

マウスエピブラスト幹細胞からの生殖細胞の分化誘導

福永直人¹、荒田隆志¹、大野真奈²、
岸上哲士^{1,2}、細井美彦^{1,2}

要 旨

近年、マウスエピブラストより、エピブラスト幹細胞 (Epiblast stem cells; EpiS 細胞) が樹立された^[1,2]。この EpiS 細胞はマウスより樹立されているが、マウス胚性幹細胞 (Embryonic stem cells; ES 細胞) よりもヒト ES 細胞に近い性質を有しており、幹細胞研究の新たなツールとして注目を集めている。この EpiS 細胞は、Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) の作用により始原生殖細胞 (Primordial germ cells; PGC) の前駆細胞で発現が確認される Blimp1 や Stella の発現が増加するが^[1]、ヒト ES 細胞と同様に減数分裂開始前後の PGC 様の細胞が誘導可能であるかは不明である^[3]。

本実験では、EpiS 細胞が BMP4 の作用により、PGC 様の細胞が誘導可能であるか、移動期で発現する Mvh 遺伝子や第一減数分裂開始前に発現する Stra8 遺伝子の発現を確認し検討を行った。

その結果、BMP4 の添加により、EpiS 細胞は PGC 様の細胞への誘導が促進されることが確認された。このことから、マウス EpiS 細胞は生殖細胞への分化様式がヒト ES 細胞と類似している可能性が示された。

1. 緒 論

近年、精子や卵子の元となる PGC は、胚体外外胚葉から作用する BMP4 の働きによりエピブラストから形成されることが解明された^[4]。また BMP4 は培養液中に添加することで、三胚葉系譜のすべての細胞に分化することのできるヒト ES 細胞に作用して PGC 様の細胞へと分化を促すことが報告されている^[3]。この作用は、ヒト ES 細胞が BMP4 の作用を受けて生殖細胞へと運命決定される、エピブラストに近い性質をもつためであると考えられる^[5]。さらに、近年マウスのエピブラストから EpiS 細胞が樹立され、マウス ES 細胞よりもヒト ES 細胞に類似した性質を有していることが報告された^[1,2]。EpiS 細胞はヒト ES 細胞に近い性質と、実験動物として確立されているマウスから樹立される点から、ヒト ES 細胞研究において有効なツールになることが期待されている。この EpiS 細胞も BMP4 を添加することで PGC の前駆細胞で確認される遺伝子の発現が増加する^[1]。しかし、ヒト ES 細胞と同様に、BMP4 の作用を受けて PGC 様の細胞に誘導されるかは不明である。ヒト ES 細胞と同様の方法で EpiS 細胞から生殖細胞の誘導が可能となれば、不妊治療への応用を視野に入れたヒト ES 細胞からの生殖細胞の分化誘導研究において有効なツールとなることが考えられる。

本実験では、EpiS 細胞が BMP4 の作用により、PGC 様の細胞が誘導可能であるか、移動期で発現する Mvh 遺伝子や第一減数分裂開始時に発現する Stra8 遺伝子の発現を確認し検討を行った。

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 材料と方法

・EpiS 細胞の培養

当研究室で樹立を行った C57BL 系マウス EpiS 細胞は、マイトマイシン処理を施したマウス胎仔性繊維芽細胞上で培養を行った。培養液には 20% KSR 含有、LIF 非添加マウス ES 培養液を用い、bFGF (Wako) を 6ng/ml 添加し培養を行った。また培養液は一日一回交換した。

・胚様体 (Embryoid body;EB) の形成と生殖細胞への分化誘導

0.25% Trypsin/0.04% EDTA-PBS (-) を用いて細胞培養用ディッシュより EpiS 細胞を解離し、50 μ l のハンギングドロップで培養 8 日目まで培養を行った。分化誘導で用いた培養液には 20% FBS 含有、LIF 非添加マウス ES 培養液を使用し、解離時の細胞死を抑えるため、実験区作成時のみ Y-27632 (Wako) を 10ng/ml 添加した。また培養液は一日一回交換した。実験区には 50ng/ml の BMP4 (Humanzyme) の添加、非添加区を作成し、分化誘導を行った。

