

低酸素環境がマウス胚性幹細胞（ES細胞）の 生殖細胞分化に及ぼす影響

三 原 敏 敬^{1, 2}、林 地 のぞみ³、寺 村 岳 士²、小野寺 勇 太²、
松 岡 俊 樹⁴、福 田 寛 二^{2, 4}、細 井 美 彦^{1, 3}

要 約

酸素濃度は、細胞の様々な生理的状态、遺伝子発現状態に影響を与え、初期発生とも深く関わっていることが知られている。酸素の濃度依存的に様々な遺伝子の発現を調節する転写因子として Hypoxia Inducible Factor (HIF) ファミリーの存在が知られており、中でも HIF-1 α 、2 α が多くの遺伝子の転写調節を行っていることが報告されている。近年、HIF ファミリーの発現が初期の生殖細胞発生に重要な役割を持っていることが示唆されているが、主体となっている分子とその機能は明らかとなっていない。

本研究では、マウス ES 細胞を材料に、低酸素環境下における生殖細胞発生関連遺伝子 (Blimp1、Stella、MVH) の発現変化を観察した。また、通常酸素濃度で HIF を誘導する Deferoxamine mesylate (DFO) を添加し、その結果を比較する事で、HIF 遺伝子が生殖細胞分化に与える影響について検討を行った。

1. 緒 論

生殖細胞は、有性生殖を行う生物において遺伝情報を次世代に伝達するための重要な役割を担っている。これらの生物の中でもショウジョウバエについては多くの生殖細胞特異的な遺伝子 (Oskar、Nanos、Vasa) が発見されており [1]、マウス等の哺乳類における生殖細胞の発生過程を解明する上で有用なモデルとなっている。これらの生殖細胞特異的な遺伝子の中でも、Vasa は線虫、ツメガエル、ゼブラフィッシュ、マウスにおいて相同遺伝子が発見されており [2]、それらの全てが生殖細胞特異的な発現をすることから、生殖細胞の発生過程において重要な役割を果たしている遺伝子ではないかと考えられている [3, 4]。そのため、ES 細胞からの生殖細胞への分化誘導研究においても広く用いられている遺伝子である。また、近年、マウス 6.5 日齢胚において Blimp1 を発現する細胞が始原生殖細胞 (PGC) へと分化することが報告され [5, 6]、哺乳類の生殖細胞の発生過程の解明や ES 細胞からの生殖細胞への分化誘導時における新たなマーカー遺伝子として注目を集めている。加えて Stella 遺伝子についても、これまでの報告により生殖細胞特異的なマーカー遺伝子として用いられている [7]。

胚性幹細胞 (ES 細胞) は三胚葉全ての細胞へと分化することが可能な分化多能性と高い自己複製能を持つ細胞であり、体内及び体外において生殖細胞へ分化する能力を有することから、生殖細胞の形成機構の解明や不妊治療の基礎研究における有用な材料として注目を集めている。[8, 9]。

近年、低酸素環境で誘導される HIF ファミリーが、様々な遺伝子発現の調節に関わっていることが示された。HIF ファミリーは通常の酸素環境では、翻訳後ユビキチン化により速やかに分解されるが、低酸素環境では安定化し、HRE (Hypoxia Response Element) に結合することによって幅広い遺伝子発現を直接調節することが明らかとなっている [10]。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀ノ川市西三谷 930

2. 近畿大学医学部附属病院高度先端総合医療センター／再生医療部門 〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

3. 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀ノ川市西三谷 930

4. 近畿大学医学部リハビリテーション科 〒589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2

近年、ES 細胞の未分化状態あるいは生殖細胞の形成過程においても HIF ファミリーが深く関わっていることが示された [11]。しかし、生殖細胞の分化制御、増殖に実際に関わっている HIF 分子は確定されておらず、またそのメカニズムは明らかとされていない。

本研究では、まず低酸素環境（1 % O₂）と通常の酸素環境（20 % O₂）において、マウス ES 細胞を培養し、生殖細胞関連遺伝子発現への低酸素環境の影響を検討した。次に、通常の酸素環境（20 % O₂）で HIF を誘導する機能を有する Deferoxamine mesylate (DFO) [12] を添加することにより、HIF の生殖細胞関連遺伝子発現への影響を検討した。

