

「第19回日本臨床環境医学会学術集会シンポジウム」 (臨床環境19:72~78, 2010)

刷り込み型遺伝子発現における DNA メチル化の影響： ES 細胞を用いた解析

三 瀬 名 丹

自治医科大学 医学部 薬理学講座 環境毒性学部門

The impact of DNA methylation on the imprinted gene expression: analyses using embryonic stem (ES) cells

Nathan Mise

Division of Environmental Toxicology, Department of Pharmacology,
School of Medicine, Jichi Medical University

要約

マウス胚性幹 (ES) 細胞は、胚盤胞期の内部細胞塊を体外培養することで樹立できる多能性幹細胞である。マウス ES 細胞は、ノックアウトマウスの作成など、近年の発生工学的解析手法を用いた研究にはなくてはならないツールである。また、ES 細胞の試験管内分化系は、胚発生過程の細胞分化を再現するモデルとして盛んに利用されており、様々な組織へ特異的に分化させる手法も確立されつつある。最近の iPS 細胞の開発により、幹細胞、再プログラム化研究が基礎生物学分野のみならず、医療、産業面からも盛んになり、多くの成果が得られている。我々は、ゲノムのエピジェネティック修飾が胚発生過程や環境への応答としてどのように変化し、発生や健康にどのような影響を与えているかという観点から、胚発生過程における細胞分化と生殖細胞分化に注目して研究を行っており、ES 細胞の発生分化・エピゲノム研究への利用に関しての取り組みについて紹介する。

《キーワード》 ES 細胞、エピジェネティクス、DNA メチル化、試験管内分化系

Abstract

Mouse embryonic stem (ES) cells are the cultured pluripotent stem cells derived from the inner cell mass (ICM) of the isolated blastocyst stage embryos. The ES cells are essential tools for the analysis of cell differentiation and development using developmental technology, such as the production of knock-out mouse. The *in vitro* differentiation of ES cells is considered an experimental system reproducing the early cellular differentiation *in vivo* and is also a technique frequently used for analyzing

別刷請求宛先：三瀬名丹

〒329-0498 下野市薬師寺 3311-1 自治医科大学 医学部 薬理学講座 環境毒性学部門

Reprint Requests to Nathan Mise, Division of Environmental Toxicology, Department of Pharmacology, School of Medicine, Jichi Medical University, 3311-1 Yakushiji, Shimono-shi, Tochigi 329-0498, Japan

the cell differentiation process. The methodologies of differentiation of ES cells to specific cell types and lineages are being established. Due to development of induced-pluripotent stem (iPS) cells, the stem cell research area is one of the most active fields-not only in basic biological science, but also in medicine and industry. The importance of the analyses of the ES cells and the related stem cells is increasing. We are analyzing the epigenetic regulation of cell differentiation and germ cell development using the ES cell *in vitro* differentiation system as the model to analyze the mechanism of epigenetic regulation accompanying cellular differentiation and responses to the environmental factors of the organisms. In this review, I would like to introduce our approach using ES cells as an *in vitro* system of epigenetic regulation of the development and response to environmental factors.

《Key words》 ES cells, epigenetics, DNA methylation, *in vitro* differentiation

I. エピジェネティック修飾と発現現象

近年、遺伝子発現調節機構を解析する分野として、エピジェネティクス (Epigenetics) が注目を集めている。エピジェネティクスは遺伝子の DNA 塩基は同一ながら遺伝子発現に変化を起こすメカニズムを研究する分野であり、ゲノム DNA のメチル化と染色体構造の基礎となるヒストンタンパク質のメチル化、アセチル化などの修飾とそれらの変化などが主な研究対象である。発現している遺伝子のプロモータ領域などではそのゲノム DNA はメチル化されていないが、発現抑制されている遺伝子の中にはプロモータ領域の CG 配列の C がメチル化されている場合があり、DNA のメチル化は発現抑制の指標となっている。また、ヒストン分子の修飾に関しては、一般にアセチル化は転写活性化の印となるが、メチル化についてはアミノ酸残基の位置によってその役割が複雑に制御されている (図 1 A)。このようなゲノム DNA やクロマチンへのエピジェネティック修飾は胚発生過程の細胞分化や環境の変化や様々なシグナルを受けることによってダイナミックに変化し、遺伝子発現に影響を与えている。こういったエピジェネティック修飾の制御が乱れることで肥満や心臓疾患を初めとする生活習慣病やがんなど様々な疾患の原因となる可能性が指摘されており、その制御の分子メカニズムの解明は基礎生物学分野だけでなく、医学においても非常に重要な課題となっている¹⁾。

