

平成25年 2月

森川久未 学位論文審査要旨

主 査 谷 口 晋 一

副主査 山 本 一 博

同 久 留 一 郎

主論文

Heterochromatin protein 1 γ overexpression in P19 embryonal carcinoma cells elicits spontaneous differentiation into the three germ layers

(P19胚性癌腫細胞におけるヘテロクロマチンプロテイン1 γ の強制発現は三胚葉への自発的分化を引き起こす)

(著者：森川久未、池田信人、久留一郎、白吉安昭)

平成25年 Biochemical and Biophysical Research Communications 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

Heterochromatin protein 1 γ overexpression in P19 embryonal carcinoma cells elicits spontaneous differentiation into the three germ layers

(P19胚性癌腫細胞におけるヘテロクロマチンプロテイン1 γ の強制発現は三胚葉への自発的分化を引き起こす)

近年、エピジェネティック制御による幹細胞の分化制御機構が明らかになってきた。一例として、マウス胚性幹 (Embryonic Stem : ES) 細胞の未分化状態では、クロマチン構造が“開いた”状態 (ユークロマチン) になっているが、分化に伴い、これが“閉じた”状態へと変化し、ヘテロクロマチンを形成することが知られている。このヘテロクロマチン化に重要な蛋白質が、ヘテロクロマチンプロテイン1 (HP1) ファミリーである。このHP1ファミリーのうちHP1 γ は、ユークロマチンとヘテロクロマチンの両方に局在することが知られており、分化への関与が示唆されている。

P19胚性癌腫 (Embryonal Carcinoma : EC) 細胞は胎生7.5日胚を精巣に移植し樹立された幹細胞である。このP19細胞は、未分化状態では、ES細胞と同等の形態とOct4などの多能性マーカー遺伝子の発現を示す。一方、ES細胞が、胚様体形成のみで三胚葉へ分化を示すのに対して、P19細胞は、胚様体を形成しただけでは分化せず、レチノイン酸 (RA) やDMSOといった薬剤添加を必要とする。そこで、今回は、HP1 γ の細胞分化における役割を調べるために、P19細胞において、HP1 γ を強制発現する細胞株 (HP1 γ -P19細胞) を樹立し、この細胞の分化能力を検討した。

方 法

P19細胞にHP1 γ を強制発現させた細胞株を樹立し、未分化性をアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色、免疫染色、フローサイトメトリー (FCM) により検討した。次に、胚様体形成法による分化誘導を行い、細胞の三胚葉への分化能を免疫染色、real-time RT-qPCR、FCMなどにより確認した。

結 果

まず、樹立したHP1 γ -P19細胞の形態を観察すると、通常培養条件下では、野生型と同じ典型的なコンパクトなコロニーの形態を示した。次に、HP1 γ -P19細胞の未分化性について

検討したところ、ALP活性を有し、未分化マーカーであるE-cadherinの発現も認められた。続いて、胚様体形成法により、分化誘導を行った。この際培地には、薬剤の添加は行わず、血清を加えた通常培地のみを用いた。誘導後約6日で、拍動する心筋細胞を特徴とする中・内胚葉の細胞や神経突起が現れた。さらに、経時的にRNAを回収し、RT-qPCRで解析すると、多能性マーカーOct4、FGF5の発現は、HP1 γ -P19細胞の分化に伴い減少することが分かった。一方、三胚葉の各種分化マーカーの発現は上昇しており、三胚葉への分化がおこなわれていることが判明した。最後に、HP1 γ -P19細胞における各種分化マーカーの発現を免疫染色法で検討した。Tuj1陽性の神経細胞や、Gata6、Sox17、CK18陽性の内胚葉細胞、Tropomyosin CやcTnT陽性の心筋細胞、 α -SMA陽性の血管内皮細胞などへ分化していることが示された。

考 察

今回の研究で、HP1 γ の強制発現は分化の引き金になることが分かった。この分化誘導は薬剤添加を必要とせず、胚様体形成のみによっておこなうことが判明した。通常、野生型P19細胞の分化は、胚様体形成に加えて、特定の薬剤処理を必要とする。このように、HP1 γ の強制発現は、胚様体形成時に、分化誘導薬剤の代わりとして機能すると考えられる。ヒストン脱アセチル化・脱メチル化酵素であるKdm3aのようなエピジェネティック因子が、RA受容体に依存したEC細胞の分化に関与することが知られている。これらより、HP1 γ はP19細胞において、エピジェネティック修飾を変化させ、分化関連遺伝子を活性化すると考えられる。また、*in vitro*で起こるP19細胞分化は、RA処理により神経細胞へ、DMSO処理により中胚葉細胞へというように、薬剤によって分化の方向性が限られてしまう。しかし、HP1 γ -P19細胞は、外胚葉や中胚葉、内胚葉系へと同時に分化をする。この現象は、ES細胞の胚様体形成による分化誘導とよく似ており、HP1 γ の強制発現が三胚葉への自発的分化能を与えていることを示す。このメカニズムは解明されていないが、HP1 γ の強制発現によって、胚様体成時に生ずる自発的な分化誘導シグナルに応答できるような状態へとクロマチン構造が変化するのではないかと考えられる。加えて、P19細胞の発生起源や遺伝子発現プロファイルはエピブラスト細胞に非常によく似ている。したがって、今回の解析は、エピブラスト細胞における未分化性維持機構のエピジェネティック制御と、分化の引き金となるクロマチン状態の役割を理解する一助となるだろう。

結 論

今回の研究から、HP1 γ の強制発現によりP19細胞が自発的に分化することが明らかとなり、HP1 γ は、幹細胞の分化の引き金となる因子であることが示された。