

# 研究報告書

## 「X染色体再活性化ライブメーキング技術を用いた幹細胞研究」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 小林 慎

### 1. 研究のねらい

近年、ヒト iPS 細胞の樹立が報告され、幹細胞を用いた再生医療への応用に期待が集まっている。しかし、一口に幹細胞といっても複数の種類があり分化能に違いがあることが分かってきた。幹細胞の分化能を表す新しい表現として、naïve 状態と primed 状態という区別が用いられるようになってきている。マウスの ES (mES) 細胞は naïve 状態を示す細胞で、非常に高いキメラ形成能を持ち、生殖細胞へも寄与しうる。一方、これまでヒト ES 細胞 (iPS 細胞) として同定された「幹細胞」は、マウスの ES 細胞が持つ多能性 (naïve 状態) はなく、限られた細胞種にしか分化できずキメラへの寄与率もほとんど認められない primed 状態を示すことが分かってきた (図 1)。ヒト ES (iPS) 細胞は、むしろマウスの EpiSC (epiblast stem cell) として報告された mES 細胞より分化の進んだ状態の幹細胞と似た性質を持つ。ヒトの再生医療への応用を考えると、primed 状態から naïve 状態のヒト iPS 細胞を作製することが、医療応用範囲が広く望ましい。一方マウスを用いた実験から、EpiSC は特定の遺伝子 (Klf4 など) を一過性に過剰発現させることにより、naïve 状態の iPS 細胞にリプログラミングできることが報告された。このリプログラミングの過程を分子レベルで理解することが、真の多能性を持ったヒト naïve 状態 iPS 細胞を効率よくかつ安全に作出する為の基礎的知見として重要である。しかし EpiSC 及びマウス ES 細胞はどちらもいわゆる幹細胞マーカーを発現しており、これまでのマーカーでは両者を区別することは難しい。そこで本研究では epiSC と、mES / iPS 細胞の大きな違いである X 染色体の再活性化に注目した。X 染色体再活性化の状態をモニタリングすることにより、これまで不可能であった多能性幹細胞の識別が細胞を生かしたまま簡単かつ正確に行える実験系を構築することを目指した。

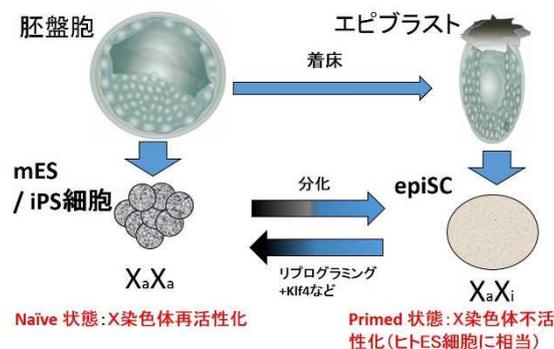


図 1、幹細胞でも mES/iPS 細胞と epiSC では X 染色体の不活化状態が異なる

(注) Xa: 活性化している X 染色体、Xi: 不活性化された X 染色体

## 2. 研究成果

### (1) 概要

本研究では幹細胞の多能性と密接な関連が指摘されている X 染色体再活性化に注目し、再活性化状態を簡便に Live imaging で検出できる系を開発する点に特徴がある。X 染色体の不活性化は、雌の発生で 2 本ある X 染色体の内 1 本が不活性化され、雄と雌の間で活性を持つ X 染色体の本数が揃う機構である。これまでの研究から、いったん X 染色体の不活性化が成立すると、その記憶は分化した全ての細胞で維持されるが、内部細胞塊/mES 細胞や始原生殖細胞といった多能性をもつ幹細胞では、不活性化された X 染色体が再活性化されることが報告されている。また、iPS 細胞樹立過程で、いったん分化した体細胞を人工的に幹細胞にリプログラミングしても X 染色体の再活性化が観察されることが分かってきた。このように、幹細胞の持つ多能性(pluripotency)と X 染色体の再活性化は密接に関連していると考えられている。本研究ではマウスを材料に、X 染色体の再活性化の状態を生きた細胞でモニタリングするため、図2に示すように 2 本ある X 染色体それぞれに赤(mCherry)と緑(eGFP)のレポーター遺伝子を挿入した(それぞれの X 染色体を  $X^{RED}$ ,  $X^{GFP}$  と表記)。これにより、これまで区別が困難であった naïve 状態と primed 状態の幹細胞を生かしたまま簡単に区別することが可能となった。この系を用いると、一端起きたランダムな不活性化(1 本の X 染色体が不活性化、一本が活性化: 赤又は緑の細胞)がリプログラミングを受け再活性化(2 本の X 染色体が活共に性化: 黄色の細胞)される過程が検出できるようになると期待できる。

