



ES 細胞よりもヒトの受精卵に近い段階の初期胚様細胞を効率よく作製
—ヒトの初期発生のメカニズムのさらなる理解へ前進—

千葉大学国際高等研究基幹・大学院医学研究院の吉原正仁 准教授、カロリンスカ研究所（スウェーデン）、ヘルシンキ大学（フィンランド）からなる共同研究グループは、ヒト ES 細胞^{注1} よりもさらに受精卵に近い段階の細胞モデルの作製に取り組みました。その結果、ヒト ES 細胞に DUX4 という遺伝子を一時的に発現させることで、8 細胞期胚に似た細胞集団を誘導し、さらに、SLC34A2 (NaPi2b)^{注2} という細胞表面蛋白に対する抗体を用いて、これらの細胞を効率良く回収することに成功しました。

これらの細胞は誘導割球様 (induced blastomere-like: iBM) 細胞と名付けられました。iBM 細胞は、新たに受精卵を作ることなく、胚性ゲノム活性化(embryonic genome activation: EGA)^{注3} の研究に役立つ細胞モデルとして用いることができるため、ヒトの初期発生の分子メカニズムの理解が加速することが期待されます (図 1)。

本研究成果は、2022 年 6 月 30 日 (米国時間) に、学術誌「Stem Cell Reports」でオンライン公開されました。

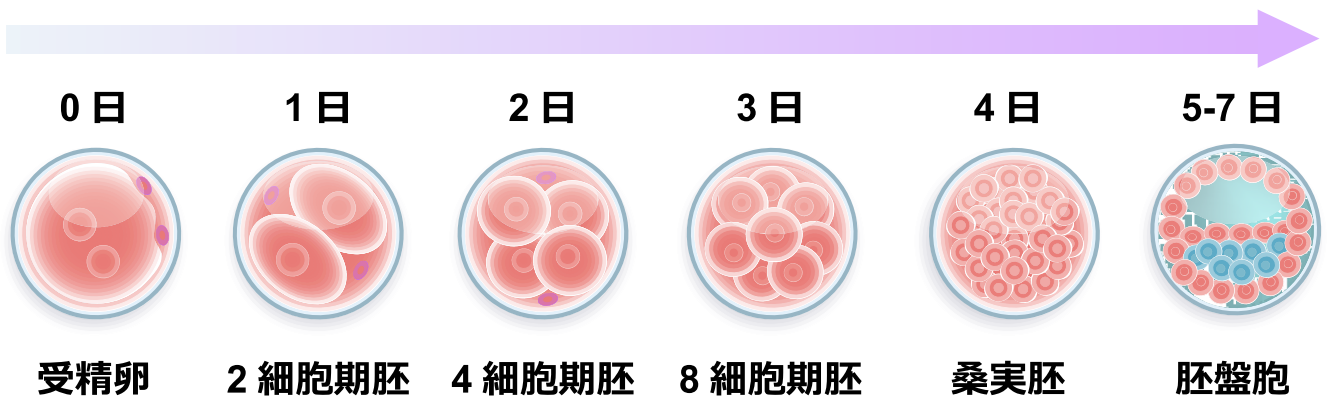


図 1 : ヒトの初期発生段階。ES 細胞は胚盤胞の内細胞塊から取り出し、培養することで作製される。

■ 研究の背景

生命は 1 つの受精卵から始まり、細胞分裂に伴い、細胞ごとに適切な遺伝子が適切な段階で活性化されて細胞が分化し、様々な組織や臓器が形成されます。受精直後の最初の遺伝子発現である EGA は、あらゆる細胞に分化する能力の獲得・維持に非常に重要な段階です。EGA が適切に起こらないと、正常な発生が停止してしまうと考えられているため、EGA の詳細を明らかにすることで、不妊の原因究明や体外受精の成功率の向上に繋がることが期待されます。研究グループは以前、ヒト初期胚を用いて、一細胞レベルで網羅的に遺伝子の発現量を定量するシングルセルトランスクリプトーム解析により、数々の EGA 遺伝子を同定しました。これらの遺伝子は分化能の獲得・維持に関与することが示唆され、再生医療研究への応用も期待されていますが、その多くは詳細な機能が分かっていません。

