

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660250

研究課題名(和文)メチル化DNA可視化マウス(メチロー)を用いた細胞の評価

研究課題名(英文)Assesment of cellular quality using methylated DNA reporter mouse, MethyIRO

研究代表者

山縣 一夫(YAMAGATA, Kazuo)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：10361312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：平成26年度は、メチローマウス由来のES細胞や初期胚の解析を進めることで、細胞分化にともなって核内のDNAメチル化の強度やヘテロクロマチンパターンのパターンに大きな変化が生じることを定量的に証明し、Stem Cell Reports誌で発表することができた。27年度は、それまでに確立した長時間高精細ライブセルイメージング技術を応用・改良し、単一ES細胞からコロニー形成に至るまで細胞が増殖してゆく過程、ES細胞からエピプラスト幹細胞が、エピプラスト幹細胞から始原生殖様細胞が誘導されてくる過程の核内メチル化DNAの変動を定量化するために、各種培養やイメージング条件の設定を行った。

研究成果の概要(英文)：In 2014-2015, we elucidated that intensity and intra-nucleic pattern of methylated DNA were dynamically changed during cellular differentiation by using ES cells and preimplantation embryos. With these data, we have reported and published in Stem Cell Report Journal. In 2015-2016, by improving the above "long-term and high-resolution live-cell imaging technology", we determined the experimental conditions to capture and quantify the processes of colony formation of ES cells from single cell and of germ cell formation from ES cell.

研究分野：発生工学、生殖生物学

キーワード：DNAメチル化 細胞評価 メチロー ライブセルイメージング

1. 研究開始当初の背景

ゲノムのエピジェネティック修飾や、それに起因するクロマチンの細胞核内の構造は、発生や細胞分化に伴い大規模に変化することが知られている。さらに、最近では癌などの病態変化や、外的ストレスによってもさまざまな細胞においてそれらが変動することが知られ始めてきている。しかし、免疫染色やシークエンシングを基にする従来のエピジェネティクス状況の解析法では、細胞や組織を固定・破碎する必要があるため、単一細胞の継時的な変化を追跡することは不可能であった。この問題を解決するため、申請者らはこれまでに初期胚の DNA メチル化状態を生きたまま時空間的に可視化できる技術開発を行ってきた (Yamagata et al., *Dev Biol*, 2007; Okada et al., *Nature*, 2010)。またごく最近、それを個体全体で可視化できるレポーターマウスの開発に成功した (メチローと命名。Ueda et al., *Stem Cell Rep*, 2014, 本論文の一部は本課題の成果である)。このメチローマウスは、メチル化 CpG 配列を認識する MBD1 (Methylcytosine Binding Domain Protein 1) タンパク質のメチル化 DNA 結合ドメイン (MBD) に赤色蛍光蛋白質を融合した遺伝子を、マウス個体でユビキタス且つ均一に発現することで知られている ROSA26 遺伝子座にノックインすることで DNA のメチル化を全身で可視化している (図 1)。このマウスを用いて着床前初期胚、ES 細胞、体細胞などの核内構造をライブセルイメージングし画像解析を行ったところ、細胞の未分化性が高ければ高いほど、DNA のメチル化状態や修飾によって構成されるヘテロクロマチンの流動性が高いことが観察された。つまり、このマウスの各種細胞核の時空間的变化を指標にすることで、細胞の分化状態や病態などの応答変化を生きたまま個体レベルで評価できる可能性があることを示している。

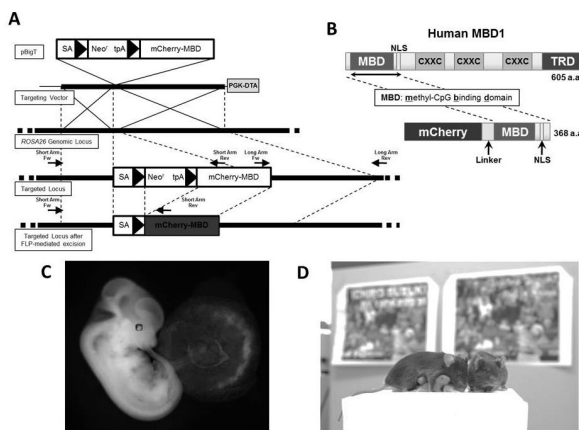


図 1 メチローマウス作製のストラテジー (A) ノックインストラテジー。全身の細胞で均一な発現が見られる ROSA26 遺伝子座に相同組み換え法によりノックインした。(B) プロープに用いたヒト MBD1 の分子構造と、プロープの構造。(C) メチローの胎児。全身の細胞でプロープが発現している。(D) メチローの親子。メチローマウスは健康かつ生殖可能。