哺乳類の胚発生初期過程は、母胎内の非常に少ない細胞で起こり、エピジェネティック修飾制御

の分子メカニズムの詳細を解析するためには、実験の微量化、あるいは代替モデル系の確立が極めて重要である。特に生化学的な解析を行うために必要なサンプル量を得るためには、実験の微量化だけではなく、培養細胞を用いたモデル実験系が非常に有用である。マウス胚性幹 (ES) 細胞は初期胚のモデルとして非常によく知られており、多くの研究に用いられている培養系実験モデルである。ゲノム刷り込みは、発生過程及び成体におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御の端的な例として良く知られている²⁾。ゲノム刷り込みは、両親から受け継いだ遺伝子が等価に働かず、父親あるいは母親から受け継いだ遺伝子のみが機能するという現象で (図 1 B)、精子と卵子から持ち込まれるゲノム DNA のメチル化の違いが発現の違いを生じさせる。また、生殖細胞の発生過程において、両親から受け継がれたゲノム刷り込みなどエピジェネティック修飾を次世代に受け継ぐためには、それぞれの性に従って書き改める必要があり、これをゲノム再プログラム化と呼んでいる³⁾。我々は、これらのエピジェネティックな現象、特にゲノム刷り込み型遺伝子発現の成立過程と生殖細胞におけるゲノム再プログラム化を、ES 細胞の試験管内分化系を用いて解析している。

II. これまでの ES 細胞の問題点

これまでも、ゲノム刷り込みの分子メカニズムの解析に ES 細胞を用いた実験系が使われた例があるが⁴⁾、一般に使用されている ES 細胞の性質から、十分に活用されているとは言いがたい面

