

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22510212

研究課題名(和文) ERas細胞におけるERas遺伝子のRho/ROCK経路を介したアポトーシスへの関与

研究課題名(英文) ERas regulated apoptosis in ES cells through Rho pathway.

研究代表者

池田 たま子 (IKEDA, TAMAKO)

秋田大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：10406035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：霊長類ES細胞は、マウスES細胞の様な単細胞継代培養を行うと、アポトーシスで死滅する。これは臨床応用に向けた、ヒトiPS細胞の「遺伝子改変」や「株化細胞樹立」の障害となる。我々は、霊長類とマウスES細胞の違いに着目し、ERas遺伝子発現が異なることを見つけた。近年、ヒトES細胞にROCK阻害薬を添加することにより、単細胞継代時のアポトーシス抑制・細胞増殖を促進が報告された。本研究では、マウス・霊長類ES細胞におけるERas遺伝子の「Rho/ROCK経路」を介した「アポトーシス」への関与を明らかにし、ERas遺伝子の新たな機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ERas promotes proliferation of mouse embryonic stem cells, however human ES cells hardly express the ERas gene. Human ES cells, poor survival after cell dissociation is a major obstacle to research, hindering manipulation such as sorting and cloning of cells. On the other hand, treatment of hES cells with ROCK inhibitor markedly diminished apoptosis, enabling hES cells to propagate as mouse ES cells do following dissociation(Watanabe et al.,2007). We examined the relationship between ERas and the Rho/ROCK pathway. Results, our study have revealed a previously unknown pathway that inactivated the Rho/ROCK pathway in ES cells to suppress apoptosis.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：ERas遺伝子 Rho/ROCK経路 アポトーシス ROCK阻害薬 ES細胞

1. 研究開始当初の背景

高い増殖能と分化能を持ち患者自身の細胞から作製できることから、iPS細胞/ES細胞は、遺伝子治療・移植治療、個人向けの副作用の少ない薬物治療等のオーダーメイド治療、疾患発症機序の解析等への応用が期待されている。その為、効率の良い分化方法や作製された iPS 細胞の選択・純化(株化)が必要となる。しかし、マウス ES 細胞/iPS 細胞は、単一細胞分散継代が可能であるが、霊長類(ヒト・サル) ES 細胞/iPS 細胞は、単一細胞分散継代によりアポトーシスを起こし、殆どの細胞が死滅する事が知られている。その為、遺伝子導入効率やクローニング効率が低く、さらに細胞継代に熟練を要し取り扱いが難しい。

そこで、我々は、マウスとヒトのES/iPS細胞の間で発現の異なる因子の一つである「ERas遺伝子」に着目した。ERas遺伝子(ES cells expressed-Ras)は、遺伝子配列はイヌ・ブタ等でも存在するが、未分化マウスES細胞にのみ発現し、ヒトES細胞では全く発現していない(Kameda et al. Stem Cells 2005;23:1535)。ERas遺伝子は、ES細胞の増殖能を有するが、個体発生やES細胞の未分化性には関与しない(Takahashi et al. Nature2003;423:541)。さらに、ERas遺伝子はRasファミリーに属し、PI3キナーゼ-AKTを介した細胞増殖促進機能が報告されている(Takahashi et al. Nature 2003 ;423:541)。しかし、Ras遺伝子と異なり、Raf1、RalGDSとは結合しない事が報告されている。(Takahashi et al. BioSociety&Transaction2005;33:1522, Takahashi et al. JBC2005; 280:32768)。また、近年、「マウスiPS細胞由来のガン幹細胞にERas遺伝子が発現している」(ChenL et al. PlosOne 2012; 7(4):e33544)や、「神経芽細胞腫にERas遺伝子が、発現すると抗癌治療耐性になる」という報告がある(Aoyama et al. International Jour of Onco 2010; 37:1011-1016)。これら論文の多くは「PI3キナーゼ経路を介した細胞増殖能の亢進による」と報告され、他の伝達経路についての知見は殆ど報告されていない。近年、渡辺らにより、ヒトES細胞の単一細胞分散継代時に「ROCK阻害薬」を作用させるとアポトーシスを抑制する事が報告された(Watanabe et al. NatureBiotech 2007; 25: 681)。さらに、ROCK阻害薬の研究により、Rho-ROCK経路は、アポトーシスを抑制する報告があった(Minambres et al. J.CellScience 2006;119:271)。一方

