

始原生殖細胞の分化と多能性幹細胞への再プログラム化のメカニズム

松居 靖久

胚発生初期段階の着床前の胚には、高い分化多能性を持つ幹細胞が存在する。この幹細胞は胚の着床後に、性質がやや異なり分化能が制限された多能性幹細胞に変化し、やがて始原生殖細胞 (PGC) を含む、さまざまな細胞への分化を開始する。さらに PGC は分化に伴い特徴的なエピゲノム変化を起こしながら、配偶子 (精子または卵子) へと分化する。また PGC はサイトカインの作用のみで容易に多能性幹細胞へ再プログラム化されることが知られている。このように PGC は、配偶子のみで分化する単能性細胞であるにも関わらず、配偶子の形成を通して発生全能性を持つ受精卵を生み出したり、再プログラム化により多能性を獲得したりすることができる。これらの変化を担う分子機構には興味を持たれるが、現在のところ不明な点が多い。

1. はじめに

受精卵から我々の体が作られる胚発生の最初の段階では、まず分化多能性を持った幹細胞の集団が現れ、着床後しばらくすると、その多能性幹細胞から特定の機能を発揮する細胞の分化が始まり個体が形成されていく。個体の成長に伴い、多くの分化細胞はある程度の時間が経つと細胞死を起こすが、幹細胞からの分化により更新される。しかし最終的にはこういった更新も起こりにくくなり、個体全体として死を迎えることになる。一方、生殖細胞は個体の維持には必須ではなく細胞数としてもそれほど多くないが、精子と卵子に分化し、それらが受精すると個体全体を作り出す発生全能性を獲得し、次世代へと命をつないでいくことができる。そして生殖細胞のみが持つこの性質を支えている分子基盤には大きな興味を持たれる。本稿では、多能性幹細胞と生殖細胞の性質と両者の関連性について、最近の知見を含めて概説する。

2. 初期胚細胞の分化多能性

1) 内部細胞塊と ES 細胞

子宮内で受精卵が卵割し細胞数がある程度増えると、その細胞塊に内腔が生じ、ボール状の胚盤胞が形成される。この胚盤胞の内部には内部細胞塊と呼ばれる分化多能性を持った細胞集団があり、胚盤胞が子宮に着床した後に、これが発達し胚体 (胎仔) を形成する (図 1)。またその外側のボール状の細胞層は栄養外胚葉と呼ばれ、胎盤などの胚体外の組織へと分化する。

この胚盤胞の内部細胞塊を培養皿の中で特定の条件で培養すると、増殖しながら分化多能性を持つ細胞コロニーを形成し、これを継代することにより培養細胞株として胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) が樹立できる¹⁾ (図 1)。ES 細胞は分化を阻害するための適切な条件で培養することにより、分化多能性を維持したまま活発に増殖し、継代培養により長期間の培養が可能である。マウス ES 細胞の培養を行う場合、マウス胎仔線維芽細胞 (MEF) などをフィーダー細胞として、未分化状態を保つ鍵となるサイトカインである白血病阻害因子 (leukemia inhibitory factor: LIF) が必要で、また培地に使用する血清のロットによっても未分化状態の維持が影響を受けるため、当初は培養条件の確立が難しかった。しかしその後、ロットによる影響が少ない人工的に作られた血清代替液である Knock-out Serum Replacement (KSR) が開発され、培養が容易になった。さらに ES 細胞の分化誘導に関わる MAPK 経路分子 Mek と、Wnt 経路に関わることが知られている Gsk3 を、それぞれ阻害する化合物 (PD0325901, CHIR99021) を、

東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター (〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 4-1)

Molecular mechanisms underlying differentiation of primordial germ cells and their reprogramming to pluripotent stem cells

Yasuhisa Matsui (Cell Resource Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Seiryō-machi 4-1, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan)

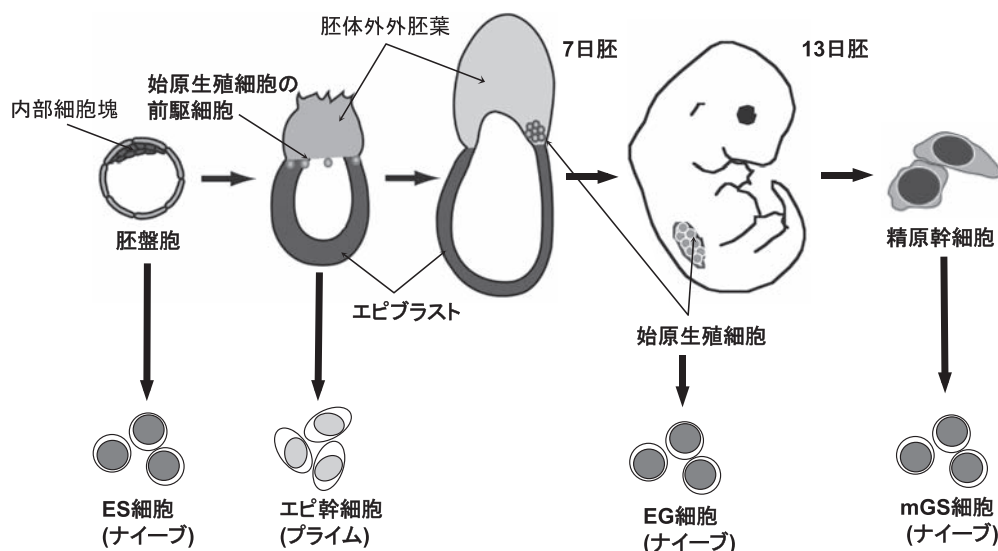


図1 マウス初期胚，生殖細胞の発生と多能性幹細胞

着床前の胚盤胞の内部細胞塊は高い分化多能性（ナイーブ多能性）を持ち，培養することによりES細胞が得られる。着床後，内部細胞塊はエピプラストへと発達する。エピプラスト細胞と，それを培養して得られるエピ幹細胞は，やや制限された多能性（プライム多能性）を持つと考えられ，胚盤胞への移植によるキメラ形成には寄与できない。このエピプラスト上端部の細胞が始原生殖細胞（PGC）へ誘導され，さらに精巣内で精原幹細胞へと変化する。PGCや精原幹細胞を培養することにより，内部細胞塊やES細胞と同じナイーブ多能性を持つ多能性幹細胞であるEG細胞およびmGS細胞へ，それぞれ変化する。

