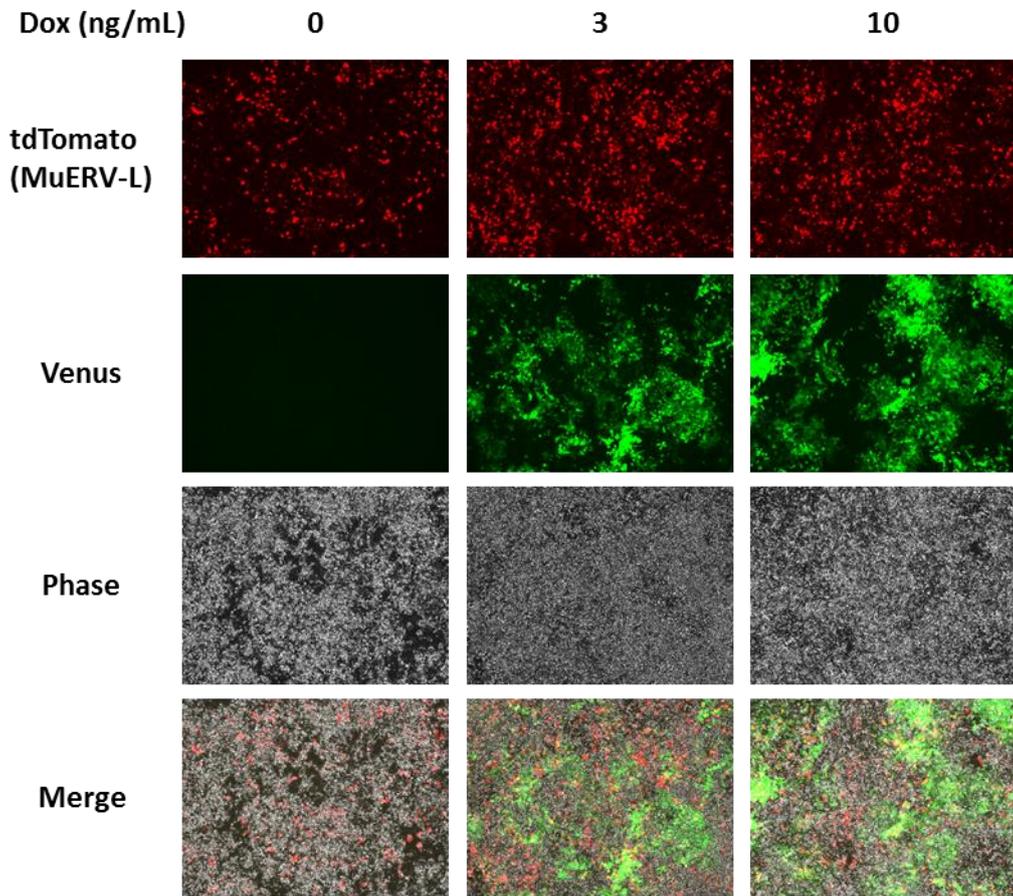


図 23. Rfp14 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR を含む培地中で Dox 依存的に Rfp14 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

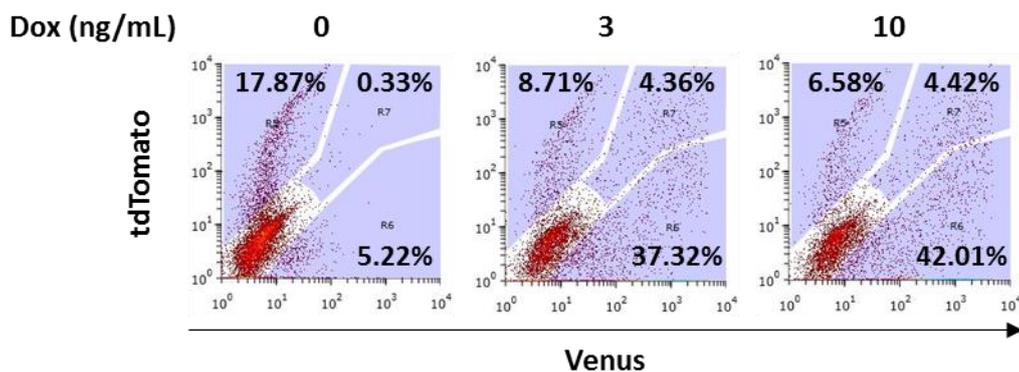
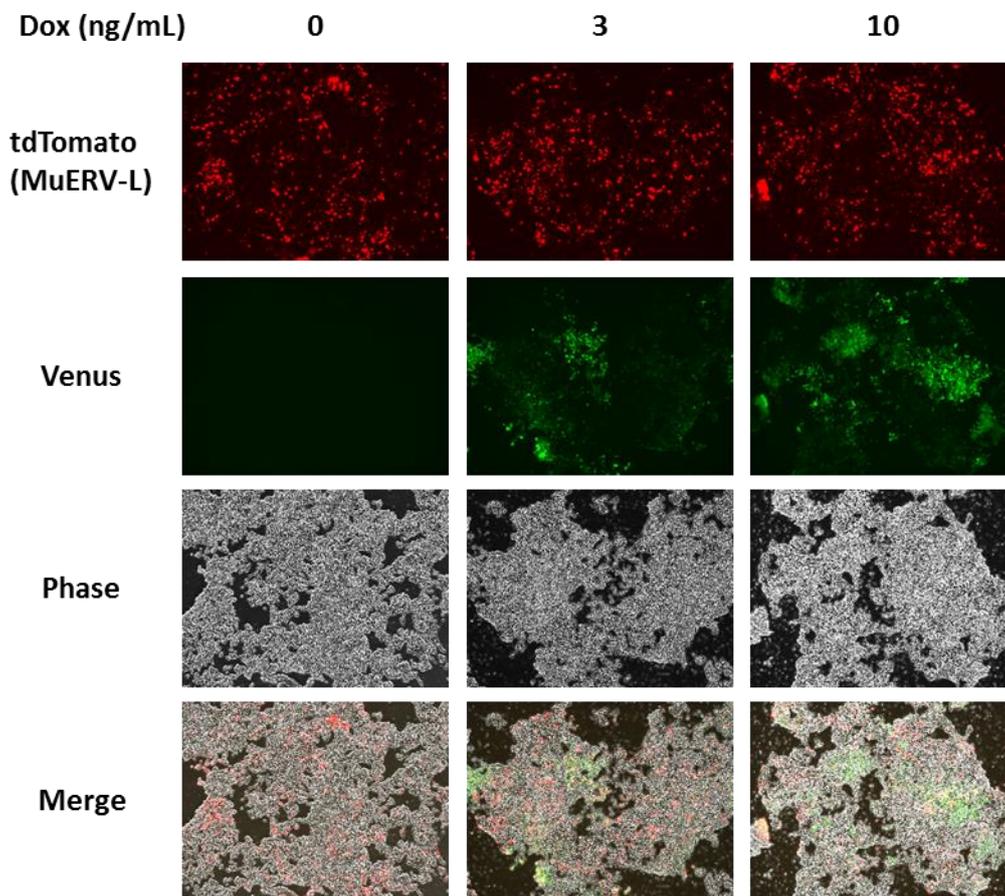


図 24. Trim61 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR を含む培地中で Dox 依存的に Trim61 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

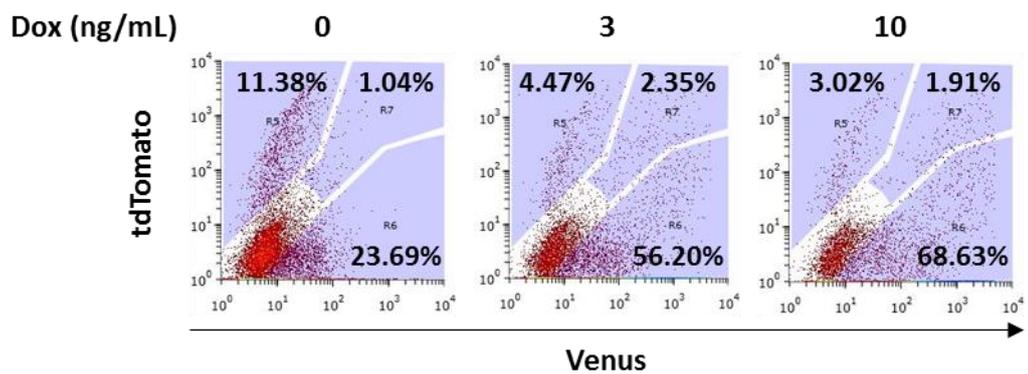
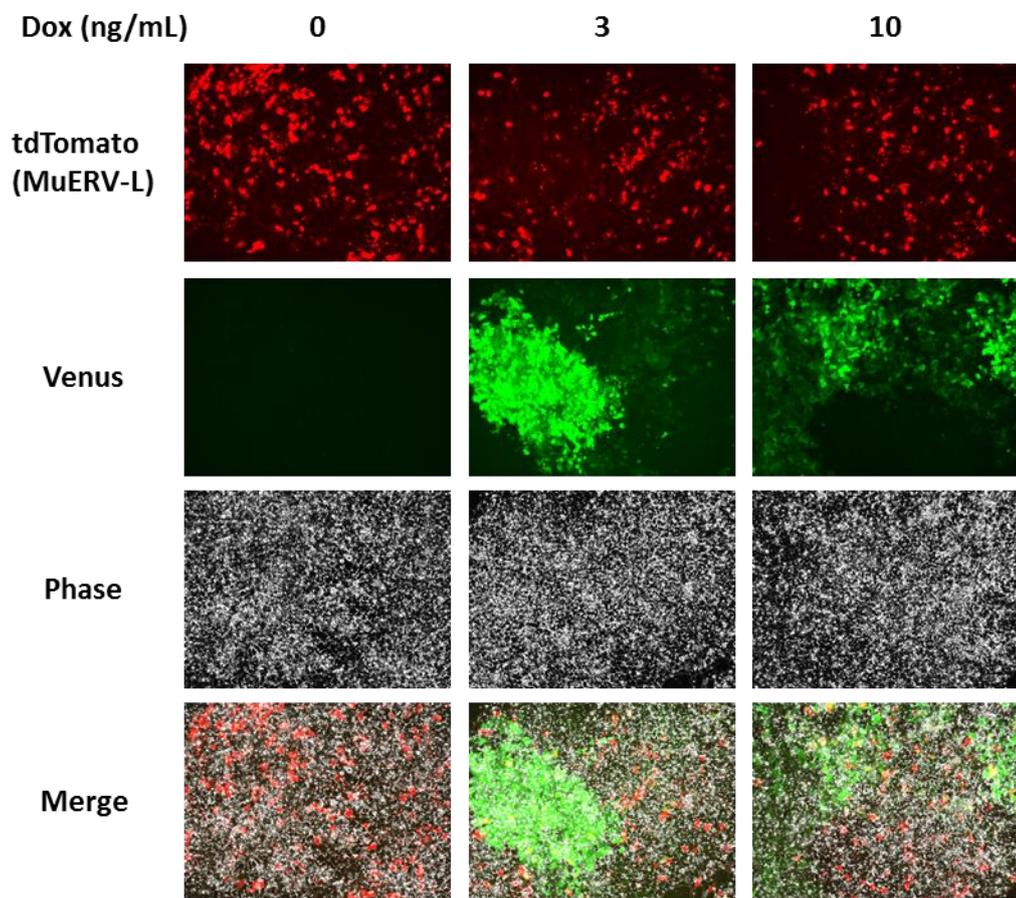