2. 材料と方法

・ ES 細胞の培養

当研究室で樹立し、生殖細胞系列への寄与を確認している C57BL 系マウス ES 細胞 (EL-1) を、ゼラチンコート処理を施した細胞培養用ディッシュ上に播種し、LIF を除去した ES 細胞培養液で培養した。培養条件には 1 % O₂、20 % O₂ の 2 区の酸素濃度を用い、酸素濃度以外は 37℃、5 % CO₂ 飽和湿度条件で統一した。

・ DFO を添加した ES 細胞の培養

ES 細胞は上記と同様のものを用い、ゼラチンコート処理を施した細胞培養用ディッシュ上に播種し、LIF を除去した ES 細胞培養液を用いて培養を行った。培養条件には、DFO の添加濃度を非添加、50 μM、100 μM、150 μM、200 μM の 5 区とし、DFO 添加濃度以外は 20 % O₂、37℃、5 % CO₂ 飽和湿度条件で統一した。

・ Real Time PCR

低酸素環境において培養した ES 細胞を、0.25 % Trypsin/0.04 % EDTA - PBS (-) を用いて細胞培養用ディッシュより解離し、細胞のみを回収した。回収した細胞に TRizol Reagent (Invitrogen) を用いて行い、cDNA 合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI) を使用した。Real Time PCR には、SYBR Green II (Takara) を用い、95℃ 10 秒、95℃ 5 秒、60℃ 30 秒を 40 サイクル繰り返した。使用したプライマーについては以下に示す。

遺伝子		配列	Tm 値
beta-Actin	F	5' -TTCCAGCCTTCCTTCTTG-3'	60.5
	R	5' -GTCACACTTCATGATGGAATTG-3'	61.8
Stella	F	5' -AGGCTCGAAGGAAATGAGT-3'	60.4
	R	5' -GCAGAAAGTGCAGAGACATC-3'	60.2
MVH	F	5' -TGCATCTGTTGACACGAGGA-3'	65.7
	R	5' -GTGAAGAAGAAATCCCCGCT-3'	64.2
Blimp1	F	5' -GGTACACACAGGAGAGAAGCC-3'	62.6
	R	5' -ATTGCTTGTGCTGCTAAATC-3'	59.5

・半定量解析

半定量解析には $\Delta\Delta$ CT法を用いて解析を行った。 $\Delta\Delta$ CT値の算出方法については以下に示す計算式を用いて算出した。

$$\Delta\text{CT 値} = \text{各遺伝子の発現量 (CT 値)} / \text{beta-Actin の発現量 (CT 値)}$$

$$\Delta\Delta\text{CT 値} = \text{各}\Delta\text{CT} / \text{キャリブレーターサンプル (ES 細胞) の}\Delta\text{CT 値}$$

・Western Blot 法及び Western Blot 法を用いた半定量解析

低酸素環境において培養を行った ES 細胞を、培養 2 日において回収後 SDS に溶解し、定法に従ってウェット式による Western Blot 解析を行った。MVH の発現解析には抗 MVH 抗体を用いた。

3. 結 果

低酸素環境において ES 細胞を培養した場合の生殖細胞関連遺伝子への影響を検討するため、Real Time PCR を用いた半定量解析を行った。その結果、生殖細胞関連遺伝子の一つである MVH の mRNA 発現が低酸素環境の影響により有意に上昇していることが示された。しかし、同時に検討を行った Blimp1 及び Stella の mRNA 発現については、有意差は確認されなかった (図 1)。