・Real Time PCR

EpiS 細胞より形成させた EB は TRizol Reagent (Invitrogen) を用いて mRNA を抽出し、cDNA 合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI) を使用した。Real Time PCR には、SYBR Green I (Takara) を用い、95°C 10 秒、95°C 5 秒、60°C 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
<i>beta-Actin</i>	F	5'-TTCCAGCCTTCCTTCTTG-3'	60.5
	R	5'-GTCACACTTCATGATGGAATTG-3'	61.8
<i>Stella</i>	F	5'-AGGCTCGAAGGAAATGAGT-3'	60.4
	R	5'-GCAGAAAGTGCAGAGACATC-3'	60.2
<i>Nanog</i>	F	5'-ACCAGTGGTTGAAGACTAGCAAT-3'	62.7
	R	5'-CTGCAATGGATGCTGGGATA-3'	65.8
<i>Stra8</i>	F	5'-CCCCTCCTCCTCCACTCTC-3'	65.2
	R	5'-AGGTCCATGGTCTGCTTGTA-3'	63.4
<i>Mvh</i>	F	5'-TGCATCTGTTGACACGAGGA-3'	65.7
	R	5'-GTGAAGAAGAAATCCCCGCT-3'	64.2

・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。

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

$$\Delta\Delta \text{CT 値} = \text{各} \Delta \text{CT} / \text{キャリアプレートーサンプル (EpiS 細胞) の} \Delta \text{CT 値}$$

・免疫組織化学染色

EpiS 細胞より形成させた EB を O.C.T Compound (SAKURA) で包埋し、定法に従って凍結切片を作成した。その後、4% パラホルムアルデヒドで固定処理を行い、定法に従って免疫組織化学染色を行った。本実験では MVH の発現解析に、抗 human VASA 抗体 (R & D) を用いた。

• Western Blot

EpiS 細胞より形成させた EB は 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。免疫組織化学染色と同様に、MVH の発現解析には抗 human VASA 抗体を用いた。

3. 結 果

EpiS 細胞より形成させた EB は BMP4 添加、非添加区において形態に大きな差は見られなかった (図 1)。

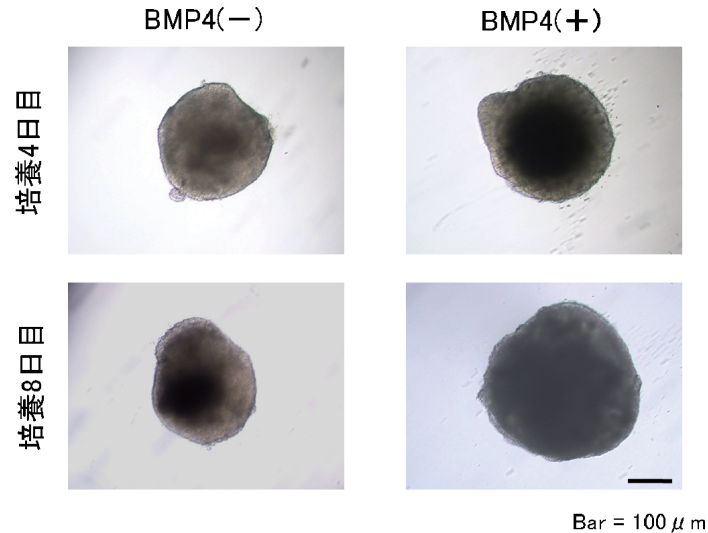


図 1. BMP4 添加、非添加区の EB の形態

そこで、生殖細胞関連遺伝子への影響を確認するため、Real Time PCR を用いて半定量解析を行った。結果、PGC 形成初期に発現する *Stella*^[6]、*Nanog*^[7]、PGC の移動期に発現する *Mvh*^[8]、第一減数分裂の開始時に発現する *Stra8*^[9] は BMP4 添加、非添加区の両区において発現が確認された (図 2)。このとき、BMP4 非添加区では培養 8 日目にかけて各生殖細胞関連遺伝子の発現量は増加するが、BMP4 の添加区では培養 4 日目で有意に発現量が増加し、培養 8 日目に減少することが確認された。