図 25. Pramef12 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR を含む培地中で Dox 依存的に Pramef12 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

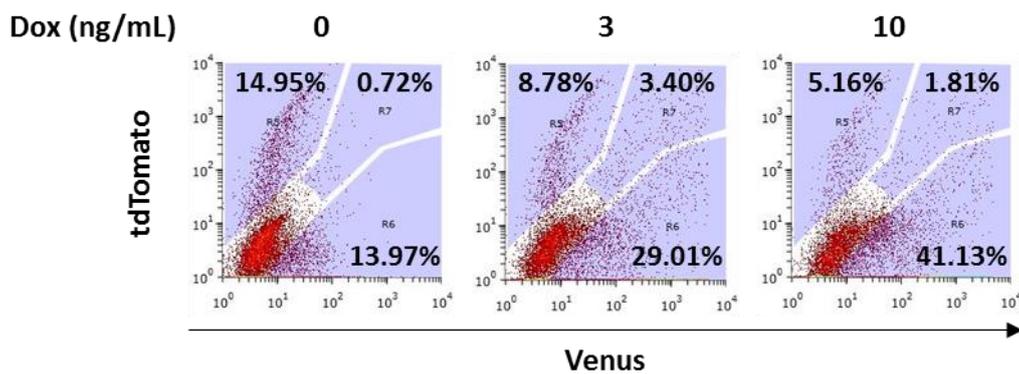
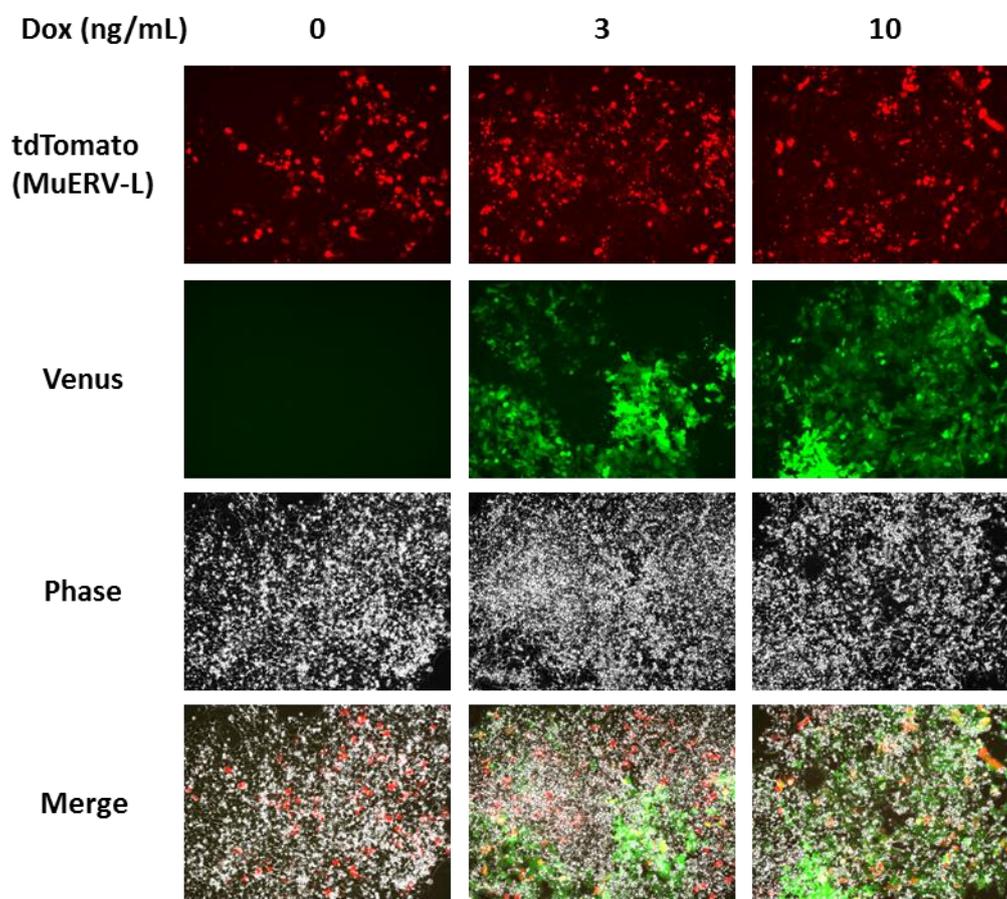


図 26. Btg4 が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR を含む培地中で Dox 依存的に Btg4 の発現を誘導し、培養 5 日目の Venus 及び tdTomato の蛍光を FACS で解析した。

第2章 ES細胞と2細胞期様細胞におけるエネルギー代謝経路

緒言

初期の着床前胚では、解糖系が未熟なために、ピルビン酸や乳酸をエネルギー源とし、8細胞期以降に解糖系が発達し、グルコースをエネルギー源とすることが示されている（図27）（Absalon-Medina et al., 2014; Mathieu and Ruohola-Baker, 2017）。また、体細胞では主にミトコンドリアにおける酸化的リン酸化によりエネルギーを得るのに対して、多能性幹細胞では、主に解糖系によりエネルギーを得ることも明らかにされている（Mathieu and Ruohola-Baker, 2017）。このように、エネルギー代謝経路は細胞の分化状態と密接に関係することが明らかにされつつある。そこで、本研究ではES細胞と2細胞期様細胞のエネルギー代謝経路に着目して、解糖系や酸化的リン酸化に関連する遺伝子の発現解析を行った。また、エネルギー代謝経路を制御することにより2細胞期様細胞の誘導効率を人為的に制御できるかどうかについても検討を行った。

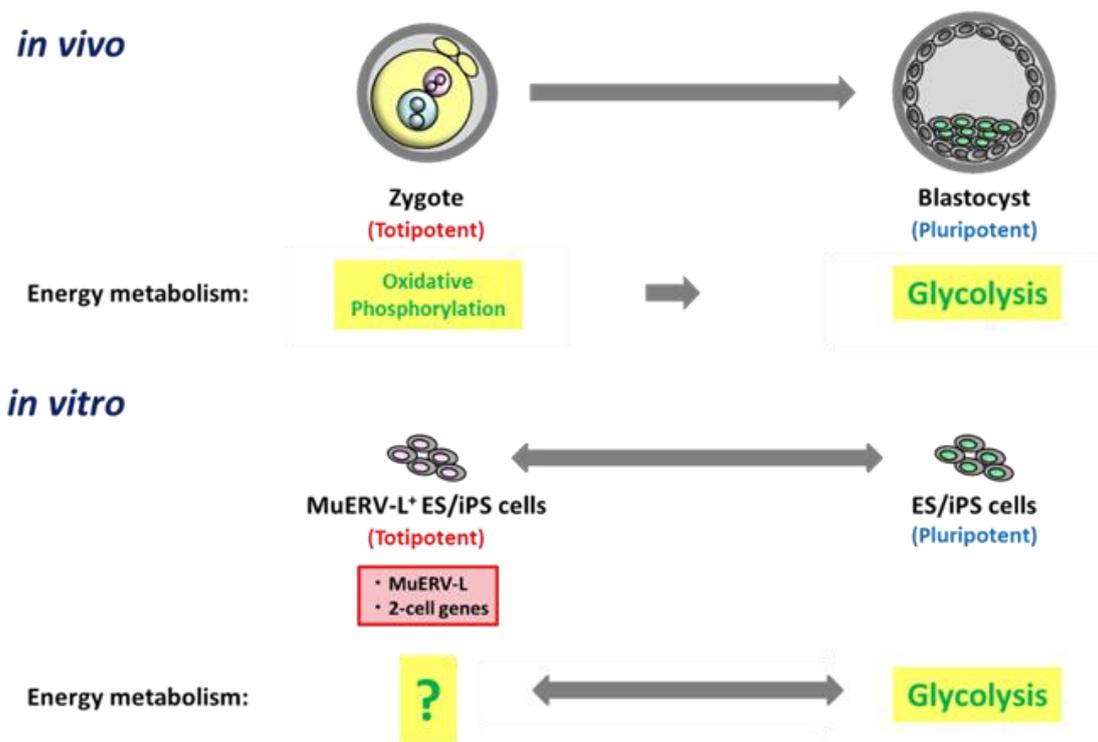


図 27. 着床前胚におけるエネルギー代謝経路の変化

受精卵から 8 細胞期胚までは、解糖系に関連する遺伝子の発現が低いことから、ピルビン酸や乳酸をエネルギー源とするのに対して、8 細胞期以降の着床前胚や ES/iPS 細胞では、解糖系の遺伝子の発現が上昇し、グルコースをエネルギー源とするように変化する。

材料と方法

1. ES 細胞の培養

ES 細胞 の培養は、第 1 章と同様の方法で行った。本研究に用いた添加物については表 6 に示した。

表 6 ES 細胞の培養に用いた添加物

Product name	Supplier	Cat. NO.
2-DG	Sigma-Aldrich	349631-5G
Rotenone	MP Biomedicals, LLC	150154

2. qRT-PCR

qRT-PCR は、第 1 章と同様の方法で行った。本研究で用いたプライマーは表 7 に示した。

表7 qRT-PCRに用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
Hk2-S	TGTGTGGTAGCTCCTAGCCC
Hk2-AS	GGAGCTCAACCAAACCAAG
Gpi1-S	GCTCGAAGTGGTCAAACCT
Gpi1-AS	ACACGGCCAAAGTGAAAGAG
Pfkl-S	TATGCCCATACGGGTCACAG
Pfkl-AS	CTACCGTGGACCTGGAGAAA
Gapdh-S	TTGAGGTCAATGAAGGGGTC
Gapdh-AS	TCGTCCCGTAGACAAAATGG
Pgk1-S	CAGCCTTGATCCTTTGGTTG
Pgk1-AS	CTGACTTTGGACAAGCTGGA
Pgam1-S	CTGCACAGAGGTGAAGCAGA
Pgam1-AS	GGAACCTGGAGAACCGCT

