TITLE:

Smarb1 maintains the cellular identity and the chromatin landscapes of mouse embryonic stem cells(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sakakura, Megumi

CITATION:

Sakakura, Megumi. Smarb1 maintains the cellular identity and the chromatin landscapes of mouse embryonic stem cells. 京都大学, 2020, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2020-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22829>

RIGHT:

DOI:10.1016/j.bbrc.2019.09.054

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	坂倉 恵
論文題目	Smarchb1 maintains the cellular identity and the chromatin landscapes of mouse embryonic stem cells (Smarchb1 はマウス ES 細胞の細胞アイデンティティおよびクロマチン状態を維持する)		
(論文内容の要旨)			
<p>マウス受精卵は胎仔および胎盤を形成することができる全能性を持つ。マウス受精卵の細胞運命は受精後 2.5 日前後で将来胎仔を形成する内部細胞塊と胎盤を形成する栄養外胚葉とに分岐する。内部細胞塊から樹立される胚性幹細胞 (ES 細胞) は内部細胞塊が持つ多能性を維持しながら、同時に自己複製能を有する特異な細胞である。ES 細胞の多能性、自己複製能の維持には特徴的な転写ネットワークの活性化が必要であることが知られているものの、それらの転写活性を制御するクロマチン制御については不明な点が多い。Switch/Sucrose NonFermentable (SWI/SNF) complex は、ATP 依存的クロマチン再構成複合体の一種であり複合体の核となるコアサブユニットと呼ばれる BRG1、BAF155 や BAF47 を中心に約 30 のサブユニットから構成される約 2MDa の複合体である。これまでに、BRG1 などの複数のサブユニットが ES 細胞の多能性維持に寄与することが報告されているが、BAF47 をコードする <i>Smarchb1</i> の ES 細胞での機能は不明であった。本研究では、マウス ES 細胞において <i>Smarchb1</i> を欠損させ、表現型を解析することで ES 細胞の維持における <i>Smarchb1</i> の役割を明らかにすることを目的とした。まず、マウス ES 細胞において CRISPR/Cas9 を用いて <i>Smarchb1</i> を欠損させ、<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞を樹立した。<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞は野生型 ES 細胞と比較して細胞増殖能が低下し、一部の細胞において、多能性幹細胞が持つアルカリホスファターゼ活性や SSEA1 の発現が低下していた。さらに、<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞では栄養外胚葉に由来する栄養膜細胞系列のマーカー遺伝子である <i>Cdx2</i>、<i>Hand1</i>、<i>Cited1</i> の発現が上昇していた。<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞はテラトーマアッセイにおいて 3 胚葉（外胚葉・内胚葉・中胚葉）に由来する細胞を含む奇形腫を形成し、多能性を維持していることが示唆された。しかし、それらの奇形腫には、通常 ES 細胞が分化できない栄養膜巨細胞様の細胞が認められた。これらのことから、<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞は、栄養外胚葉への分化傾向を獲得していることが明らかとなった。次に個体発生過程での分化能を検討するために、<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し胎生 14.5 日で胎仔を解析した。<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞は、胎盤への寄与は確認されなかったものの、胎仔全身の臓器に寄与しており、多能性を維持していることが確認された。しかし、<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞由来の神経細胞には分化異常が観察され、<i>Smarchb1</i> は神経発生過程において重要な機能を持つことが示唆された。さらに、<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞のクロマチン状態の変化を検討するため、Assay for Transposase-Accessible Chromatin (ATAC)-Sequencing を行なった。その結果、<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞において、アクセシビリティが低下している領域には ES 細胞の多能性維持に重要な転写因子である SOX2、NANOG、OCT3/4 の結合領域が濃縮しており、反対にアクセシビリティが増加している領域には栄養膜細胞系列への分化に関与する AP-1 や CTCF の結合領域が濃縮していた。クロマチン状態の変化が <i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞の表現型に関与していることが示唆された。以上の結果より、<i>Smarchb1</i> は ES 細胞の特徴的なクロマチン状態および遺伝子発現状態を維持し、ES 細胞としての性質を維持する上で重要な働きを担っていることが明らかとなった。本研究は、幹細胞のクロマチン制御と多能性維持との関係を理解する一助となるものであり、クロマチン制御因子異常による病態メカニズムの解明に貢献することが期待される。</p>			

（論文審査の結果の要旨）			
<p>SMARCB1 は SWI/SNF クロマチン構造変換因子複合体の構成因子として、SWI/SNF の結合標的の制御を介して遺伝子発現制御に関与する。SMARCB1 はマウス初期胚の発生に不可欠であることが報告されているが、多能性幹細胞での SMARCB1 の機能は不明である。本研究では、ES 細胞の多能性維持における SMARCB1 の役割を明らかにすることを目的として、CRISPR/Cas9 を用いて <i>Smarchb1</i> 欠損マウス ES 細胞を樹立した。<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞では、一部の細胞集団において多能性マーカー（SSEA1）の発現低下を認めた。SSEA1 発現が低下している細胞群では分化関連遺伝子が高発現していた。<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞はテラトーマアッセイにおいて三胚葉へと分化し、少なくとも多能性を維持している細胞を含んでいたが、テラトーマ内には栄養膜巨細胞様細胞も観察された。</p> <p><i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞を用いて作製したキメラマウス胎仔では、<i>Smarchb1</i> 欠損神経細胞の早熟分化を認めた。ATAC-seq の結果、<i>Smarchb1</i> 欠損 ES 細胞においてアクセシビリティが低下する領域には多能性維持に重要な転写因子の結合モチーフが濃縮し、反対に上昇する領域には ES 細胞分化に関与する AP-1 の結合モチーフが濃縮していた。SMARCB1 によるクロマチン構造変換が ES 細胞の未分化性維持および分化指向性に関与していることが示唆された。</p>			
<p>以上の研究は、幹細胞におけるクロマチン制御と多能性維持との関係を理解する一助となるものであり、クロマチン制御因子異常による病態メカニズムの解明に貢献することが期待される。したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 1 月 7 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			