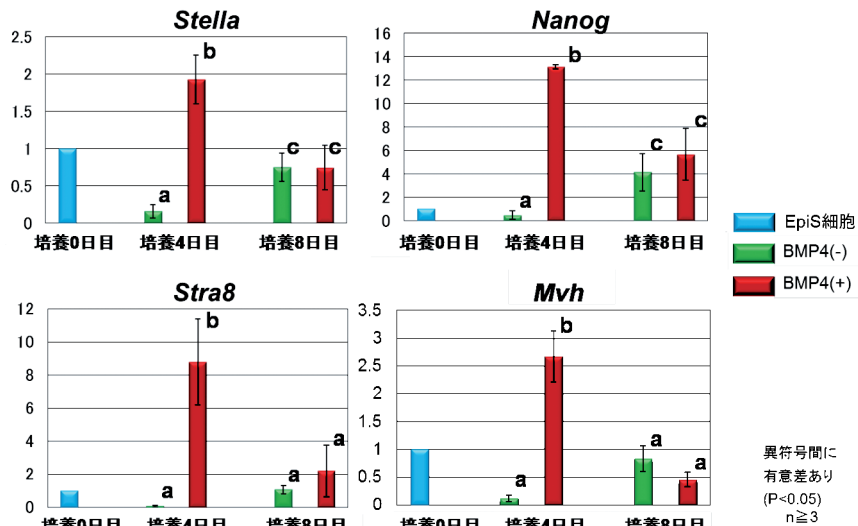


図 2. BMP4 添加が生殖細胞関連遺伝子に及ぼす影響

さらに MVH 遺伝子発現を免疫組織化学染色で確認したところ、Real Time PCR における結果と同様、BMP4 添加、非添加区の両区において発現が確認された (図 3)。

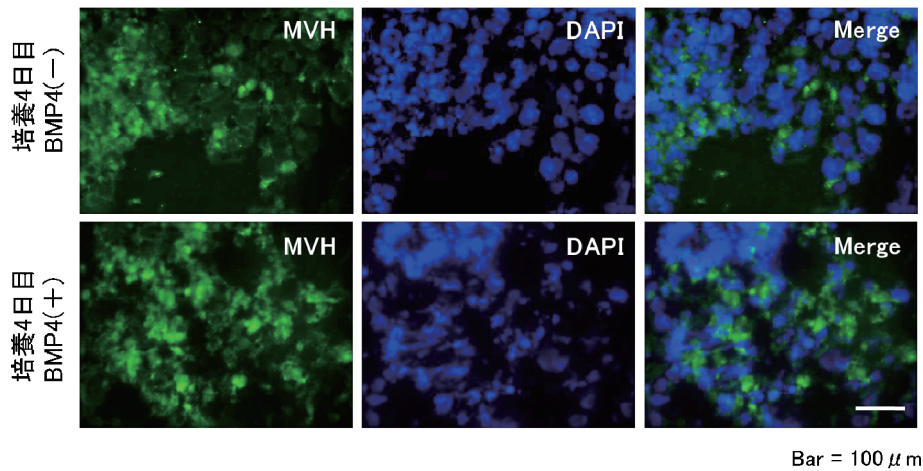


図 3. 免疫組織化学染色による MVH タンパク質発現解析

次に MVH タンパク質の発現量を比較するため、Western Blot を用いて解析を行ったところ、やはり BMP4 添加、非添加区の各実験区において発現が確認されたが、中でも BMP4 添加区の培養 4 日目において発現量増加する傾向が確認された (図 4)。