ヒトでは受精後 2-3 日で、4 細胞期から 8 細胞期にかけて EGA が起こりますが、EGA は動物種によって起こる時期が異なるため、動物モデルをヒト EGA の研究に使用するのは困難でした。また、多能性

幹細胞である ES 細胞・iPS 細胞^{注4)} は発生モデルとして広く用いられていますが、これらは受精後 5 日目以降の発生段階に相当し、EGA の研究モデルには適していません。従って、EGA 遺伝子の機能を解明するには、ヒト初期胚そのものを使う必要があり、研究のために新たな受精卵を作り破壊することになるため、倫理的な問題を伴いました。

近年、研究グループは DUX4 という転写因子^{注5)}が EGA 遺伝子の発現を促進することを報告しました。そこで、研究グループは、DUX4 を用いてヒト ES 細胞の EGA 遺伝子を活性化し、より受精卵に近い段階の細胞モデルを作製することを目指しました。

■ 研究の成果

DUX4 は EGA に重要な役割を担う一方で、細胞毒性を持つことが知られています。顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー(FSHD)^{注6)}患者では、筋細胞に異所性に発現することで細胞死を引き起こします。実際、DUX4 をヒト ES 細胞に長時間発現させると、数時間後には多くの細胞が死んでしまいました。これでは細胞モデルとして研究に使用することは出来ません。そこで、研究グループはヒト初期胚における DUX4 の発現が一過性であることに着目し、15 分間のみ DUX4 を ES 細胞に発現させることで、多くの細胞が生存し、増殖することを確認しました。短時間の DUX4 発現では、DUX4 が活性化すべき EGA 遺伝子が十分に活性化されないことも懸念されましたが、長時間発現させた時と同等に活性化されていることが確認されました。

受精卵を含め、全ての細胞は同じ遺伝子情報を持っていますが、細胞種ごとに異なる遺伝子のセットが発現しています。特に初期発生段階では短時間で劇的に遺伝子の発現パターンが変化するため、発現パターンを調べることで、その細胞の発生段階を推測することができます。そこで、研究グループは、ヒト初期胚に発現している遺伝子を網羅的に解析したシングルセルトランスクリプトームのデータと、15 分間のみ DUX4 を発現させた ES 細胞のシングルセルトランスクリプトームのデータを比較し、それらの類似性を確認しました。すると、DUX4 を発現させた ES 細胞の一部の細胞集団が、受精後 3 日目の 8 細胞期胚に特異的に発現する遺伝子を多く発現し、8 細胞期胚と類似した遺伝子発現パターンを示していました(図 2)。これはつまり、ES 細胞に特徴的な遺伝子の発現が減少し、8 細胞期胚に特徴的な遺伝子の発現が増加したことで、元の ES 細胞の性質が失われ、8 細胞期胚様の性質を獲得したと考えられます。研究グループは、これらの細胞を iBM 細胞と名付けました。iBM 細胞は DUX4 を強制発現させてから 12 時間後の細胞に多く認められました。