表 7 続き

Eno1-S	AGATCGACCTCAACAGTGGG
Eno1-AS	CTTAACGCTCTCCTCGGTGT
Pkm2-S	GTCTGAATGAAGGCAGTCCC
Pkm2-AS	GTCCGCTCTAGGTATCGCAG
Pdk1_qPCR_FWD	GTTGAAACGTCCCGTGCT
Pdk1_qPCR_REV	GCGTGATATGGGCAATCC
Pdk3_qPCR_FWD	AAGCAGATCGAGCGCTACTC
Pdk3_qPCR_REV	TTCACATGCATTATCCCTTCC
Cox7a1_qPCR_FWD	CGAAGAGGGGAGGTGACTC
Cox7a1_qPCR_REV	AGCCTGGGAGACCCGTAG
Cpt1a_qPCR_FWD	GACTCCGCTCGCTCATTC
Cpt1a_qPCR_REV	TCTGCCATCTTGAGTGGTGA
Idh2_qPCR_FWD	GGATGTACAACACCGACGAGT
Idh2_qPCR_REV	CGGCCATTTCTTCTGGATAG
Slc2a1_qPCR_FWD	TCCCAGCAGCAAGAAGGTG
Slc2a1_qPCR_REV	GCGGTGGTTCCATGTTTGAT
Stk11_qPCR_FWD	ATGGAGAGGCCAACGTCAAG
Stk11_qPCR_REV	ACCATATACATCTTCTGCTTCTCCT
Dlst_qPCR_FWD	AGACTTCTGTGCAGGTTCCG
Dlst_qPCR_REV	AGCAGCACCAGTTTTCTGA

結果

1. 2細胞期様細胞におけるエネルギー代謝に関与する遺伝子の発現解析

着床前胚の発生過程では、エネルギー代謝経路が酸化的リン酸化から解糖系へと変化することが知られている。2細胞期様細胞とES細胞はそれぞれ2細胞期胚と胚盤胞に近い遺伝子発現を示すことから、これらの細胞間においてもエネルギー代謝経路が変化する可能性が考えられた。この可能性を検証するために、ES細胞と2細胞期様細胞における解糖系、及び酸化的リン酸化に関連する遺伝子の発現をRNA-seqのデータをもとに解析した(図28、29)。その結果、解糖系に関連する酵素の遺伝子であるヘキソキナーゼ(Hexokinase; Hk)、グルコース6-ホスホイソメラーゼ(Glucose-6-phosphate isomerase; Gpi)、ホスホフルクトキナーゼ(Phosphofructokinase; Pfk)、ホスホグリセリン酸キナーゼ(Phosphoglycerate kinase; Pgk)、ホスホグリセリン酸ムターゼ(Phosphoglycerate mutase; Pgam)、エノラーゼ(Enolase; Eno)、及びグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Gapdh)の発現が2細胞期様細胞において顕著に低下した(図29)。一方で、酸化的リン酸化に関連する酵素の遺伝子であるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼアイソエンザイム1(pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1; Pdk1)の発現量はES細胞と比較した場合に2細胞期様細胞で低下していたが、それ以外の遺伝子(pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3; Pdk3, cytochrome c oxidase subunit 7A1; Cox7a1, carnitine palmitoyltransferase 1a; Cpt1a, isocitrate dehydrogenase 1; Idh1, isocitrate dehydrogenase 2; Idh2, dihydrolipoamide S-succinyltransferase; Dlst)の発現に変動が見られなかった(図29)。また、qRT-PCRにより、ES細胞と2細胞期様細胞における特定の遺伝子群の発現について検討したところ、今回調べたほぼ全ての遺伝子においてRNA-seqにより得られた結果と同様の結果が得られた(図30、31)。これらのことから、2細胞期様細胞では、ES細胞と

比較して、解糖系よりも酸化的リン酸化によりエネルギーを得ている可能性が示唆された。

2. エネルギー代謝経路が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

2-デオキシ-D-グルコース (2-Deoxy-D-glucose;2DG) はグルコースと極めて類似した構造をもつグルコース誘導體であり、細胞内に取り込まれた後、ヘキソキナーゼによりリン酸化された 2-デオキシ-D-グルコース-6-リン酸 (2-DG-6-リン酸) は解糖系酵素で代謝されず、結果として解糖系によるエネルギー産生を阻害することで知られている。また、ロテノン (Rotenone) は電子伝達系におけるミトコンドリアの呼吸鎖複合体 1 が NADH から電子を受け取り、ユビキノンに渡される経路を阻害し、最終的に酸化的リン酸化におけるエネルギー産生を阻害することが知られている。そこで、これらの阻害剤が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、2DG を添加しても、2 細胞期様細胞の誘導にはほとんど影響を及ぼさないことが示された (図 32)。一方で、Rotenone 存在下では、5 日後に出現する 2 細胞期様細胞の割合が顕著に低下した (図 33)。エネルギー代謝経路に関連する遺伝子の発現パターンと合わせて考えると、ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換には、遺伝子発現だけではなくエネルギー代謝経路においても、解糖系から酸化的リン酸化に変換されることが示された。

考察

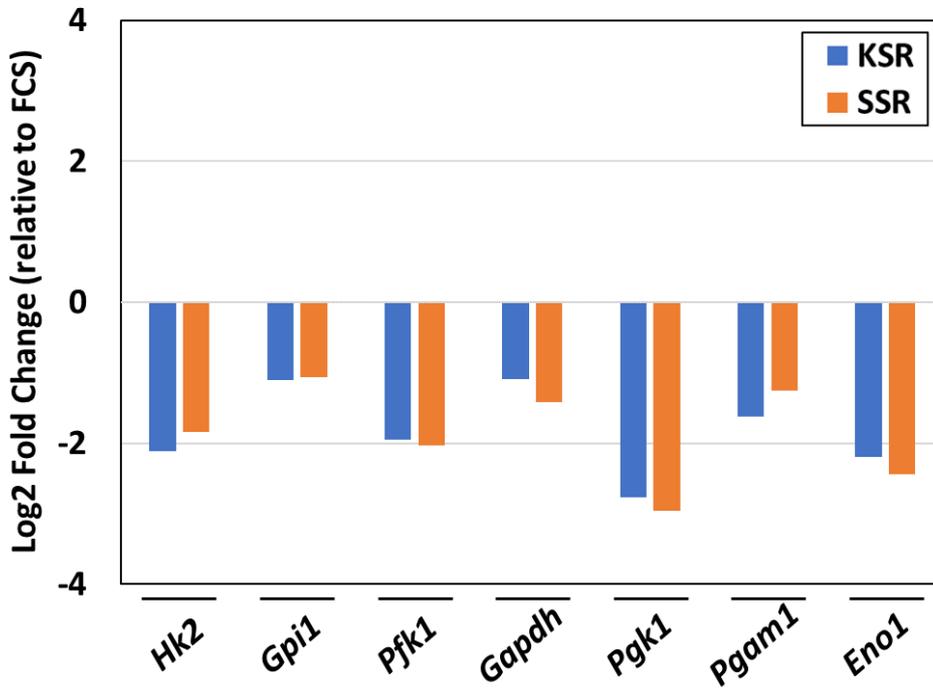
本研究では、ES 細胞と 2 細胞期様細胞におけるエネルギー代謝経路について検討を行い、ES 細胞から 2 細胞期様細胞が誘導される際に、エネルギー代謝経路が解糖系から酸化的リン酸化へと変換されることを示した (図 29-33)。RNA-seq の解析結果から、解糖系に関連する遺伝子の発現において ES 細胞と 2 細胞期様細胞では遺伝子の発現量が大きく変動しており、2 細胞期様細胞において解糖系に関連する遺伝子の発現は有意に低下することを示した (図 29)。このことから、2 細胞期様細胞は少なくとも解糖系によりエネルギー産生が行われていないことが考えられた。一方、酸化的リン酸化に関連する遺伝子の発現においては ES 細胞と 2 細胞期様細胞では一部を除いて遺伝子の発現量に変動がなかった (図 29)。2 細胞期様細胞において発現が低下していた Pdk1 はピルビン酸からアセチル CoA へ変換する酵素であり、Pdk3 も Pdk1 と同様の機能を示している。このことから、2 細胞期様細胞は酸化的リン酸化を利用する際に、特定の酵素を利用していることが示唆された。以上のことから、2 細胞期様細胞では解糖系よりも酸化的リン酸化を利用しエネルギー産生を行う可能性が考えられた。今後、エネルギー代謝経路における各代謝物を解析することにより、遺伝子発現とエネルギー代謝経路の因果関係が明らかにできると考えられる。

過去の報告から、低酸素誘導因子である HIF-1/2/3 は iPS 細胞の誘導過程においてエネルギー代謝経路における解糖系を活性化することが明らかにされている (Sone et al., 2017)。また、HIF-1 α は 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, 2OGD) の一種である γ -ブチロベタインヒドロキシラーゼ (γ -butyrobetaine dioxygenase, γ -BBOX) の活性により制御されていることが明らかにされている (Berchner-Pfannschmidt et al., 2010)。第一章で示したように、2 細胞期様細胞の誘導はアスコルビン酸が重要であることを明らかにした (図 8)。また、アスコル

ビン酸は γ -BBOX を活性化させ、HIF-1 α を抑制することが報告されている (Rebouche, 1991)。これらのことから、アスコルビン酸の添加により、HIF-1 α を分解することにより、解糖系を抑制する可能性が考えられる。

2 細胞期様細胞で解糖系に関連する遺伝子の発現が顕著に低下することから、解糖系によるエネルギー代謝経路を阻害することが 2 細胞期様細胞の誘導に重要であるかどうかを検討するために、解糖系を阻害する 2DG を用いて検証した。その結果、解糖系を阻害しても、ES 細胞から 2 細胞期様細胞の誘導効率は変化しなかった (図 32)。このことから、ES 細胞から 2 細胞期様細胞へと変化する際に生じる大規模に遺伝子発現が変化した結果としてエネルギー代謝経路が変換する可能性が考えられた。今後、アスコルビン酸で処理した ES 細胞の HIF-1 α のタンパク質量を経時的に解析することにより、ES 細胞から 2 細胞期様細胞へ誘導される際に、解糖系が抑制されている可能性をより詳細に明らかにできると考えられる。