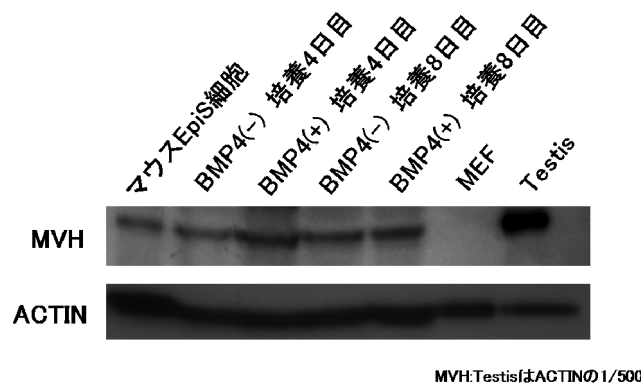


図 4. Western Blot による MVH タンパク質発現解析

4. 考 察

EpiS 細胞はキメラマウスを作成しても生殖細胞系譜へと寄与しないことが示されているが^[1]、in vitro で卵子様の細胞へと分化することが報告されているため、生殖細胞系譜へと分化可能であることは証明されている^[10]。本研究ではこの EpiS 細胞が、ヒト ES 細胞と同様に BMP4 の作用を受けて PGC 様の細胞へと分化が可能であるか、ヒト ES 細胞との分化様式の類似性を検討することを目的とした。

本研究から、まず BMP4 の添加、非添加に関わらず、生殖細胞関連遺伝子の発現が上昇することが示された。EB を形成することで自発的に PGC 様の細胞が得られることは、マウス ES 細胞、ヒト ES 細胞さらにはカニクイザル ES 細胞でも同様である^[11, 12, 13]。このとき、形成された EB において BMP4 添加による形態的な変化は確認されなかったが、生殖細胞関連遺伝子の発現は、BMP4 添加区の培養 4 日目で有意に増加していることが確認された。また生殖細胞関連遺伝子である Mvh 遺伝子のタンパク質の発現も BMP4 添加区の培養 4 日目で増加する傾向が確認された。in vivo では、Stella、Nanog、Stra8、Mvh の発

現と同時に確認されるのは減数分裂開始前後であり、Stra8 は第一減数分裂への移行に必要とされる遺伝子である^[9]。そのため、少なくとも BMP4 の添加、非添加区において誘導された PGC 様の細胞は減数分裂の直前まで発生が進んでいると考えられ、BMP4 を添加することで PGC 様細胞への誘導が促進されることが示された。

しかし、PGC 様細胞への誘導の促進が確認された BMP4 添加区では培養 8 日目において生殖細胞関連遺伝子の発現が低下していた。この原因として Nanog の発現に注目した。Nanog は生殖細胞の生存性を維持する遺伝子として報告されている^[14]。BMP4 添加区において、培養 4 日目から 8 日目にかけて Nanog の発現も減少していることから、誘導された PGC 様の細胞の生存性が低下し、それとともなって生殖細胞関連遺伝子が低下している可能性が考えられる。in vivo において、PGC を形成するには BMP4 の作用が主に働くが、LIF や BMP8b、Nodal や Wnt3 シグナルなど補助的に働くシグナル因子が多数存在し、さらに in vivo に存在する未知の因子の重要性が報告されている^[5]。また立体構造の重要性も示唆されており^[15]、今回誘導方法として用いた BMP4 のみを添加し EB を形成させる方法は、PGC 以降の生殖細胞の発達を支持することが難しいことが示された。