で、ROCK阻害薬の霊長類ES細胞への作用機序については、不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々は、ERas遺伝子は、ROCK阻害剤の作用機序を担う一因子である可能性が高いと考えた。本研究では、マウス・霊長類ES細胞におけるERas遺伝子の「Rho/ROCK経路」を介した「アポトーシス」への関与を検討する。

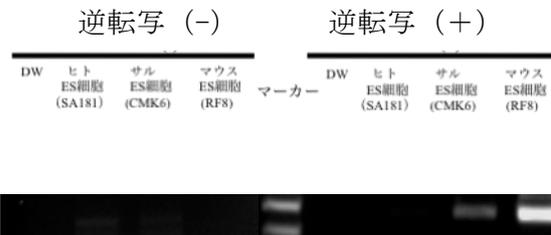
3. 研究の方法

初めに、ヒトES細胞の代用として、カニクイザルES細胞を用いる為に、カニクイザルにおけるERas遺伝子発現を検討した。1. ヒト・マウス共通配列上で作製したprimerを作製し、カニクイザルで保存されているERas遺伝子配列を確認した。さらに、カニクイザルES細胞(CMK6)、カニクイザル組織(脳・心臓・腸・脾臓・卵巣・骨格筋・肝臓・腎臓)におけるERasの発現を検討した。発現が認められた場合には、ERas遺伝子の細胞増殖機能において検討した。次に、カニクイザルES細胞の単一細胞継代時にROCK阻害剤を使用し、アポトーシス抑制効果の有無を確認した。

さらに、ERas欠損マウスES細胞へのROCK阻害薬の効果を検討した。細胞増殖能亢進の効果が認められた場合には、細胞増殖能によるものか精査し、ERas欠損マウスES細胞へのERas遺伝子の再導入を行い、細胞増殖能・アポトーシス抑制能について検討する。

4. 研究成果

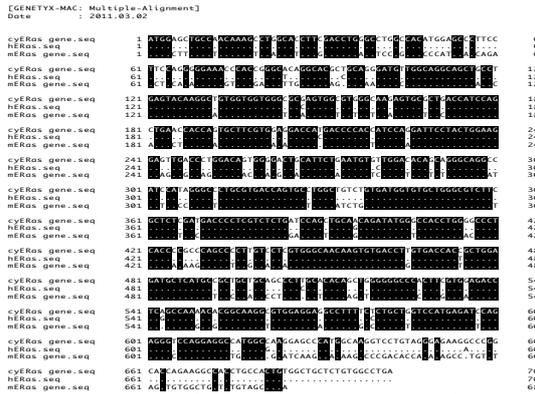
ERas遺伝子は、マウスES細胞では発現が認められるが、ヒトでは発現しない事が知られている。初めに、カニクイザルES細胞における発現を検討した。その結果、カニクイザルES細胞では、マウスES細胞より発現量は少ないが、発現している事がわかった。(fig.1)



<fig.1:ヒト・カニクイザル・マウスES細胞におけるERas遺伝子の発現比較(RT-PCR)>

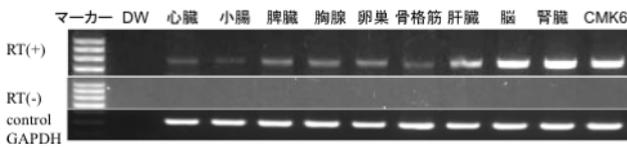
このカニクイザルES細胞から、カニクイザルERas遺伝子をクローニングし、遺伝子配列を比較した結果、マウスよりも、ヒトERas

の遺伝子配列に近いものである事がわかった。(fig.2)