Glycolysis



Oxidative phosphorylation

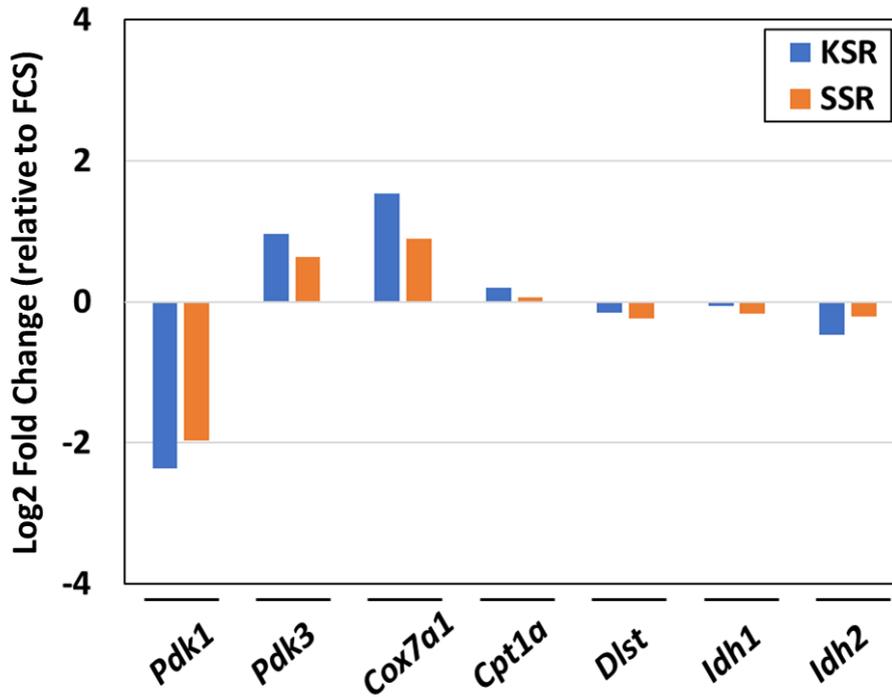


図 29.2 細胞期様細胞における解糖系及び酸化的リン酸化に関与する遺伝子の発現量の変動

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR 及び 10% SSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングした後、RNA-seq 解析を行った。2 細胞期様細胞における解糖系及び酸化的リン酸化に関与する遺伝子の発現を、ES 細胞を基準として示した。

Glycolysis-associate genes

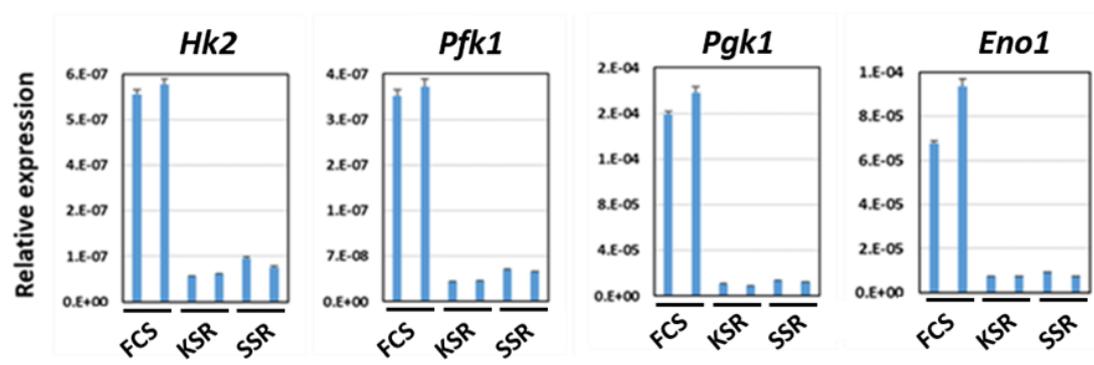


図 30.2 細胞期様細胞における解糖系に関与する遺伝子の発現

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR または SSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングした後、解糖系に関与する遺伝子の発現を qRT-PCR で解析した。

Oxidative phosphorylation

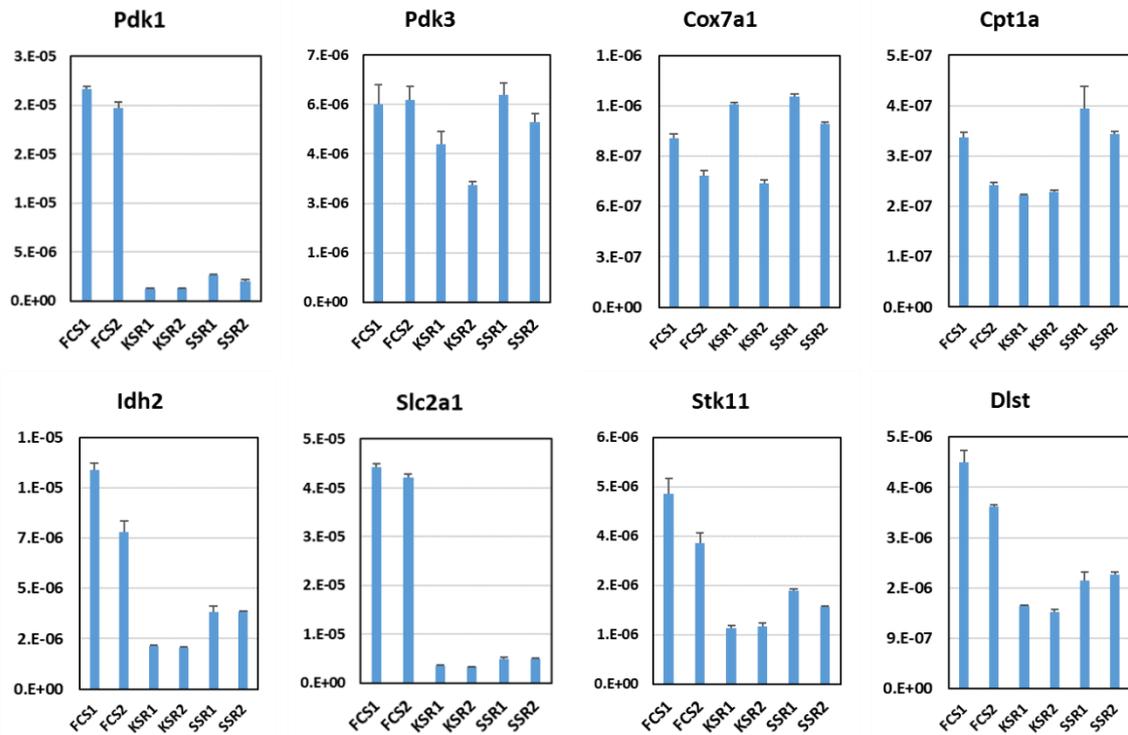


図 31. 2 細胞期様細胞における酸化的リン酸化に関する遺伝子の発現

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR または SSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングした後、酸化的リン酸化に関する遺伝子の発現を qRT-PCR で解析した。

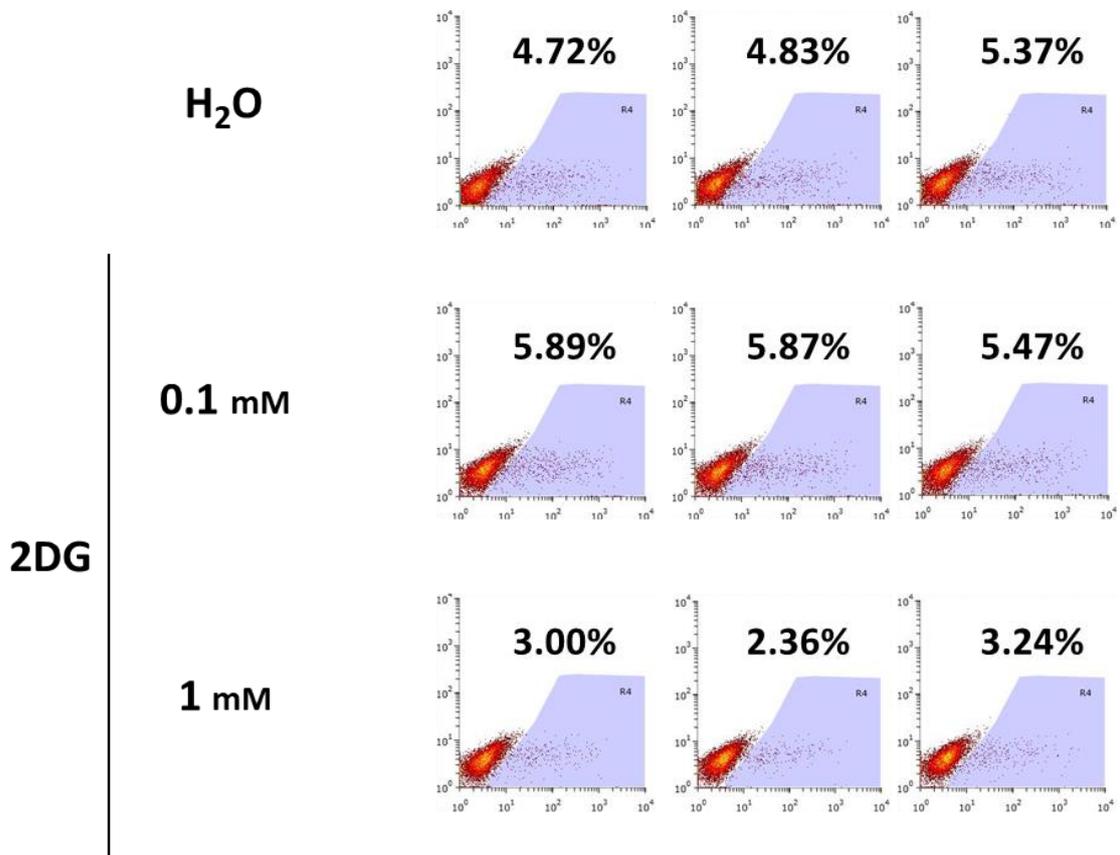


図 32. 2DG が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、2DG と 10% KSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞を FACS により解析した。

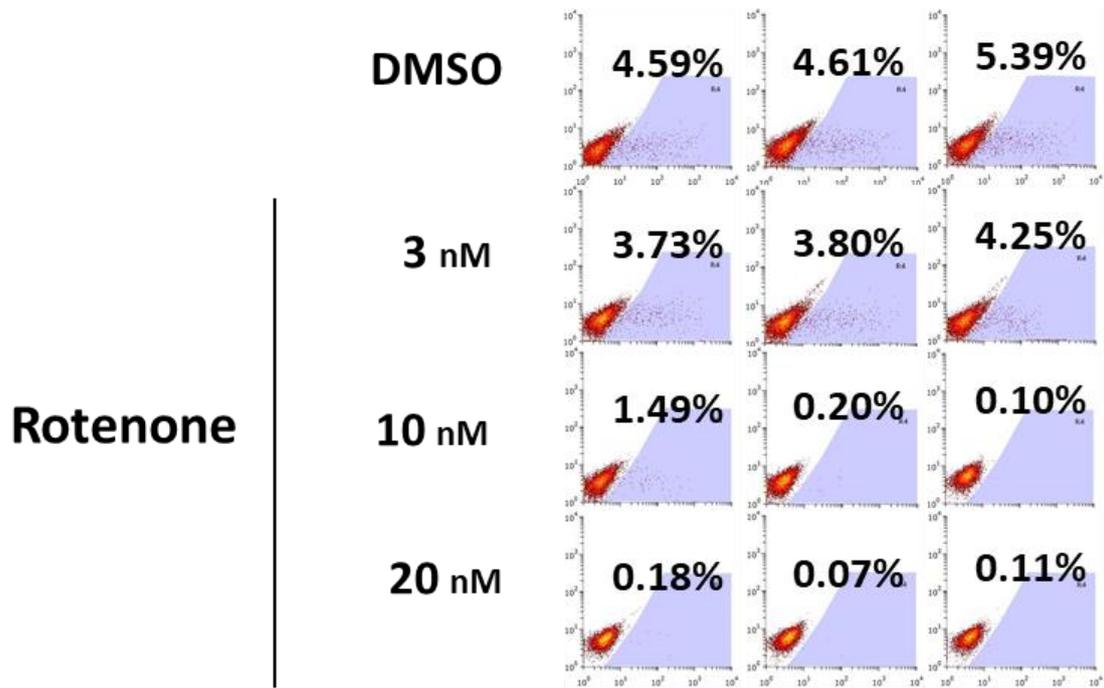


図 33. Rotenone が 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、Rotenone と 10% KSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞を FACS により解析した。