2. 研究の目的

本研究では、以上のような背景をもとに、メチローマウスを用いて細胞のエピジェネティックな状況をこれまでよりさらに高精細に、かつ生きたまま評価する系を立ち上げることを目的とする。本目的を達成させるために、これまでに開発してきた顕微鏡システムを大きく改良する。合わせて、各種画像解析技術を用いて、細胞核内の蛍光シグナルを評価する方法を開発する。それらを用いて、メチローマウスの発生や老化・ストレス応答にもなう各種細胞の分化・応答において、細胞核内の DNA メチル化の程度やその核内構造パターンの時空間的变化を観察し、それらを画像・統計処理によりパターン化することで、細胞の状態を示す指標を作る。

3. 研究の方法

(1) 平成 26 年度：細胞や組織の長時間高解像イメージングの確立と条件設定

申請者らは、これまでにマウス初期胚発生の各種イベントを長時間観察できるライブセルイメージング技術の開発を行ってきた (Yamagata et al., *J Reprod Dev*, 2009; Yamagata et al., *Dev Growth Differ*, 2013)。その最大の特徴は細胞に対する低侵襲性である。これにより、長時間の観察が可能になり、例えば初期胚から ES 細胞が誘導されて来る 10 日間の連続三次元観察も可能にしている (Yamagata et al., *Dev Biol*, 2010)。また、より細胞にダメージなく観察できる顕微鏡器具の改良や (Yamagata et al., *PLoS one*, 2012)、共同研究により生体組織深部観察のための顕微鏡開発 (Shimozawa et al., *PNAS*, 2012) も行ってきた。一方、核内構造を詳細に観察するためには、これまでよりも高解像な画像取得が望まれる。そこで、26 年度はこれまでに蓄積したノウハウや、さまざまな人的交流を活用して、長時間にわたって細胞や個体組織の核内をダメージなく高解像度に観察できる顕微鏡システムの構築と、その条件設定を行なった。具体的には以下の改良を検討した。

・われわれの顕微鏡システムが細胞に対して光毒性が少ないのは、スピニングディスク式の共焦点顕微鏡を用いているためであることはすでに明らかになっている。これまでの検討により、感度や分解能、細胞へのダメージはディスク上のピンホールの大きさやホール間の距離に依存することがあきらかとなっていた。そこで、より高精細に観察しても細胞毒性を抑えられるように、ディスクの改良を行うことでより最適な条件を探った。

・CMOS カメラの画素数は EM-CCD の 20 倍ほどであり、撮影した画像の分解能の大幅な向上が見込める。反面、感度が約 4 分の 1 に劣る。そこで、これらを両立させるような条件を検討するため、顕微鏡光学系やレーザー強度

とのバランスと合わせて検討した。

以上のような顕微鏡ハードの改良に加えて、画像解析法のようなソフト面での改良も行った。具体的には、得られた顕微鏡画像について画像解析ソフトを用いてバイアスをかけずにノイズ除去、二値化、レンダリングを行うことで領域を設定し、細胞核の中の蛍光輝度やパターンをもとに細胞の状態を評価できる指標の策定を行った。

(2) 平成27年度：メチロームを用いた細胞評価基準の確立

上述のように、すでにわれわれは細胞の分化段階にともなって核内の構造が光学顕微鏡レベルで変化することを明らかにしている (Ueda et al., Stem Cell Rep, 2014、一部は本課題の成果)。また、体細胞クローン胚のような異常胚においても劇的に DNA メチル化の強度や核内パターンに相違があることも見出している (Yamagata et al., Dev Biol, 2007; Mizutani et al., Dev Biol, 2012)。これらの知見をもとに、26年度に改良した顕微鏡システムを用いてメチロームの発生段階の各種細胞、特に申請者がこれまで研究対象としてきて、その核内で大規模なリプログラミングが起きていることが知られている生殖細胞系列や ES 細胞に着目しながらその核内におけるメチル化 DNA の強度や核内局在性を撮影した。得られた画像について、26年度に策定した評価基準を適用し、実際に核内のシグナルによって細胞の分化状態を評価できるかの検討を行った。