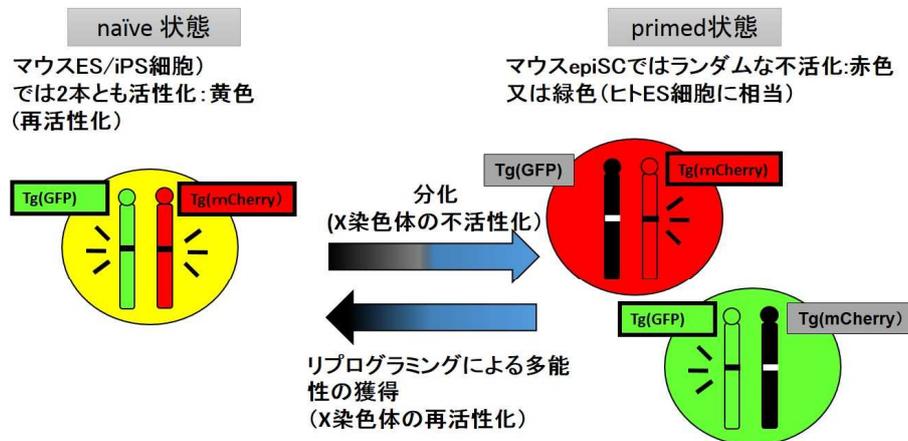


図2、赤緑レポーター遺伝子( $X^{RED}X^{GFP}$ )による X染色体の再活性化イメージング

### (2) 詳細

X 染色体へのレポーター遺伝子の挿入はマウス ES 細胞を用い相同組み換えを利用し行った。1copy の遺伝子を目的部位に挿入することによりモニタリングの系が定量性を持つことが期待できる。更に目的の相同組み換えを起こした ES 細胞を用い、遺伝子組換えマウスを製作することに成功した。得られたマウスを用い、レポーター遺伝子がどれだけ X 染色体の状態

を忠実に検出できるか新生児 1 日目の雄と雌の臓器について緑色蛍光の発現を調べた結果が図 3 である。雄では 1 本ある X 染色体は活性化状態にあり、予想通りほぼ全ての細胞で緑色蛍光が検出できた。一方、雌の臓器では 1 本が活性化され、もう一本が不活性化されることが予想される。実際の蛍光は、予想通り約半数の細胞で緑色蛍光が検出でき、臓器レベルで X 染色体の状態を忠実にモニタリングできることが分かった。更に、作製した赤及び緑色レポーター遺伝子を持つマウス( $X^{RED}X^{GFP}$ )から、ES 及び EpiSC を樹立し、X 染色体の活性化状態の観察を行った(図 4)。その結果、期待通り ES 細胞(naïve 状態)では X 染色体は再活性化され赤と緑の 2 色が共に陽性の黄色の細胞を、EpiSC(primed 状態)では 2 本の X 染色体の片方が不活性化され、赤または緑単色の細胞を検出することに成功した。これにより、X 染色体の再活性化を指標に、異なる種類の幹細胞を生かしたまま見た目で区別することが初めて可能となった。