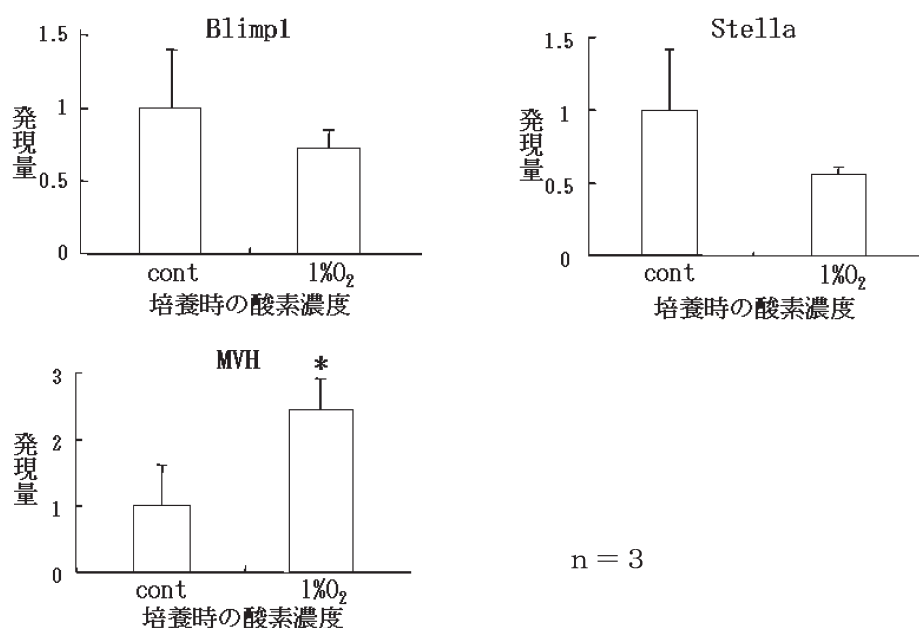


図 1. 各生殖細胞関連遺伝子の Real Time PCR による発現解析

* : $p < 0.05$ (mean + S.D.)

cont : Control = 20%酸素条件

そのため、有意な mRNA 発現の上昇が見られた MVH についてタンパク質の発現解析を行った。その結果、MVH のタンパク質発現についても mRNA 発現同様、低酸素環境の影響により有意に上昇していることが示された (図 2)。

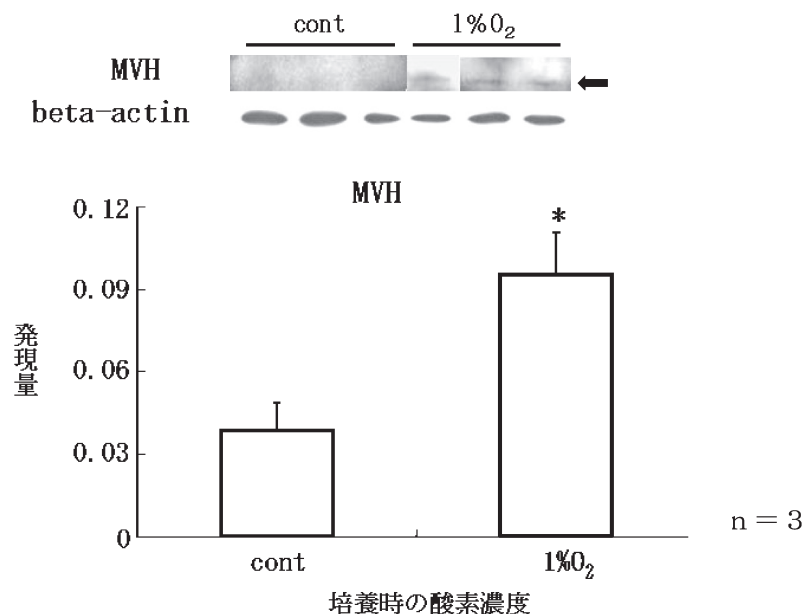


図2. Western Blot 法によるタンパク質発現解析及び半定量解析

← : MVH タンパク質検出部位

* : $p < 0.05$ (mean + S.D.)

cont : Control = 20%酸素条件

次に低酸素環境において発現上昇する HIF ファミリーのうち、どの因子が生殖細胞関連遺伝子に影響を与えているのかを検討するため、DFO を ES 細胞培養液に添加し、培養を行った。

DFO は通常の酸素環境において、HIF の発現を誘導する試薬である。そのため、DFO 添加により低酸素環境同様、MVH の発現が上昇すれば HIF が MVH の発現に関与していることを確認することができる。

まず通常の培養環境下に DFO を添加することにより HIF が上昇するのかを検討するため、HIF-1 α により発現が増加することが報告されている Sox9 [14] の mRNA 発現量を Real Time PCR により検討した。