4. 研究成果

(1) 平成26年度は、共焦点顕微鏡のディスクや検出系の改良を行い、高精細かつ初期胚に対してダメージの少ない観察法の確立に成功した。合わせて、開発した画像解析アルゴリズムをもとに、核内構造やクロマチンの流動性を数値化し、各種細胞の分化状態を区別することができた。これら一連の技術を用いて、メチローム由来の ES 細胞や初期胚の解析を進めることで、細胞分化にともなって核内の DNA メチル化の強度やヘテロクロマチンパターンのパターンに大きな変化が生じることを定量的に証明し、Stem Cell Reports 誌で発表することができた (図2)。

(2) 27年度は、それまでに確立した長時間高精細ライブセルイメージング技術を応用・改良し、単一 ES 細胞からコロニー形成に至るまで細胞が増殖してゆく過程、ES 細胞からエピプラスト幹細胞が、エピプラスト幹細胞から始原生殖様細胞が誘導されてくる過程の核内メチル化 DNA の変動を定量化するために、各種培養やイメージング条件の設定を行った。

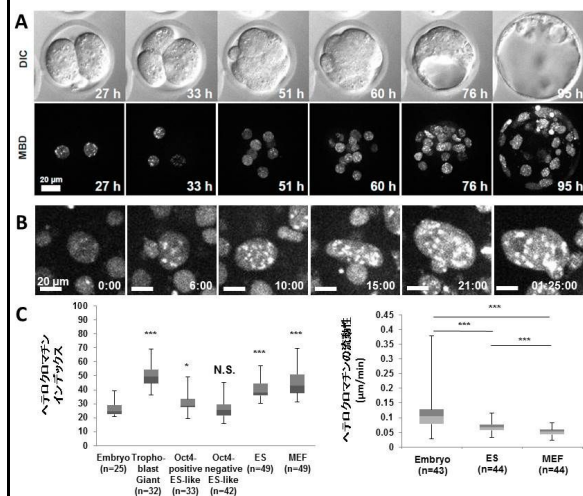


図2 メチローム由来の初期胚の長時間イメージング

(A) 受精卵から胚盤胞期までの約4日間の連続観察。実際は10分おきに観察したのから、各ステージの画像を選んだ。このプロブは細胞ごとに均一に発現し、単一細胞の長時間観察が可能である。(B) 胚盤胞期胚から栄養膜細胞(将来胎盤になる)が分化誘導される過程の核内構造の変化。細胞核内でメチル化強度が上昇し、顕著にヘテロクロマチン構造が構築されてくる。(C) 初期胚から分化した各種細胞を撮影し、得られた画像情報から独自に開発したアルゴリズムと計算式でヘテロクロマチン・インデックスとその流動性を導いた。細胞の分化状態によってこれら指標に違いがある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8件)

Muro Y, Hasuwa H, Isotani A, Miyata H, Yamagata K, Ikawa M, Yanagimachi R, Okabe M. Behavior of Mouse Spermatozoa in the Female Reproductive Tract from Soon after Mating to the Beginning of Fertilization. Biol Reprod. 2016 Apr;94(4):80. doi: 10.1095/biolreprod.115.135368.

Isotani A, Yamagata K, Okabe M, Ikawa M. Generation of Hprt-disrupted rat through mouse rat ES chimeras. Sci Rep. 2016 Apr 11;6:24215. doi: 10.1038/srep24215.

Vázquez-Diez C, Yamagata K, Trivedi S, Haverfield J, FitzHarris G. Micronucleus formation causes perpetual unilateral chromosome inheritance in mouse embryos. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jan 19;113(3):626-31. doi: 10.1073/pnas.1517628112.