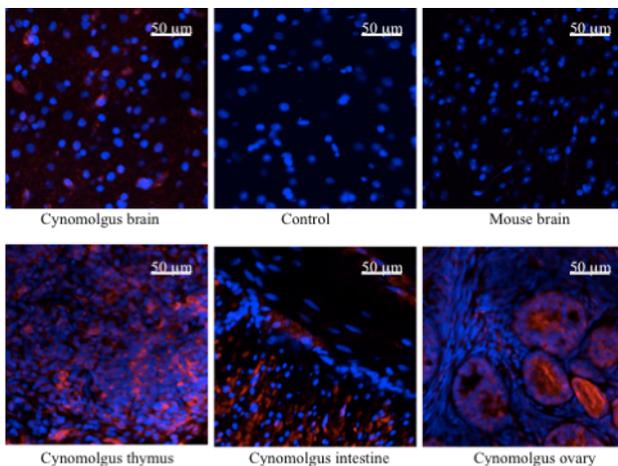
<fig.2: カニクイザル・ヒト・マウスERas遺伝子配列の比較>

次に、マウスERasは、未分化ES細胞にのみ発現が認められ、分化した細胞・組織には、発現しない事が知られている。また、ヒトにおいては、ESのみならず、体細胞にも発現しないが、ヒトの胃がん細胞では発現している報告がある。そこで、ERasカニクイザルの体組織における、ERasの発現を調べた。その結果、カニクイザルの体細胞では発現が認められた。(fig.3)



<fig.3: カニクイザルにおけるERas遺伝子発現 (RT-PCR) >

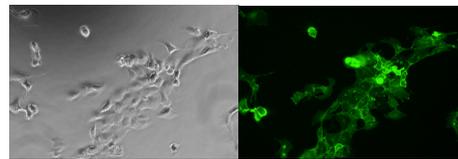
カニクイザルにおけるERasタンパク発現を免疫染色にて検討した結果、ERasタンパクは、各組織に発現していることがわかった。(fig.4)



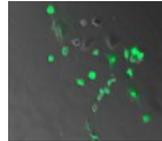
<fig.4: カニクイザル体組織中のERas発現(赤色)>

さらに、カニクイザルES細胞由来の奇形種において、サルERasの発現を検討した。奇形種は、NOGマウスにカニクイザル未分化ES細胞を接種して作製した。カニクイザルES細胞と、その細胞由来の奇形種由来のERasのmRNAの発現を比較したところ、奇形種の発現は、ES細胞の5倍の結果であった。

次に、サル・マウスERas遺伝子の機能について検討した。ERas遺伝子の機能は、細胞増殖の亢進と増腫瘍性が知られている。そこで、カニクイザルストローマ細胞に、サルおよびマウスERas-GFP遺伝子を強制発現させた細胞株を作製した。これらの細胞株を、FACSの調べた処、遺伝子発現効率は、93%-97%であった。また、ERas遺伝子は、細胞膜裏打ちタンパクであり、ERas強制発現サルストローマ細胞には、膜への局在が認められた。(fig5)

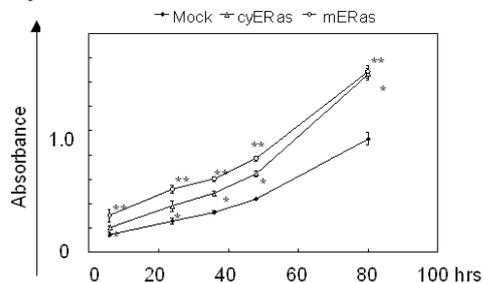


(下図control: GFPvectorのみ)



<fig5: サルERas遺伝子発現サルストローマ細胞内におけるERas遺伝子 (GFP) の細胞膜への局在を示した。下図は、GFP遺伝子のみを発現させた場合で細胞全体に発現している。>

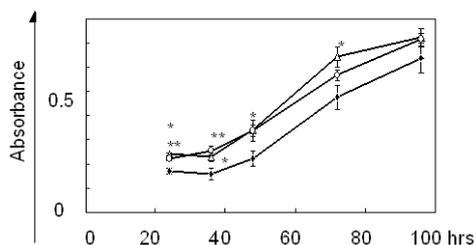
さらに、ERas遺伝子強制発現サルストローマ細胞の増殖機能をMTTアッセイにて調べた。