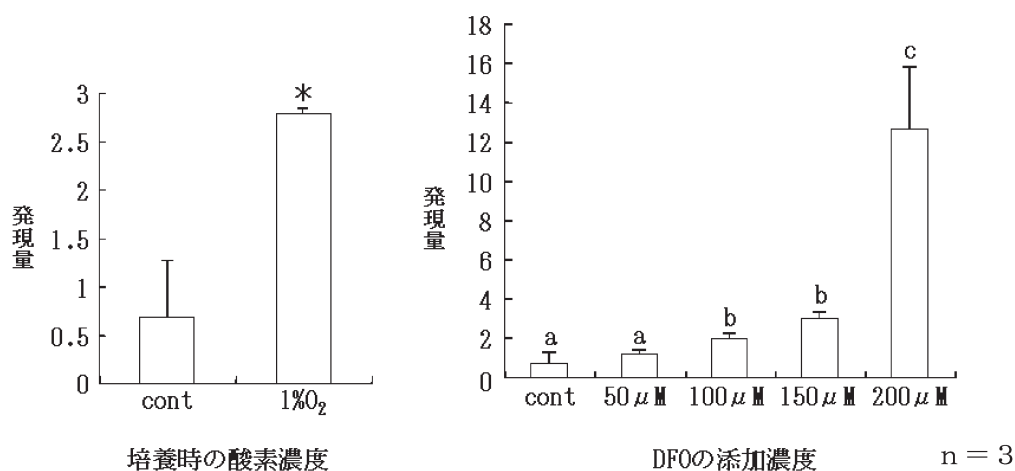


図3. DFO 添加による Sox9 発現への影響

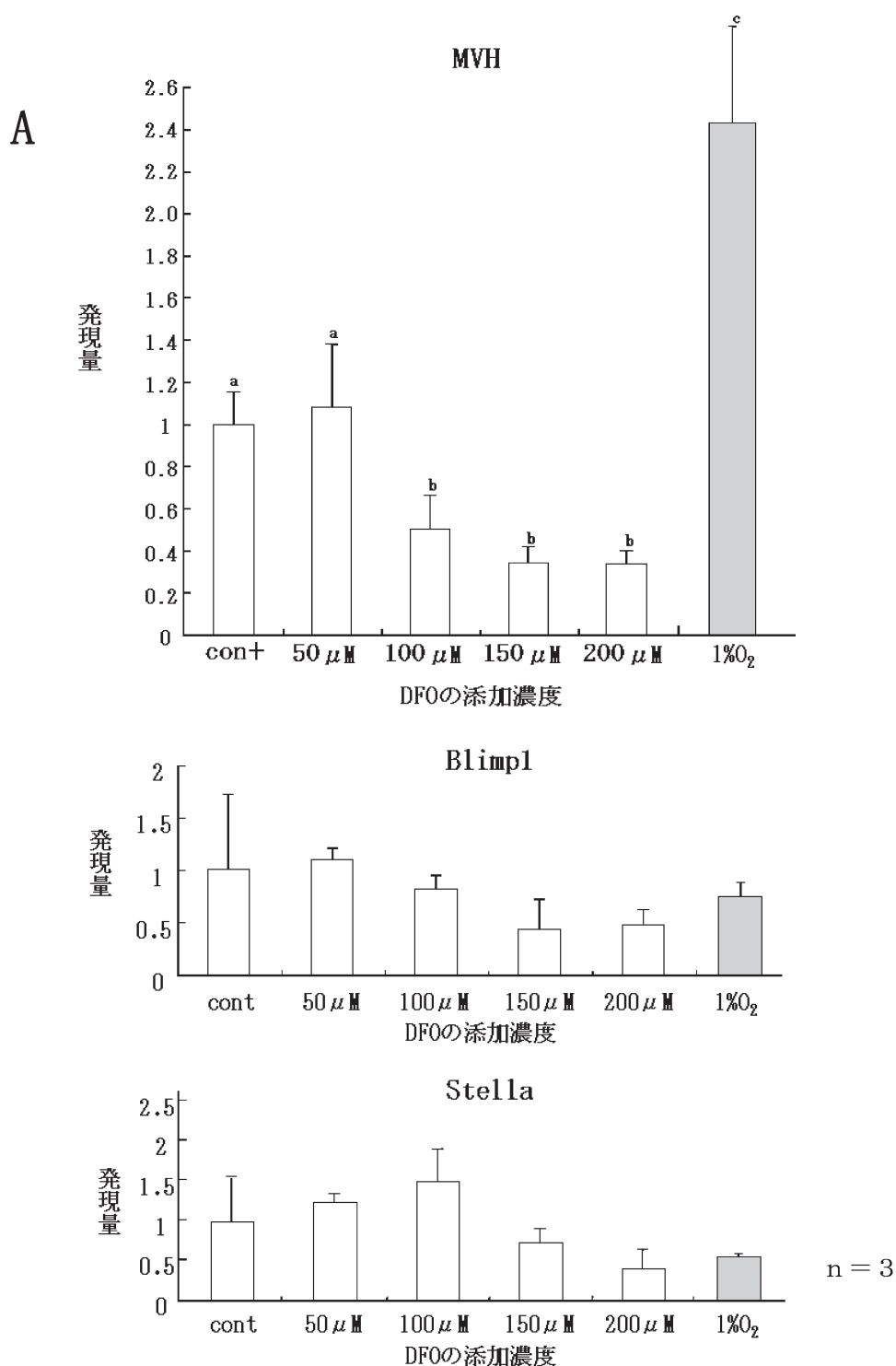
* : $p < 0.05$

a,b,c : $p < 0.05$ (mean+S.D.)

cont : Control = 20%酸素条件 + DFO 非添加

その結果、Sox9 の発現は低酸素環境同様、DFO 添加により上昇することが示された（図 3）。このことから、DFO が HIF-1 α の発現を誘導することが間接的に示唆された。

そこで同条件を用いて ES 細胞を培養し、生殖細胞関連遺伝子への HIF-1 α の影響を検討した。低酸素環境の影響により発現上昇の確認された MVH について Real Time PCR 及び Western Blot 法による発現解析を行った結果、mRNA 発現及びタンパク質発現において、有意な発現上昇は確認されなかった（図 4 A, B）。しかし、MVH の mRNA において、有意な発現低下が確認された。続いて他の生殖細胞関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、Blimp1 及び Stella の mRNA 発現についても有意な遺伝子発現の変化は見られなかった（図 4 A）。