第3章 2 細胞期様細胞におけるオルガネラのリモデリング

緒言

初期の着床前胚は酸化的リン酸化をエネルギー源にしており、そのエネルギー代謝経路を担うミトコンドリアの外膜が分厚く、内部構造であるクリステが複雑化することが知られている。その後、胚の発生の進行とともに解糖系へとエネルギー代謝経路を変換するため、ミトコンドリアの構造も単純化することも明らかにされている。このようにエネルギー代謝経路は、細胞の形態変化に伴い変換されることが考えられる。そこで、ES細胞が2細胞期様細胞に変換される際にオルガネラのリモデリングが生じるかどうかを電子顕微鏡解析により検討した。また、ミトコンドリアの生成や解糖系を制御する遺伝子の発現についても検討した。

材料と方法

1. ES 細胞の培養

ES 細胞 の培養は、第 1 章と同様の方法で行った。本研究に用いた添加物については表 8 に示した。

表 8 ES 細胞の培養に用いた添加物

Product name	Supplier	Cat. NO.
Triacsin C	Abcam	Ab1411888
BODIPY493/503	Thermo Fisher Scientific	D3922

2. 2 細胞期胚の採取

8-12 週齢のメスの BDF1 マウスに 7.5 IU の PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin 、あすかアニマルヘルス株式会社；動物用セロトロピン) を腹腔内に投与し、48 時間後に 7.5 IU の hCG (human Chorionic Gonadotropin 、あすかアニマルヘルス株式会社；動物用ゴナトロピン 3000) を腹腔内に投与することにより過排卵処理を行い、オスの BDF1 マウスと 14-16 時間交配させた。交配後、輸卵管より卵塊を採取し、M2 培地(Sigma; M7167) 中で Hyaluronidase (350U/mL, Sigma; H4272) 処理を行い、卵丘細胞を除去した。M2 培地で洗浄後、KSOM 培地 (Millipore; MR-620P-5D) に移し 37°C、5%CO₂ で培養し、翌日 2 細胞期胚を回収した。

3. 電子顕微鏡解析

電子顕微鏡解析は、株式会社東海電子顕微鏡 (<https://www.tokai-ema.com>) に依頼した。

4. LD の染色

表 8 に示した TriacsinC を用いて脂質成分を阻害した 2 細胞期様細胞を作

製し、表 8 に示した BODIPY493/503 (4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene) 存在下で1時間培養することにより細胞に含まれる脂質成分を染色した。この細胞に含まれる 2 細胞期様細胞をセルソーター (Bio-rad; S3 Cell sorter) で分取した後、サイトスピン (Thermo shandon; Cytospin 3) により細胞をスライドガラスに固定した。PAP PEN で細胞の回りを囲んだ後、4% PFA/PBS を加えて遮光下で室温 15 分間静置することにより細胞の固定処理を行った。固定した細胞を PBS で洗浄した後、DAPI (1 μ g/mL, 4',6-diamidino-2-phenylindole, Dojindo; 340-07971) / PBS を添加し、遮光下で室温 20 分静置した。PBS で洗浄し、蛍光褪色防止剤 (Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Nacalai tesque; 12593-64) を添加したカバーガラスでスライドガラスをマウントした後、マニキュアで封入した。サンプルは、倒立蛍光顕微鏡 (Olympus IX71) または、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV10i) を用いて観察した。

5. qRT-PCR

qRT-PCR は、第 1 章と同様の方法で行った。Esrrb の発現については、表 5 に示したプライマーを用い、その他のプライマーは表 9 に示した。

表9 qRT-PCRに用いたプライマー

Name	Sequence (5' to 3')
HIF1 α _qPCR_FWD	AGATTTGGAGATGCTGGCTC
HIF1 α _qPCR_REV	GGAGAATTGCTCTCTAATGG
HIF2 α _qPCR_FWD	CACACACACATCTAATCACC
HIF2 α _qPCR_REV	AGACAGCTTCGAACACCACC
HIF3 α _qPCR_FWD	AAGACGCCCTGACCCCCAGG
HIF3 α _qPCR_REV	CCCTCTGCTGGTGAGCGTGC
Zic3_qPCR_FWD2	TCCTTCAAGGCGAAGTACAAACTG
Zic3_qPCR_REV2	GGTTTCTCACCTGTATGGGTCCT

結果

1. ES 細胞と 2 細胞期様細胞の電子顕微鏡解析

ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換におけるオルガネラの構造変化について電子顕微鏡を用いて検討した。その結果、2 細胞期様細胞ではミトコンドリアが ES 細胞に比べて顕著に発達しており、ミトコンドリアの内部構造であるクリステが複雑化していることを明らかにした (図 34)。さらに、ES 細胞には存在せず、初期の着床前胚に存在する Lipid droplet (LD) に類似した構造が確認できた (図 35) (Furuta and Nakamura, 2021)。LD は脂質代謝の制御に関与しており、初期の着床前初期胚の発生に重要な役割を果たすことが知られている (Aizawa et al., 2019; Tatsumi et al., 2018)。実際に、初期の着床前胚である 2 細胞期胚において、電子顕微鏡解析により LD は核周辺に存在することを確認した (図 36)。また、卵細胞に存在するほぼ全ての LD は脂質成分を染色する BODIPY493/503 (4,4-difluoro-3a,4a-diaza-s-indacene) により検出できることが明らかにされている (Aizawa et al., 2019)。実際に、2 細胞期胚に存在する LD を染色したところ、核周辺において BODIPY493/503 の蛍光が強く染色された (図 36)。そこで、BODIPY493/503 を用いて 2 細胞期様細胞に出現する LD 様構造の染色を検討した。その結果、ES 細胞において全ての細胞で BODIPY493/503 の蛍光は確認できなかったが (図 37) (Furuta and Nakamura, 2021)、2 細胞期様細胞において、核周辺に BODIPY493/503 の蛍光が強く染色された (図 37)。このことから、BODIPY493/503 を用いることにより 2 細胞期様細胞に出現する LD を可視化できることが明らかとなった。前述のように、LD におけるエネルギー産生が初期の着床前胚の発生に重要な役割を果たすことが報告されている (Aizawa et al., 2019; Tatsumi et al., 2018)。また、LD は脂肪酸の一つであり、脂質代謝を行うために補酵素 CoA を付加しアシル CoA として細胞のミトコンドリア内に取り込まれ、 β 酸化を行うことで代謝される (Dunning et al.,

2010; Dunning et al., 2014)。Triacsin C は、このアシル CoA を合成する酵素 (acyl-CoA synthetase) を阻害し、新たに生成される脂質を制御することが報告されている (Aizawa et al., 2019)。そこで、Triacsin C を用いて LD 生成が ES 細胞から 2 細胞期様細胞の誘導に及ぼす影響を検討した (図 37)。その結果、Triacsin C 存在下でも 2 細胞期様細胞は誘導できることが示された (図 37)。Triacsin C 存在下で誘導した 2 細胞期様細胞を BODIPY493/503 で染色した結果、MuERV-L を発現している細胞においても、LD が検出できず、Triacsin C により LD の生成が阻害されていることが示された (図 37)。

以上の結果から、ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換には、大規模な遺伝子発現変化やエネルギー代謝経路の変化だけではなく、ミトコンドリアの構造変化や LD の生成などのオルガネラのリモデリングも伴うことが明らかとなった。また、LD 生成は ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換には必須でないことが明らかとなった。

2. ミトコンドリアの生成及び解糖系を制御する遺伝子の発現解析

2 細胞期様細胞が誘導される際に、エネルギー代謝経路やミトコンドリアの形態が変化することから、ミトコンドリアの生成や解糖系を制御する遺伝子の発現を検討した。その結果、ミトコンドリアの生合成に促進する *Pgc1 α* の発現が 2 細胞期様細胞で有意に増加することが明らかとなった (図 38)。一方で、解糖系を活性化する *Hif1 α /2 α /3 α* の発現は有意に低下することが示された (図 38)。

考察

本研究では、ES 細胞と 2 細胞期様細胞におけるオルガネラについて電子顕微鏡を用いて解析を行い、2 細胞期様細胞では、ES 細胞よりも成熟したミトコンドリアを有すること (図 34)、2 細胞期様細胞では、ES 細胞には認められず、2 細胞期胚に存在する LD を有することを示した (図 35-37)。

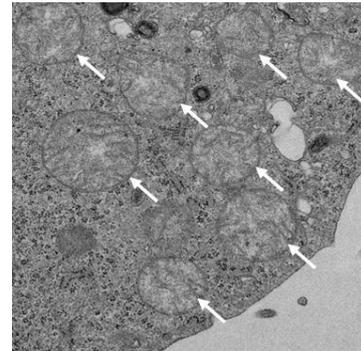
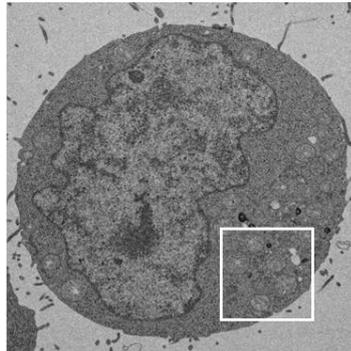
2 細胞期様細胞では、ES 細胞と同程度の ATP を産生することが報告されている (Rodriguez-Terrones et al., 2020)。しかし、2 細胞期様細胞は酸化的リン酸化によりエネルギーを得る受精卵から 8 細胞期胚までとは異なり、細胞外のピルビン酸や乳酸を取り込むことができず、これらをエネルギー源として使えないことが示されている。これらのことから、2 細胞期様細胞は解糖系の活性が低く、ピルビン酸や乳酸をエネルギー源として利用できないにも関わらず、ES 細胞と同程度の ATP を得ていることになる。

マウスの卵子や初期の着床前胚では、LD が細胞質に存在するが、ブタやウシの卵子に比べて量が少ないことから、LD の役割についてはあまり議論されてこなかった。しかし、最近の研究から LD はマウスの着床前胚において重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。マウスの卵子に存在する LD にはトリアシルグリセロールが貯蔵されており、LD に含まれるトリアシルグリセロールは、リパーゼを介して加水分解され、グリセロールと遊離脂肪酸を生成する (Dunning et al., 2010; Dunning et al., 2014)。この脂肪酸には補酵素 CoA が付加されアシル CoA として細胞のミトコンドリア内に取り込まれ、 β 酸化を介して ATP を生成する (Dunning et al., 2010; Dunning et al., 2014)。LD が 2 細胞期様細胞で生成されることから、2 細胞期様細胞に存在する LD は脂肪酸の貯蔵や β 酸化を介してエネルギー産生に重要である可能性が考えられる。