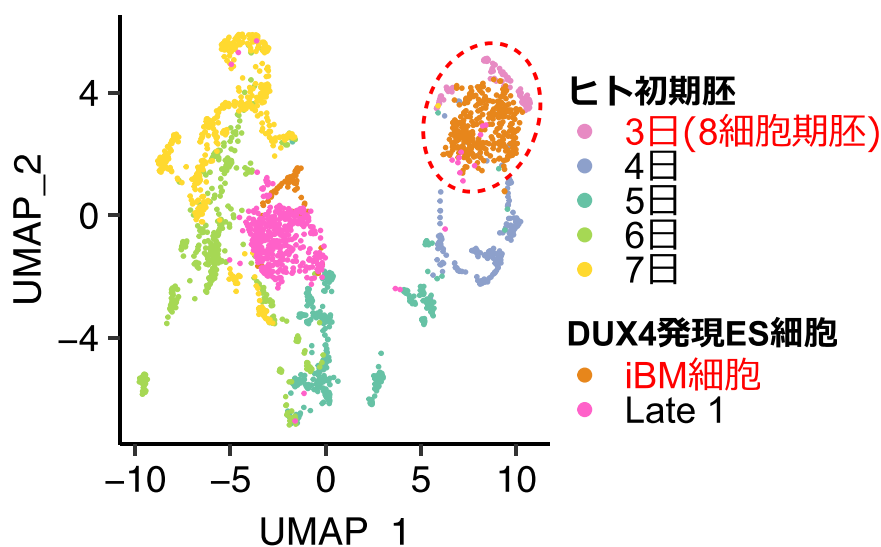


図 2 : ヒト着床前初期胚(受精後 3 日~7 日)と、DUX4 を一過性に強制発現させたヒト ES 細胞のシングルセルトランスクリプトームデータの統合解析。一つ一つの点は各細胞を示す。受精後 3 日の 8 細胞期胚と iBM 細胞が赤点線で囲まれた部分に一塊となって存在しており、非常に近い発現パターンを示している。Late 1 は iBM 細胞から派生したと考えられる細胞。

DUX4 を強制発現した ES 細胞の一部のみが 8 細胞期胚に類似していたため、細胞モデルとして使用するには、これらの細胞を生きたままの状態、効率良く回収する必要があります。FACS^{注7)}は細胞表面に存在するタンパク質に対する抗体を用いて、様々な細胞から構成される集団から、特定の集団の細胞のみを生きたまま単離する技術です。研究グループは FACS による iBM 細胞の単離を目指し、DUX4 を強制発現した ES 細胞の中で、iBM 細胞に特異的に発現する細胞表面蛋白として、SLC34A2 (NaPi2b) を同定しました。DUX4 強制発現後 12 時間で iBM 細胞が多く認められたことから、強制発現後 6 時間後の細胞を抗 NaPi2b 抗体を用いた FACS により分離し、さらに 6 時間培養しました。すると、NaPi2b 陽性細胞は、NaPi2b 陰性細胞や FACS による分離前の細胞と比較し、8 細胞期胚に近い遺伝子発現パターンを示していました。このことから、抗 NaPi2b 抗体を用いて、効率良く iBM 細胞を回収できることが分かりました (図3)。

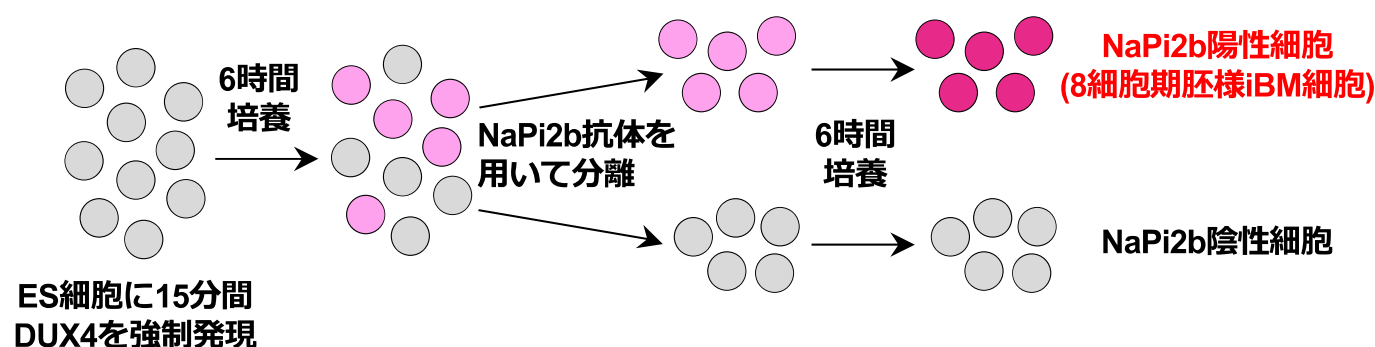


図3：本研究の概略図。ヒト ES 細胞に DUX4 を一過性に強制発現させた後、抗 SLC34A2 (NaPi2b)抗体を用いた FACS により細胞を分離し、8 細胞期胚様の iBM 細胞 (NaPi2b 陽性細胞) を効率良く回収することが出来る。