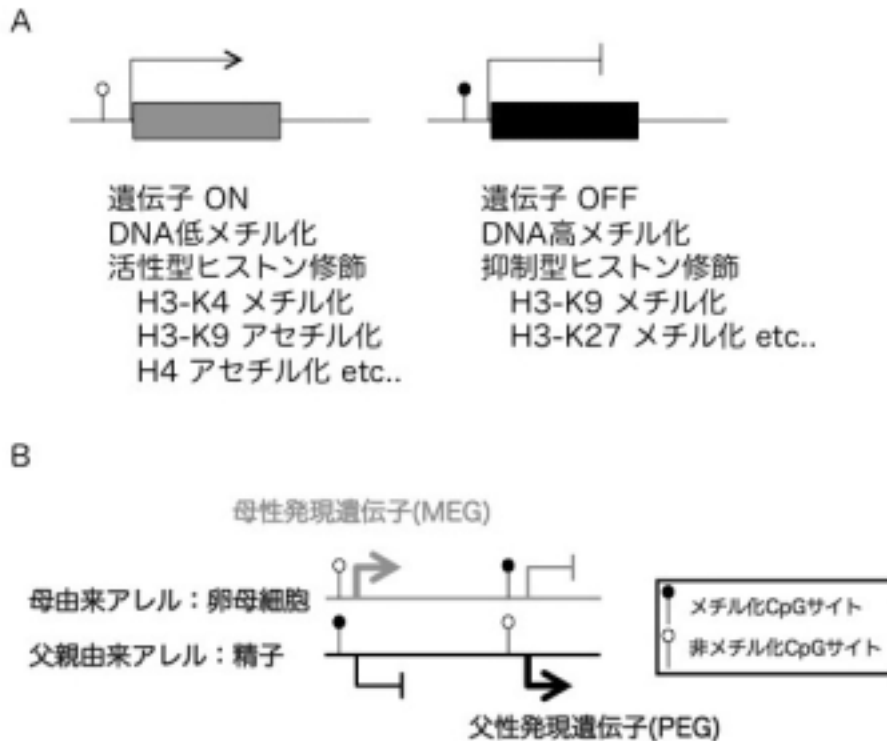


図1 エピジェネティック修飾による遺伝子発現制御

(A) 哺乳類におけるエピジェネティック修飾の例 (B) ゲノム刷り込み現象

がある。その原因として、まず、既存のES細胞の多くが129/Svを中心とする129系統とその近縁系統から樹立されており、ほとんど遺伝的なバリエーションをもっていないことが挙げられる。このため、ゲノム刷り込みを調べようとしても、両親から受け継いだ遺伝子座が区別できず、エピジェネティック修飾の違いについて厳密な解析ができない上に、発現した転写産物についてもどちらのアレルに由来する転写産物なのか区別できない。さらに、遺伝子ノックアウトを目的とした発生工学の急速な発展により、マウス胚とキメラにしたときに生殖系列に効率よく分化することが重要な性質として選択が進められてきた結果、一般によく利用されているES細胞株は正常とは異なりゲノムのエピジェネティック修飾に変化が生じたものである可能性がある。実際、マウスのES細胞の刷り込み遺伝子のメチル化パターンについては、体細胞のものから変化していることを示唆する報告もある^{5,6)}。

細胞分化過程において、特定の遺伝子の発現を再現するようにGFPなどの蛍光タンパク質を発現させることは、その細胞分化過程を可視化することができるほか、セルソーターを用いて特定の細胞種のみを集めてくるなど、非常に有用な手法である。ES細胞においても、細胞分化マーカーとなる遺伝子のプロモータによって蛍光タンパク質を発現させることはよく行われる実験手法である(図2A)。細胞分化過程を長く追跡していくためには、外来遺伝子をゲノム中に取り込んだstable transformantを用いることが必須である。しかし、導入されたDNAのゲノム上の位置効果やコピー数の違いによって発現が影響されてしまい、クローンごとにその発現パターンや発現量に差が生じることはよく見受けられる。さらに通常のプラスミドで利用できる数kbのプロモータ領域では内在性遺伝子の発現が再現されず、予想外の発現をすることもよくあり、分化マーカーと同様に蛍光タンパク質を発現させることは容易ではない。