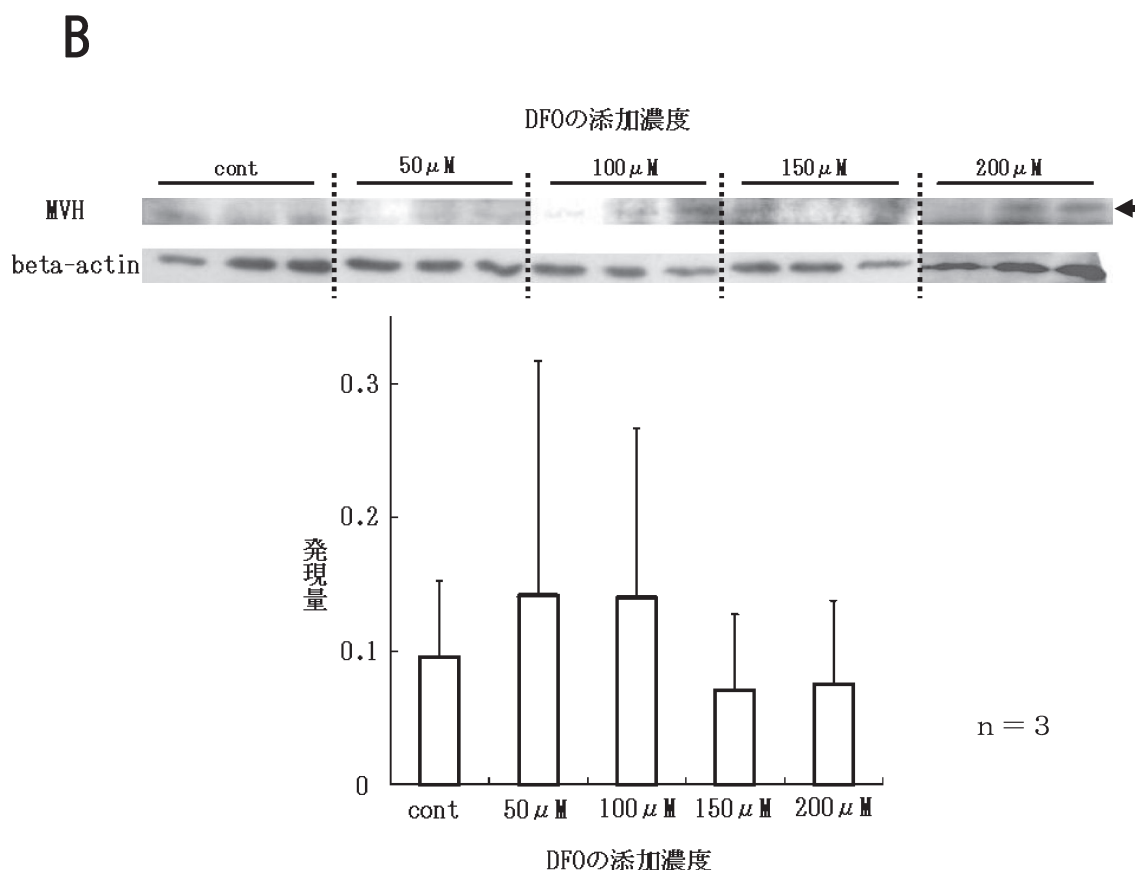


図4. DFO添加による生殖細胞関連遺伝子発現への影響

A : Real Time PCR による mRNA 発現解析

B : Western Blot 法によるタンパク質発現解析

← : MVH タンパク質検出部位

a,b,c : $p < 0.05$ (mean + S.D.)

cont : Control = 20%酸素条件 + DFO 非添加

4. 考 察

本研究では、低酸素環境により誘導される HIF ファミリーが ES 細胞における生殖細胞関連遺伝子にどのように影響するのかを検討することを目的とした。

本研究で観察した生殖細胞マーカーのうち、Blimp1 及び Stella については、低酸素下、DFO 添加のいずれの条件でも、mRNA の発現量には有意な変化は認められなかった。一方、低酸素環境において ES 細胞を培養することにより MVH の mRNA 発現及びタンパク質発現が有意に上昇することが示された。しかし、DFO 添加区では低酸素状態における変化とは逆に、MVH の mRNA 発現が有意に低下することが示された。また、有意差は認められなかったが、MVH のタンパク質発現についても発現量が低下する傾向が認められた。

本研究で発現の変化が観察された MVH は、生殖細胞への分化と同時に増殖にも関与している遺伝子である。子宮内における酸素濃度は 1 ～ 5% といった低酸素環境にあることが知られており [15]、MVH が本来発現を開始する 10.5 日齢胚は常に低酸素環境下にあるといえる。そのため、HIF の発現が MVH の発現上昇を誘起し、始原生殖細胞の細胞増殖に関与している可能性は高い。このことから、低酸素環境下での培養あるいは DFO の添加は HIF の安定化を通して PGC 形成関連遺伝子の発現を上昇させることが予想

された。近年、HIF-2 α が初期の生殖細胞で発現がみられる Oct-4 の発現を制御していることが示されており、これをノックアウトしたマウスでは始源生殖細胞（Primordial Germ Cells；PGCs）数が著しく低下することが報告されている [11]。低酸素環境下での培養で MVH の発現が上昇した事は、MVH の発現制御にも HIF が関与する可能性を示唆するものであった。

一方、DFO 添加区で MVH の発現低下が認められた事については、DFO のもつ細胞毒性が一因としてあげられる。本研究において、DFO が報告通り HIF を誘導するという事は、HIF-1 α あるいは HIF-2 α によって転写が促進される遺伝子である Sox-9 の発現により確認した。しかし、未分化な ES 細胞では、HIF ファミリーのうち主に HIF-1 α が機能しており、HIF-2 α は発現しているものの、機能的な関わりは薄いと考えられている。そのため、おそらく LIF 除去環境で分化を開始した時点で HIF-2 α が機能するようになると考えられるが、DFO 添加区では、何らかの要因によって HIF-2 α が生殖細胞の発生に機能する前に他系譜へと分化の傾倒した可能性も考えられる。