■今後の展望

これまで適切なモデルが存在しなかったため、ヒトの EGA 遺伝子の詳細な機能は長らく不明でしたが、本研究で作製された iBM 細胞にゲノム編集技術などを応用することで、これらの遺伝子の機能解明が可能となると考えられます。EGA は正常な胚発生が起こるための重要な鍵であり、EGA が適切に起こらないことで初期胚が死に至るとも考えられています。EGA 遺伝子の機能解明により、ヒトの正常な初期発生過程のメカニズムを理解することで、不妊の原因究明や体外受精の成功率の向上などの生殖医療の発展だけでなく、分化能の獲得・維持機構の解明により再生医療研究の発展にも繋がることが期待されます。

■研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会 海外特別研究員制度、公益財団法人 アステラス病態代謝研究会、公益財団法人 日本アイバンク協会、スカンジナビア・ニッポン ササカワ財団からの支援を受けて実施されました。

■用語解説

注1) ES 細胞：胚性幹細胞 (embryonic stem cell) の略。受精後 5-6 日目の胚盤胞の内細胞塊から細胞を取り出し、それを培養することによって作製される。ほぼ無限に増殖させることができる。

注2) SLC34A2 (NaPi2b)：IIb 型ナトリウム依存性リン運搬蛋白 (NaPi2b)をコードする遺伝子。SLC34A2 は II 型肺胞上皮細胞に特異的に発現するとされているが、8 細胞期胚にも高発現している。

注3) 胚性ゲノム活性化 (EGA)：Zygotic genome activation (ZGA)とも呼ばれる。受精時は母性因

子に依存した遺伝子発現が見られるが、やがて母性因子は減少して胚自身からのゲノムの活性化へと切り替わる。これを EGA と呼ぶ。研究グループは以前、ヒト初期胚において 32 の遺伝子が 4 細胞期胚で、129 の遺伝子が 8 細胞期胚で活性化されることを報告した。

注 4) iPS 細胞 : 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell) の略。体細胞に初期化因子を導入することにより樹立される多能性幹細胞。ES 細胞に類似した性質を持つ。

注 5) 転写因子 : DNA 上の転写制御領域に結合することで、遺伝子の転写調節に関与するタンパク質。京都大学の山中伸弥教授らにより発見された初期化因子も転写因子であり、ES 細胞に多く発現する転写因子から絞り込まれた。

注 6) 顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー : Facioscapulohumeral muscular dystrophy (FSHD)。顔面や肩、上腕などの筋肉の変性を起こす遺伝性疾患。本来発現していない DUX4 が骨格筋細胞で発現し、細胞傷害を起こすと考えられている。

注 7) FACS : Fluorescence-activated cell sorting の略。蛍光抗体で染色した細胞が発する蛍光を測定することで、特定の細胞を生きたままの状態で単離することができる。

■ 論文情報

タイトル : Transient *DUX4* expression in human embryonic stem cells induces blastomere-like expression program that is marked by SLC34A2

著者 : Masahito Yoshihara^{*,#}, Ida Kirjanov^{*}, Sonja Nykänen, Joonas Sokka, Jere Weltner, Karolina Lundin, Lisa Gawryski, Eeva-Mari Jouhilahti, Markku Varjosalo, Mari H. Tervaniemi, Timo Otonkoski, Ras Trokovic, Shintaro Katayama, Sanna Vuoristo[#], Juha Kere[#]

(*共同筆頭著者、#共同責任著者)

雑誌名 : Stem Cell Reports

DOI : <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.06.002>

<本研究に関するお問い合わせ>

千葉大学国際高等研究基幹

千葉大学大学院医学研究院人工知能 (AI) 医学 准教授

吉原 正仁

TEL: 043-226-2977 メール : masahito.yoshihara@chiba-u.jp

<広報に関するお問い合わせ>

千葉大学亥鼻地区事務部総務課企画係

TEL: 043-226-2841 メール : inohana-koho@chiba-u.jp