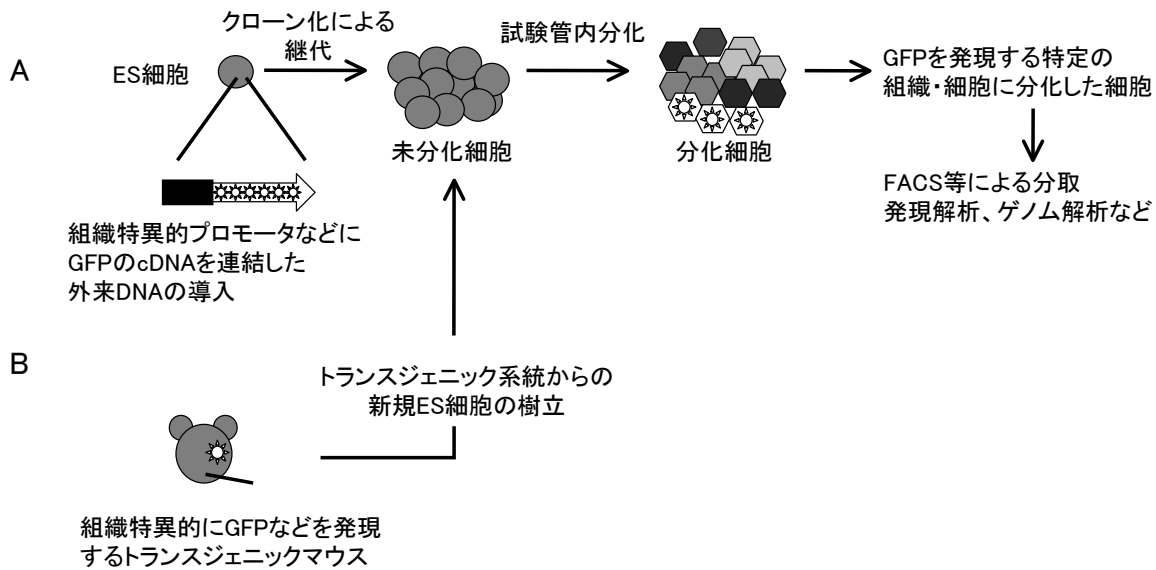


図2 ES細胞試験管内分化系を用いた細胞分化過程研究の実際

(A) 遺伝子導入を介したES細胞での解析手法。遺伝子導入の過程でクローン化と多くの継代を経てから実験に利用される。(B) 組織特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを利用した場合。生体内における発現が解析されたものが利用可能であり、樹立後、直接実験に利用出来る。

一方、マウス個体レベルでの研究では、発現制御領域をうまく利用することで、組織特異的にGFPを発現するようなトランスジェニックマウス系統が数多く作成されており、詳細な発現解析が行われているものもある^{7,8)}。こういったトランスジェニック系統のマウスから新たにES細胞を樹立した場合は、生体内での発現様式がすでに確認されているので、ES細胞、あるいは分化させたES細胞における蛍光タンパク質の発現は生体内における発現を再現していることが期待できる(図2B)。

III. 新規ES細胞株の樹立

近年、ES細胞の未分化性を維持する因子の同定が進んできたことにより、ES細胞の培養が非常に安定するようになり⁹⁾、その樹立も以前に比べて容易になってきている。我々は、上述の問題点を克服するために、研究の目的に必要な遺伝的マーカーを持ったES細胞を新たに樹立し、モデル実験系として利用している。ゲノム刷り込み研究には、両親由来のゲノムをDNA塩基配列レベル

で区別出来るように、C57BL/6J (B6) と日本産野生マウス由来のMSM/Ms (MSM) とのF1個体からES細胞を樹立し、利用している(図3A)。MSMはアジアに生息する*mus musculus molossinus*に由来しており、標準系統としてよく利用されているヨーロッパ由来のマウス*Mus musculus domesticus*のB6とは亜種関係となる。解析されたMSMのゲノム配列も公開されており、数百bpにひとつ以上のSNP (Single Nucleotide Polymorphism) が見つかり¹⁰⁾、ゲノムDNAと転写産物であるmRNAともにDNA塩基配列レベルで区別することが出来る。また、独自の研究目的に合致した細胞株を樹立し、樹立直後の細胞を多数凍結保存することで、継代の進んでいない細胞を実験に用いることが可能になった。

このようなES細胞を用いて、ゲノムDNAのメチル化を調べてみたところ、代表的な刷り込み遺伝子座について体細胞と同様のメチル化が維持されていることがわかった。また、Igf2r (Insulin-like growth factor 2 receptor) 遺伝