このように、幹細胞から自発的に誘導可能な PGC 様の細胞以上に発達した生殖細胞を誘導するためには、より多くの知見の蓄積と、それを応用した基礎実験での検討が必要であり、移植実験等、制限のかかるヒト ES 細胞を使用して生殖細胞の研究を行うことは難しいと考える。しかし、現在不妊症は社会的問題の一つであり、不妊治療の更なる発展は急務である。本研究結果から、マウス EpiS 細胞は生殖細胞への分化様式がヒト ES 細胞と類似している可能性が示唆された。そのため、ヒトと比較して倫理問題の観点から動物実験が比較的容易に行えるマウスで研究を行うことが可能であり、なおかつヒト ES 細胞へと知見が応用できる可能性のあるマウス EpiS 細胞は、今後の幹細胞を用いた生殖細胞研究において重要な細胞になるかもしれない。

参考文献

1. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*.2007;448 (7150):196-9
2. Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*.2007;448 (7150):191-5.
3. Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*.2006;15 (6):831-7.
4. Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, Saitou M. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*.2009;137 (3):571-84.
5. Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev*.2008;22 (15):1987-97.
6. Sato M, Kimura T, Kurokawa K, Fujita Y, Abe K, Masuhara M, Yasunaga T, Ryo A, Yamamoto M, Nakano T. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech Dev*.2002;113 (1):91-4.
7. Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns*.2005;5 (5):639-46.
8. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T. The

- mouse homolog of *Drosophila Vasa* is required for the development of male germ cells. *Genes Dev.*2000;14 (7):841-53.
- 9 . Oulad-Abdelghani M, Bouillet P, Décimo D, Gansmuller A, Heyberger S, Dollé P, Bronner S, Lutz Y, Chambon P. Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by *Stra8*, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol.*1996;135 (2):469-77.
 10. Hayashi K, Surani MA. Self-renewing epiblast stem cells exhibit continual delineation of germ cells with epigenetic reprogramming in vitro. *Development.*2009;136 (21):3549-56.
 11. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature.* 2004;427 (6970):148-54.
 12. Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet.*2004;13 (7):727-39.
 13. Teramura T, Takehara T, Kawata N, Fujinami N, Mitani T, Takenoshita M, Matsumoto K, Saeki K, Iritani A, Sagawa N, Hosoi Y. Primate embryonic stem cells proceed to early gametogenesis in vitro. *Cloning Stem Cells.*2007;9 (2):144-56.
 14. Yamaguchi S, Kurimoto K, Yabuta Y, Sasaki H, Nakatsuji N, Saitou M, Tada T. Conditional knockdown of *Nanog* induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. *Development.*2009;136 (23):4011-20.
 15. Nakatsuji N, Chuma S. Differentiation of mouse primordial germ cells into female or male germ cells. *Int J Dev Biol.*2001;45 (3):541-8.

英文要旨

Derivation of germ cells from mouse epiblast stem cells

Naoto Fukunaga¹, Takashi Arata¹, Mina Oono²,
Satoshi Kishigami^{1, 2}, Yoshihiko Hosoi^{1, 2}

Abstract

Recently, mouse epiblast stem cells (EpiSCs) were established from mouse epiblast. These cell's characters are similar to human embryonic stem cells (ESCs) than mouse ESCs. Because of this point, EpiSCs have started to gain attention as a new tool for stem cell research. In this study, we examined whether EpiSCs can differentiate into germ cells in a similar manner as human ESCs. Human ESCs can differentiate to primordial germ cells (PGCs) when bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is added to culture medium. Similarly, when BMP4 is added EpiSCs can increase Blimp 1 and Stella that are precursor cells of PGCs marker. However, it is not clear whether BMP4 can influence EpiSCs to differentiate into PGCs. As a result, EpiSCs promoted expression of late PGCs marker gene, MVH and Stra8 when BMP4 is added. These results show that EpiSCs are differentiated to germ cells in a manner similar to human ESCs. EpiSCs may be available not only for stem cell research, but also in advancing germ cell research with human ESCs.

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

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