ミトコンドリアの生成や解糖系を制御する遺伝子の発現を検討した結果、ミトコンドリアの生合成に促進する Pgc1 α (Lin et al., 2005) の発現が 2 細胞

期様細胞で有意に増加することが明らかとなった (図 38)。一方で、解糖系を活性化する Hif1 α /2 α /3 α (Mathieu and Ruohola-Baker, 2017; Sone et al., 2017) の発現は有意に低下することが示された (図 38)。これらのことから、ES 細胞から 2 細胞期様細胞が誘導される際に生じるミトコンドリアの構造変化は、遺伝子発現の大規模な変化に起因することが考えられた。過去の報告から、ES 細胞の中には 2 細胞期胚で一過的に発現する遺伝子群の一つである Zscan4 を発現する細胞が 5%程度混在しており、その中に MuERV-L を発現する 2 細胞期様細胞がごくわずかに混在することが明らかにされた (Rodriguez-Terrones et al., 2018)。このことから、Zscan4 陽性 ES 細胞は、ES 細胞から 2 細胞期様細胞へ誘導される過程で生じる細胞であり、2 細胞期様細胞の前駆細胞であることが明らかにされている。今後、Zscan4 の発現を可視化できる ES 細胞を作製し、2 細胞期様細胞の前駆細胞としてエネルギー代謝経路やミトコンドリアの構造を解析できれば、ES 細胞から 2 細胞期様細胞へ誘導されるメカニズムを詳細に明らかにできると考えられる。

ES cells



2-cell like cells

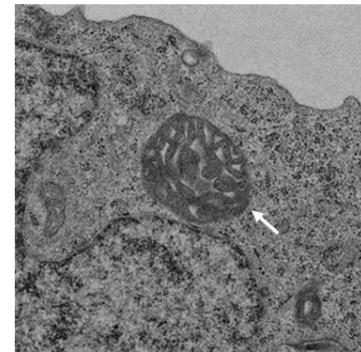
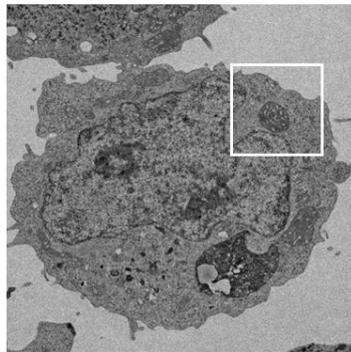
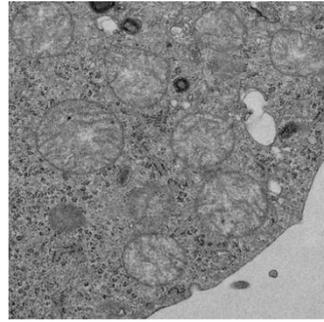
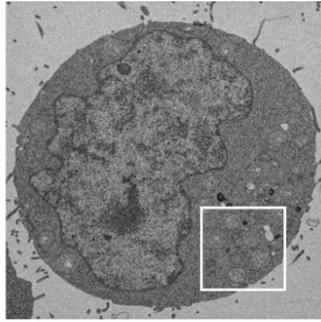


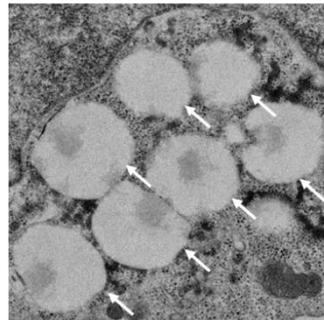
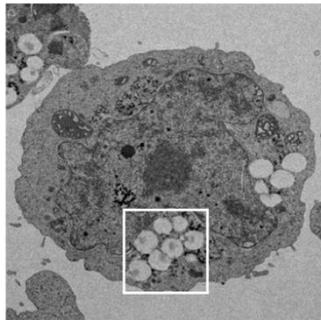
図 34. ES 細胞と 2 細胞期様細胞におけるミトコンドリアの形態変化

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングし、電子顕微鏡により解析を行った。白矢印はミトコンドリアを示す。

ES cells



2-cell like cells



White arrows indicate lipid droplet

図 35. ES 細胞と 2 細胞期様細胞における LD の形成

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングし、電子顕微鏡により解析を行った。白矢印は LD 様構造を示す。

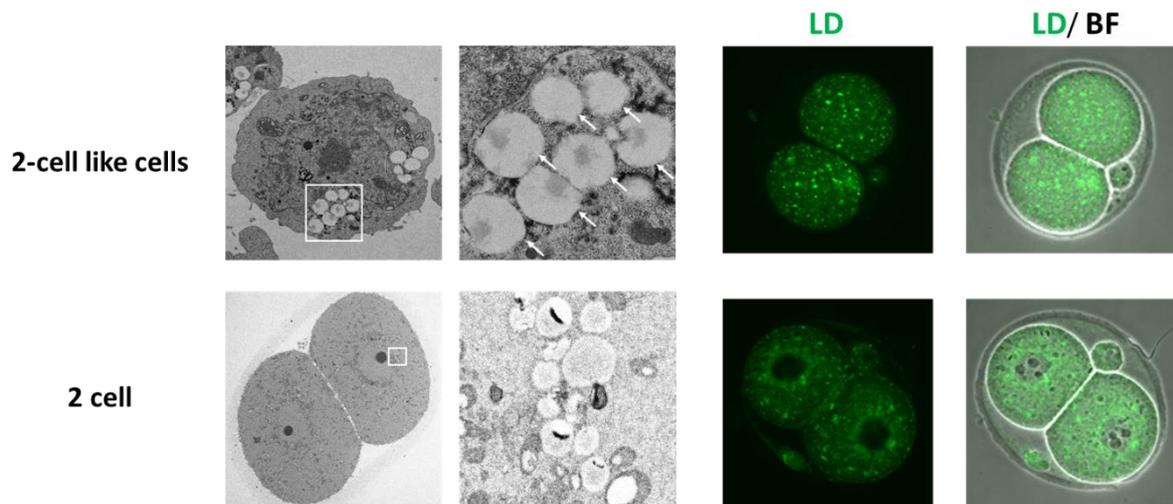


図 36. 2 細胞期様細胞と 2 細胞期胚における LD の検出

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR 含む培地で 5 日間培養し、FACS を用いてソーティングした tdTomato 陽性細胞と 2 細胞期胚を電子顕微鏡および BODIPY493/503 染色により解析した。白矢印は LD 様構造を示す。

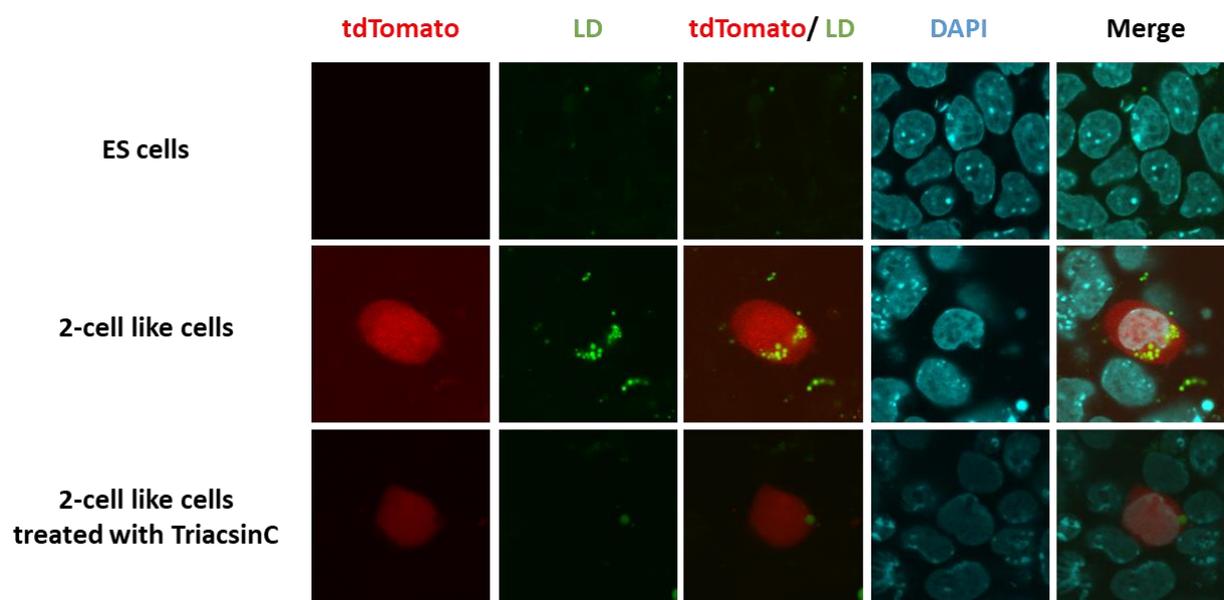


図 37. ES 細胞と 2 細胞期様細胞における LD の検出

ES 細胞と 2 細胞期様細胞を BODIPY493/503 染色により解析した。赤 : TdTomato ; 緑 : LD ; 青 : DAPI。

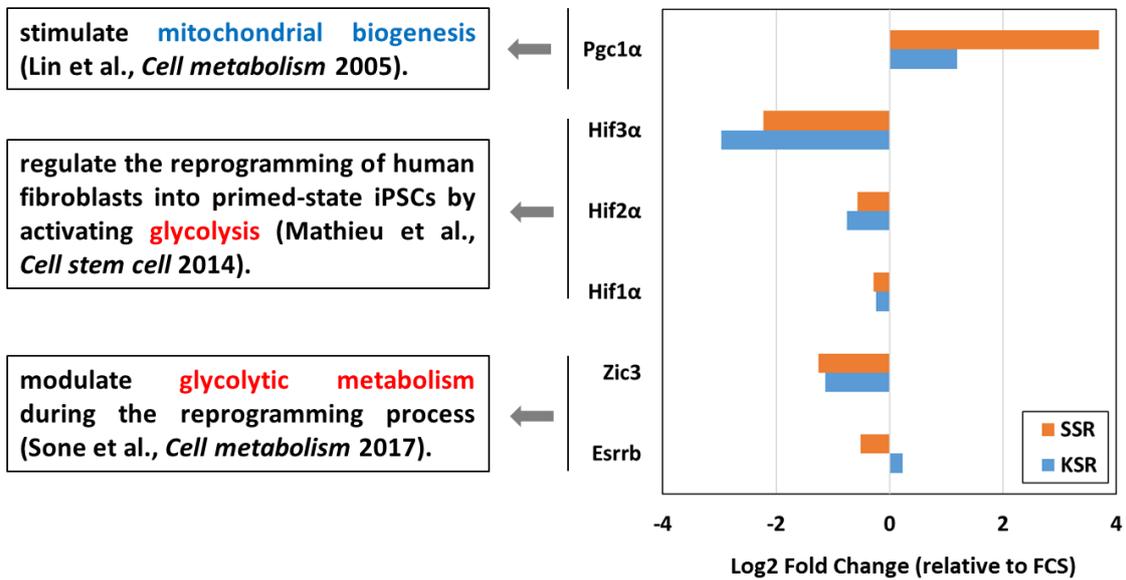


図 38. ES 細胞と 2 細胞期様細胞におけるミトコンドリアの生成及び解糖系を制御する遺伝子の発現解析

MuERV-L の発現を可視化できる ES 細胞を、10% KSR または SSR 含む培地で 5 日間培養し、tdTomato 陽性細胞をソーティングした後、ミトコンドリアの生成及び解糖系を制御する遺伝子の発現を qRT-PCR で解析した。