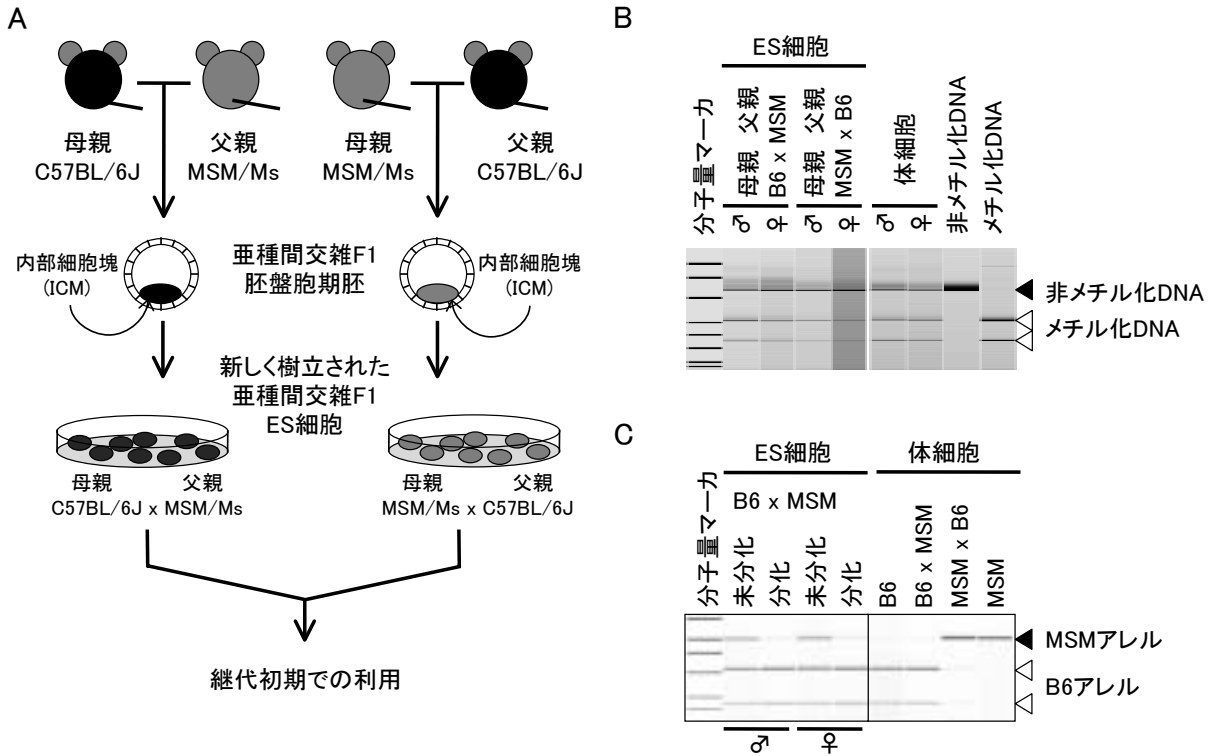


図3 亜種間交雑によって得られるF1胚から樹立したES細胞

(A) 亜種間交配により得られたF1ハイブリッド胚からのES細胞の樹立。(B) COBRA法による未分化ES細胞における代表的な刷り込み遺伝子のメチル化の状態。ここでは、Meg3という遺伝子のメチル化解析の結果を示した。この手法ではアレルを区別出来ていないが、ES細胞においても体細胞と同程度のメチル化が検出されている。(C) 母性発現するIgf2r遺伝子のRT-PCR産物を制限酵素処理し、制限酵素多型によって発現しているアレルを区別した。この場合、B6由来の転写産物だけが制限酵素によって切れる。分化前は両アレルが検出されているが、分化後には母親アレルであるB6アレルだけが発現している。

子の発現をRT-PCR (Reverse transcription Polymerase Chain Reaction) 産物に存在する制限酵素サイトの多型を利用して解析したところ、未分化状態ではメチル化に関係なく両アレルからのmRNAが検出されたのに対して、分化にともなって体細胞と同様に母親アレルからの発現へと偏っていくことが分かり、胚発生初期における発現変化を再現していた (図3B, C 論文作成中)。以上から、細胞の分化にともなってDNAメチル化を読み取るメカニズムに変化が起きていると考えられ、その分子メカニズムの解析を目指している。

また、未分化細胞及び生殖細胞においてGFPを発現するトランスジェニックマウス⁷⁾からES細胞を樹立することに成功した (図4)。樹立さ

れたES細胞は、未分化状態では強くGFPを発現していたが、未分化性維持に必須なLIF (Leukemia Inhibitory Factor) を培地から除去し、浮遊培養を行うことによって分化を誘導した場合、分化開始後徐々に蛍光を失い、8日目にはほとんど蛍光が観察されなくなっており、期待されたような発現変化を示した。ごく一部の細胞ではGFPの蛍光を残す細胞も見られたが、これらは、分化が十分に進行していない細胞か生殖系列の細胞へと分化した細胞である可能性がある。

さらに、我々は、独自に開発した生殖細胞特異的に赤い蛍光を示すRFPや強い黄色を示すVenusを発現するトランスジェニックマウスを作成しており、このようなトランスジェニックマウスから樹立されたES細胞やiPS細胞を用いて、

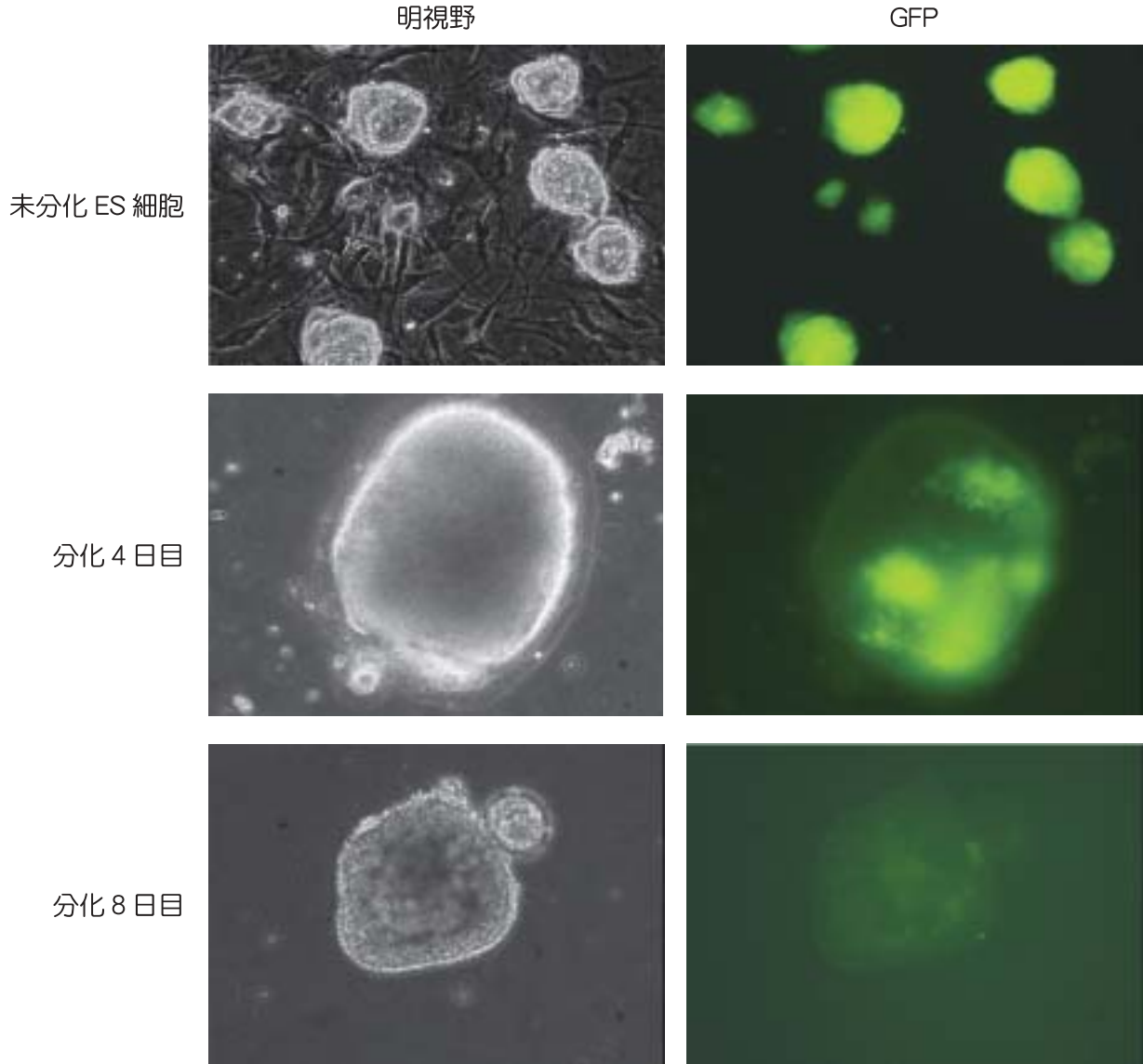


図4 ES 細胞、iPS 細胞を用いた試験管内での生殖細胞分化研究への応用例

生殖細胞分化系の確立を目指して研究を進めている¹¹⁾。

IV. おわりに

エピゲノムの変化がヒトの健康に与える影響は注目される場所である。特に、重金属類やダイオキシン類、内分泌攪乱活性を持つような環境因子が胚発生過程に与える影響については、多くの研究がその危険性について指摘しているが、その詳細に関しては不明な点が多い^{12~14)}。現在、我々

はこういった分野でも、実験系に合わせてデザインされた ES 細胞を樹立、利用することで、詳細な分子メカニズムの解明につなげるべく研究を行っている。また、我々の研究アプローチがエピゲノム解析や生殖細胞研究だけでなく、他の多くの研究分野に取り入れられることを期待している。

なお、各種のトランスジェニックマウス系統に関しては理化学研究所バイオリソースセンター・実験動物開発室や米国のジャクソン研究所などから配布されているものもあり、用途に合わせてマ

ウス系統を選択することによって、それぞれの実験系に適合した ES 細胞株を作り出すことが可能である。

文献

- 1) Jirtle RL, Skinner MK: Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 8: 253-262, 2007
- 2) Reik W, Walter J: GENOMIC IMPRINTING: PARENTAL INFLUENCE ON THE GENOME. *Nat Rev Genet* 2: 21-32, 2001
- 3) Hajkova P: Epigenetic reprogramming - taking a lesson from the embryo. *Curr Opin Cell Biol* 22:342-350, 2010
- 4) Latos PA, Stricker SH, et al: An in vitro ES cell imprinting model shows that imprinted expression of the *Igf2r* gene arises from an allele-specific expression bias. *Development* 136: 437-448, 2009
- 5) Baqir S, Smith LC: Growth restricted in vitro culture conditions alter the imprinted gene expression patterns of mouse embryonic stem cells. *Clon Stem Cells* 5: 199-212, 2003
- 6) Dean W, Bowden L, et al: Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development* 125: 2273-2282, 1998
- 7) Ohbo K, Yoshida S: Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 258: 209-225, 2003
- 8) Payer B, Chuva de Sousa Lopes SM, et al: Generation of stella-GFP Transgenic Mice: A Novel Tool to Study Germ Cell Development. *genesis* 44: 75-83, 2006
- 9) Sato H, Amagai K, et al: Stable generation of serum- and feeder-free embryonic stem cell-derived mice with full germline-competency by using a GSK3 specific inhibitor. *Genesis* 47: 414-422, 2009
- 10) Abe K, Noguchi H, et al: Contribution of Asian mouse subspecies *Mus musculus molossinus* to genomic constitution of strain C57BL/6J, as defined by BAC-end sequence-SNP analysis. *Genome Res* 14: 2439-2447, 2004
- 11) Imamura M, Aoi T, et al: Induction of Primordial Germ Cells From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Derived From Adult Hepatocytes. *Mol Reprod Dev* 77: 802-811, 2010
- 12) Anway MD, Cupp AS, et al: Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility. *Science* 308: 308-311, 2005
- 13) Waterland RA, Dolinoy DC, et al: Maternal Methyl Supplements Increase Offspring DNA Methylation at Axin Fused. *genesis* 44: 401-406, 2006
- 14) Dolinoy DC, Huang D, et al: Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 13056-13061, 2007