LIFとともに無血清培地に添加することにより，未分化性が高度に保たれることが示された²⁾。またこの2種類の化合物は，まとめて2i（2 inhibitor）と呼ばれている。

ES細胞は培養条件下で，さまざまな組織細胞へ分化し，またマウスの皮下などに移植するといろいろな分化細胞からなる奇形腫を形成する。さらに，マウスのES細胞を胚盤胞に移植し仮親の子宮に戻して発生させると，移植したES細胞と胚盤胞の内部細胞塊の両者に由来する細胞が，生殖細胞を含むすべての組織細胞において混ざり合っているキメラマウスが得られる。これらの実験から，ES細胞が内部細胞塊と同等の高い分化多能性を持つことがわかる。この高い多能性は，ナイーブ多能性（naïve pluripotency）と呼ばれている³⁾（図1）。

2) エピプラストとエピ幹細胞

胚盤胞はやがて，マウスの場合には受精後4日目ごろに，栄養外胚葉の細胞を介して子宮に着床し胚発生がさらに進行していく。そして内部細胞塊の細胞集団は増殖しながらかたちを変え，エピプラストと呼ばれる組織を形成する。マウスの場合には，エピプラストは上皮様の細胞がカップ状に配列し内腔構造を持つ（図1）。さらに胚発生が進行し，受精後6～7日目ごろになると原腸陥入が始まり，エピプラストの細胞の一部が，将来の体の後ろ側からエピプラストを外側から包み込み，それらの細胞がやがて中胚葉へと分化する。

原腸陥入が始まる前のエピプラスト細胞は分化多能性を保っているが，その分化能は内部細胞塊や，そこから得られるES細胞と比較して，やや制限されていると考えられ

る。たとえばエピプラストの細胞は，胚盤胞に移植した場合，ES細胞のようにキメラマウスを形成することはできない。さらにエピプラストを培養することによりエピ幹細胞（epiblast stem cell）と呼ばれる多能性を持つ細胞株を樹立することができる^{4,5)}。この細胞株の分化能もエピプラストと同様に，ES細胞に比べて制限されている。このエピプラストの示すやや制限された多能性はプライム多能性（primed pluripotency）と呼ばれている³⁾（図1）。このように胚発生の進行に伴い多能性の状態が変化する生物学的な意義は不明だが，プライム多能性は胚内でさまざまな細胞へ分化する前段階として必要である可能性が考えられる。

ES細胞のようなナイーブ多能性幹細胞と，エピ幹細胞のようなプライム多能性幹細胞では，キメラ形成能の有無以外にもいくつかの違いがあることが報告されている。たとえばナイーブ多能性幹細胞では，プライム多能性幹細胞に比べて，発生関連遺伝子プロモーター領域でのヒストンH3リシン(K)27のメチル化レベルが低く⁶⁾，雌（XX）の細胞でX染色体不活性化が起こっていない⁷⁾。

ヒトの胚盤胞からもES細胞が樹立できるが，細胞の形態や遺伝子発現パターン，さらに上記のようなエピジェネティックな状態から，ヒトES細胞はマウスのエピ幹細胞に近い性質，つまり分化能がやや制限されたプライム多能性を持つと考えられている⁸⁾。体細胞の再プログラム化により得られる人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS細胞）でも，マウスとヒトでは同様の差異がある。ヒトの場合には培養条件が最適でないために，樹立された多能性幹細胞がプライム状態にとどまると考えられる。実際に従来の多能性幹細胞の維持に必要な因子に加え

て、いくつかの情報伝達分子の阻害剤を添加した培地で培養することにより、ヒト ES 細胞、iPS 細胞の遺伝子発現パターンがナイーブ多能性幹細胞と似た状態を示すようになる⁹⁾。ただしヒトではキメラ形成能を調べることができないので、遺伝子発現パターンとナイーブあるいはプライム多能性との対応関係がマウスと同等であるかどうかは不明確な部分が残る。

3. 始原生殖細胞 (PGC) の分化

1) PGC の形成

成体の精巣、卵巣に存在する精子と卵子は、胚発生の初期段階で形成される始原生殖細胞 (primordial germ cell : PGC) に由来する。そしてこの PGC 形成の分子機構に関して、マウスを用いた研究による知見が蓄積している。

マウス胚では、先に述べた原腸陥入に伴う中胚葉分化と平行して、エピプラスト細胞の一部が PGC へと分化する (図 1)。エピプラストの単一細胞を色素で標識し、発生が進んだ後にどのような組織細胞に分化したかを調べる細胞系譜解析により、エピプラスト内の上端部に位置している一部の細胞が PGC へ分化することが示された¹⁰⁾。またエピプラストの上部には、胎盤などの胚体外組織に分化する胚体外外胚葉が接しており、この胚体外外胚葉をエピプラストから切り離したり、再結合したりして培養する実験から、胚体外外胚葉からのシグナル分子がエピプラストに作用することにより、PGC の分化が誘導されることがわかった¹¹⁾。さらに分泌性の分化制御因子としてさまざまな細胞系で重要な役割を果たしている骨形成タンパク質 4 (bone morphogenetic protein 4 : BMP4) が胚体外外胚葉で発現し、そのノックアウトマウスでは PGC 形成が阻害されることから、BMP4 がエピプラスト細胞に作用して PGC への分化が起こることが示された¹²⁾。

BMP シグナルによりエピプラスト細胞から誘導された細胞は、なお PGC そのものではなく、その前駆細胞と考えられている。たとえば先に述べた細胞系譜解析では、BMP4 が作用する時期の細胞で、将来 PGC に分化する細胞は中胚葉の細胞にも同時に分化することが示されている¹⁰⁾。この PGC 前駆細胞は、6.5 日胚で原腸陥入が始まると、胚の後端部に集合して細胞塊を形成し、1 日ほどの間に PGC 特異的な遺伝子を発現するようになり、最終的に PGC としての分化運命が決定されると考えられている。この集合した前駆細胞間では、細胞接着分子の一つである E カドヘリンを介した細胞間相互作用が働いている。そして E カドヘリンの作用を阻害すると前駆細胞から PGC への分化が起こらなくなることから、前駆細胞どうしの相互作用が PGC への分化決定に重要であることがわかった¹³⁾。

このようにエピプラスト細胞から PGC への分化は、細胞外からのシグナル分子の段階的な作用によっていると思われるが、前駆細胞内で働く転写制御因子も PGC への分化に必須な役割を果たしている。多能性幹細胞の未分化状