結論

本研究では、MuERV-L の発現を指標にして ES 細胞に含まれる 2 細胞期様細胞を可視化するシステムを構築し、2 細胞期細胞への変換はアスコルビン酸により促進され、インシュリンにより抑制されることを明らかにした (図 39)。遺伝子発現解析から、2 細胞期様細胞は 2~8 細胞期胚の遺伝子発現を兼ね備えた細胞集団であり、エネルギー代謝に関わる解糖系関連遺伝子の発現が低下し、酸化的リン酸化に関与する遺伝子の発現は維持されることを明らかにした (図 39)。また、阻害剤を用いた実験から、ES 細胞から 2 細胞期様細胞に変換される際には、遺伝子発現だけではなく、エネルギー代謝経路も解糖系から酸化的リン酸化へと変化することを明らかにした (図 39)。さらに、2 細胞期様細胞は ES 細胞よりも成熟したミトコンドリアを有しており、ES 細胞には存在せず 2 細胞期胚に存在する LD を有すること、また LD の生成は 2 細胞期様細胞への変換には必須ではないことを明らかにした (図 39)。

総合考察

現在までに、遺伝子発現だけではなく、移植実験により胚体だけではなく胚体外組織への分化能が確認されている「全能性細胞」は、Macfarlan らにより 2012 年の報告と Yong らの 2017 年の報告しかない。Macfarlan らは、ES 細胞には非常に低い割合で MuERV-L を発現する細胞集団が含まれていることを明らかにし、移植実験により MuERV-L 陽性 ES 細胞が全能性を示すことを報告した。しかし、この論文では、分化能を検討する移植実験に 4-5 個の細胞を用いており、移植した細胞の中に内部細胞塊または栄養外胚葉への分化が運命づけられた細胞が混在している可能性が排除されておらず、真の全能性を証明するには至っていない。一方、Yong らの論文では、マイクロ RNA である *miR-34 a* を KO した ES 細胞において、全能性の指標となる MuERV-L の発現が有意に上昇することを明らかにした。また、1 個の *miR-34 a* KO ES 細胞を桑実胚に移植した場合に、移植した細胞の約 4 割が胚の中で増殖を経て内部細胞塊と栄養外胚葉の両方に寄与できる全能性細胞であることが示された。しかし、*miR-34 a* はがん抑制遺伝子として知られる *p53* を標的としており、その転写を抑制することが示されている (Chang et al., 2007; He et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007)。したがって、この細胞は、腫瘍細胞を増殖する引き金となる可能性が高く、全能性細胞として再生医療に応用するには、この懸念を解消する必要があると考えられる。また、序論にも述べたように、遺伝子発現や分子メカニズムにおいて 2 細胞期胚と極めて類似した特徴を示す 2 細胞期様細胞の誘導には、遺伝子の改変を伴うものがほとんどであり、再生医療への応用を考えた場合には大きな問題となる。これらのことから、本研究において、遺伝子の改変を伴わずに 2 細胞期様細胞を効率よく誘導する実験系を構築したことには大きな意義があると考えられる。また、全能性を保持したまま自己複製できる「全能性幹細胞」は未だに報告されていない。これは、ES 細胞に適した培地が 2 細胞期様細胞の

維持には適していないことによる可能性が高いと考えられる。実際に、ES細胞では、解糖系からエネルギーを得るためにエネルギー源としてグルコースを含む培地を用いているが、2細胞期様細胞では、酸化的リン酸化によりエネルギーを得ているために、エネルギー源としてのグルコースは不要であると考えられる。また、受精卵から8細胞期までの胚ではグルコースをエネルギー源として利用できないために、胚体外からピルビン酸や乳酸を取り込み、酸化的リン酸化に用いているが、2細胞期様細胞では細胞外の乳酸やピルビン酸を取り込むことができないことが示されている。一方で、ATP産生量についてはES細胞と2細胞期様細胞の間で変化しないことも示されている。また、2細胞期様細胞では、ES細胞には存在せず卵子や2細胞期胚に存在するLDが形成されることを明らかにした。LDは、卵細胞においてリパーゼを介して加水分解された後、ミトコンドリアに取り込まれ、 β 酸化を経て酸化的リン酸化によりエネルギー産生に利用されることが知られている。これらのことから、培地に長鎖脂肪酸を加えることにより、2細胞期様細胞を安定的に培養することができ、分化能を検討することにより真の全能性幹細胞を樹立できる可能性が考えられる。

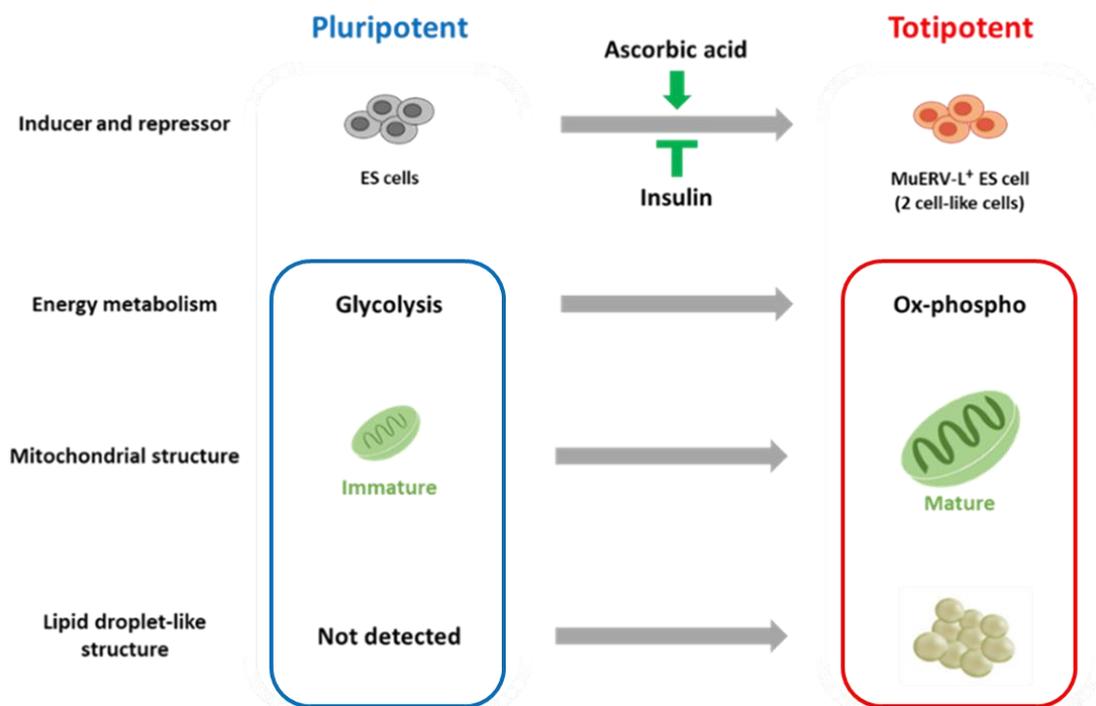


図 39. ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換

ES 細胞から 2 細胞期様細胞への変換はアスコルビン酸により促進され、インシュリンにより抑制される。ES 細胞から 2 細胞期様細胞の変換は、エネルギー代謝経路の変化、ミトコンドリアの成熟、および、LD の形成を伴う。

参考文献

- Absalon-Medina, V.A., Butler, W.R., and Gilbert, R.O. (2014). Preimplantation embryo metabolism and culture systems: experience from domestic animals and clinical implications. *J Assist Reprod Genet* 31, 393-409.
- Aizawa, R., Ibayashi, M., Tatsumi, T., Yamamoto, A., Kokubo, T., Miyasaka, N., Sato, K., Ikeda, S., Minami, N., and Tsukamoto, S. (2019). Synthesis and maintenance of lipid droplets are essential for mouse preimplantation embryonic development. *Development* 146.
- Beddington, R.S., and Robertson, E.J. (1989). An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105, 733-737.
- Berchner-Pfannschmidt, U., Tug, S., Kirsch, M., and Fandrey, J. (2010). Oxygen-sensing under the influence of nitric oxide. *Cell Signal* 22, 349-356.
- Brazil, D.P., Yang, Z.Z., and Hemmings, B.A. (2004). Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends Biochem Sci* 29, 233-242.
- Bryja, V., Bonilla, S., Cajanek, L., Parish, C.L., Schwartz, C.M., Luo, Y., Rao, M.S., and Arenas, E. (2006). An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 844-849.
- Canham, M.A., Sharov, A.A., Ko, M.S., and Brickman, J.M. (2010). Functional heterogeneity of embryonic stem cells revealed through translational amplification of an early endodermal transcript. *PLoS Biol* 8, e1000379.
- Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., *et al.* (2007). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 26, 745-752.
- Cheng, J., Dutra, A., Takesono, A., Garrett-Beal, L., and Schwartzberg, P.L. (2004).

Improved generation of C57BL/6J mouse embryonic stem cells in a defined serum-free media. *Genesis* 39, 100-104.

Choi, Y.J., Lin, C.P., Risso, D., Chen, S., Kim, T.A., Tan, M.H., Li, J.B., Wu, Y., Chen, C., Xuan, Z., *et al.* (2017). Deficiency of microRNA miR-34a expands cell fate potential in pluripotent stem cells. *Science* 355.

Chung, T.L., Brena, R.M., Kolle, G., Grimmond, S.M., Berman, B.P., Laird, P.W., Pera, M.F., and Wolvetang, E.J. (2010). Vitamin C promotes widespread yet specific DNA demethylation of the epigenome in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 28, 1848-1855.

Cimmino, L., Neel, B.G., and Aifantis, I. (2018). Vitamin C in Stem Cell Reprogramming and Cancer. *Trends Cell Biol* 28, 698-708.

Davies, T.J., and Fairchild, P.J. (2012). Optimization of protocols for derivation of mouse embryonic stem cell lines from refractory strains, including the non obese diabetic mouse. *Stem Cells Dev* 21, 1688-1700.