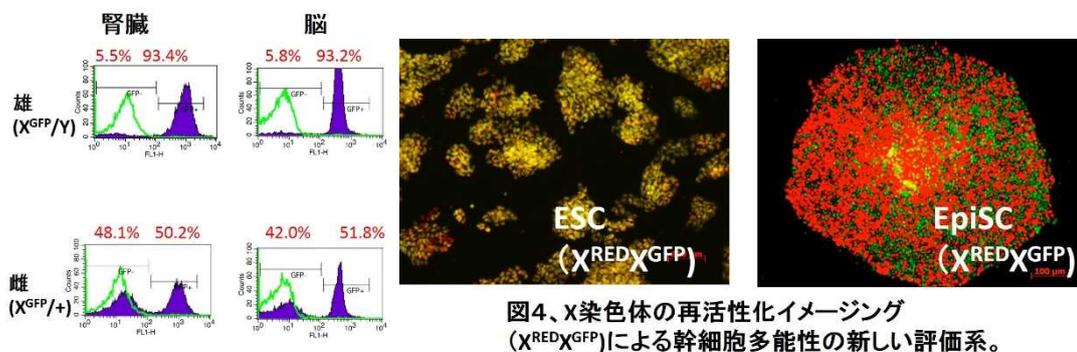


図3、新生児 1 日目における X<sup>GFP</sup> マウスの FACS 解析

図4、X 染色体の再活性化イメージング (X<sup>RED</sup>X<sup>GFP</sup>) による幹細胞多能性の新しい評価系。

### 3. 今後の展開

本研究では X 染色体の再活性化を連続的に Live imaging として検出する方法を開発することに成功した。これにより、これまで判別が困難であった複数の「幹細胞」を生きたまま簡単に分類することが可能となった。この系は、「幹細胞」の多能性を評価できる新しい技術であり、今後幹細胞の性質を理解する上で有用なツールとなる。細胞を生かしたまま X 染色体の再活性化状態を観察出来れば、iPS 細胞樹立におけるリプログラミング過程が追跡でき、各段階で起きていることの詳細な解析が可能となる。その成果は、将来的に真の多能性を持ったヒト naïve 状態 iPS 細胞を効率よくかつ安全に作出する為の基礎的知見として役に立つと考える。

### 4. 評価

- (1) 自己評価  
(研究者)

当初の目標であった「X 染色体再活性化のライブイメージングする方法を確立し、幹細胞の多能性を簡便に評価できる系」の開発は達成できたと考えている。この系を用いることにより、これまで不可能であった異なる種類(naïve 状態と primed 状態)の幹細胞を生かしたまま見た目で区別することが初めて可能となった。今後、幹細胞の性質やリプログラミング過程を理解する上で有用なツールであると考え。また現在マウス iPS 細胞はマウス ES 細胞よりキメラ能が低い細胞が多いことが分かっており、一口にリプログラミングと言っても細胞内で起きていることは種々雑多で幹細胞の分化能にばらつきがあることが分かってきた。しかし、幹細胞の品質を管理する定量的なマーカー遺伝子などの基準は殆どない。今後、リプログラミングの実体に分かれれば、雑多な幹細胞集団からより分化能が高く、安全な「質」の良い幹細胞を選別する技術開発に繋がる可能性も考えられる。これら知見は、将来様々な細胞に分化できる真のヒト iPS/ES 細胞の効率的な作出方法を確立する基盤となるだけでなく、その安全性基準を科学的に決める為に必須な情報となる点で発展性があると考え。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

X 染色体の再活性化と幹細胞の関係に注目して、新しい幹細胞の多能性を評価する系を確立することを目標にした。そのために2本のX染色体の活性が異なる蛍光でモニターできるマウスを作成した。目標としていたX染色体の再活性化をライブイメージングでモニターできる系であることを確認し、系の有用性を示した点は評価できる。今後この系を用いて、リプログラミングのライブでの可視化やその機構解明、多能性幹細胞の品質管理、あるいは組織幹細胞、がん幹細胞の研究など具体的活用が求められる。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Soma M, Fujihara Y, Okabe M, Ishino F, **Kobayashi S\***. Ftx is dispensable for imprinted X-chromosome inactivation in preimplantation mouse embryos *Sci Rep.* 2014 4:5181. (doi: 10.1038/srep05181. PMID: 24899465)
2. **Kobayashi S\***, Totoki Y, Soma M, Matsumoto K, Fujihara Y, Toyoda A, Sakaki Y, Okabe M, Ishino F. Identification of an Imprinted Gene Cluster in the X-Inactivation Center *PLoS One* 2013 8(8):e71222. (doi: 10.1371/journal.pone.0071222. PMID: 23940725)

\*は corresponding author を示す。

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

特許出願準備中

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・ 小林 慎、十時 泰、相馬未来、松本和也、藤原祥高、豊田敦、榊佳之、岡部勝、石野史敏「X 染色体不活化中心領域に発見した雌でのみ発現するインプリント遺伝子群の解析」第8回年会日本エピジェネティクス研究会 2014年5月25-27日 伊藤国際学術研究センター
- ・ 小林 慎、十時 泰、相馬未来、松本和也、藤原祥高、豊田敦、榊佳之、岡部勝、石野史敏「X 染色体不活性化中心(Xic)領域に発見したインプリント遺伝子のクラスター」第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3-6日 神戸国際会議場
- ・ 小林 慎「X染色体上に発見したインプリント遺伝子のクラスター」信州生命科学サマナーセミナー2013 2013年7月23日 長野
- ・ 相馬未来、十時 泰、松本和也、藤原祥高、豊田敦、榊佳之、岡部勝、石野史敏、小林 慎「マウス着床前胚において雌でのみ発現する small RNA の探索」35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 (ワークショップ口頭発表)
- ・ 小林 慎「雌雄の発生と X 染色体上のインプリント遺伝子」第5回生殖研究若手の会 2012年7月26-28日 神奈川
- ・ Kobayashi S "Discovery of female specific small RNAs in preimplantation embryos" The 22<sup>nd</sup> CDB Meeting RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II 2012/06/11-13 Kobe