態の維持および体細胞の iPS 細胞への変化に必須な転写因子 Oct4 を生殖細胞で特異的に欠損したマウス胚では、PGC は存在するが細胞死を起こしやすく、正常胚に比べて PGC 数が顕著に少ない¹⁴⁾。そして Oct4 を PGC 前駆細胞内で機能しないように操作すると PGC への分化が阻害されることがわかり、前駆細胞から PGC への分化運命の決定にも Oct4 が関わっていることが明らかになった¹⁵⁾。

さらに、ヒストンメチル化酵素にみられる PR ドメインを持つ Prdm1 (Blimp1) と Prdm14 も PGC 形成に必須な役割を果たしている^{16, 17)}。Prdm1 欠損胚では PGC 形成は起こるものの、形成時の PGC は非常に少なく、それ以上に細胞数が増えることはない。また正常胚では PGC は形成後、増殖しながら胎仔生殖巣に向かって移動するが、こういった移動もみられず、やがて消失する。さらに Prdm1 欠損 PGC では、通常は発現しない体細胞性の遺伝子である *Hoxa1*, *Hoxb1* が異常に発現していることから、Prdm1 は PGC で体細胞性の遺伝子の発現を抑制する役割があると考えられる¹⁶⁾。Prdm14 欠損胚でも PGC 形成は起こるが、その後の細胞数の増加がみられない。また抑制性のヒストンのメチル化状態が異常になっていることから、Prdm14 はヒストンメチル化の制御を介して、PGC の増殖や分化を制御していると考えられる¹⁷⁾。しかし、Prdm1, Prdm14 とともに、ヒストンメチル化酵素の構造上の特徴は持つものの、いまのところその活性は確認されておらず、PGC における作用機構の詳細は明らかになっていない。

2) PGC の分化に伴う特徴的なエピゲノム変化

このようにして形成された PGC は、形成直後は 30 細胞程度だが、その後活発に増殖し、最終的に 13.5 日胚では 3 万細胞程度にまで達する。また増殖しながら形態形成の進む胚の中を移動し、将来の精巣や卵巣のもとになる組織である生殖隆起が形成される場所にたどり着き、11.5 日胚ごろまでにその中に定着する。その後、14.5 日胚ごろに PGC は細胞分裂を停止し、雄では出生時まで増殖休止期に保たれたのち、精子へと分化する幹細胞である精原細胞として増殖を再開する。一方、雌では増殖停止後すぐに減数分裂を開始し、さらに出生時までにいったん第一減数分裂前期で停止し、卵母細胞として卵巣中に保たれる。そして出生後に個体が性成熟したのちに、性周期に伴い卵母細胞が少数ずつ減数分裂を再開し卵子へと成熟する。こうして形成された精子と卵子が受精してできる受精卵は個体全体を作る能力を持ち、このような性質はほかのどのような細胞にもない。この個体発生全能性を生殖細胞が獲得する分子機構は興味深い。

細胞の分化能は細胞核の状態によるところが大きい。ほとんどの細胞では、どの細胞にも同じひとそろいの遺伝子が備わっているが、転写される遺伝子の種類と転写のタイミングにより細胞分化や細胞機能が制御される。こういった核全体の転写パターンの制御機構として、DNA のメチル化やヒストン修飾によるエピジェネティック制御が注目

されている。そして PGC は特徴的なエピジェネティック変化を起こすことが知られている¹⁸⁾。たとえば ES 細胞やエピプラスト細胞では全ゲノムの 80% 程度が DNA メチル化状態にあるが、PGC では分化に伴い全ゲノム DNA が徐々に低メチル化状態に変化し、13.5 日胚ではメチル化 DNA の割合は 10% 前後にまで低下する^{19, 20)}。また転写活性化に対して抑制的なヒストン修飾として知られているヒストン H3 リシン(K)9 のメチル化も、PGC では全ゲノム的に低いレベルになっている²¹⁾。

こういった変化が起こる意味の一つとして、生殖細胞で特異的に発現する遺伝子の転写活性化への関与が考えられ、実際に生殖細胞の分化過程で発現する遺伝子は DNA が低メチル化状態になっている²²⁾。また、ゲノム刷り込み遺伝子の初期化にも、この時期の PGC で起こる DNA 脱メチル化が働いている。ゲノム刷り込み遺伝子は父または母由来の片方の遺伝子 (片アレル) のみが発現する遺伝子で、胚発生の進行に重要な働きをすることがわかっており、これまでに数十種類の遺伝子がゲノム刷り込み遺伝子として知られている。ゲノム刷り込み遺伝子は精子または卵子のそれぞれの形成過程で、遺伝子ごとに決まった片方のアレルの遺伝子のみが DNA のメチル化を受け、それが引き金になり胚発生過程や成体内の細胞で片アレル発現する。精子や卵子形成過程に先立って、PGC ではこの片アレルの DNA が脱メチル化され、ゲノム刷り込みが初期化される。それにより、その後の配偶子形成過程で、再び精子または卵子に特異的な片アレルのみの DNA メチル化が確立できる¹⁸⁾。これもまた、PGC で起こる DNA 脱メチル化の意味の一つといえる。

しかし DNA の脱メチル化やヒストン修飾変化は、生殖

細胞で特異的に発現する遺伝子やゲノム刷り込み遺伝子以外でも、全ゲノム的に起こっている。その意義として、初期発生過程で受けたさまざまなエピジェネティック修飾を生殖細胞は初期化することで生殖細胞が個体発生全能性を獲得することができる可能性が考えられているが、詳細は今のところ明らかになっていない。一方、PGC の分化過程で DNA 脱メチル化が起こりにくい領域もあることが示されている。その一つにトランスポゾンがある^{19, 20)}。トランスポゾンはその転写の活性化によりゲノム上を移動し、それが遺伝子変異の原因ともなりうるが、次世代に遺伝情報を伝える生殖細胞ではゲノムの変異を抑えるために、トランスポゾンの DNA メチル化が保たれその発現が抑制される可能性が考えられる。

3) 多能性幹細胞から PGC 分化を再現できる培養系

先に述べたように、胚発生の初期過程ではいくつかの鍵になる制御因子の働きにより PGC 形成が起こるが、培養下で ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞株から PGC 形成を再現できることが報告されている。