<fig.6: カニクイザルStroma細胞に、カニクイザルまたは、マウスERas遺伝子を強制発現させ、時間(横軸)経過とともに、細胞増殖能を調べた。>

この結果より、ERas遺伝子強制発現Stroma細胞は、細胞増殖能が亢進している様な結果が得られた。次に、単一細胞継代後の接着細胞数を合わせて再測定を行った。(fig.7)。結果、細胞増殖曲線の傾きはほぼ一致

しており、fig. 6で見られた細胞増殖は、継代直後の細胞接着数の違いによる事がわかった。



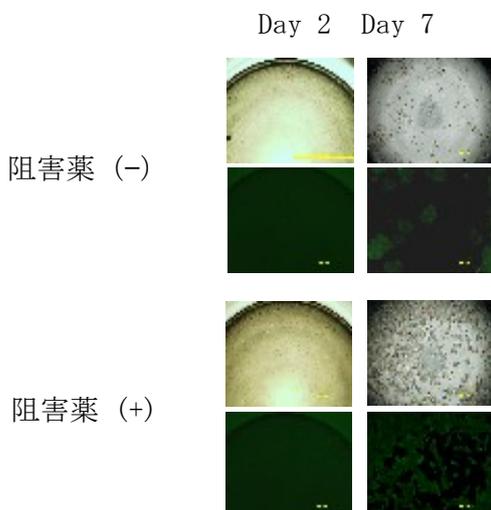
<fig. 7: fig. 6のDATAから、単一継代培養後に接着した細胞数を同一にしたDATA。細胞の増殖曲線は、全て同じ傾きをしめしている。>

以上の事から、ERas 遺伝子は、カニクイザルにおいて、ES 細胞および体細胞に発現している事を発見した。さらに、サル ERas 遺伝子は、細胞増殖亢進および増腫瘍性にはあまり関与しない事が示唆された。さらに、Fig. 6 と 7 より、ERas 遺伝子の機能は、細胞増殖亢進というより、継代後の細胞接着を促進している結果が得られた。

次に、ヒト ES/iPS 細胞も、単一細胞継代時に細胞の殆どがアポトーシスを起こして死滅する事が知られている。近年、ROCK 阻害薬を作用させる事により、継代時のアポトーシスを抑制できる事が報告された (Watanabe et al. Nature Biotech 2007; 25: 681) しかし、詳細な作用機序は、まだ不明な点が多い。

そこで、我々の発見した ERas 遺伝子の新たな機能 (細胞接着能亢進) が、ROCK 阻害薬の機能と関わりがある可能性を考えた。

まず、同じ霊長類であるカニクイザル ES 細胞でも、ROCK 阻害薬を作用させるとヒトと同様の現象が得られるかを検討した。(fig. 8)



<fig. 8: カニクイザル ES 細胞を単一細胞継代時に、添加した ROCK 阻害薬の効果を検討した。継代後 2 日目と 7 日目。>

この結果から、カニクイザル ES 細胞においても、ヒト ES 細胞と同様、ROCK 阻害薬の添加により、継代後の細胞数が増加していた。

さらに、カニクイザル ES 細胞の継代時、ROCK 阻害薬を添加した場合は、細胞数・コロニー数共に、優位にコロニー数・細胞数とも増加していた。(論文作成中の為、DATA なし)

次に、ERas 欠損マウス ES 細胞株 (ERas (-)) に、ROCK 阻害薬を作用させた。ERas 欠損マウス ES 細胞株の細胞増殖能は、野生株 (マウス ES 細胞: ERas (+)) の約 35%-60%であったが、ROCK 阻害薬を作用させると、野生株とほぼ同等の細胞増殖能にまで回復した (論文作成中の為、DATA なし)。

さらに、ERas 欠損マウス ES 細胞株 (ERas (-)) と野生株 (ERas (+)) の単一継代培養時の細胞接着数を継代 12 時間後に比較した。結果、親株と比較し、細胞接着している細胞割合が優位に低下していた。

しかし、ERas 欠損マウス ES 細胞株 (ERas (-)) に ROCK 阻害薬を作用させた場合には、野生株 (ERas (+)) と同等近くまで回復していた (論文作成中の為、DATA なし)。

これらの結果により、ERas 遺伝子は、ROCK 経路によるアポトーシスの調整に関与している事がわかった。さらに、詳細に検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Tanaka Y, Masuda S, Abe T, Hayashi S, Kitano Y, Nagao Y, Hanazono Y.

Intravascular route is not superior to an intraperitoneal route for in utero transplantation of human hematopoietic stem cells and engraftment in sheep.

Transplantation. 2010 Aug 27;90(4):462-3. (査読有り)

2. Abe T, Masuda S, Ban H, Hayashi S, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, Nagao Y, Hanazono Y. Ex vivo expansion of human HSCs with Sendai virus vector expressing HoxB4 assessed by sheep in utero transplantation. Exp Hematol. 2011 Jan;39(1):47-54.

3. Masuda S, Hayashi S, Ageyama N, Shibata H, Abe T, Nagao Y, Hanazono Y.

Migration of cells from the yolk sac to hematopoietic tissues after in utero

transplantation of early and mid gestation canine fetuses.

Transplantation. 2011 Jul 27 ;92(2):e5-6

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 池田たま子
実験動物技術者協会奥羽支部勉強会 特別講演 2013.4 秋田市
「再生医学:iPS細胞と実験動物における最近の知見」
2. 池田たま子, 松田幸久
第38回 国立大学実験動物施設協議会全国大会 サテライト シンポジウム 2012.5 秋田市「秋田大学におけるSPF動物の飼育状況と検疫・微生物モニタリングの現状」
3. 長縄明大, 小松和, 池田たま子, 松田幸久, 岡潔
第15回 日本消化器病学会 2013.11 出雲
「実験動物に対する消化管運動バルーン計測法の検討」
4. 小畑孝弘, 柴田淑子, 川越政美, 二部恒美, 池田勝久, 佐藤政義, 戸井田和実, 助川康子, 池田たま子, 松田幸久
実験動物技術者協会 第47回総会 in 晴れの国 岡山 2013.9 岡山市
「緑膿菌等の細菌を用いた微酸性水の殺菌・消毒効果の検証」
5. 川越政美, 小畑孝弘, 戸井田和実, 九島秀美, 柴田淑子, 池田勝久, 佐藤政義, 二部恒美, 池田たま子, 松田幸久
日本実験動物技術者協会 平成24年度奥羽・東北支部合同勉強会, 2012.11 盛岡
「セリウスソフト水の長期摂取がB6マウスの繁殖等に及ぼす影響について」
6. 助川康子, 二部恒美, 川越政美, 柴田淑子, 池田勝久, 佐藤政義, 小畑孝弘, 戸井田和実, 鈴木美帆子, 九島秀美, 津谷優子, 池田たま子, 松田幸久
日本実験動物技術者協会 平成24年度奥羽・東北支部合同勉強会, 2012.11 盛岡市
「秋田大学動物実験部門での蠕虫感染についての事例」
7. 戸井田 和実, 池田 たま子, 二部恒美, 鈴木美帆子, 佐藤正義, 小畑孝弘, 九島秀美, 川越政美, 助川康子, 池田勝久, 柴田淑子, 津谷優子, 松田幸久
平成23年 日本実験動物技術者協会 奥羽・東北支部合同勉強会 2011.11
「秋田大学におけるSPFマウス飼育エリア(A)の飼育環境改善の取組みと工夫」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田たま子 (Ikeda Tamako)
秋田大学
学内共同利用施設等
助教
研究者番号: 10406035

(3) 連携研究者

花園豊 (Hanazono Yutaka)

自治医科大学

医学部

教授

研究者番号: 70251246