De Iaco, A., Coudray, A., Duc, J., and Trono, D. (2019). DPPA2 and DPPA4 are necessary to establish a 2C-like state in mouse embryonic stem cells. *EMBO Rep* 20.

De Iaco, A., Planet, E., Coluccio, A., Verp, S., Duc, J., and Trono, D. (2017). DUX-family transcription factors regulate zygotic genome activation in placental mammals. *Nat Genet* 49, 941-945.

Dunning, K.R., Cashman, K., Russell, D.L., Thompson, J.G., Norman, R.J., and Robker, R.L. (2010). Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod* 83, 909-918.

Dunning, K.R., Russell, D.L., and Robker, R.L. (2014). Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and beta-oxidation. *Reproduction* 148, R15-27.

Eckersley-Maslin, M., Alda-Catalinas, C., Blotenburg, M., Kreibich, E., Krueger, C., and Reik, W. (2019). Dppa2 and Dppa4 directly regulate the Dux-driven zygotic transcriptional program. *Genes Dev* 33, 194-208.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Furuta, A., and Nakamura, T. (2017). DNA hypomethylation circuit of mouse rDNA repeats in the germ cell lineage. *Biochem Biophys Res Commun* 490, 429-433.

Furuta, A., and Nakamura, T. (2021). Lipid droplets are formed in 2-cell-like cells. *J Reprod Dev*.

Hayashi, K., de Sousa Lopes, S.M.C., Tang, F., Lao, K., and Surani, M.A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell* 3, 391-401.

He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., *et al.* (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447, 1130-1134.

Hendrickson, P.G., Dorais, J.A., Grow, E.J., Whiddon, J.L., Lim, J.W., Wike, C.L., Weaver, B.D., Pflueger, C., Emery, B.R., Wilcox, A.L., *et al.* (2017). Conserved roles of mouse DUX and human DUX4 in activating cleavage-stage genes and MERVL/HERVL retrotransposons. *Nat Genet* 49, 925-934.

Ishiuchi, T., Enriquez-Gasca, R., Mizutani, E., Boskovic, A., Ziegler-Birling, C., Rodriguez-Terrones, D., Wakayama, T., Vaquerizas, J.M., and Torres-Padilla, M.E. (2015). Early embryonic-like cells are induced by downregulating replication-dependent chromatin assembly. *Nat Struct Mol Biol* 22, 662-671.

Kimura, Y., Oda, M., Nakatani, T., Sekita, Y., Monfort, A., Wutz, A., Mochizuki, H., and Nakano, T. (2015). CRISPR/Cas9-mediated reporter knock-in in mouse haploid embryonic stem cells. *Sci Rep* 5, 10710.

Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S.J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* *105*, 369-377.

Kunath, T., Arnaud, D., Uy, G.D., Okamoto, I., Chureau, C., Yamanaka, Y., Heard, E., Gardner, R.L., Avner, P., and Rossant, J. (2005). Imprinted X-inactivation in extra-embryonic endoderm cell lines from mouse blastocysts. *Development* *132*, 1649-1661.

Lallemand, Y., and Brulet, P. (1990). An in situ assessment of the routes and extents of colonisation of the mouse embryo by embryonic stem cells and their descendants. *Development* *110*, 1241-1248.

Leung, C.Y., and Zernicka-Goetz, M. (2015). Mapping the journey from totipotency to lineage specification in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* *34*, 71-76.

Li, P., Wang, L., Bennett, B.D., Wang, J., Li, J., Qin, Y., Takaku, M., Wade, P.A., Wong, J., and Hu, G. (2017). Rif1 promotes a repressive chromatin state to safeguard against endogenous retrovirus activation. *Nucleic Acids Res* *45*, 12723-12738.

Lin, J., Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2005). Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* *1*, 361-370.

Lu, F., and Zhang, Y. (2015). Cell totipotency: molecular features, induction, and maintenance. *Natl Sci Rev* *2*, 217-225.

Macfarlan, T.S., Gifford, W.D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H.M., Bonanomi, D., Firth, A., Singer, O., Trono, D., and Pfaff, S.L. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* *487*, 57-63.

Manning, B.D., and Toker, A. (2017). AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* *169*, 381-405.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos

cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.

Mathieu, J., and Ruohola-Baker, H. (2017). Metabolic remodeling during the loss and acquisition of pluripotency. *Development* 144, 541-551.

Morgani, S.M., and Brickman, J.M. (2014). The molecular underpinnings of totipotency. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369.

Morgani, S.M., Canham, M.A., Nichols, J., Sharov, A.A., Migueles, R.P., Ko, M.S., and Brickman, J.M. (2013). Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. *Cell Rep* 3, 1945-1957.

Niakan, K.K., Ji, H., Maehr, R., Vokes, S.A., Rodolfa, K.T., Sherwood, R.I., Yamaki, M., Dimos, J.T., Chen, A.E., Melton, D.A., *et al.* (2010). Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. *Genes Dev* 24, 312-326.

Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., and Oren, M. (2007). Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* 26, 731-743.

Rebouche, C.J. (1991). Ascorbic acid and carnitine biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 54, 1147S-1152S.

Rodriguez-Terrones, D., Gaume, X., Ishiuchi, T., Weiss, A., Kopp, A., Kruse, K., Penning, A., Vaquerizas, J.M., Brino, L., and Torres-Padilla, M.E. (2018). A molecular roadmap for the emergence of early-embryonic-like cells in culture. *Nat Genet* 50, 106-119.

Rodriguez-Terrones, D., Hartleben, G., Gaume, X., Eid, A., Guthmann, M., Iturbide, A., and Torres-Padilla, M.E. (2020). A distinct metabolic state arises during the emergence of 2-cell-like cells. *EMBO Rep* 21, e48354.

Rossant, J. (2007). Stem cells and lineage development in the mammalian blastocyst. *Reprod Fertil Dev* 19, 111-118.

Sato, T., Katagiri, K., Gohbara, A., Inoue, K., Ogonuki, N., Ogura, A., Kubota, Y., and Ogawa, T. (2011a). In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 471, 504-507.

Sato, T., Katagiri, K., Yokonishi, T., Kubota, Y., Inoue, K., Ogonuki, N., Matoba, S., Ogura, A., and Ogawa, T. (2011b). In vitro production of fertile sperm from murine spermatogonial stem cell lines. *Nat Commun* 2, 472.

Sharkis, S.J., Neutzel, S., and Collector, M.I. (2001). Phenotype and function of hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 938, 191-194; discussion 194-195.

Singh, A.M., Hamazaki, T., Hankowski, K.E., and Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 2534-2542.

Sone, M., Morone, N., Nakamura, T., Tanaka, A., Okita, K., Woltjen, K., Nakagawa, M., Heuser, J.E., Yamada, Y., Yamanaka, S., *et al.* (2017). Hybrid Cellular Metabolism Coordinated by Zic3 and Esrrb Synergistically Enhances Induction of Naive Pluripotency. *Cell Metab* 25, 1103-1117 e1106.

Stadtfield, M., Apostolou, E., Ferrari, F., Choi, J., Walsh, R.M., Chen, T., Ooi, S.S., Kim, S.Y., Bestor, T.H., Shioda, T., *et al.* (2012). Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat Genet* 44, 398-405, S391-392.

Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., *et al.* (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from

mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A.K., Nagy, A., and Rossant, J. (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* 282, 2072-2075.

Tatsumi, T., Takayama, K., Ishii, S., Yamamoto, A., Hara, T., Minami, N., Miyasaka, N., Kubota, T., Matsuura, A., Itakura, E., *et al.* (2018). Forced lipophagy reveals that lipid droplets are required for early embryonic development in mouse. *Development* 145.

Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K., and Niwa, H. (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* 135, 909-918.

Tsukiyama, T., Kato-Itoh, M., Nakauchi, H., and Ohinata, Y. (2014). A comprehensive system for generation and evaluation of induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition. *PLoS One* 9, e92973.

Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K., Okabe, M., Kimura, T., and Nakano, T. (2006). Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* 25, 2697-2707.

Whiddon, J.L., Langford, A.T., Wong, C.J., Zhong, J.W., and Tapscott, S.J. (2017). Conservation and innovation in the DUX4-family gene network. *Nat Genet* 49, 935-940.

Wu, G., Lei, L., and Scholer, H.R. (2017). Totipotency in the mouse. *J Mol Med (Berl)* 95, 687-694.

Xu, R.H., Chen, X., Li, D.S., Li, R., Addicks, G.C., Glennon, C., Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 20, 1261-1264.

Yang, J., Ryan, D.J., Lan, G., Zou, X., and Liu, P. (2019). In vitro establishment of

expanded-potential stem cells from mouse pre-implantation embryos or embryonic stem cells. *Nat Protoc* 14, 350-378.

Yang, J., Ryan, D.J., Wang, W., Tsang, J.C., Lan, G., Masaki, H., Gao, X., Antunes, L., Yu, Y., Zhu, Z., *et al.* (2017a). Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature* 550, 393-397.

Yang, Y., Liu, B., Xu, J., Wang, J., Wu, J., Shi, C., Xu, Y., Dong, J., Wang, C., Lai, W., *et al.* (2017b). Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency. *Cell* 169, 243-257 e225.

Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.

Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519-523.

Yu, Y., Liang, D., Tian, Q., Chen, X., Jiang, B., Chou, B.K., Hu, P., Cheng, L., Gao, P., Li, J., *et al.* (2014). Stimulation of somatic cell reprogramming by ERas-Akt-FoxO1 signaling axis. *Stem Cells* 32, 349-363.

Zalzman, M., Falco, G., Sharova, L.V., Nishiyama, A., Thomas, M., Lee, S.L., Stagg, C.A., Hoang, H.G., Yang, H.T., Indig, F.E., *et al.* (2010). Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. *Nature* 464, 858-863.

Zhou, L.Q., and Dean, J. (2015). Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. *Trends Cell Biol* 25, 82-91.

後藤悠比、修士論文、2015

鈴木健士、修士論文、2015

稲岡京介、修士論文、2016

比留田圭佑、修士論文、2019

中田健太、修士論文、2017

謝辞

本研究において、6年間ご指導ご助言いただきました中村肇伸教授に深く感謝いたします。時に応じて、厳しくご指導いただいたことや励ましてくださったことを通して、私自身の至らなさを実感できたことは今後の努力の糧になるものであります。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、共同研究としてSSRの成分を提供していただきました富士フィルム和光純薬上村光宏氏に深く感謝いたします。

博士過程で副査をお願い致しました向由起夫教授、齊藤修教授、また、修士課程において副指導教員をお願い致しました蔡晃植教授にはご多忙の中貴重なご意見とご助言を賜り深く感謝いたします。また、研究を進めていく上で、迷惑をかけ、お世話になったエピジェネティック制御学研究室の皆様にも深く感謝いたします。更に、貴重な生命を提供してくれた実験動物にも深く感謝するとともに、哀悼の意を表します。そして、大学、大学院の9年間暖かく見守り、辛抱強く支援して下さった両親に心から感謝します。