まず、多能性幹細胞が分化しながら凝集してできる胚様体からの PGC 分化が報告された²³⁾ (図 2)。その実験では、まず多能性幹細胞では発現が低く PGC で発現が高い *Vasa* 遺伝子の発現を指標として、多能性幹細胞が PGC に分化したことを検出した。その結果、胚様体形成後、3 日程度で *Vasa* 陽性の細胞がみられるようになった。さらに、この *Vasa* 陽性細胞をセルソーターで精製し、精巣に移植したところ移植細胞に由来する精子形成が確認された。しかし、その精子が正常に受精し胚発生が進行することは確認されなかった²³⁾ (図 2)。また別の研究グループが、ES 細胞

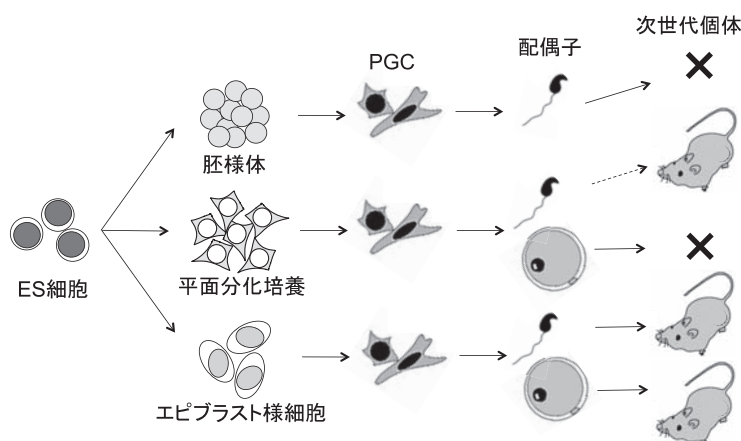


図 2 ES 細胞からの培養下での生殖細胞分化

ES 細胞が細胞凝集塊を作りながら分化して形成される胚様体の内部に、少数の始原生殖細胞 (PGC) が分化し、これを精巣に移植すると精子にまで分化するが、その精子による受精と個体発生は確認されていない。ES 細胞を平面培養条件で分化させても PGC が現れ、さらに長期間培養することで卵子の形態を持つ細胞が得られるが、受精と発生は確認されていない。また類似した培養条件で得られる精子は受精し個体が産まれるが、生後半年以内に死亡することが報告されている。ES 細胞をエピプラスト様細胞へ変化させた後に誘導して得た PGC を精巣または卵巣に移植すると、正常な発生能を持つ精子または卵子へ分化する。

胞をフィーダー細胞と LIF が存在しない平面培養条件下で培養すると、PGC マーカー陽性の細胞が現れることを確認し、さらに長期間の培養により卵子に類似した細胞が形成されることを報告した。しかし、この場合にも ES 細胞に由来する卵子の正常な発生は報告されていない²⁴⁾ (図 2)。その後、類似した平面培養系で ES 細胞に由来する精子が培養下で得られ、さらにそれが受精しマウス個体を得られたという報告がなされた²⁵⁾。しかし、そのマウスは 6 か月齢までに死亡したことから、ES 細胞に由来する精子に何らかの異常があった可能性が考えられた (図 2)。

より最近になって、胚の中で起こる PGC 形成過程を模倣する培養系が確立され、そこで得られた PGC を精巣または卵巣に移植することにより、正常な個体へと発生する精子と卵子が分化することが報告された^{26, 27)} (図 2)。この培養系では、まず ES 細胞や iPS 細胞を、アクチビンや塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) などのサイトカインとともに培養することにより、エピプラスト細胞に似た性質の細胞へ変化させる。さらにその細胞を、細胞塊を作りながら、PGC 形成に必要な BMP4 などのサイトカインの存在下で培養することにより、比較的早い分化段階の PGC に類似した細胞が得られた。次にこの PGC 類似細胞を精巣に移植、または雌の胎仔生殖巣細胞とともに培養して卵子への分化をある程度進めた後に卵巣に移植し、ES 細胞や iPS 細胞に由来する精子または卵子を得た。さらにそれらを受精することで、完全に正常なマウス個体を得られることが示された^{26, 27)} (図 2)。ただし、いまのところ培養のみで正常な精子や卵子を得られることは報告されていない。

このように、胚の中でも培養条件下でも、PGC はエピプラスト細胞から分化すると考えられる。先に述べたように、このエピプラストの細胞は多能性だが、着床前の内部細胞塊や、それに由来する ES 細胞が持つナイーブ多能性とは少し異なり、分化能がより限定的になったプライム多能性を持つ³⁾ (図 1)。

一方、後に述べるように、PGC は培養条件下でいくつかの細胞外シグナル分子の働きにより、短時間で容易に多能性幹細胞に再プログラム化される^{28, 29)}。また興味深いことに、この PGC に由来する多能性幹細胞 (embryonic germ cell: EG 細胞) は、PGC が直接に由来するエピプラスト細胞の性質ではなく、ES 細胞と同様のナイーブ多能性を示し (図 1)、このことから PGC は、ナイーブ多能性と密接に関連していると考えられる。にも関わらず、上記のようにプライム多能性のエピプラストから PGC が分化する生物学的意義は興味深い。以下に述べるように、PGC はナイーブ多能性幹細胞から直接的に分化できるポテンシャルを持つが、体細胞の分化を保証するためのメカニズムとしてプライム多能性幹細胞への変化が必要なかもしれない。

4) 多能性幹細胞での生殖細胞遺伝子の発現抑制機構

以上のように、ナイーブ多能性幹細胞と PGC は細胞の性質として似た部分があり、また多能性の維持に関わる多くの遺伝子が両者で共通して発現している。このことから、内部細胞塊細胞や ES 細胞では、PGC への変化を抑制する機構が働いていて、それを解除すれば、エピプラスト細胞を経なくても直接的に PGC に変化する可能性があるように思われる。そのような考えに基づいて、ES 細胞の生殖細胞への直接変化を引き起こすような RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) スクリーニングを試みた³⁰⁾。ES 細胞で発現している約 900 種類あまりの転写制御因子遺伝子について、それぞれの遺伝子に対応する small interfering RNA (siRNA) を ES 細胞に導入することで、それら遺伝子の発現を阻害した。生殖細胞方向へ変化したかどうかは、ES 細胞や体細胞では発現せず、生殖細胞だけで発現する *Vasa* 遺伝子の発現制御領域に蛍光タンパク質遺伝子をつないだレポーターの発現誘導により調べた。その結果、がん遺伝子 *Myc* ファミリーの *Max* をはじめとする 5 種類の候補遺伝子を得た³⁰⁾。