Nakatani T, Yamagata K, Kimura T, Oda M, Nakashima H, Hori M, Sekita Y, Arakawa T, Nakamura T, Nakano T. Stella preserves maternal chromosome integrity by inhibiting 5hmC-induced H2AX

accumulation. EMBO Rep. 2015 May;16(5):582-9.

doi: 10.15252/embr.201439427.

Iwamoto D, Yamagata K, Kishi M, Hayashi-Takanaka Y, Kimura H, Wakayama T, Saeki K. Early development of cloned bovine embryos produced from oocytes enucleated by fluorescence metaphase II imaging using a conventional halogen-lamp microscope. Cell Reprogram. 2015 Apr;17(2):106-14.

doi: 10.1089/cell.2014.0086.

Kimura H, Yamagata K. Visualization of epigenetic modifications in preimplantation embryos. Methods Mol Biol. 2015;1222:127-47.

doi: 10.1007/978-1-4939-1594-1_10.

Bashar MK, Yamagata K, Kobayashi TJ. Improved and robust detection of cell nuclei from four dimensional fluorescence images. PLoS One. 2014 Jul 14;9(7):e101891.

doi: 10.1371/journal.pone.0101891. eCollection 2014.

Ueda J, Maehara K, Mashiko D, Ichinose T, Yao T, Hori M, Sato Y, Kimura H, Ohkawa Y, Yamagata K. Heterochromatin dynamics during the differentiation process revealed by the DNA methylation reporter mouse, MethylRO. Stem Cell Reports. 2014 Jun 3;2(6):910-24.

doi: 10.1016/j.stemcr.2014.05.008. eCollection 2014 Jun 3.

〔学会発表〕(計 2 件) 招待講演のみ記載

山縣一夫、初期胚ライブセルイメージングを始めるには～タイムラプスを用いた知見を含めて～、第 11 回日本生殖再生医学会学術集会 2016 年 3 月 6 日、シェーンバッハ・サボー、東京都千代田区

山縣一夫、Mouse testis specific histone H3 variant, H3t is essential for spermatogenesis、第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市

山縣一夫、初期胚ライブセルイメージングを始めよう。、第 33 回日本受精着床学会総会・学術講演会、2015 年 11 月 26 日、東京ビックサイト、東京都江東区

Kazuo Yamagata, Live-cell imaging of chromatin and DNA-methylation dynamics using MethylRO mouse, 6th Hiroshima Conference on Education and Science in Dentistry 広島大学シンポジウム 2015 年 10 月 24 日、International Conference Center Hiroshima, Hiroshima-city

山縣一夫、ライブセルイメージングを用いた着床前初期胚の質の評価、関西実験動物研究会第 127 回研究会、2015 年 9 月 12 日、

大阪大学銀杏会館、大阪府吹田市

山縣一夫、ライブセルイメージングで「卵子の質」を評価する、第 55 回日本卵子学会、2014 年 5 月 17 日、神戸国際会議場、兵庫県神戸市

Kazuo Yamagata, Quantification of embryo quality by live-cell imaging, 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2014 年 5 月 28 日、愛知県産業労働センター-WINC AICHI, 愛知県名古屋

山縣一夫、ライブセルイメージングで「卵子の質」を定量化する、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 13 日、奈良県新公会堂、奈良県奈良市

山縣一夫、メチローで動くメチル化 DNA を追う、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16 日、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都、京都府京都市

山縣一夫、初期胚の高精細イメージングで見えてくるもの、第 59 回日本生殖医学会学術講演会、2014 年 12 月 4 日、京王プラザホテル、東京都新宿区

山縣一夫、メチローマウスで動くメチル化 DNA を追う、平成 26 年度基礎生物学研究所重点共同利用研究「哺乳類初期胚の発生胴体解析システムの構築とその応用」公開研究会、2014 年 1 月 19 日、基礎生物学研究所、愛知県岡崎市

Kazuo Yamagata, Visualization of Dynamics of Methylated DNA in living cell and animal, International Symposium on Bio-imaging and Gene Targeting Science in Okayama, 2014 年 2 月 15 日、岡山大学創立五十周年記念館金光ホール、岡山県岡山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
該当ありません。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山縣 一夫 (YAMAGATA, Kazuo)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号: 10361312

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし