

氏名	岡下修己
学位の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	甲理第159号(文部科学省への報告番号甲第557号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2015年3月17日
学位論文題目	PRDM14による始原生殖細胞特異的なエピゲノム調節とその機能
論文審査委員	(主査) 教授 大谷 清 (副査) 教授 平井 洋平 准教授 関 由行

多細胞生物を構成する細胞は生殖細胞と体細胞の2種類の細胞に大別することができ、体細胞が個体の恒常性を維持するために機能しているのに対して、生殖細胞は次世代を新たに生み出すことで生命の連続性を維持している。生殖細胞が次世代において個体形成を行うためには、ゲノム上の全遺伝情報を読み込み可能な状態へ初期化する必要がある。卵・精子の起源である始原生殖細胞では、ゲノムに付与されている大部分のDNAのメチル化が消去されることが知られている(エピゲノムリプログラミング)。始原生殖細胞によるゲノム全体の脱メチル化機構の存在は、約25年前からその実体が明らかになってきたが、近年までその分子メカニズムは全く分かっていなかった。エピゲノムリプログラミングは、人工多能性幹細胞であるiPS(induced pluripotent stem)細胞の作製過程においても観察されることから、始原生殖細胞によるエピゲノムリプログラミング機構の解明は、高品質iPS細胞の作製や人為的細胞系譜制御法の開発に繋がる可能性も期待できる。本論文では、マウス始原生殖細胞特異的に発現し、かつ生殖細胞の形成・初期分化に必須の因子であるPRDM14に着目し、PRDM14とDNA脱メチル化および多能性獲得・維持の関係を検証した。

論文内容の要旨

本論文は、緒論(第1章)、本文(第2章から第3章)、及び総括(第4章)からなる。

第2章第1節では、生殖系列の成立に重要な因子PRDM14の発現を薬剤の添加の有無で制御できるES細胞を樹立し、PRDM14とDNAのメチル化の関係を検証した。その結果、PRDM14の誘導発現に伴い多能性関連遺伝子群、生殖細胞特異的遺伝子群及びゲノム刷り込み領域の脱メチル化が誘導されることが明らかとなった。また、メチルシトシンの酸化酵素であるTET(Ten-eleven translocation)及びチミンDNAグリコシラーゼであるTDG(thymine DNA Glycosylase)のノックダウン系を用いた解析によって、PRDM14がTET-塩基除去修復を介した能動的脱メチル化反応を促進することも見出した。さらに、PRDM14の部分欠損変異体を用いた解析及びクロマチン免疫沈降法によって、PRDM14がN末端を介してTET1/TET2と結合し、TET1/TET2を脱メチル化の標的領域へと動員していることが明らかとなった。

第2章第2節では、PRDM14によるES細胞の多能性維持活性に関する検証を行った。マウスES細胞は、サイトカインであるLIF(leukemia inhibitory factor)によって未分化性を維持することができる。培地からLIFを除去してPRDM14高発現ES細胞を培養したところ、LIF非存在下にも関わらずES細胞は未分化性を維持することができ、ヌードマウスの移植実験によって多能性も確認された。PRDM14はES細胞において内在的に発現していること、また*Pdm14* KO ES細胞の解析によって、血清存在下におけるES

細胞の未分化性維持には内在性 PRDM14の発現が必要であることが示されていた。一方で始原生殖細胞では ES 細胞の数十倍程度の PRDM14の発現が観察される。そこで、LIF 非依存的な未分化性維持活性に対する PRDM14の発現量の影響を解析するために、異なる発現量を示す PRDM14安定発現 ES 細胞株を作製し、LIF 非依存的な未分化性維持活性を検証した。その結果、LIF 非依存的に ES 細胞の未分化性を維持するためには、始原生殖細胞と同レベルの PRDM14の発現量が必要であることが明らかとなった。また、PRDM14による ES 細胞の多能性維持活性は、*Tet1/Tet2* のノックダウン及び塩基除去修復阻害剤の添加によって消失したことから、PRDM14による TET-塩基除去修復経路を介した能動的脱メチル化が多能性維持に関与していることが明らかとなった。

第2章第3節では、ES 細胞の分化誘導系を用いて、始原生殖細胞の前駆細胞であるエピブラスト様細胞 (EpiLC : epiblast-like cell) を作製し、作製した EpiLC に PRDM14を人為的に発現させることで、始原生殖細胞における PRDM14の機能を *in vitro* で再構築した。EpiLC に PRDM14を誘導的に発現させた結果、ES 細胞と類似した細胞形態へと変化し、多能性活性の指標となるアルカリファスファターゼ活性を有していた。また、遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR で確認したところ、ES 細胞から EpiLC への分化誘導過程で減少した多能性関連遺伝子群の発現が、PRDM14の誘導発現に伴い発現上昇することが明らかとなった。さらに、EpiLC に PRDM14を誘導発現することで出現した ES 様細胞をヌードマウスの皮下に移植したところ、内胚葉・中胚葉・外胚葉に由来する細胞集団が観察され、PRDM14には多能性誘導活性が存在することが示された。また、第2章第1節において PRDM14に能動的脱メチル化誘導活性が存在することを見出していたため、PRDM14による多能性誘導と能動的脱メチル化の関係を検証した。ES 細胞の多能性は転写因子のネットワークによって維持されている。そこで、多能性を制御する転写因子ネットワークの中でも iPS 細胞の誘導活性を持つ OCT3/4及び KLF2に着目し、さらなる解析を行った。その結果、ES 細胞から EpiLC へ分化する過程で *Klf2* のエンハンサー領域の DNA メチル化レベルが上昇し、OCT3/4のエンハンサーへの結合が阻害されること、また、EpiLC に PRDM14が発現することで、*Klf2* エンハンサー領域へ付与された DNA のメチル化が能動的に脱メチル化され、OCT3/4が再度 *Klf2* のエンハンサー領域へ結合できるようになり、*Klf2* の発現誘導が起きることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

分化した体細胞に多能性誘導活性を持つ転写因子を強制発現することで、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作製することができるが、iPS 細胞を再生医療へ応用するためにはいくつかの問題が存在する。近年の受精卵 ES 細胞と iPS 細胞のエピゲノム比較解析によって、iPS 細胞のゲノムにはドナー細胞由来のエピゲノム情報の残存や新規異常メチル化の出現などが観察され、このようなエピゲノム異常が iPS 細胞の品質低下に寄与していることが示されている。iPS 細胞は人為的に細胞を初期化する技術であるが、受精卵 ES 細胞は生体内の生殖細胞によって生理的に初期化された多能性幹細胞である。したがって、生殖細胞で起こる生理的な細胞初期化機構の解明は、高品質 iPS 細胞の作製に貢献できる可能性がある。そこで、本論文では、卵・精子の起源である始原生殖細胞で誘導されるエピゲノムリプログラミング機構を制御する分子基盤とエピゲノムリプログラミング機構が保証する生命機能の解明を目指した。

本論文の重要な貢献は以下の通りである。

- (1) 細胞の記憶に関わる DNA のメチル化を能動的に消去する機構は、長年存在は想定されていたが、その分子機構は全く分かっていなかった。本論文において PRDM14が、メチルシトシンの酸化酵素である TET1, TET2を標的領域へ動員することで能動的脱メチル化反応を促進することが明らかとなり、DNA 脱メチル化反応の新たな動作原理を提唱することができた。今後、PRDM14の能動的脱メ

チル化誘導活性を人為的に制御することで、領域選択的な DNA 脱メチル化誘導法及び低品質 iPS 細胞で観察されるエピゲノム異常の修復法の開発に繋がる可能性が期待できる。

- (2) PRDM14は、一部の乳がんで遺伝子増幅によって異常発現していることが報告されており、また乳がん組織に存在するがん幹細胞は ES 細胞と多くの共通点が観察される。今回明らかとなった PRDM14 による多能性獲得・維持機構が乳がん幹細胞の発生・維持に関与している可能性も考えられ、今後の解析次第では乳がんの新規治療・診断法への応用が期待される。

本論文の内容の一部は、査読付き学術論文である Development に報告した。2014年1月に発刊されてから現在までの約1年間の間に、計17報の学術論文に引用されていることから当該分野に対する高い貢献度が示されている。さらに、これらの成果は国内外の学会においても報告している。審査委員は本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容や用いた技法について十分な理解とともに関連する分野についても学識を有し、また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認した。以上のことより、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定する。