得られた候補遺伝子の一つである *Max* に関してさらに詳しく調べたところ、*Max* の発現を阻害すると *Vasa* レポーターの発現だけでなく、内在性の *Vasa* 遺伝子や、それ以外の多くの生殖細胞特異的な遺伝子の発現が誘導されることがわかった。またトランスクリプトーム解析から、生殖細胞特異的な遺伝子は全ゲノム的に発現上昇していると思われるが、*Max* 機能阻害細胞の全体の転写パターンを PGC と比較すると、生殖細胞特異的な遺伝子以外の遺伝子発現は異なる部分が多いことがわかった。また *Vasa* 陽性になった細胞を精巣に移植して精子への分化が起こるかを調べたが、精子形成はみられなかった³⁰⁾。したがって、*Max* の機能阻害により、ES 細胞が生殖細胞特異的な遺伝子を発現するようになるが、それ以外の遺伝子発現は生殖細胞と一致せず、細胞としても生殖細胞としての性質を獲得しているとはいえないと考えられた。しかし *Max* の機能阻害に加えて、何らかの条件が組み合わさることで、ES 細胞が生殖細胞としての性質を持つように、直接的に変化する可能性もあると考えられる。

一方、*Max* が ES 細胞でどのようなメカニズムで生殖細胞特異的な遺伝子の発現を抑制しているのかに興味を持たれる。この点を調べた結果、*Max* はヒストン H3K9 をメチル化する酵素である G9a および GLP と相互作用をしながら、生殖細胞特異的な遺伝子のプロモーター領域に結合し、その結果、その部分のヒストン H3K9 をメチル化することがわかった³⁰⁾ (図 3)。このメチル化は転写を抑制する働きがあることが知られており、生殖細胞特異的な遺伝子の発現も抑制されることが考えられる。

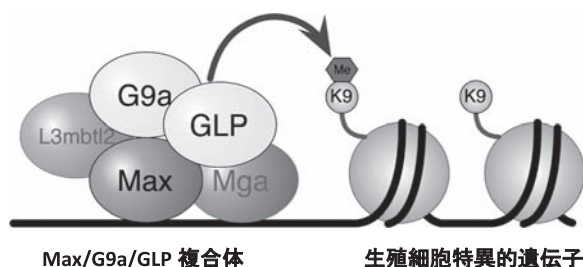


図3 Max 複合体による生殖細胞遺伝子の発現制御

ES 細胞の中で、転写制御因子 Max はヒストン H3K9 メチル化酵素の GLP および G9a と複合体を作り、生殖細胞特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域に結合する。そして H3K9 をメチル化することで抑制的なクロマチン構造を誘導し、生殖細胞特異的遺伝子の転写を抑制すると考えられる。

4. 細胞の再プログラミング

1) PGC から多能性幹細胞への再プログラミング

このように通常 PGC は、プライム多能性幹細胞から分化するが、ナীব細胞でも Max の機能が阻害されると生殖細胞特異的遺伝子を発現し、PGC への直接変化に向かう可能性が示唆され PGC とナীব多能性幹細胞は、類似した性質を共有しているように思える。

さらに興味深いことに、PGC は培養条件下で細胞外から働くいくつかのシグナル分子によって、短時間でナীব多能性幹細胞へ変化する^{28, 29)}。体細胞が iPS 細胞へ再プログラミングされる際には、多能性関連遺伝子を強制発現する必要があるが、PGC では多能性関連分子が発現しているため、細胞外からの刺激のみで容易に再プログラミングが起こると考えられる。次に、この PGC の再プログラミング機構をみる。

マウスの PGC は通常の培養条件下では長期間にわたって増え続けることはない。幹細胞因子 (stem cell factor: SCF) や LIF といったサイトカイン³¹⁾や、レチノイン酸またはフォルスコリンといった化合物³²⁾を培地に添加することで、PGC の増殖や生存がやや促進されるが、いずれにしても数日で細胞死を起こし消滅する。しかし SCF, LIF に加えて bFGF が共存すると、一部の PGC が増え続けながら多能性幹細胞へ再プログラミングされることがわかった^{28, 29)} (図4)。PGC から樹立された多能性幹細胞株は EG 細胞と呼ばれており、ES 細胞と同様にキメラ形成能を示すナীব多能性幹細胞としての性質を持っている。また bFGF の代わりにレチノイン酸、フォルスコリン³²⁾、またはヒストン脱アセチル化阻害剤のトリコスタチン A³³⁾と、SCF および LIF の共存下でも EG 細胞が得られる (図4)。さらに先に述べた Mek と Gsk3 をそれぞれ阻害する化合物 (PD0325901, CHIR99021: 2i) と LIF のみで、SCF と bFGF が存在しない条件でも、効率はやや低くなるが、EG 細胞が樹立できることが報告されている^{34, 35)}。

PGC の再プログラミングの効率は培養条件によって異なるが、筆者らが用いている条件では、10.5 日胚の PGC の

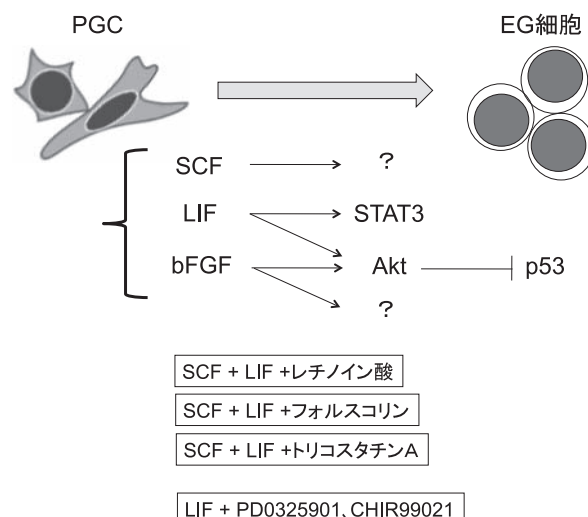


図4 始原生殖細胞 (PGC) の多能性幹細胞 (EG 細胞) への再プログラミングを引き起こす因子

PGC を SCF, LIF, bFGF の存在下で培養すると、多能性幹細胞である EG 細胞へ変化する。LIF の下流では STAT3 が働き、また bFGF や LIF の下流では Akt の活性化により p53 の働きが抑えられ EG 細胞への変化を促進すると考えられるが、Akt 以外の情報伝達分子も関与していると思われる。bFGF の代わりにレチノイン酸、フォルスコリンまたはトリコスタチン A でも EG 細胞形成が起こる。さらに LIF と、Mek と Gsk3 を阻害する化合物 (PD0325901, CHIR99021) でも EG 細胞への変化が起こる。

場合、最初に培養した PGC の 30% 程度が EG 細胞へ再プログラミングされる³⁶⁾。しかし、その効率は胚発生の進行とともに低下し、12.5 日胚では 4% 程度に、また 15.5 日胚では EG 細胞は形成されなくなる。その理由としては、14.5 日胚以降では PGC の増殖が停止することが関係していると思われる。またそれより前の胚発生段階でも再プログラミング効率が低下していくのは、PGC の分化が進行し、再プログラミングに影響する何らかの遺伝子の発現や、エピゲノムの状態や細胞周期の状態が変化することによると考えられる。

PGC の再プログラミングには SCF, LIF, bFGF による細胞内情報伝達系が関わると思われる。実際に、LIF の下流で働く STAT3 の機能を阻害すると再プログラミングが起こりにくくなることが報告されている³⁵⁾ (図4)。また Akt は bFGF や LIF により活性化されることが知られている細胞内情報伝達分子だが、外来 Akt 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの PGC では再プログラミングが促進される。さらに Akt の下流で p53 が不活性化されることが再プログラミングに関わることが示されている³⁷⁾ (図4)。これらの分子経路の活性化により、PGC の培養下での生存と増殖が促進されることが、再プログラミングに寄与すると考えられる。しかし、Akt の活性化のみでは EG 細胞への変化が起こらないので、bFGF の下流では Akt 以外の情報伝達分子も働いていると思われる³⁶⁾。一方、PGC の再プログラミングの過程では、PGC 特異的遺伝子の発現低下と、多能性の維持に関わる c-myc などの発現上昇が起こることが

知られているが³⁸⁾、細胞外から働く因子による刺激が、それらの遺伝子発現変化にどのように関わっているのかは明らかになっていない。

Akt を強く活性化した場合、10.5 日胚の PGC では 60% という高い割合の PGC が EG 細胞に変化することがわかった³⁶⁾。このことから比較的早い発生段階である 10.5 日胚ごろまでの PGC は、細胞集団全体として多能性を獲得しやすい状態にあると思われる。

2) 精原細胞の多能性幹細胞への再プログラム化

精巣の中で精子を作り出す幹細胞が精原幹細胞で、この細胞を培養条件下で増やす方法が確立されている。精原幹細胞の増殖の鍵となるサイトカインとして知られるグリア細胞由来神経栄養因子 (glial cell-derived neurotrophic factor: GDNF) 等を含む培地で培養して得られる細胞株は GS 細胞 (germ-line stem cell: GS cell) 呼ばれていて、精巣に移植すれば正常な精子へ分化する。またこの GS 細胞の培養系で、ごく低頻度だが多能性幹細胞が現れることが示されていて、こうして得られた細胞は mGS 細胞 (multipotent germ-line stem cell: mGS cell) と呼ばれている (図 1)³⁹⁾。mGS 細胞への再プログラム化も、PGC から EG 細胞が形成される際と同様に p53 の機能が阻害されることにより促進されるが、それ以外の再プログラム化機構の詳細は明らかになっていない。

3) 体細胞の再プログラム化

生殖細胞は、多能性の維持に関わる遺伝子を発現しているので、比較的容易に多能性幹細胞へ再プログラム化されることは理解しやすいが、分化した体細胞が多能性幹細胞に逆戻りすることは難しいと予想されていた。しかし 1997 年に、分化した体細胞の核を、あらかじめ核を取り

除いた卵子に移植すると胚発生が進行しクローン動物ができることが示され、分化した細胞の核が予想以上の分化可塑性を持つことが明らかにされた⁴⁰⁾。しかしその場合も卵子の力を借りての変化で、メカニズムに関してはブラックボックスの部分が大きかった。その後、よく知られているように、2006 年に京都大学の山中伸弥教授のグループが、多能性の維持に関わる可能性のある 24 種類の遺伝子の中から *Oct4*, *Sox2*, *c-myc*, *Klf4* の四つの遺伝子を選択し、それらをマウスおよびヒト皮膚細胞などに導入することにより、ES 細胞と同等の性質を持つ iPS 細胞へ変化することを発見した⁴¹⁾ (図 5)。これらの多能性関連遺伝子を強制的に発現することが引き金になり、転写パターンやエピゲノム状態が分化細胞型から多能性幹細胞型へ変化していくものと理解されている。

こういった体細胞の再プログラム化の効率は当初は非常に低く、0.01% 程度だった。しかし、その後、転写制御因子をコードする *Glis1* 遺伝子も合わせて導入すること⁴²⁾、ヌクレオソーム・リモデリング複合体に含まれる *Mbd3* 遺伝子をノックダウンすること⁴³⁾、あるいはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などを培地に添加すること⁴⁴⁾で、より高い再プログラム化効率が得られることが報告された。さらに細胞に遺伝子を導入することなしに、培地に小分子化合物を添加することで iPS 細胞を作る方法が示された⁴⁵⁾。しかし、再プログラム化の分子機構の全貌は解明されていない。多能性関連遺伝子を発現すれば必ず再プログラム化されるわけではなく、再プログラム化されるためには、多能性関連遺伝子の発現以外の要因がそろう必要がある。一方、より最近になって、再プログラム化されやすい細胞集団がもともと存在することが示唆されている⁴⁶⁾。その一つとして、通常の細胞では 16~24 時間程度の細胞周期だが、骨髓中の顆粒球・単球前駆細胞の中に G1 期が短いために

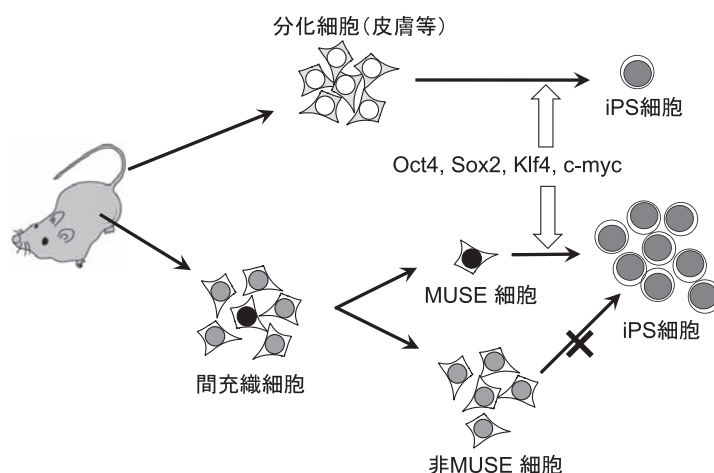


図5 体細胞の多能性幹細胞への再プログラム化

分化した体細胞で、多能性の鍵となる Oct4, Sox2, Klf4, c-myc を強制的に発現させると、多能性幹細胞の iPS 細胞への再プログラム化が起こる。また間充細胞には MUSE 細胞という多能性を持った細胞が含まれていて、MUSE 細胞からは効率よく iPS 細胞ができるが、MUSE 細胞ではない間充細胞からは iPS 細胞ができない。

8時間程度という非常に短い細胞周期を持つ細胞集団が存在し、それがより高頻度で再プログラム化を起こすことが示された⁴⁶⁾。このように、体細胞からiPS細胞を誘導する方法については、改良された手法が次々と発表されており、さらなる進展が期待されるが、一方で今後、再現性等については慎重に検討が重ねられていくことも重要である。

もう一つ、間充織細胞の中に多能性の潜在能力を持つMUSE細胞(multilineage-differentiating stress- enduring cell: MUSE cell)と名づけられたユニークな細胞が同定されており、この細胞がiPS細胞に再プログラム化されやすいことが報告されている⁴⁷⁾。ヒト骨髄や皮膚の間充織細胞集団内の1%程度の細胞が未分化細胞表面抗原のSSEA-3を発現しており、この細胞を培養条件下で増やして得た多能性を示す細胞がMUSE細胞である。しかし、ES細胞のように盛んに増殖を続けることはなく、小さな細胞塊を形成する培養により多能性細胞として維持できる。一方、興味深いことに、皮膚の間充織細胞をMUSE細胞と非MUSE細胞に分けた後にiPS細胞への再プログラム化を誘導すると、MUSE細胞のみから多能性細胞として盛んに増殖するiPS細胞ができることがわかった⁴⁸⁾。この結果は、少なくともヒト皮膚の間充織細胞では、MUSE細胞の性質を示す細胞集団のみが再プログラム化される潜在能力を持つことを示している。

5. おわりに

多能性幹細胞と受精卵は、いずれも体を構成するさまざまな細胞を生み出す能力を持っている点で似ている。しかし多能性幹細胞は、受精卵のように形態形成を伴う個体発生能は持たない。一方、PGCそのものは多能性ではなく、配偶子にのみ分化する単能性の細胞だが、配偶子に分化することにより、再び受精卵を生み出すことができ、さらにサイトカインの働きのみで多能性幹細胞に容易に再プログラム化する。このように生殖細胞の性質(生殖細胞性)、受精卵のもつ個体発生能、多能性幹細胞が持つ細胞分化多能性の相違を支える分子基盤およびそれら異なる性質の細胞間の変化を担う分子機構には興味を持たれる。iPS細胞の発見により、多能性幹細胞の分子基盤および体細胞を再プログラム化する分子機構は明らかになりつつある。一方で、生殖細胞の性質がどのようなメカニズムにより支えられているのか、そして生殖細胞から多能性幹細胞、受精卵への変化がどのようにして起こるのかに関しては、不明な点が多い。今後の研究で、たとえば皮膚細胞に操作を加え、直接的に生殖細胞を生み出す方法がみいだされ、生殖細胞性の遺伝子や分子による再構成ができれば、生殖細胞性を支える分子基盤の全貌が解明できる可能性があるかもしれない。

文 献

- Nichols, J. & Smith, A. (2011) *Development*, 138, 3-8.
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Battlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., & Smith, A. (2008) *Nature*, 453, 519-523.
- Nichols, J. & Smith, A. (2009) *Cell Stem Cell*, 4, 487-492.
- Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., de Sousa Lopes, S.M.C., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pederson, R.A., & Vallier, L. (2007) *Nature*, 448, 191-195.
- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davis, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., & McKay, R.D.G. (2007) *Nature*, 448, 196-199.
- Marks, H., Kalkan, T., Menafrá, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., Nichols, J., Kranz, A., Stewart, F., Smith, A., & Stunnenberg, H.G. (2012) *Cell*, 149, 590-604.
- Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., & Smith, A. (2009) *Development*, 136, 1063-1069.
- Rossant, J. (2008) *Cell*, 132, 527-531.
- Gafni, O., Weinberger, L., Mansour, A.A., Manor, Y.S., Chomsky, E., Ben-Yoef, D., Kalma, Y., Viukov, S., Maza, I., Zviran, A., Rais, Y., Shipony, Z., Mukamel, Z., Krupalnik, V., Zerbib, M., Geula, S., Caspi, I., Schneir, D., Schwartz, T., Gilad, S., Amann-Zalcenstein, D., Benjamin, S., Amit, I., Tanay, A., Massarwa, R., Novershtern, N., & Hanna, J.H. (2013) *Nature*, 504, 282-286.
- Lawson, K.A. & Hage, W. J. (1994) *Ciba Found. Symp.*, 182, 68-91.
- Yoshimizu, T., Obinata, M., and Matsui, Y. (2001) *Development*, 128, 481-490.
- Lawson, K.A., Dunn, N.R., Roelen, B.A., Zeinstra, L.M., Davis, A.M., Wright, C.V.E., Korving, J.P.W.F.M., & Hogan, B.L. (1999) *Genes Dev.*, 13, 424-436.
- Okamura, D., Kimura, T., Nakano, T., Matsui, Y. (2003) *Development*, 130, 6423-6430.
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin, K.J., Scholer, H.R., Tomilin, A. (2004) *EMBO Rep.*, 5, 1078-1083.
- Okamura, D., Tokitake, Y., Niwa, H., & Matsui, Y. (2008) *Dev. Biol.*, 317, 576-584.
- Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S.C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovskiy, A., Saitou, M., & Surani, M.A. (2005) *Nature*, 436, 207-213.
- Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigetani, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., & Saitou, M. (2008) *Nat. Genet.*, 40, 1016-1022.
- Sasaki, H. & Matsui, Y. (2008) *Nat. Rev. Genet.*, 9, 129-140.
- Seisenberger, S., Andrews, S., Krueger, F., Arand, J., Walter, J., Santos, F., Popp, C., Thienpont, B., Dean, W., & Reik, W. (2012) *Mol. Cell*, 48, 849-862.
- Kobayashi, H., Sakurai, T., Miura, F., Imai, M., Mochiduki, K., Yanagisawa, E., Sakashita, A., Wakai, T., Suzuki, Y., Ito, T., Matsui, Y., Kono, T. (2013) *Genome Res.*, 23, 616-627.
- Seki, Y., Hayashi, K., Itoh, K., Mizugaki, M., Saitou, M., Matsui, Y. (2005) *Dev. Biol.*, 278, 440-458.
- Mochizuki, K., Tachibana, M., Saitou, M., Tokitake, Y., Matsui, Y. (2012) *PLoS ONE*, 7, e46036.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akutsu, R., & Noce, T. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11457-11462.
- Hubner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L.K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss III, J.F., Boiani, M., & Scholer, H.R. (2003) *Science*, 300, 1251-1256.
- Nayernia, K., Nolte, J., Michelmann, H.W., Lee, J.H., Raath-

- sack, K., Drusenheimer, N., Dev, A., Wulf, G., Ehrmann, I.E., Elliott, D.J., Okpanyi, V., Zechner, U., Haaf, T., Meinhardt, A., & Engel, W. (2006) *Dev. Cell*, 11, 125–132.
- 26) Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., & Saitou, M. (2011) *Cell*, 146, 519–532.
 - 27) Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H., & Saitou, M. (2012) *Science*, 338, 971–975.
 - 28) Matsui, Y., Zsebo, K., & Hogan, B. L. (1992) *Cell*, 70, 841–847.
 - 29) Resnick, J.L., Bixler, L.S., Cheng, L., & Donovan, P.J. (1992) *Nature*, 359, 550–551.
 - 30) Maeda, I., Okamura, D., Tokitake, Y., Ikeda, M., Kawaguchi, H., Mise, N., Abe, K., Noce, T., Okuda, A., Matsui, Y. (2013) *Nat. Commun.*, 4, 1754.
 - 31) Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K.M., & Hogan, B.L.M. (1991) *Nature*, 353, 750–752.
 - 32) Koshimizu, U., Taga, T., Watanabe, M., Saito, M., Shirayoshi, Y., Kishimoto, T., & Nakatsuji, N. (1996) *Development*, 122, 1235–1242.
 - 33) Durcova-Hills, G., Tang, F., Doody, G., Tooze, R., & Surani, A. (2008) *PLoS ONE*, 3 (10), e3531.
 - 34) Leitch, H.G., Blair, K., Mansfield, W., Ayetey, H., Humphreys, P., Nichols, J., Suuani, M.A., & Smith, A. (2010) *Development*, 137, 2279–2287.
 - 35) Leitch, H.G., Nichols, J., Humphreys, P., Mulas, C., Martello, G., Lee, C., Jones, Surani, M.A., & Smith, A. (2013) *Stem Cell Rep.*, 1, 66–78.
 - 36) Matsui, Y., Takehara, A., Tokitake, Y., Ikeda, M., Obara, Y., Morita-Fujimura, Y., Kimura, T., & Nakano, T. (2014) *Development*, 141, 4457–4467.
 - 37) Kimura, T., Tomooka, M., Yamano, N., Murayama, K., Matoba, S., Umehara, H., Kanai, Y., & Nakano, T. (2008) *Development*, 135, 869–879.
 - 38) Durcova-Hills, G., Adams, I.R., Barton, S.C., Surani, A., & McLaren, A. (2006) *Stem Cells*, 24, 1441–1449.
 - 39) Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Lee, J. Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Toyoshima, M., Miwa, M., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A., & Shinohara, T. (2004) *Cell*, 119, 1001–1012.
 - 40) Wilmut, I., Achnieke, A.E., Mcwhlr, J., Kind, A.J., & Campbell, K.H.S. (1997) *Nature*, 385, 810–813.
 - 41) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, 126, 663–676.
 - 42) Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., & Yamanaka, S. (2011) *Nature*, 474, 225–229.
 - 43) Rais, Y., Zviran, A., Geula, S., Gafni, O., Chomsky, E., Viukov, S., Mansour, A.A., Caspi, I., Krupalnik, V., Zerbib, M., Maza, I., Mor, N., Baran, D., Weinberger, L., Jaitin, D.A., Lara-Astiaso, D., Blecher-Gonen, B., Shipony, Z., Mukamel, Z., Hagai, T., Gliad, S., Amamm-Zalcenstein, D., Tanay, A., Amit, I., Novershtern, N., & Hanna, J.H. (2013) *Nature*, 502, 65–70.
 - 44) Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., & Melton, D.A. (2008) *Nat. Biotechnol.*, 26, 795–797.
 - 45) Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., & Deng, H. (2013) *Science*, 341, 651–654.
 - 46) Guo, S., Zi, X., Schulz, V.P., Cheng, J., Zhong, M., Koochaki, S.H.J., Megyola, C.M., Pan, X., Heydari, K., Weissman, S.M., Gallagher, P.G., Krause, D.S., Fan, R., & Lu, J. (2014) *Cell*, 156, 649–662.
 - 47) Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Shigemoto, T., Matsuse, D., Akashi, H., Tanimura, Y., Tsuchiyama, K., Kikuchi, T., Goda, M., Nakahata, T., Fujiyoshi, Y., & Dezawa, M. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 9875–9880.
 - 48) Kuroda, Y., Kitada, M., Wakao, S., Nishikawa, K., Tanimura, Y., Makinoshima, H., Goda, M., Akashi, H., Inutsuka, A., Niwa, A., Shigemoto, T., Nabeshima, Y., Nakahata, T., Nabeshima, Y., Fujiyoshi, Y., & Dezawa, M. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 8639–8643.

著者寸描

●松居 靖久 (まつい やすひさ)

東北大学加齢医学研究所教授。薬学博士。

■略歴 1959年東京都に生る。83年東京大学薬学部卒業。88年同大学院薬学系研究科博士課程修了。88年米国バンダービルト大学に留学。92年東北大学助手。96年同助教授。98年大阪府立母子保健総合医療センター研究所部長。2004年より現職。

■研究テーマと抱負 主な研究テーマは、生殖細胞分化のエピジェネティック制御機構、細胞分化多能性と生殖細胞性の相違を生み出す分子機構。生物学的に新たなコンセプトを明らかにすることをめざすとともに、次の世代の研究を担う人達に研究の面白さと厳しさを伝えていきたいと思っています。

■ウェブサイト <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/crcbr/>

■趣味 研究すること、写真を撮ること、鉄道に乗ること、新しい建築物を眺めること。