現在までに、HIF ファミリーには、HIF-1 α 以外に HIF2 α あるいは 3 α が知られている。特に、HIF-1 α と HIF-3 α は未知の部分が多く、近年では初期発生との関わりも知られるようになってきている。今後は HIF ファミリーである HIF-1 α や 2 α を、siRNA を用いてノックダウンした ES 細胞を用いて、同様の低酸素環境において培養を行うことで、今回の低酸素環境の影響により発現の上昇した生殖細胞関連遺伝子の一つである MVH に、どの HIF ファミリーが影響しているのかを検討することができないのかと考えられる。また、本研究において用いた低酸素環境は 1% O₂のみであり、真に生理学的条件においたとは考え難い。そのため、他の酸素濃度において同様の培養を行い、生殖細胞関連遺伝子の発現解析を行うことにより、より生殖細胞への分化誘導に適した酸素濃度を決定することができるかもしれない。

参 考 文 献

1. Liang L, Diehl-Jones W, Lasko P. (1994) Localization of vasa protein to the Drosophila pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120, 1201-1211.
2. Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto H, Furusawa M, Noce T. (1994) Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 12258-12262.
3. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T. (2000) The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.* 14, 841-853.
4. Noce T, Okamoto-Ito S, Tsunekawa N. (2001) Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct Funct.* 26, 131-136.
5. Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, Saitou M, Surani MA. (2005) Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature.* 436, 207-213.
6. Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, Yamanaka K, Ohinata Y, Saitou M. (2008) Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet.* 40, 1016-1022.
7. Payer B, Saitou M, Barton SC, Thresher R, Dixon JP, Zahn D, Colledge WH, Carlton MB, Nakano T, Surani MA. (2003) Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice.

Curr Biol. 13, 2110-2117.

- 8 . Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T. (2003) Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 100, 11457-11462.
- 9 . Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. Nature. 427, 148-154.
10. Jeong CH, Lee HJ, Cha JH, Kim JH, Kim KR, Kim JH, Yoon DK, Kim KW. (2007) Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in Vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. J Biol Chem. 282, 13672-13679.
11. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. (2006) HIF-2alpha regulates Oct-4 : effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. Genes Dev. 20, 557-570.
12. Wang GL, Semenza GL. (1993) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity : implications for models of hypoxia signal transduction. Blood. 82, 3610-3615.
13. Hu CJ, Iyer S, Sataur A, Covello KL, Chodosh LA, Simon MC. (2006) Differential regulation of the transcriptional activities of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in stem cells. Mol Cell Biol. 26, 3514-3526.
14. Amarilio R, Viukov SV, Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, Zelzer E. (2007) HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. Development. 134, 3917-3928.
15. Fischer B, Bavister BD. (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. J Reprod Fertil. 99, 673-679.

英文要旨

Effect of hypoxia on early germ cell differentiation
from a mouse embryonic stem cell line.Toshihiro Mihara^{1, 2}, Nozomi Hayashiji³, Takeshi Teramura², Yuta Onodera²,
Toshiki Matsuoka⁴, Kanji Fukuda^{2, 4}, Yoshihiko Hosoi^{1, 3}

Abstract

Hypoxia is involved in many physiological and pathophysiological processes such as erythropoiesis, tumor growth and embryo/fetal development. Hypoxia alters a lot of gene expression via stabilization of the hypoxia-inducible factor (HIF) family members. HIFs are heterodimeric transcription factors and bind to the defined hypoxia response element (HRE) in the promoter of the affected genes. Recently, it has been reported that the HIFs play some important roles in early germ cell development. However, the detailed mechanisms and the target genes remain unknown.

Here, we examined the effect of hypoxia and hypoxia-mimetic deferoxamine mesylate (DFO) on expression of primordial germ cell (PGC)-marker genes *Mvh*, *Stella* and *Blimp-1* using a mouse embryonic stem cell (ESC) line.

1. Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Nishimitani, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

2. Institute of Advanced Clinical Medicine, Kinki University School of Medicine, Ohno-Higashi, Osaka-Sayama, Osaka, 589-8511, Japan

3. Department of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University, Nishimitani, Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan

4. Department of Orthopaedic Surgery, Kinki University School of Medicine, Ohno-Higashi, Osaka-Sayama, Osaka 589-8511, Japan